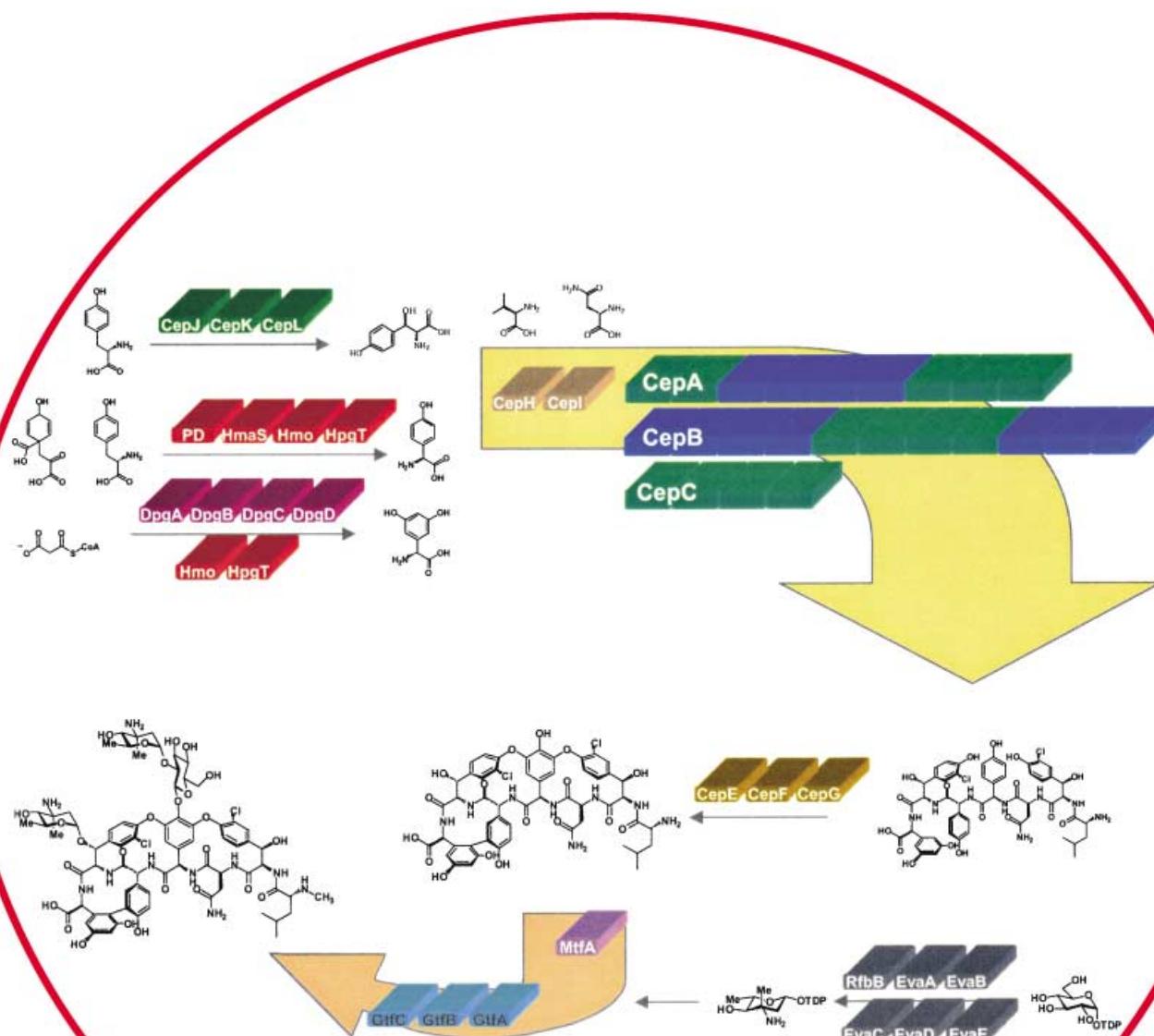


# Der Aufbau von Vancomycin: so macht es die Natur

Brian K. Hubbard\* und Christopher T. Walsh\*

Stichwörter:

Antibiotika · Biosynthese · Glycopeptide · Naturstoffe



**A**ntibiotika sind wertvolle Therapeutika im Kampf gegen Infektionen, die durch pathogene Bakterien verursacht werden. Vancomycin ist eine der letzten wirksamen „Waffen“ bei lebensbedrohlichen Infektionen durch Gram-positive Bakterien. Die Regeln, nach denen die Natur die Glycopeptid- (Vancomycin) und Lipoglycopeptid-Antibiotika (Teicoplanin) aufbaut, werden zunehmend geklärt und abgesichert: Zuerst werden Aminosäuren synthetisiert, diese anschließend zusammengebaut und vernetzt. Damit öffnen sich Möglichkeiten, die Synthesestrategien umzuprogrammieren auf der Ebene veränderter Monomere, durch Verschiebungen beim Peptidaufbau und durch verschiedene Enzyme zur Nachbearbeitung des Aglycons.

## 1. Einleitung

Antibiotika sind wertvolle Therapeutika beim Kampf gegen Infektionen, die durch pathogene Bakterien verursacht werden. Vancomycin, mit dem sich dieser Aufsatz befasst, ist eine der letzten wirksamen „Waffen“ bei lebensgefährlichen Infektionen durch Gram-positive Bakterien. In Tabelle 1 sind einige Gram-positive und Gram-negative pathogene Bakterien und die von ihnen verursachten Syndrome und Krankheitsbilder zusammengestellt.<sup>[1]</sup> Dazu gehören verschiedene Bakterien, die auf unterschiedlichen Wegen Durchfallerkrankungen auslösen, wie *Chlostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und das Bakterium *Vibrio cholerae*, das die massive wässrige Diarrhöe auslöst, die zum Krankheitsbild der lebensgefährlichen Cholera gehört. Außer dem Choleraerreger gibt es noch zwei weitere pathogene Stämme, die in der langen Geschichte der Gefährdung menschlicher Gesundheit als Auslöser von Pest und Tuberkulose eine wichtige Rolle gespielt haben, nämlich *Yersinia pestis* und *Mycobacterium tuberculosis*.

Viele Patienten, die sich einem chirurgischen Eingriff unterziehen mussten, werden prophylaktisch mit Antibiotika behandelt, um dem Entstehen bakterieller Infektionen in der Operationswunde vorzubeugen: Staphylococci und Enterococci sind die Bakterien, die in US-amerikanischen Krankenhäusern am häufigsten postoperative Infektionen hervorrufen. Bakterien unterscheiden sich erheblich in ihrer Virulenz und Pathogenität:<sup>[2]</sup> *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* können hochvirulent sein und wurden als obligate Pathogene beschrieben, während *Enterococcus faecalis* und *Pseudomonas aeruginosa* oft als opportunistische Pathogene charakterisiert wurden, die dann in Erscheinung treten, wenn andere Bakterien abgetötet wurden und die Abwehr des Wirts geschwächt ist, z. B. bei immunsuppressiver Therapie.<sup>[3]</sup>

Wie später noch näher ausgeführt wird, sind all diesen bakteriellen Pathogenen Angriffspunkte gemeinsam, die von den meisten Klassen antibakterieller Wirkstoffe genutzt werden. Antibiotika, die hauptsächlich als Therapeutika in der Humanmedizin verwendet werden, lassen sich in zwei Kategorien einteilen, in Naturstoffe und ihre Derivate sowie in rein synthetische Substanzen. Zu den gebräuchlichen

## Aus dem Inhalt

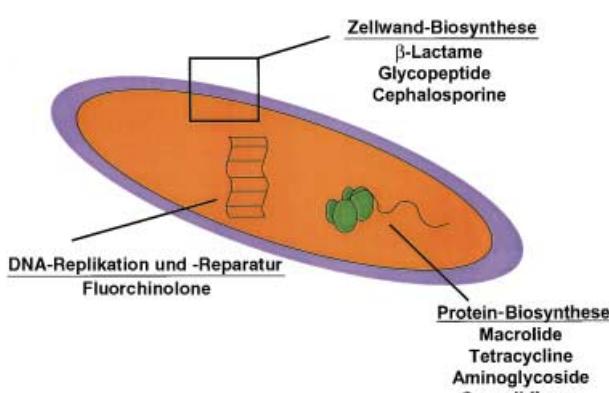
1. Einleitung	753
2. Angriffspunkte antibakterieller Wirkstoffe	754
3. Resistenzentwicklung	755
4. Wirkmechanismus	756
5. Selbstschutz in Organismen	758
6. Die molekulare Grundlage der VanA-, VanB- und VanC-Phänotypen	759
7. Synthesestrategien	761
8. Gencluster für die Biosynthese	762
9. Enzymatische Bildung der nichtproteinogenen Aminosäuren	766
10. Der Peptidsynthetase-Multienzymkomplex	772
11. Nachbearbeitung des Heptapeptides	775
12. Glycosylierung durch Thymidindiphospho-Zucker-Donoren	776
13. Glycosylierung durch Peptid-Antibiotika-Glycosyltransferasen	781
14. Ansätze zur Behandlung vancomycinresistenter Bakterien	782
15. Schlussfolgerungen	785

synthetischen Antibiotika zählen drei unterschiedliche Substanzklassen: die beiden Komponenten von Bactrim, Sulfoxmethoxazol und Trimethoprim, die zwei Enzymschritte bei der bakteriellen Biosynthese von Folsäure-Coenzymen hemmen;<sup>[4]</sup> die Fluorchinolon-Antibiotika, die die DNA-Topoisomerasen hemmen;<sup>[5]</sup> und das Oxazolidinon Linezolid, das die Proteinsynthese beeinflusst.<sup>[6]</sup> Alle übrigen gebräuchlichen Antibiotika-Typen,  $\beta$ -Lactame, Glycopeptide, Makrolide, Tetracycline und Aminoglycoside, sind Naturstoffe oder halbsynthetische Naturstoffderivate.

[\*] B. K. Hubbard, C. T. Walsh  
Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology  
Harvard Medical School  
Boston, MA 02115 (USA)  
Fax: (+1) 617-432-0438  
E-mail: bhubbard@mpi.com  
christopher\_walsh@hms.harvard.edu

**Tabelle 1:** Pathogene Bakterien und Krankheiten, die sie hervorrufen.

Bakterium	Gram-positive Erreger	Bakterium	Gram-negative Erreger
	Infektion		Infektion
<i>Staphylococcus</i>	Postoperative Infektionen	<i>Escherichia coli</i>	Harnwegsinfektionen, Diarrhoe
<i>Streptococcus</i>	Lungenentzündung	<i>Salmonella typhimurium</i>	Diarrhoe
<i>Mycobacterium</i>	Tuberkulose	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	opportunistisches Pathogen bei Mukoviszidose
<i>Enterococcus</i>	Postoperative Infektionen	<i>Vibrio cholerae</i>	Cholera
<i>Clostridium difficile</i>	Diarrhoe	<i>Yersinia pestis</i>	Pest



**Abbildung 1.** Bakterienzelle mit Angriffspunkten für Antibiotika.

## 2. Angriffspunkte antibakterieller Wirkstoffe

Abgesehen von dem Kombinationspräparat Bactrim, das aus zwei Hemmstoffen der Folsäurebiosynthese besteht, richten sich nahezu alle größeren Klassen von Antibiotika gegen drei primäre Stoffwechselprozesse pathogener Bakterien: die Zellwandbiosynthese, die Proteinbiosynthese und die Replikation und Reparatur der DNA (Abbildung 1).<sup>[7,8]</sup> Zu den Antibiotika gegen die Zellwandbiosynthese gehören die β-Lactame, also Penicilline und Cephalosporine, ebenso wie die Glycopeptid-Antibiotika, von denen die beiden Substanzen Vancomycin und Teicoplanin für die klinische

Anwendung am Menschen zugelassen sind (Tabelle 2). Bei der Proteinbiosynthese an bakteriellen Ribosomen gibt es zahlreiche Schritte, bei denen Antibiotika ihre Wirkung entfalten können, und vier Antibiotika-Klassen, die Makrolide, Tetracycline, Aminoglycoside und Oxazolidinone, hemmen diese Synthese. Die erfolgte Strukturaufklärung der 30S- und 50S-Untereinheiten bakterieller Ribosomen auf atomarer Ebene wird sehr zur Vertiefung des mechanistischen Verständnisses und zum Design von Antibiotika beitragen, die an spezifischen Stellen der 16S- und 23S-rRNA der Ribosomen angreifen.<sup>[9–11]</sup> Die einzige gegenwärtig gebräuchliche Antibiotika-Klasse, die die Replikation und Reparatur der DNA inhibiert, ist die der Fluorchinolone, die die DNA-Gyrase und eine verwandte Topoisomerase, Topo IV, hemmen.<sup>[12,13]</sup>

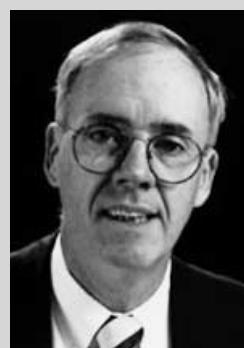
### 2.1. Zielstrukturen für β-Lactame und Glycopeptid-Antibiotika

Da sich dieser Aufsatz auf die Wirkung von Vancomycin und Teicoplanin als Inhibitoren der Peptidoglycan-Vernetzung in der bakteriellen Zellwand konzentriert, wird hier nur kurz auf das Vorkommen und die Funktion des Peptidoglycans in Stoffwechsel und Physiologie der Bakterienzelle eingegangen. Wie in Abbildung 2 zu sehen, haben sowohl Gram-negative Bakterien (*E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*) als auch Gram-positive Bakterien (*Staph. aureus*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*) eine Peptidoglycanschicht außerhalb der Cytoplasmamembran. Gram-negative Bakterien haben außerdem eine geschlossene äußere Membran, die eine Permeabilitätsbarriere für Substanzen wie Vancomycin ist. Daher können Vancomycin und Teicoplanin nicht bis zur Peptidoglycan(PG)-schicht vordringen, wirken also nicht gegen Gram-negative, sondern nur gegen Gram-positive Bakterien.

Die PG-Schicht, deren Glycanstränge kovalent durch Peptidbrücken vernetzt sind (Abbildung 3a) und die so die notwendige mechanische Stabilität erhält, schützt die Bakte-



Brian K. Hubbard, geboren 1972, absolvierte sein Chemiestudium am College of William and Mary und promovierte bei John A. Gerlt an der University of Illinois, Urbana-Champaign. Bis im Jahr 2001 arbeitete er als Postdoc bei Christopher T. Walsh und wechselte anschließend zu Millenium Pharmaceuticals Inc. in Cambridge, MA. Sein Forschungsinteresse gilt Enzymmechanismen und neuen Enzymklassen. Ein Schwerpunkt ist die Rolle von Enzymen als Zielmoleküle von Wirkstoffen zur Behandlung von Stoffwechselkrankungen.



Christopher T. Walsh wurde 1944 geboren, studierte Biologie an der Harvard University und promovierte in Biochemie im Labor von Fritz Lipmann am Rockefeller Institute of Medical Research. 15 Jahre, von 1972–1987, arbeitete er in der Chemischen Fakultät des MITs und ist seit 1987 an der Harvard Medical School. Er leitete das Department für Biologie, Chemie und Molekulare Pharmakologie der Harvard Medical School von 1987–1995. Sein Forschungsinteresse gilt enzymatischen Reaktionsmechanismen, dem Mechanismus von Inhibitoren und der nichtribosomalen Biosynthese von Peptid-Antibiotika.

Tabelle 2: Antibiotika-Zielstrukturen und Resistenzmechanismen.

Antibiotikum	Zielstrukturen	Resistenzmechanismus
<b>Zellwand</b>		
$\beta$ -Lactame	Transpeptidase/ Transglycosylasen (PBPs)	$\beta$ -Lactamasen, PBP-Mutanten
Vancomycin	D-Ala-D-Ala-Termi von Peptidoglycan und Lipid II	Umprogrammierung von D-Ala-D-Ala zu D-Ala-D-Lac oder D-Ala-D-Ser
Teicoplanin	D-Ala-D-Ala-Termi von Peptidoglycan und Lipid II	Umprogrammierung von D-Ala-D-Ala zu D-Ala-D-Lac oder D-Ala-D-Ser
<b>Proteinsynthese</b>		
Erythromycine	Peptidyltransferase/ Ribosomen	rRNA-Methylierung/Export
Tetracycline	Peptidyltransferase	Wirkstoffexport
Aminoglycoside	Peptidyltransferase	Wirkstoffmodifizierung
Oxazolidinone	Peptidyltransferase	unbekannt
<b>DNA-Replikation/Reparatur</b>		
Fluorochinolone	DNA-Gyrase	Gyrase-Mutationen

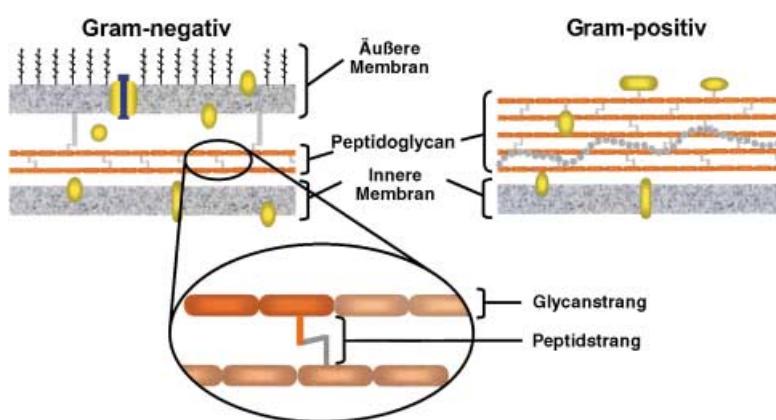


Abbildung 2. Aufbau der Zellwand von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien.

rienzelle bei Änderungen des osmotischen Drucks, durch die die Zellen sonst zerrissen würden. Die meisten Querverbindungen werden durch Transpeptidasen eingeführt, die den Angriff der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin an Position 3 einer Peptidkette auf die Carbonylgruppe von D-Ala<sub>4</sub> in einer benachbarten Kette katalysieren. Gleichzeitig zur Bildung dieser Lys-D-Ala-Isopeptidverknüpfung wird eine D-Ala<sub>4</sub>-D-Ala<sub>5</sub>-Bindung gespalten, sodass netto eine Transpeptidierung erfolgt. Es gibt die unterschiedlichsten Transpeptidasen, und viele sind Zielenzyme für  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, die die N-Acyl-D-Ala-D-Ala-Peptidsubstrate nachahmen.<sup>[14,15]</sup> Die Transpeptidase leitet einen katalytischen Zyklus mit einem Penicillinmolekül ein, indem sie das  $\beta$ -Lactam angreift und ein Acyl-Enzym-Analogon bildet, das stabiler ist als das normale PG-D-Ala<sub>4</sub>-Enzym.<sup>[16,17]</sup> Die langsam hydrolysierenden Penicilloyl-Enzym-Intermediate inaktivieren die Transpeptidasen wirkungsvoll, indem sie ihr aktives Zentrum besetzen und damit die Einführung der PG-Isopeptid-Verknüpfung blockieren und so die mechanische Belastbarkeit des PG-Netzes vermindern (Abbildung 3b).

### 3. Resistenzentwicklung

Wird ein Antibiotikum eingeführt und häufig bei Menschen eingesetzt, wird dadurch unweigerlich auf resistente Bakterienstämme selektiert; dies verringert die Wirksamkeit des Mittels und macht eine erneute Antibiotika-Suche, -Entwicklung und -Synthese nötig. Die Resistenzentwicklung wird durch zwei Eigenschaften bakterieller Populationen ausgelöst: die große Zahl an Bakterien, die an einer Infektion beteiligt sind, und ihre Mutationshäufigkeit. Bei einer massiven Infektion in Tier oder Mensch können Keimzahlen von  $10^9$ – $10^{10}$  Bakterien erreicht werden. Spontane Mutationen treten typischerweise bei etwa einer Zelle pro  $10^7$  Wildtypzellen auf. Bei einer solchen Häufigkeit sind demnach etwa tausend Mutanten in einer Population von  $10^{10}$  Zellen vorhanden. Wenn diese Mutationen zufällig entstanden sind, sollten sie gleichmäßig verteilt sein, also etwa eine Mutation pro Gen bei etwa tausend Genen im bakteriellen Genom. Werden die Bakterien nun einem Antibiotikum ausgesetzt, werden die meisten sterben. Wenn allerdings eine oder mehrere Mutationen in einem bestimmten Gen das Genprodukt

Es gibt eine zweite Variante, die Vernetzung der PG-Schicht zu verhindern. Hierbei werden die Pentapeptidstränge des noch nicht verknüpften Transpeptidase-Substrats komplexiert und so der enzymatischen Vernetzung entzogen. Nach diesem Mechanismus wirken die Glycopeptid-Antibiotika.<sup>[18,19]</sup> Vancomycin bindet an freie PG-Termi mit dem N-Acyl-D-Ala-D-Ala-Ende als hochaffine Bindestelle. Williams et. al. klärten den Mechanismus der Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und Angriffsstelle und identifizierten fünf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Oberfläche von Vancomycin und dem N-Acyl-D-Ala-D-Ala-PG-Terminus (Abbildung 4a).<sup>[20,21]</sup> Die unvernetzten Peptidoglykanketten sind sowohl in die Mureinschicht eingebaut als auch an den C<sub>55</sub>-Undecaprenol-PP-Carrier (Lipid II) an der Außenseite der Cytoplasmamembran gebunden (Abbildung 4b) – an beiden greifen Vancomycin und Teicoplanin vermutlich an.<sup>[22,23]</sup> Penicilline und Vancomycine blockieren zusammen den gleichen Schritt bei der Vernetzung des Peptidoglycans: die einen inaktivieren das Enzym, die anderen ziehen das Substrat aus dem Verkehr.

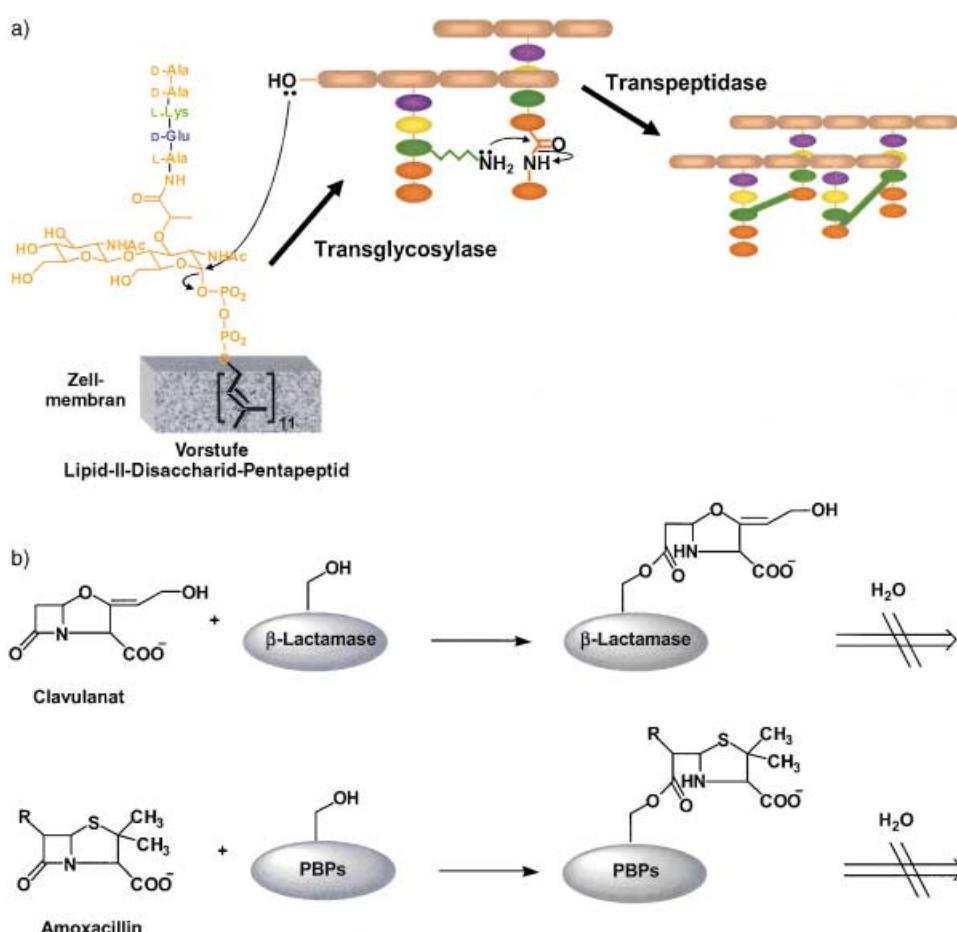


Abbildung 3. a) Peptidoglycan-Biosynthese. b) Wirkmechanismus von Penicillinen.

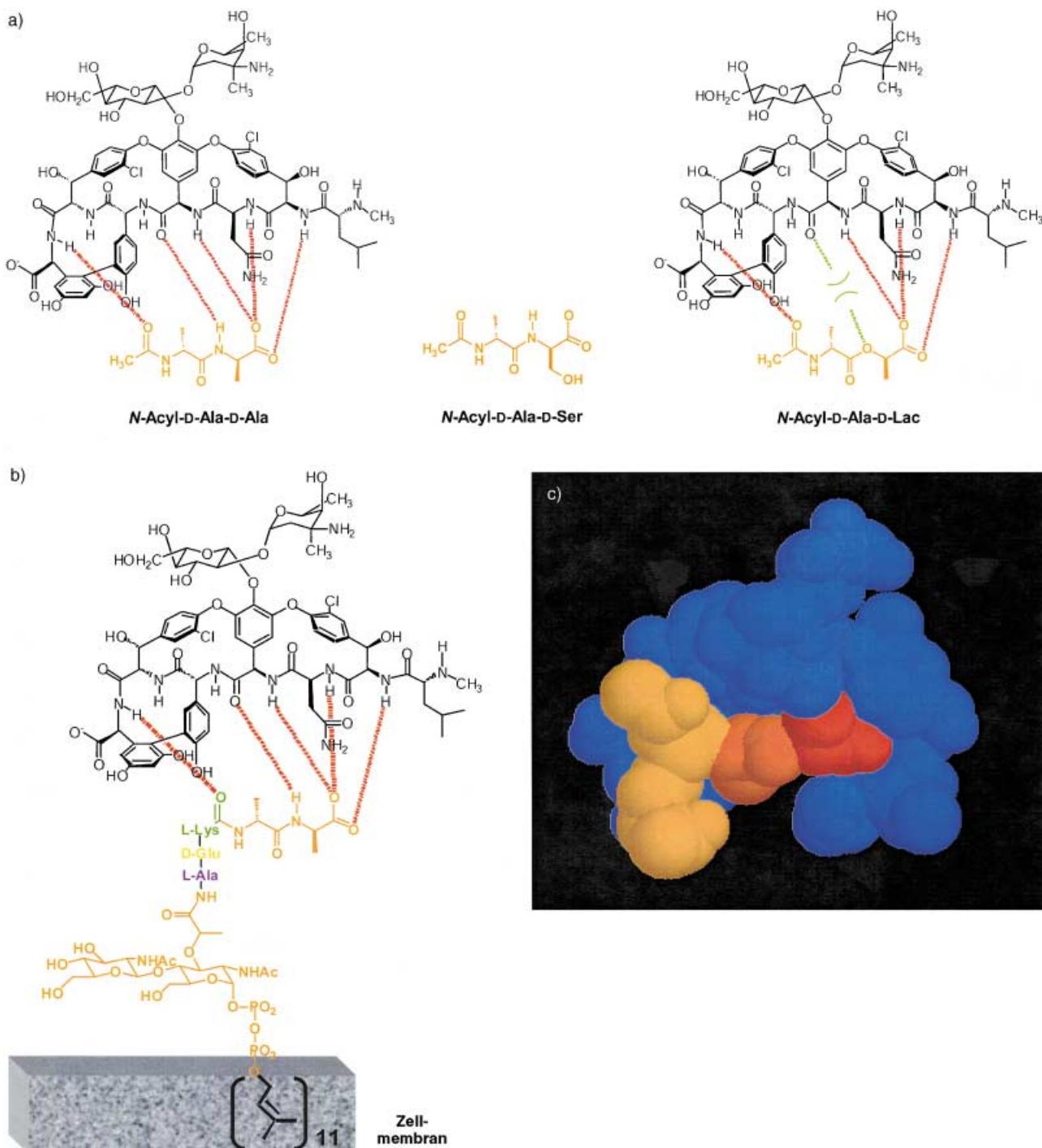
dukt so verändert, dass es Resistenz verleiht, wird daraus ein Selektionsvorteil für die Mutante erwachsen; sie wird überleben, den Lebensraum ausfüllen, der von den sterbenden (sensitiven) Nachbarn freigemacht wurde, und die Population dominieren. Das Auftreten von Resistzenzen ist eine Frage des „wann“, nicht des „ob“, und das beinahe unabhängig von Struktur und Typ des Antibiotikums. Die Resistenz kann durch die Mutation eines einzelnen Gens hervorgerufen werden; in anderen Fällen müssen mehrere Mutationen zusammenkommen, bevor ein signifikanter Wachstumsvorteil und eine Resistenz entstehen. In Abschnitt 5 ist beschrieben, dass erst eine Änderung des Peptidoglycan-Biosynthesewegs durch fünf Genmutationen zu einer signifikanten Resistenz gegen Vancomycin in Enterococcus-Klinikisolaten führte.

#### 4. Wirkmechanismus der Glycopeptid-Antibiotika

Das Hauptaugenmerk dieses Aufsatzes liegt auf der Familie der Glycopeptid-Antibiotika; diese Naturstoffe werden von der Bakterienordnung der Actinomycetes gebildet. Nach der Entdeckung von Vancomycin in einer Erdprobe, die in den 50er Jahren des vorigen Jahrhunderts in Borneo

entnommen wurde, wurden Dutzende verwandter Glycopeptid-Antibiotika aus Bodenbakterien von *Amycolaptotis*- und *Streptomyces*-Stämmen isoliert.<sup>[24]</sup> Vertreter der beiden wichtigsten Untergruppen sind die Antibiotika Vancomycin und Teicoplanin (Schema 1), die eine Heptapeptideinheit als zentrales Strukturelement haben; die Arylseitenketten der Aminosäurereste an dieser Heptapeptideinheit sind stark vernetzt, sodass dem Peptidgerüst eine starre kuppfelförmige Gestalt aufgezwungen wird. Das Peptidgerüst hat in beiden Verbindungen die Konfiguration D-D-L-D-D-L-L. Es wird von einem nichtribosomalen Peptidsynthetase-Komplex gebildet, was als entscheidend für eine Konformation angesehen wird, die eine Cyclisierung der Seitenketten ermöglicht. Vancomycin trägt nichtproteinogene Aminosäuren als Reste in den Positionen 4 und 5 (4-Hydroxyphenylglycin, Hpg) sowie in Position 7 (3,5-Dihydroxyphenylglycin, Dpg); Teicoplanin enthält zusätzlich in Position 1 Hpg und in Position 3 Dpg. Vancomycin hat drei oxidativ geknüpfte Querverbindungen zwischen den Arylseitenketten 2–4, 4–6 und 5–7, während Teicoplanin zwischen den zusätzlichen Arylseitenketten an Position 1 und 3 eine weitere Brücke trägt, sodass alle Seitenketten miteinander verbunden sind.

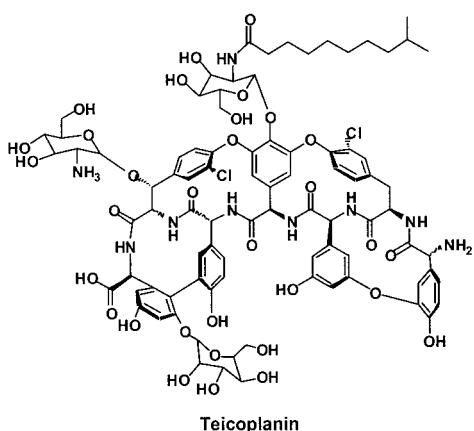
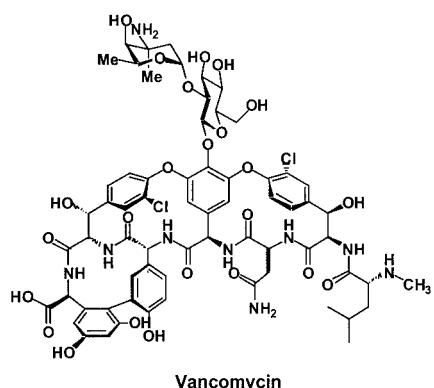
Dazu kommt die Saccharid-Komponente der Glycopeptid-Antibiotika. Bei Vancomycin ist an das phenolische



**Abbildung 4.** a) Wasserstoffbrückenbindungen bei der Wechselwirkung von Vancomycin mit *N*-Acyl-D-Ala-D-Ala, *N*-Acyl-D-Ala-D-Lac und *N*-Acyl-D-Ala-D-Ser. b) Wasserstoffbrückenbindungen bei der Wechselwirkung von Vancomycin mit dem Zellwand-Zwischenprodukt. c) Raumfüllendes Modell von Vancomycin, gebunden an  $N_{2,6}$ -Bis(acyl)-L-Lys-D-Ala-D-Ala. Vancomycin ist blau, das Peptid orange und rot dargestellt.

Sauerstoffatom von 4-Hydroxy-PheGly in Position 4 ein Disaccharid gebunden, während bei Teicoplanin Zuckerreste an den Positionen 4, 6 und 7 hängen. Das Disaccharid in Vancomycin ist ein Vancosaminyl-1,2-Glucosylrest; L-Vancosamin selbst ist eine 2,3,6-Tridesoxy-3-amino-3-methyl-L-hexose, die von der produzierenden Zelle ausschließlich für dieses Antibiotikum hergestellt wird. In Vancomycinanaloga finden sich Zucker, die mit Vancosamin verwandt sind,

darunter 4-Oxo-L-Vancosamin in Balhimycin und 4-Epi-L-Vancosamin in Chloreremomycin (Schema 2). In Chloreremomycin befindet sich ein zweites L-Epivancosamin am  $\beta$ -Hydroxy-Substituenten von  $\beta$ -OH-Tyr in Position 6. Weitere Zuckersubstituenten von Mitgliedern der Vancomycinfamilie sind wurden von Nicolaou et al. beschrieben<sup>[25]</sup> oder sind in Abschnitt 12, Tabelle 8 aufgelistet. In Teicoplanin befindet sich ein *N*-Acyl-D-Glucosamin an den Resten 4 und 6, an die



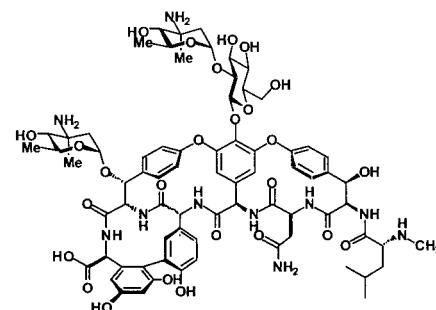
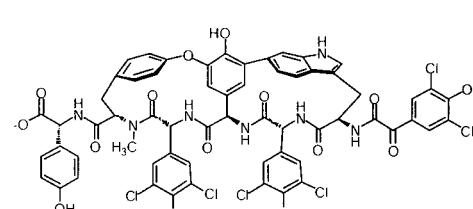
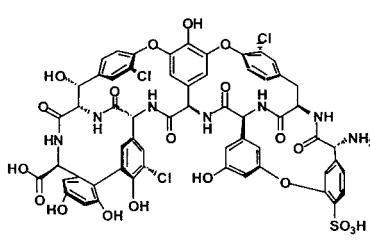
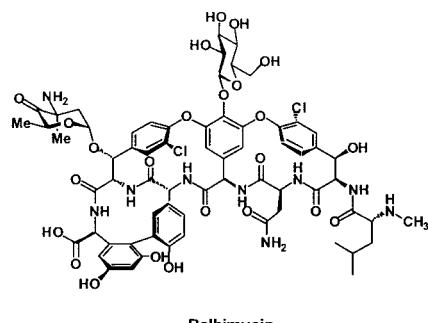
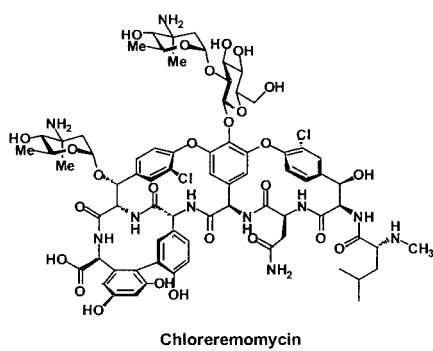
**Schema 1.** Strukturformeln von Vancomycin und Teicoplanin.

D-Glucose am Aminosäurerest 4 ist ein langkettiger Acylrest angeheftet, am Rest 6 findet sich zusätzlich die weit verbreitete *N*-Acetylglucosamine, und zudem ist ein Mannoserest an die Aminosäure 7 gebunden. In der Teicoplanin-Familie gibt es auch Verbindungen ohne Zuckerreste wie A47934 aus *Streptomyces toyocaensis* mit einer Sulfatgruppe an Rest 3 (Schema 2).

Vancomycin, Teicoplanin und andere Glycopeptid-Antibiotika mit dem versteiften, vernetzten Heptapeptidgerüst erkennen das *N*-Acyl-D-Ala<sub>4</sub>-D-Ala<sub>5</sub>-terminale D,D-Dipeptid in unverknüpften PG-Strängen sowie in Lipid-II-Molekülen und bilden hochaffine Komplexe über fünf Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 4 a) zwischen der Unterseite des Glycopeptids und den Amid- und Carbonylgruppen des PG-Endes (Abbildung 4 a). Im raumfüllenden Modell erkennt man, dass die komplementären Oberflächen eine passgenaue Zusammenlagerung des Antibiotikums mit dem Liganden *N*<sub>2,6</sub>-Bis(acyl)-L-Lys-D-Ala-D-Ala ermöglichen. Ein solches Modell ist in Abbildung 4 c gezeigt, in dem die Methyl-Seitenkette von D-Ala<sub>5</sub> eng in den Hohlraum des Antibiotikums gepackt ist. Die D-Ala<sub>4</sub>-D-Ala<sub>5</sub>-Amidbindung ist in dem Komplex mit dem Glycopeptid abgeschirmt und damit von der Erkennung durch die vernetzenden Transpeptidasen ausgeschlossen.

## 5. Selbstschutz in Glycopeptid produzierenden Organismen

Die meisten Bakterien, die Antibiotika produzieren, haben Strategien zum Selbstschutz und zur Immunität gegen die Wirkung dieser chemischen Waffen entwickelt. Die



**Schema 2.** Strukturformeln von Chloreremomycin, Balhimycin, A47934, Complestatin und Orienticin C.

Biosynthesegene nichtribosomal synthetisierter Peptid- und Polyketid-Antibiotika sind oft mit den Immunität vermittelnden Genen „geclustert“ (Abschnitt 7). Dieses gemeinsame Vorkommen von Antibiotika-Produktions- und -Resistenzgenen ermöglicht eine koordinierte Regulation. Wenn die Biosynthesegene für die Antibiotika aktiviert werden, werden gleichzeitig auch die Resistenzgene aktiviert. Daher wurde vermutet, dass Produktions- und Resistenzgene sich gemeinsam entwickelt haben.<sup>[26]</sup> Zu den typischen Resistenzgen-Produkten gehören Transmembranproteine, die als Pumppen dienen: Sie pumpen die entstehenden Antibiotika-Moleküle aus der Zelle und halten somit die intrazelluläre Konzentration in den produzierenden Bakterien unterhalb eines kritischen Schwellenwertes.<sup>[27,28]</sup> Solche Antibiotika-Pumpen findet man auch in den Biosyntheseclustern der Glycopeptid-Antibiotika.

Ein spezifischerer Schutzmechanismus wurde inzwischen bei den Produzentenstämmen von A47934, *Streptomyces toyocaensis*, und Teicoplanin, *Actinoplanes teicomycteticus*, gefunden;<sup>[29,30]</sup> möglicherweise liegt hier auch die Quelle der Resistenzgene von pathogenen Enterococcen, von denen später die Rede sein wird. Eine Kassette mit drei Genen, die drei Enzyme kodieren, wird exprimiert, wenn die Enzyme der Glycopeptid-Antibiotika-Produktion aktiviert werden. Die Resistenzgene führen zur Umprogrammierung der Synthese der Peptidoglycan-Termini (Abbildung 5). Das erste der drei Resistenz vermittelnden Enzyme, VanH, reduziert Pyruvat zu D-Lactat, das zweite (DdlM) verknüpft dieses D-Lactat mit D-Alanin zu dem Depsipeptid D-Ala-D-Lactat. Das dritte Enzym, VanX, hydrolysiert inzwischen das D-Ala-D-Ala-

Dipeptid, das durch die D-Ala-D-Ala-Ligase gebildet wurde. Insgesamt sinkt dadurch die Konzentration der physiologischen Zellwand-Vorstufe D-Ala-D-Ala, während die des Metaboliten D-Ala-D-Lactat steigt. Das MurF-Enzym, das normalerweise D-Ala-D-Ala als Substrat umsetzt, kann dieses nun nicht finden und benutzt stattdessen D-Ala-D-Lactat für die Kondensation mit UDP-Muramyltripeptid für die Synthese von UDP-muramyl-D-Ala-D-*iso*Glu-L-Lys-D-Ala-D-Lactat, das Depsipeptidanalogon des normalen UDP-muramyl-pentapeptids.<sup>[31]</sup> Dieses Analogon wird glycosyliert, auf den C55-Lipid-PP-Carrier übertragen, auf die Außenseite der Cytoplasmamembran geschleust und für die Elongation des Peptidoglycan benutzt (Schema 3). Die Transpeptidasen können für die Vernetzung auch die Tetrapeptidyl-D-Lactat-Kette umsetzen und spalten dabei die D-Ala<sub>4</sub>-D-Lac<sub>5</sub>-Esterbindung, wenn die Isopeptidbindung für die Brückenbindung gebildet ist.

Insgesamt löst die Expression der drei Resistenzenzyme eine Umprogrammierung der cytoplasmatischen Schritte der PG-Synthese aus, sodass anstelle von D-Ala-D-Ala D-Ala-D-Lactat gebildet und nach außen transportiert wird. Wie im nächsten Abschnitt beschrieben ist die Affinität von Vancomycin für die PG-D-Ala-D-Lactat-Kettenenden 1000 fach niedriger als für die PG-D-Ala-D-Ala-Termini. Die Produzentenstämmen haben die Zellwand-Biosynthese umprogrammiert, um gegen Vancomycin und Teicoplanin immun zu werden.

## 6. Die molekulare Grundlage der VanA-, VanB- und VanC-Phänotypen in vancomycinresistenten Enterococcen

Als sich die Antibiotika-Resistenzen in den 80er Jahren des vorigen Jahrhunderts ausbreiteten, besonders mit dem Auftauchen methicillinresistenter *Staphylococcus-aureus*-Stämme (MRSA), wurde Vancomycin immer wichtiger und zunehmend für die Behandlung lebensbedrohlicher Gram-positiver bakterieller Infektionen eingesetzt. Es ist inzwischen das Mittel der Wahl bei Endocarditis, bei vielen Bakteriämien von Patienten, die an Krebs erkrankt sind und sich einer Chemotherapie unterzogen haben, und ist das

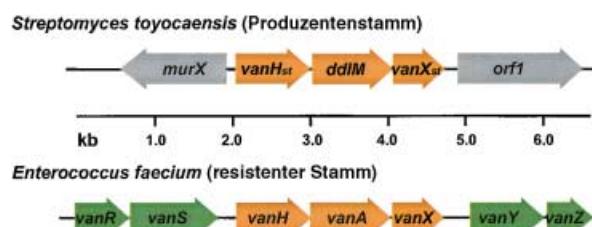
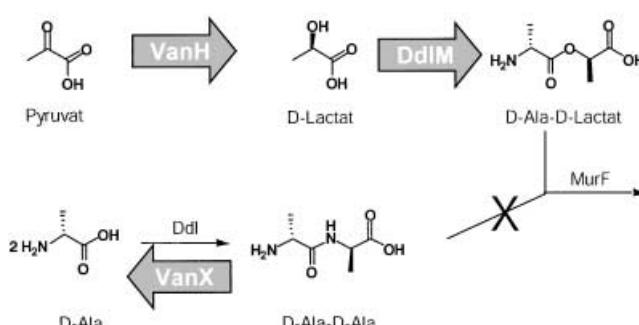
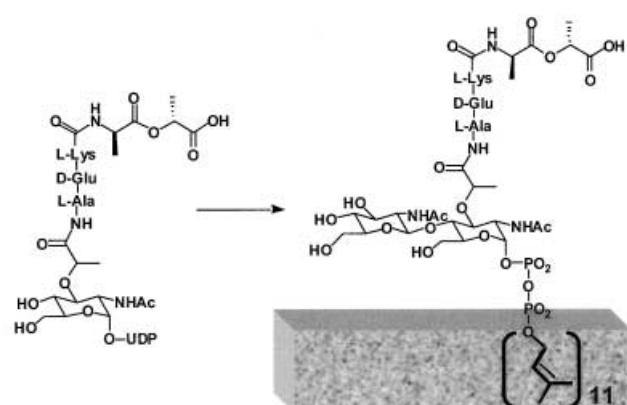


Abbildung 5. Gen-Kassetten für die Vancomycinresistenz im Produktionsorganismus und in resistenten Stämmen.



Schema 3. Biosynthese und Einbau des D-Ala-D-Lac-Terminus des Peptidoglycans.



letzte wirksame Mittel bei der Behandlung von MRSA-Infektionen in Krankenhäusern.<sup>[32]</sup> Durch den ausgedehnten Einsatz von Vancomycin in Hospitälern tauchten aber auch vancomycinresistente Gram-positive Pathogene auf, hauptsächlich vancomycinresistente Enterococci (VRE). VRE wurden als opportunistische Pathogene eingestuft, die selektioniert werden, wenn andere Bakterien absterben.<sup>[33]</sup> Die Häufigkeit von VRE in Klinikisolaten nahm alarmierend schnell von 0,4 % im Jahr 1987 auf 16 % in nur sechs Jahren zu<sup>[34]</sup> und ging mit einer hohen Mortalitätsrate einher. Etwa 95 % der VRE sind *Enterococcus faecalis*- und die übrigen 5 % *Enterococcus faecium*-Stämme. Zwei klinische Hauptphänotypen wurden als VanA und VanB beschrieben (Tabelle 3); sie unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Teicoplanin (VanA ist resistent, VanB sensitiv).<sup>[3,35]</sup> Ein dritter, weniger wichtiger klinischer Phänotyp ist VanC; außerdem wurden Varianten der Phänotypen A und B nachgewiesen.<sup>[36,37]</sup>

Den Phänotypen VanA und VanB von VRE liegt die gleiche molekulare Logik zugrunde wie der Resistenz der Glycopeptid-Antibiotika-Produzenten, nämlich eine Umprogrammierung der Peptidoglycan-Termini von D-Ala-D-Ala zu D-Ala-D-Lactat. Für diese induzierbare enzymatische Umprogrammierung ist eine Kassette mit fünf Genen erforderlich: *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX*, in der *vanH* die D-spezifische Pyruvatreduktase, *vanA* die D-Ala-D-Lactatligase und *vanX* die D-Ala-D-Ala-Dipeptidase kodiert. Damit wird der Stoffwechselweg aus Abbildung 5 eröffnet, in dem D-Ala-D-Lactat gebildet und D-Ala-D-Ala selektiv zerstört wird.<sup>[31,38]</sup> Vancomycin bindet an N-Acyl-D-Ala-D-Lactat mit 1000 fach niedrigerer Affinität als an N-Acyl-D-Ala-D-Ala, was die um drei Größenordnungen höhere minimale Hemmkonzentration (MIC) erklärt (Tabelle 3), die in VRE-Klinikisolaten vom VanA- und VanB-Typ bestimmt wurde.<sup>[39]</sup> In Abbil-

dung 4a ist zu sehen, dass der Komplex von Vancomycin mit N-Acyl-D-Ala<sub>4</sub>-D-Ala<sub>5</sub> eine Wasserstoffbrücke mehr enthält als der mit N-Acyl-D-Ala<sub>4</sub>-D-Lactat.<sup>[31,35]</sup> Wahrscheinlich tragen außerdem elektrostatische Abstoßungen zwischen dem Vancomycin-Carbonylsauerstoffatom und dem Ester-Sauerstoffatom der D-Ala-D-Lactat-Bindung zum Abfall der Affinität auf ein Tausendstel bei.

Der vancomycinresistente Phänotyp von VanA- und VanB-VRE ist durch das Antibiotikum induzierbar; dies wird durch die beiden anderen Proteine, VanS und VanR vermittelt, die auch in der fünf Gene umfassenden Resistenzkassette kodiert sind. Das Paar aus VanS und VanR bildet ein Regulationssystem aus zwei Komponenten, in dem VanS eine als Transmembran-Sensor fungierende Proteinkinase ist und VanR ein DNA-bindender Response-Regulator (Abbildung 5).<sup>[40]</sup> Vancomycin und Teicoplanin an der Außenseite der Enterococci-Zellwand induzieren beim VanA-Phänotyp die Aktivität des VanS-Transmembranproteins, sich an der cytoplasmatischen Histidinkinasedomäne zu auto-phosphorylieren, vielleicht durch eine Dimerisierung von VanS durch den externen Liganden – dies würde die cytoplasmatischen Domänen für eine Transphosphorylierung nahe genug zusammenbringen. Beim VanB-Phänotyp kann dies nur durch Vancomycin ausgelöst werden.<sup>[41]</sup> Die Phosphohistidyl-VanS-Kinasedomäne überträgt dann die Phosphatgruppe auf eine konservierte Aspartyl-β-COOH-Seitenkette in der N-terminalen Acceptordomäne von VanR. Phospho-VanR hat eine geringere Bindungsaffinität zu seinen DNA-Zielsequenzen als VanR, wodurch P-VanR von den Promotorregionen der *vanHAX*-Gene dissoziiert und so die transkriptionale Repression aufhebt.<sup>[42]</sup> Daraufhin leiten die VanHAX-Enzyme die Umprogrammierung der Peptidoglycansynthese ein, in deren Verlauf die D-Ala-D-Ala-PG-Termini durch D-Ala-D-Lactat ersetzt werden.

**Tabelle 3:** Resistenzmechanismen und die Empfindlichkeit resisterter Arten gegenüber Vancomycin und Teicoplanin.

Charakteristikum	Vertreter				
	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE*
Genetische Charakteristika	erworben (Gen <i>Tn1546</i> )	erworben (Gen <i>Tn1547</i> )	intrinsisch (chromosomal kodierte Eigenschaft der Art)	erworben	erworben
Terminus der Peptidoglycan-Vorstufe	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser
Minimale Hemmkonzentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )					
Vancomycin	64 bis >1000	4 bis >1000	2 bis 32	16 bis 64	16
Teicoplanin	16 bis 512	0.5 bis >32	0.5 bis 1	2 bis 4	0.5
Ligasegen	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC-1</i> und <i>vanC-2/vanC-3</i>	<i>vanD</i>	<i>vanE</i>
Bakterien, bei denen diese Resistenz- gene in der Natur vorkommen	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. mundtii</i> , <i>E. avium</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Streptococcus gallolyticus</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , Arcanobakterien, Lactococci, Oerskovia	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Streptococcus bovis</i> , <i>S. gallolyticus</i>	<i>E. gallinarum</i> und <i>E. casseliflavus</i> / <i>E. favescus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Bakterien, auf die die Vancomycin-Resistenz im Labor von Enterococci übertragen wurde	<i>S. sanguis</i> , <i>S. pyogenes</i> , Listerien und <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , gemeinsam mit Ampicillin- Resistenz			

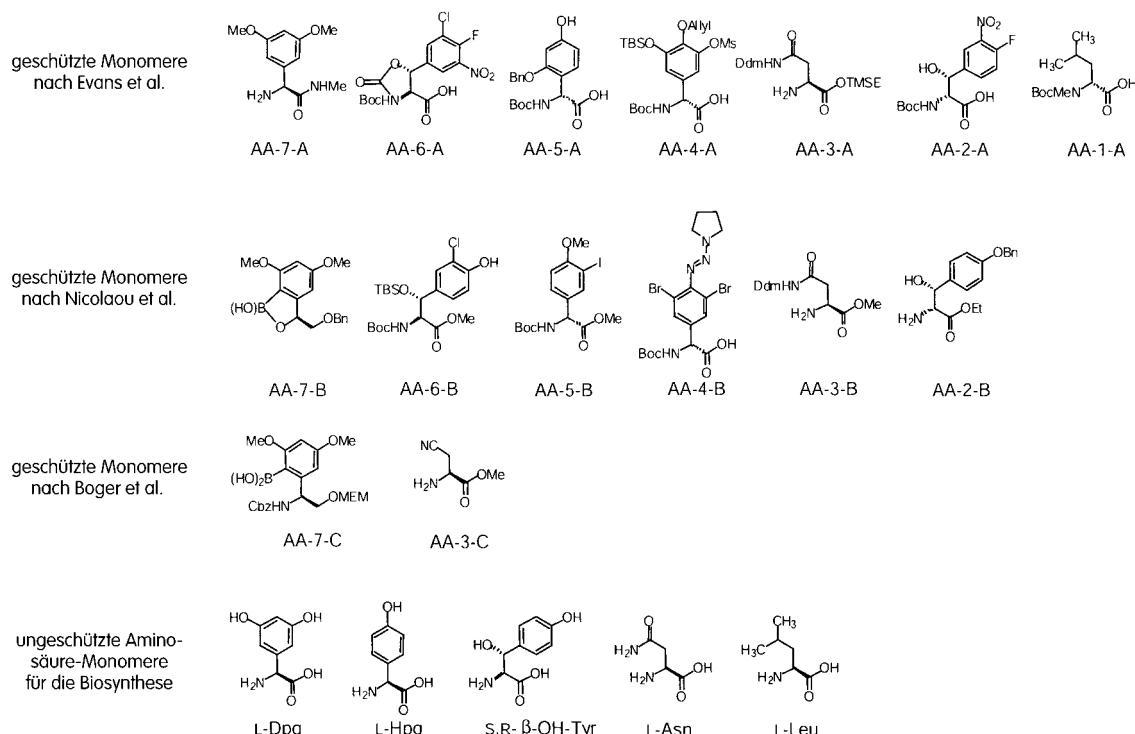
Die unveränderte Sensitivität von VRE des VanB-Typs gegenüber Teicoplanin geht ausschließlich darauf zurück, dass das Antibiotikum nicht von der VanS<sub>B</sub>-Sensorkinase erkannt wird und daher die drei Enzyme, die die PG-Synthese modifizieren (VanH<sub>B</sub>, VanA<sub>B</sub> und VanX<sub>B</sub>), nicht angeschaltet werden.<sup>[43,44]</sup> Dies ließ sich an Mutanten zeigen, die die Resistenz gegen Teicoplanin erworben hatten; alle Mutationen gingen auf Aminosäureaustausche in VanS<sub>B</sub> zurück, welches nun das Signal an VanR<sub>B</sub> übermittelte. Diese Befunde stimmen mit der Auffassung überein, dass die Glycopeptide Vancomycin (VanS<sub>A</sub>, VanS<sub>B</sub>) und Teicoplanin (VanS<sub>A</sub>) die direkten Liganden für die externen Domänen der Sensorkinasen sind.

*Enterococcus gallinarum*, das den VanC-Phänotyp ausprägt, exprimiert eine konstitutive D-Ala-D-Ser-Ligase. Das Bakterium folgt damit dem allgemeinen Prinzip, dass die Vancomycinresistenz durch eine Umprogrammierung der Peptidoglycan-D-Ala-D-Ala-Termini herbeigeführt wird.<sup>[45,46]</sup> Die Analyse der PG-Termini ergab, dass die D-Ala-D-Ser-Gruppierung mit der größeren CH<sub>2</sub>OH-Gruppe von D-Ser<sub>5</sub> bezogen auf die CH<sub>3</sub>-Gruppe von D-Ala<sub>5</sub> (Abbildung 4a) eine verringerte Bindungsaffinität für Vancomycin um eine Größenordnung und entsprechend eine Erhöhung der MIC-Werte um eine Größenordnung nach sich zieht (Tabelle 3). Interessanterweise gibt es sogar *E. faecalis*-Stämme, die Vancomycin zum Überleben benötigen.<sup>[47]</sup> Diese tragen Mutationen, die die chromosomal D-Ala-D-Ala-Ligase inaktivieren; nur wenn die Vancomycin-induzierte D-Ala-D-Lactat-Ligase (VanA) stattdessen exprimiert wird, kann dieses Bakterium Peptidoglycan synthetisieren und überleben.

## 7. Biologische und chemische Synthesestrategien

Die Synthese und der Aufbau von Vancomycin aus seinen Bausteinen sind sowohl für den produzierenden Organismus als auch für den synthetisch arbeitenden Chemiker eine echte Herausforderung. Das Hauptaugenmerk dieses Aufsatzes liegt auf der Analyse der Biosynthese von Glycopeptid-Antibiotika; die Ansätze zur chemischen Synthese wurden bereits von Nicolaou et al.<sup>[25]</sup> vorgestellt. Dennoch ist es aufschlussreich, die erfolgreichen Synthesestrategien, die von drei Arbeitsgruppen geplant und umgesetzt wurden (Evans et al.,<sup>[48-51]</sup> Nicolaou et al.<sup>[52-56]</sup> und Boger et al.<sup>[57]</sup>) mit dem Lösungsweg der Natur zu vergleichen. Die größte Schwierigkeit besteht in der Einführung der drei Verbindungen (zwei Diarylether, eine C-C-Bindung), die die fünf Arylseitenketten im Vancomycin-Heptapeptid und alle sieben Arylseitenketten (drei Diarylether und eine C-C-Bindung) in der Teicoplanin-Unterkategorie zusammenhalten.

Die erste Synthese eines Glycons vom Vancomycintyp war die des Orienticin (Schema 2), das sich vom Vancomycin-Aglycon nur durch das Fehlen der Chlorsubstituenten am  $\beta$ -Hydroxy-Tyr-2 und -Tyr-6 unterscheidet.<sup>[50]</sup> Ein Unterschied zwischen Biosynthese und chemischer Synthese besteht darin, dass die *Amycolaptosis-orientalis*-Bakterien ungeschützte Aminosäure-Monomere einsetzen, während die Chemiker Schutzgruppen anbringen (Schema 4). Für die Biosynthese sind fünf Aminosäuren erforderlich, von denen zwei, D-Hpg an den Positionen 4 und 5 und L-Hpg an Position 7, nicht proteinogen sind und speziell für diese Biosynthese hergestellt werden. Die geschützten Monomere, die von den Gruppen von Evans, Nicolaou und Boger verwendet wurden, sind in Schema 4 zusammengestellt (AA-1-A bis AA-7-A von



Schema 4. Monomere für die chemische und die biologische Synthese von Vancomycin.

Evans et al., AA-2-B bis AA-7-B von Nicolaou et al. und AA-3-C und AA-7-C für Boger et al.). Die Schutzgruppen an AA-1-A, -3-A und -7-A sind nicht ungewöhnlich, während mit den anderen vier Schutzgruppen die Verknüpfungen 2-4, 4-6 und 5-7 eingeleitet werden. Analog wurde mit dem Schutzverfahren von AA-4-B die doppelte Vernetzung zu den Resten 2 und 6 im Verlauf der Synthese vorbereitet.

## 7.1. Ablaufschema für Synthese und Vernetzung der Monomere

Eine retrosynthetische Analyse der drei chemischen Wege zum Aufbau der Glycopeptide zeigt, dass der Ansatz von Nicolaou et al. (Schema 5) sich etwas von denen von Evans et al. und auch von Boger et al. unterscheidet (Schema 6). Zur besseren Übersicht sind die Schutzgruppen, die für die Synthesen notwendig sind, in diesen Schemata weggelassen. In allen drei Synthesen wird zunächst die 5-7-C-C-Bindung und dann die 4-6-Bindung aufgebaut. Zuletzt werden die 2-4-Diaryletherbindungen geknüpft und damit das Aglycongerüst fertiggestellt. Nicolaou et al. bauten als erste Verbindung die 5-7-Diaryletherbrücke auf, gefolgt von der 5-6- und der 4-5-Peptidbindung. Dann wurde die 4-6-Diarylether-Bindung eingeführt, anschließend die 6-7-Amidbindung zur Erstellung des makrobicyclischen, doppelt überbrückten Tetrapeptides mit den Resten 4-7. Das Tripeptid 1-3 wurde zusammengesetzt und über die 3-4-Peptidbindung angekuppelt. Dem entstehenden Heptapeptid fehlt dann nur noch die 2-4-Diarylether-Bindung. Mit deren Einführung und der Entschüttung der Seitenketten (nicht gezeigt) ist die Synthese abgeschlossen, wobei das vollständig vernetzten Heptapeptid mit drei Ringen erhalten wurde.

Die Syntheseplanungen von Evans und Boger beginnen mit dem 5-7-Tripeptid und der Einführung der 5-7-Bindung. Es folgen der Einbau der Reste 4 über die 4-5-Amidbindung zum einfach verbrückten Tetrapeptid und die Knüpfung der 4-6-Diarylether-Bindung. Dieses Zwischenprodukt wurde mit dem 1-3-Tripeptid zu dem angestrebten Heptapeptidgerüst verbunden, in das nur noch die 2-4-Diarylether-Bindung eingeführt werden muss. Alle drei Wege sind hoch konvergent und mit 28 Stufen die längste lineare synthetische Sequenz. In jedem Fall erfolgt die Verknüpfung mit dem Zucker nach Abschluss der Aglycon-Synthese. Die Synthesen sind bemerkenswerte Höhepunkte der synthetischen Chemie. Eine Überführung in ein Produktionsverfahren mit durchschnittlich 95 Stufen aus einfach zugänglichen Ausgangsmaterialien ist allerdings nicht praktikabel.

Eine vergleichbare retrosynthetische Zerlegung der Vancomycin-Biosynthese ist Schema 7 zu entnehmen. Ein auffälliger Unterschied neben dem Fehlen jeglicher Schutzgruppen ist der Aufbau des vollständigen linearen Heptapeptids bevor die erste Arylseitenketten-Vernetzung erfolgt. Dadurch entstehen große Probleme bei der Steuerung der Konformerenbildung bei den nachfolgenden drei regio- und stereospezifischen Ringschlüssen durch die beteiligten Enzyme. Aus Untersuchungen mit Knock-out-Mutanten ist bekannt, dass die 4-6-Diarylether-Bindung als erste gebildet wird; die Reihenfolge der 2-4- und 5-7-Bindungsknüpfung ist jedoch noch nicht geklärt.<sup>[58,59]</sup> Wir werden die Enzymaus-

stattung für nichtproteinogene Aminosäurereste in Abschnitt 9 und die enzymatische Vernetzung in Abschnitt 11 diskutieren. Vom Anfang der Synthese bis zum voll glycosylierten Vancomycin umfasst der Biosyntheseweg etwa 35 Stufen.

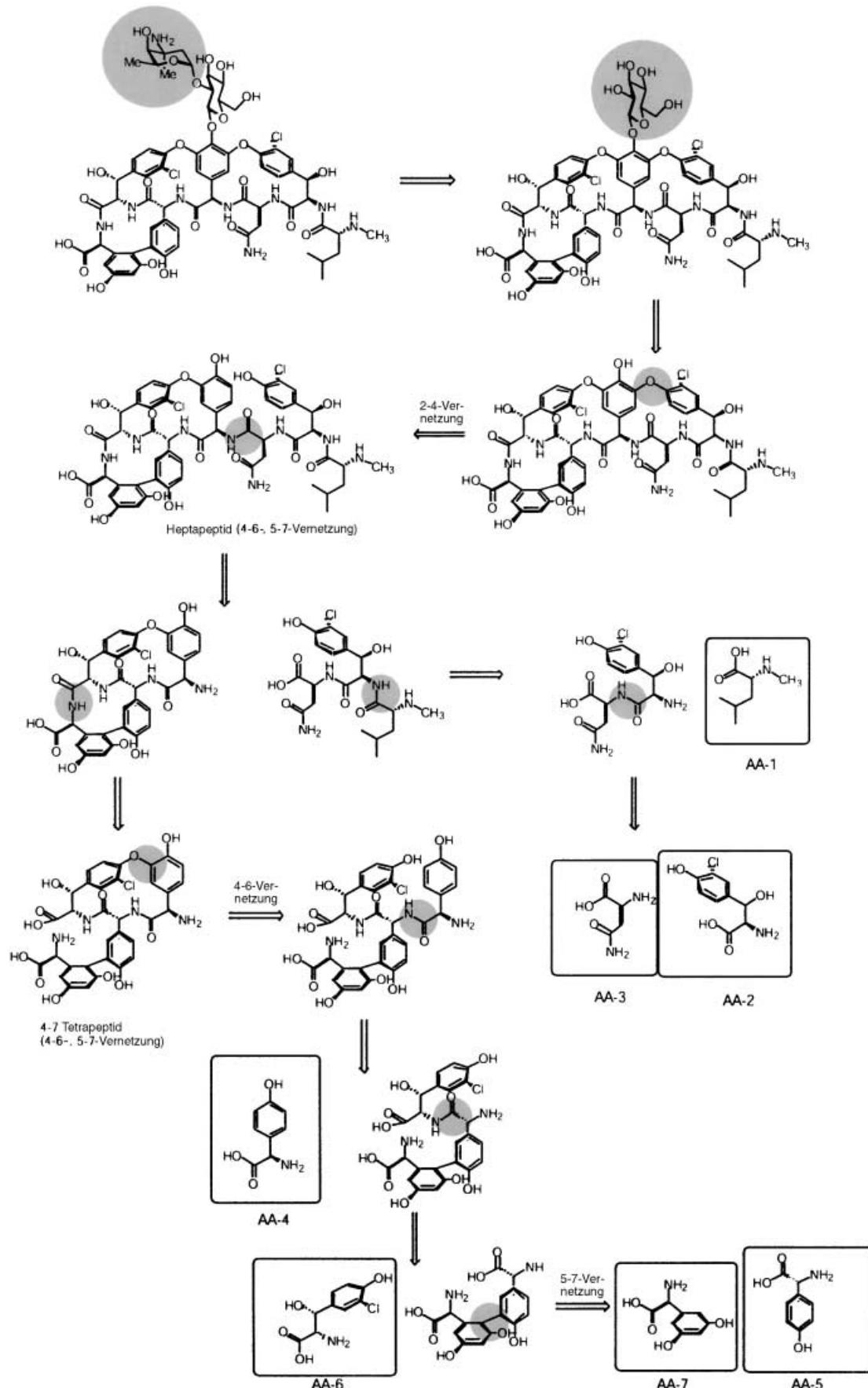
## 8. Gencluster für die Biosynthese des Peptidgerüsts und die modifizierenden Enzyme

Kennt man die DNA-Sequenz der Gencluster, die die Antibiotika-Biosynthese steuern, kann man daraus den Verlauf der Synthese ableiten und die Funktionen der einzelnen offenen Leserahmen (open reading frames, orfs) anhand der Homologie mit Proteinen bekannter Funktion und anhand der Lokalisation eines orfs relativ zu den übrigen Genen des Clusters erschließen. Die Sequenzdaten für die Antibiotika der Vancomycingruppe werden nach und nach verfügbar. Bis heute wurde das gesamte Cluster für die Synthese von Chloreremomycin, einer Verbindung der Vancomycinklasse, und von Complestatin (Schema 2), einem nichtglycosylierten Molekül, veröffentlicht.<sup>[60,61]</sup> Eine Teilsequenz des Balhimycin-Clusters liegt ebenso vor wie Kartierungsdaten des Teicoplanin-Clusters,<sup>[62,30]</sup> und auch die Sequenz des A47934-Clusters wurde beschrieben.<sup>[145]</sup>

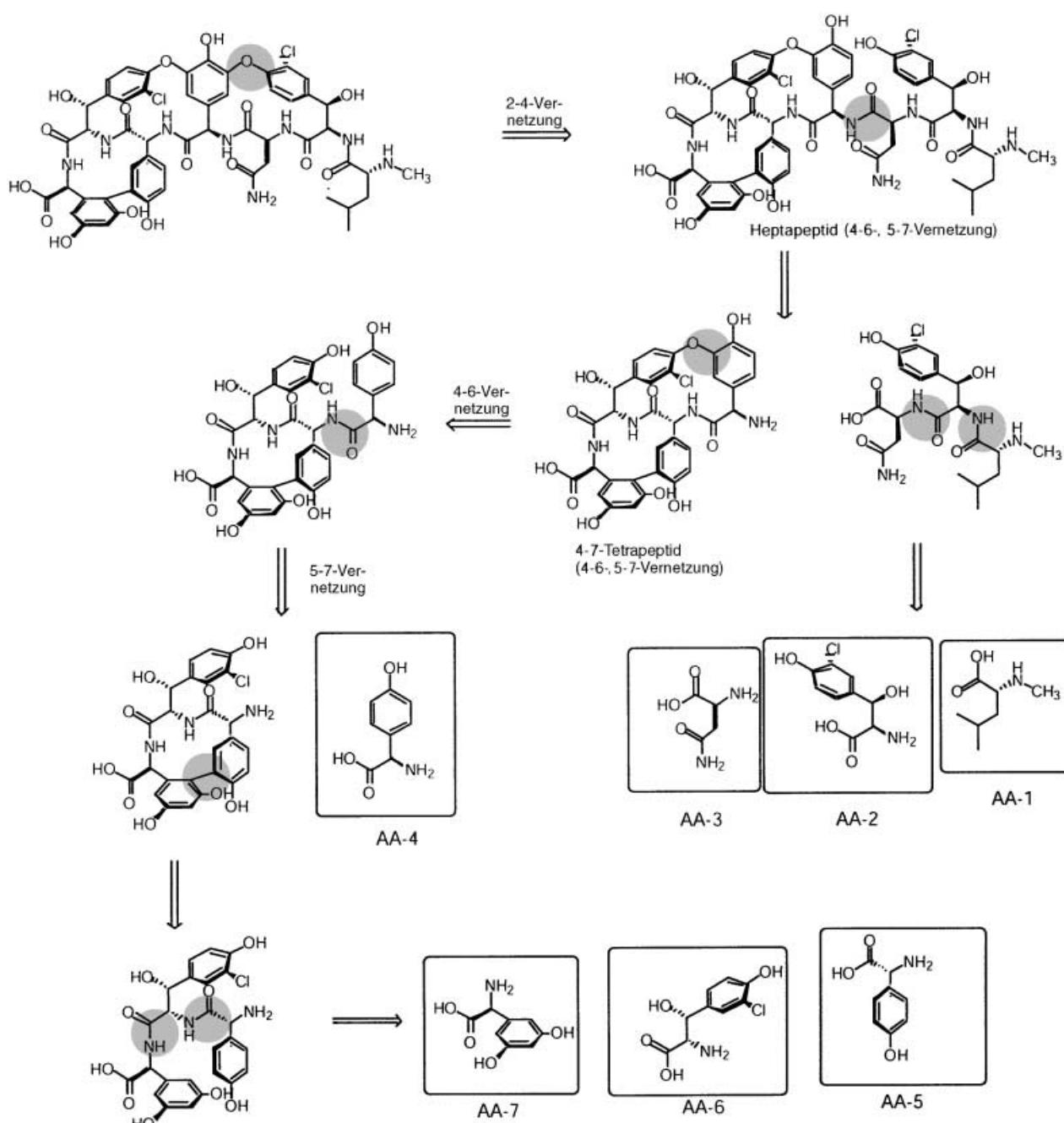
### 8.1. Chloreremomycin und Balhimycin

Etwa 40 zusammenhängende Gene des Chloreremomycin-Produzenten (Cep) *Amycolaptosis orientalis* wurden sequenziert und von van Wagonen et al. teilweise annotiert.<sup>[60]</sup> Nach gegenwärtigem Stand können 30 dieser Cep-orfs sicher Genen im Glycopeptid-Biosyntheseweg zugeordnet werden; diese sind in Tabelle 4 als orfs 1-30 in der Reihenfolge ihres Erscheinens (Abbildung 6) aufgelistet. Daneben enthält die Tabelle Angaben über die Namen der Proteine, ihre vorhergesagte oder bekannte Funktion und über Cosubstrate und Cofaktoren für die Enzymaktivität. Die Analyse der Start- und Stop-Codons dieser 30 Gene weist auf mindestens 19 mRNA-Transkripte hin. Dies bedeutet, dass mehrere der Gene zusammen (polycistronisch) transkribiert werden. Zwischen einigen Stop- und Start-Codons gibt es Überlappungen, wie aus Tabelle 4 zu erkennen ist. Eine solche Reihenfolge ist typisch für eine translationale Kopplung. Von den 30 Genprodukten sind inzwischen mindestens 23 weitgehend gereinigt und auf ihre katalytische Aktivität untersucht worden. Dies wird in den nächsten Abschnitten diskutiert werden.

Fünf verschiedene Aminosäuren werden an identischen Stellen der Heptapeptide von Chloreremomycin, Vancomycin und Balhimycin eingebaut (Schema 4). Zwei davon sind nichtproteinogen (Hpg und Dpg), während eine dritte, 3-Chlor-β-hydroxytyrosin, eine nichtproteinogene Variante von Tyrosin ist. Vermutlich sind Enzyme für die De-novo-Biosynthese von Hpg und Dpg ebenfalls in dem Cluster lokalisiert. Die vierstufige Synthese zum Hpg wird mithilfe der vier Orfs 1, 17, 21 und 22 beschritten, während die vier Orfs 27-30 den Weg zum Dpg weisen. Die Umwandlung der



Schema 5. Retrosynthetische Analyse der chemischen Synthese von Vancomycin nach Nicolaou et al.



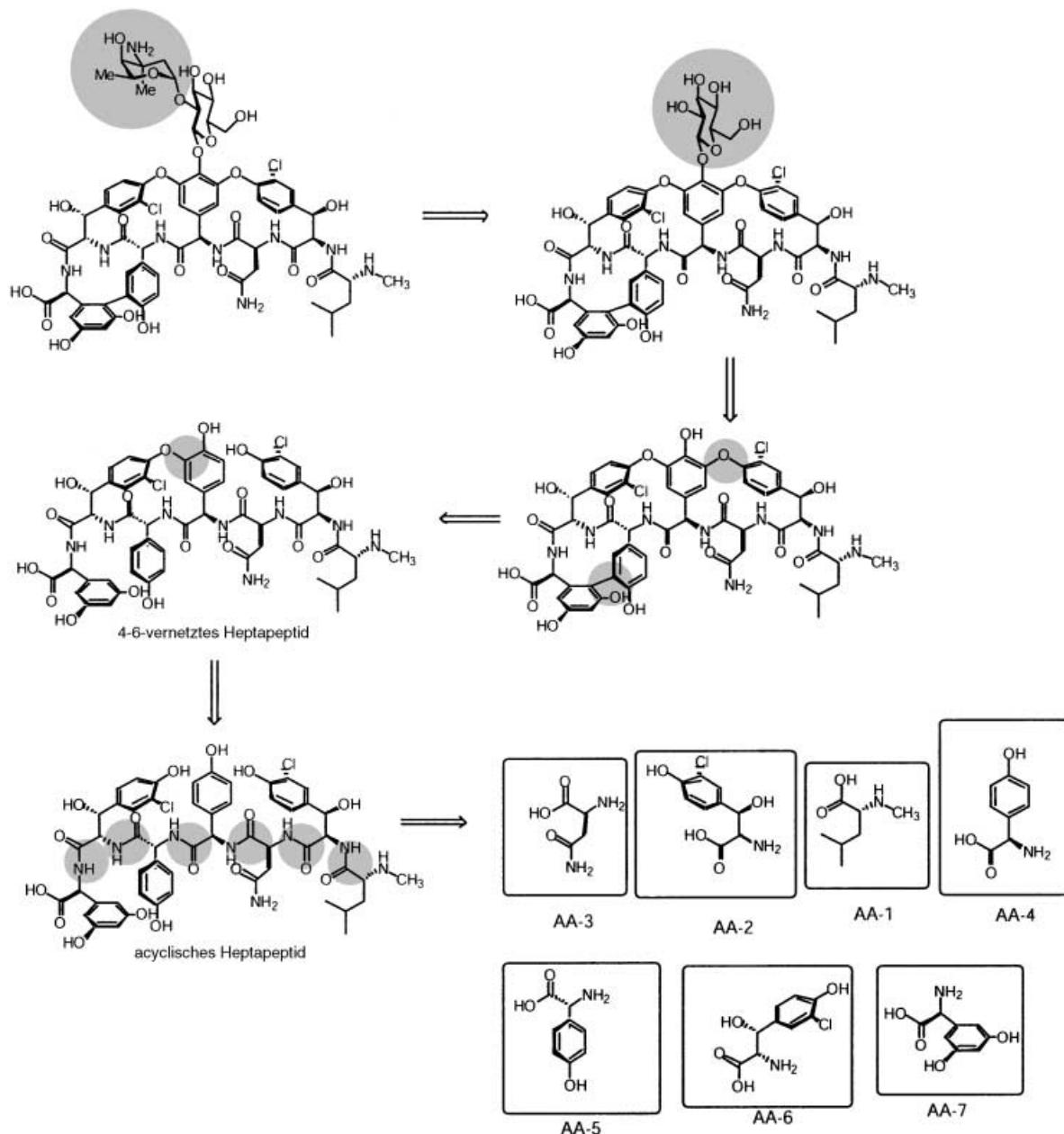
**Schema 6.** Retrosynthetische Analyse der chemischen Synthese von Vancomycin nach Boger et al. und Evans et al.

normalen Aminosäure L-Tyrosin in 3-Chlor- $\beta$ -hydroxy-Tyr, das in den Positionen 2 und 6 des Heptapeptidgerüsts einge-  
baut wird, wird vermutlich durch die vier Orfs 10, 18, 19 und  
20 bewerkstelligt. Die genaue Funktion dieser zwölf Orfs wird  
im nächsten Abschnitt beschrieben.

Drei Orfs, CepA, CepB und CepC stellen mit der  
nichtribosomalen Peptidsynthetase das „Fließband“ für die  
Produktion des Heptapeptids bereit. Weitere drei Orfs, 7, 8  
und 9, sind als Hämproteine an der oxidativen Vernetzung des  
Heptapeptids beteiligt. Acht der verbleibenden zwölf Orfs  
sind an der Bildung und Übertragung der Zuckerreste auf das  
Glycopeptid beteiligt. Die Orfs 14, 23, 24, 25 und 26 syn-

thesieren dTDP-L-Epivancosamin aus dTDP-d-Glucose;  
die Orfs 12–14 sind drei Glycosyltransferasen, die einen d-  
Glucose- und zwei L-Epivancosamin-Zuckerreste auf das  
Heptapeptidgerüst übertragen. Orf 16 ist die N-Methyltrans-  
ferase für die N-Methylierung des Leu<sub>1</sub>-Rests.<sup>[63]</sup> Orf 2 ist  
vermutlich ein Transporter für die Sekretion von Chlorere-  
momycin. Orf 15 weist Homologien zu Epimerasen auf, und  
Orf 6 ist das einzige Genprodukt, für das es bislang noch  
keine Funktionszuordnung gibt.

In der Partialsequenz des Balhimycin-Clusters wurden  
bislang sieben vollständige *orfs* identifiziert (Tabelle 5), die  
fast genauso organisiert sind wie die *orfs* auf dem Cep-Cluster



**Schema 7.** Retrosynthetische Analyse der Biosynthese von Vancomycin.

(Tabelle 4).<sup>[62]</sup> Die Balhimycin-Orfs sind homolog zu Cep-Orf 6, drei Hämproteinen analog zu Cep 7–9, einer mutmaßlichen Halogenase, drei Glycosyltransferasen und einer Teilsequenz eines Cep-14-Homologen.

## 8.2. Complestatin

Der Naturstoff Complestatin (Schema 2) aus *Streptomyces lavendulae* unterbindet Berichten zufolge Protein-Protein-Wechselwirkungen in der Komplement-Kaskade und bei der gp120-CD4-Bindung im Vermehrungscyclus des HIV-Virus.<sup>[64–67]</sup> Das Moleköl hat unverkennbare Ähnlichkeiten mit dem Peptidgerüst von Vancomycin, ist aber nicht glycosyliert. Das Biosynthese-Gencluster des Complestatin

wurde inzwischen sequenziert (Tabelle 6 und Abbildung 7).<sup>[61]</sup> Complestatin ist ein Acyl-Hexapeptid mit sieben Arylseitenketten. Die Vernetzung der elektronenreichen Arylseitenketten der Reste 2-4-6 entspricht dem 2-4-6-Muster der Verbindungsklassen von Vancomycin und Teicoplanin. Vier der sechs Reste des Complestatin sind nicht proteinogen und leiten sich vom Hpg ab. Der erste Rest, ein *p*-Hydroxy-3,5-dichlorbenzoylformiat, könnte durch Oxidation aus *p*-Hydroxy-3,5-dichlorphenylglycin entstehen, das sich an den Positionen 3 und 5 befindet. Complestatin enthält auch die Aminosäure Tryptophan, die unter allen anderen Verbindungen der Vancomycinfamilie einzigartig ist.

Von den 16 Genen des Complestatin-Clusters sind die vier *orfs*, die die Enzyme für die Hpg-Synthese kodieren (*orfs* 13–16), homolog zu den entsprechenden *cep*-Genen. Die *orfs* 3–6

**Tabelle 4:** Gene im Chloreremomycin-Biosynthesecluster.

Orf-Nr.	Zugriffsnr.	Stoffwechselweg	Proteinbez. vorhergesagte Funktion	Cofaktoren oder Cosubstrate	Relatives Start-codon	Relatives Stop-codon	Zahl der Basenpaare	Zahl der Aminosäuren	Transkript-Nr.	K <sup>[a]</sup>	R <sup>[b]</sup>	A <sup>[c]</sup>
1	CAA11792.1	Hpg	PD	Prephenat-Dehydrogenase		1	1104	1104	367	1	+	-
2	CAA11793.1	Transportprotein	CepM	ABC-Transporter	ATP	1308	3260	1953	650	2	-	-
3	CAA11794.1	HeptapeptidAufbau	CepA	NRPS	CoA, ATP	3257	12733	9477	3158	2	+	-
4	CAA11795.1	HeptapeptidAufbau	CepB	NRPS	CoA, ATP	12908	25141	12234	4077	3	+	-
5	CAA11796.1	HeptapeptidAufbau	CepC	NRPS	CoA, ATP	25161	30743	5583	1860	4	+	-
6	CAA11799.1	unbekannt	CepD			30740	30949	210	69	4	-	-
7	CAA11797.1	Oxidative Brückebildung	CepE	Oxidation	NADPH	31044	32246	1203	400	5	+	-
8	CAA11798.1	Oxidative Brückebildung	CepF	Oxidation	NADPH	32266	33486	1221	406	6	+	-
9	CAA11800.1	Oxidative Brückebildung	CepG	Oxidation	NADPH	33525	34892	1368	455	7	+	-
10	CAA11780.1	Halogenierung	CepH	Halogenierung	NADPH	34954	36429	1476	491	8	+	-
11	CAA11774.1	Glycosylierung	GtfA	Zuckerübertragung		36426	37664	1239	412	8	+	+
12	CAA11775.1	Glycosylierung	GtfB	Zuckerübertragung		37699	38922	1224	407	9	+	+
13	CAA11776.1	Glycosylierung	GtfC	Zuckerübertragung		39002	40300	1299	432	10	+	+
14	CAA11777.1	TDP-Epivan-cosamin	EvaC	Methylierung	SAM	40373	41599	1227	408	11	+	+
15	CAA11778.1	Epimerisierung	CepI	Epimerase	NADP	41601	42434	834	277	12	+	-
16	CAA11779.1	N-Methylierung	MtfA	Methylierung	SAM	42431	43309	879	292	12	+	+
17	CAA11790.1	Hpg	HpgT	Aminotransferase	PLP	44594	43278	1317	438	13	+	+
18	CAA11784.1	$\beta$ -Hydroxytyrosin	CepJ	Thioesterase		44659	45642	984	327	14	+	+
19	CAA11773.1	$\beta$ -Hydroxytyrosin	CepK	NRPS	CoA, ATP	45639	47381	1743	580	14	+	-
20	CAA11772.1	$\beta$ -Hydroxytyrosin	CepL	Hydroxylierung	NADPH	47397	48590	1194	397	15	+	-
21	CAA11761.1	Hpg	HmaS	Dioxygenierung	Fe	48766	49908	1143	380	16	+	+
22	CAA11762.1	Hpg	Hmo	Oxidase	FAD	49905	50978	1074	357	16	+	+
23	CAA11763.1	TDP-Epivan-cosamin	EvaA	Oxidase	FMN	50978	52393	1416	471	17	+	+
24	CAA11764.1	TDP-Epivan-cosamin	EvaE	Reduktase	NADPH	52395	53372	978	325	18	+	+
25	CAA11782.1	TDP-Epivan-cosamin	EvaB	Aminotransferase	PLP	53369	54478	1110	369	18	+	+
26	CAA11781.1	TDP-Epivan-cosamin	EvaD	Epimerase		54475	55119	645	214	18	+	+
27	CAA11765.1	L-Dpg	DpgA	PKS-Typ-III		55312	56430	1119	372	19	+	-
28	CAA11766.1	L-Dpg	DpgB	Isomerase		56427	57230	804	267	19	+	-
29	CAA11785.1	L-Dpg	DpgC	Thioesterase		57227	58525	1299	432	19	+	+
30	CAA11767.1	L-Dpg	DpgD	Dehydratation		58522	59325	804	267	19	+	+

[a] K = Klon; [b] R = Reinigung; [c] A = Analyse. Hpg = 4-Hydroxyphenylglycin; ATP = Adenosintriphosphat; NRPS = nichtribosomale Peptidsynthetase; CoA = Coenzym A; NADP = Nicotinamidadenindiphosphat (oxidiert); NADPH = Nicotinamidadenindiphosphat (reduziert); SAM = S-Adenosyl-L-methionin; PLP = Pyridoxal-5'-phosphat; FAD = Flavinadenindinucleotid; FMN = Flavinmononucleotid; L-Dpg = L-3,5-Dihydroxyphenylglycin; PKS = Polyketid-Synthase.

kodieren vier Proteinuntereinheiten für die nichtribosomale Proteinsynthese; ähnlich wie die CepA-C-Untereinheiten haben sie sieben erkennbare Module, um die sieben Monomere zu aktivieren. Zwei Hämproteine, Orf 10 und 11, sind vermutlich die vernetzenden Oxidasen, die durch ein Ferredoxin (Orf 12) mit Elektronen versorgt werden. Von den verbleibenden vier Genen sind wahrscheinlich zwei am Transport beteiligt, eines ist ein Transkriptions-Regulator, und auch hier gibt es ein Gen mit noch unbekannter Funktion.

Da die Sequenzen für die Glycopeptid-Antibiotika der Teicoplanin-Klasse nach und nach verfügbar werden, ist es wahrscheinlich, dass aus den gerade beschriebenen beiden Beispielen der gemeinsame molekulare Syntheseverlauf bestimmter Aminosäuren und Amino/Desoxyzucker-Monomere

re ableitbar ist.<sup>[30]</sup> Dieser umfasst die nichtribosomale Synthese des Peptidgerüsts und die Strategie für die enzymatische Halogenierung, Oxidation und Glycosylierung dieser großen Klasse von antibiotisch wirksamen Naturstoffen.

## 9. Enzymatische Bildung der nichtproteinogenen Aminosäure-Monomere

### 9.1. 4-Hydroxyphenylglycin

Jede Verbindung der Vancomycin- oder Teicoplaninfamilie der Glycopeptid-Antibiotika enthält die nichtproteinogene Aminosäure Hpg. In Vancomycin und Teicoplanin ist an jeder oxidativen Vernetzung ein Hpg-Rest beteiligt, sodass

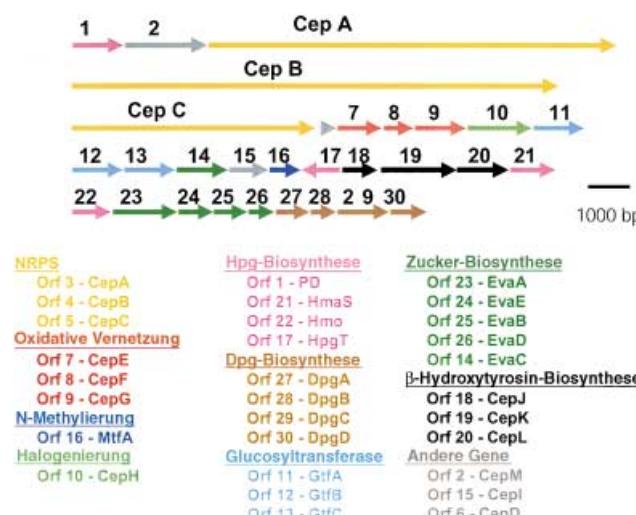


Abbildung 6. Die Gene des Chloreremomycin-Biosyntheseclusters.

die Anwesenheit dieser Aminosäure für die Konstitution des Antibiotikums notwendig ist. Das Verständnis der Biosynthese dieser ungewöhnlichen Aminosäure ist Voraussetzung dafür, den Aufbau der Glycopeptide zu verstehen.

Frühe Strukturuntersuchungen von Verbindungen der Vancomycin-Familie wiesen nach, dass alle Hpg-Reste in den fertigen Antibiotika-Molekülen  $\alpha$ -Konfiguration hatten.<sup>[68]</sup> Durch Fütterungsexperimente konnte markiertes racemisches Hpg als Monomer in das Glycopeptid eingebaut werden.<sup>[69-71]</sup> Mithilfe des <sup>13</sup>C-markierten Tyrosins wurde

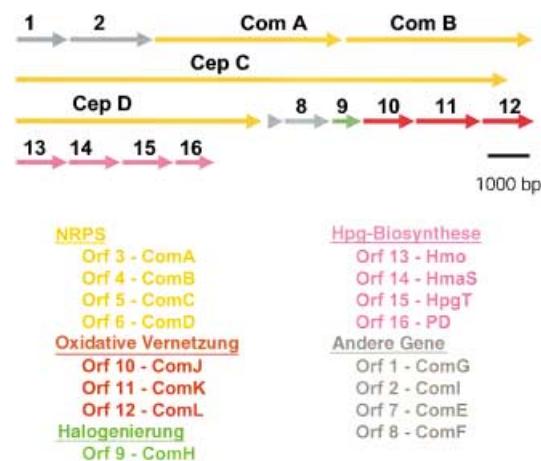


Abbildung 7. Die Gene des Complestatin-Biosyntheseclusters.

nachgewiesen, dass der Arylring von Hpg vom Tyrosin stammte und das  $\alpha$ -Kohlenstoffatom von Tyrosin in die Carboxylgruppe von Hpg eingeht (Schema 8).<sup>[69,71-73]</sup> Daher wurde die direkte Umwandlung von Tyrosin zu 4-Hydroxyphenylglycin über 4-Hydroxybenzoxyformiat mit einer unbekannten Zahl von Zwischenschritten vorgeschlagen (Schema 9).

Im Chloreremomycin-Gencluster könnten vier *orfs* an der Biosynthese von Hpg aus Prephensäure beteiligt sein. Sie haben Homologien zur Prephenat-Dehydrogenase (*orf1*), Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (*hppD*) (*orf21*), Mandelsäure-Oxidase (*orf22*) und einer Aminotransferase

Tabelle 5: Gene des teilweise aufgeklärten Biosyntheseclusters von Balhimycin.

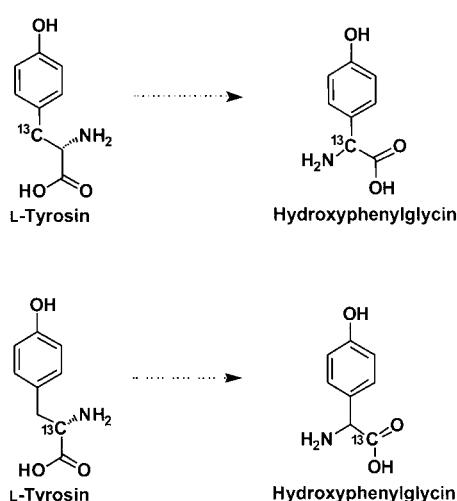
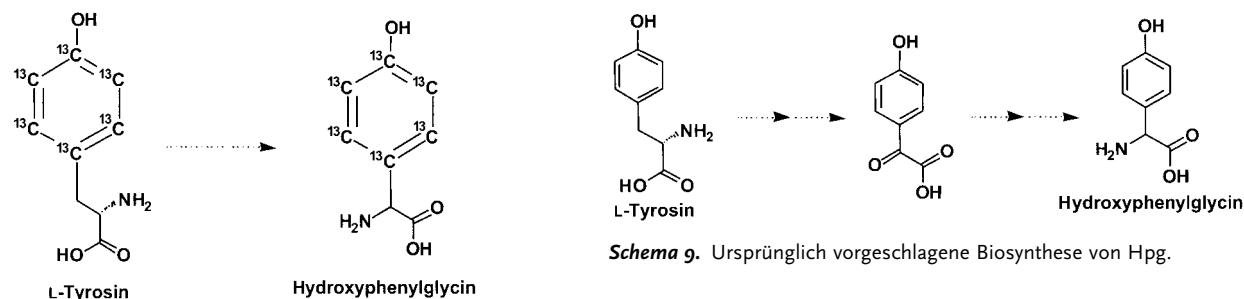
Orf-Nr.	Cep-Homologes (Orf-Nr.)	Stoffwechselweg	Proteinbezeichnung	vorhergesagte Funktion	Cofaktoren oder Cosubstrate	Relatives Startcodon	Relatives Stopcodon	Zahl der Basenpaare	Zahl der Aminosäuren	Transkript-Nr.	K <sup>[a]</sup>	R <sup>[b]</sup>	A <sup>[c]</sup>
1		Regulation	ComG			1	1047	1047	348	1	—	—	—
2	2	Transport	ComI	ABC-Transporter	ATP	1472	3598	2127	708	2	—	—	—
3	3	Acylhexapeptid-Aufbau	ComA	NRPS	CoA, ATP	3645	9995	6351	2116	3	+	+	—
4	3	Acylhexapeptid-Aufbau	ComB	NRPS	CoA, ATP	9992	14587	4596	1531	3	+	+	—
5	4	Acylhexapeptid-Aufbau	ComC	NRPS	CoA, ATP	14686	29382	14697	4898	4	—	—	—
6	5	Acylhexapeptid-Aufbau	ComD	NRPS	CoA, ATP	29420	35914	6495	2164	5	+	+	—
7	6	unbekannt	ComE			35919	36140	222	73	6	—	—	—
8		Regulation	ComF	Ionen-Antiporter		36179	37456	1278	425	7	—	—	—
9	10	Halogenierung	ComH	Halogenierung	NADPH	37485	38978	1494	497	8	+	+	—
10	8,9	Oxidative Brückenbildung	ComJ	Oxidation	NADPH	38996	40189	1194	397	9	+	+	—
11	7	Oxidative Brückenbildung	ComK	Oxidation	NADPH	40203	41474	1272	423	10	+	+	—
12		Oxidative Brückenbildung	ComL	Ferredoxin	NADPH	41519	41737	219	72	11	+	+	—
13	22	Hpg	Hmo	Oxidation	FAD	42933	41815	1119	372	12	+	+	—
14	21	Hpg	HmaS	Dioxygenierung	Fe	43936	42920	1017	338	13	—	—	—
15	17	Hpg	HpgT	Aminotransferase	PLP	44174	45520	1347	448	14	+	—	+
16	1	Hpg	PD	Prephenat-Dehydrogenase		45517	46665	1149	382	15	—	—	—

[a] K = Klon; [b] R = Reinigung; [c] A = Analyse.

**Tabelle 6:** Gene des Complestatin-Biosyntheseclusters.

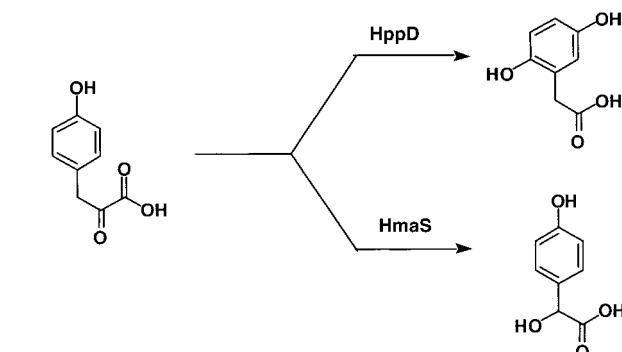
Orf-Nr.	Cep-Homologes (Orf-Nr.)	Stoffwechselweg	Proteinbezeichnung	vorhergesagte Funktion	Cofaktoren oder Cosubstrate	Relatives Startcodon	Relatives Stoppcodon	Zahl der Basenpaare	Zahl der Aminosäuren	Transkript-Nr.	K <sup>[a]</sup>	R <sup>[b]</sup>	A <sup>[c]</sup>
1	7	Oxidative Brückenbildung	OxyA	Oxidation	NADPH	224	1399	1176	391	1	—	—	—
2	8	Oxidative Brückenbildung	OxyB	Oxidation	NADPH	1449	2645	1197	398	2	—	—	—
3	9	Oxidative Brückenbildung	OxyC	Oxidation	NADPH	2795	4015	1221	406	3	—	—	—
4	10	Halogenierung	BhaA	Halogenierung	NADPH	4076	5551	1476	491	4	—	—	—
5	11	Glycosylierung	BgtfA	Zuckerübertragung		5634	6824	1191	396	5	—	—	—
6	12	Glycosylierung	BgtfB	Zuckerübertragung		6889	8118	1230	409	6	—	—	—
7	13	Glycosylierung	BgtfC	Zuckerübertragung		8266	9495	1230	409	7	—	—	—
8	14	TDP-Ketovansamin	OrfX'	Methylierung	SAM	9529	—	—	—	8	—	—	—

[a] K = Klon; [b] R = Reinigung; [c] A = Analyse.

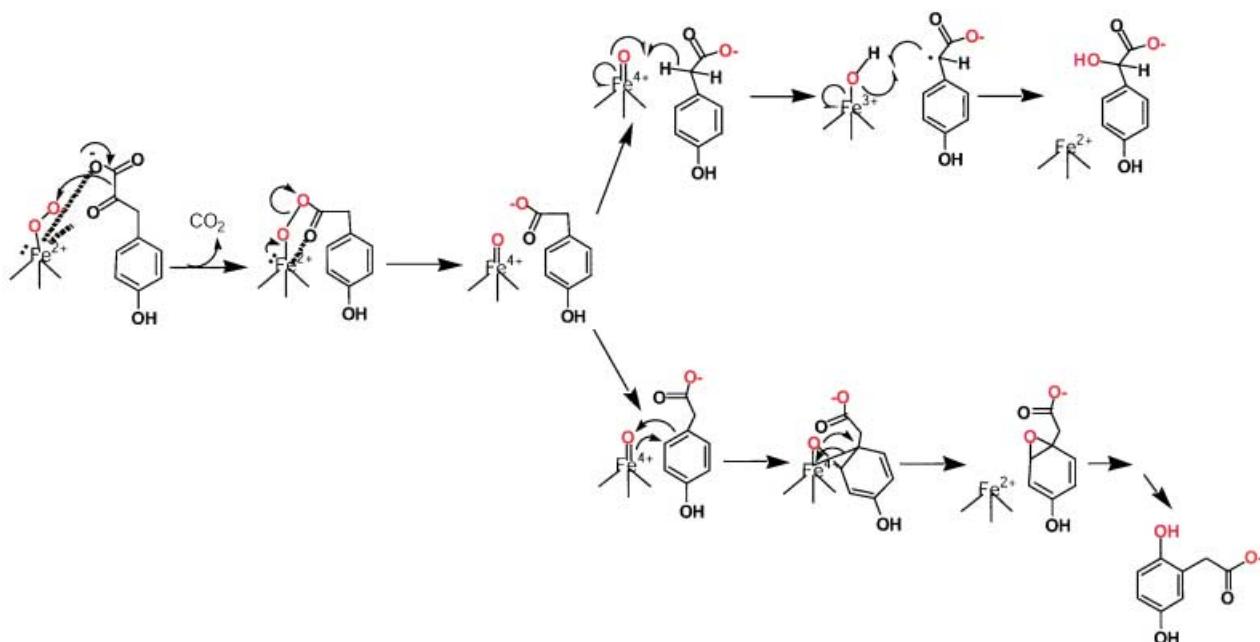


(orf17). Die Enzyme sind charakterisiert und die vorhergesagten Funktionen bestätigt worden.<sup>[74,75]</sup>

Das Homologe der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase (orf21) wurde als Hydroxymandelsäure-Synthase bezeichnet (HmaS).<sup>[74,75]</sup> Das Enzym wandelt 4-Hydroxyphenylpyruvat in (*S*)-4-Hydroxymandelsäure um (Schema 10). Der Mechanismus für diese Reaktion wurde wegen der Homologie des Enzyms zu HppD vorgeschlagen (Schema 11). Die Aktivität



der Enzyme HmaS und HppD hängen von der Eisenkonzentration ab. Die einleitenden Schritte beider Enzyme sind gleich: bei beiden erfolgt eine Decarboxylierung und eine Oxidation, sodass 4-Hydroxyphenylacetat oder eine Eisen-4-oxo-Verbindung erhalten werden. Anschließend trennen sich die Reaktionsmechanismen von HppD und HmaS. Im aktiven Zentrum von HppD wird der Arylring epoxidiert und die Seitenkette umgelagert; als Produkt erhält man Homogentisinsäure. Bei der Umsetzung durch HmaS könnte ein Radikal oder ein Kation in  $\alpha$ -Stellung zur Säuregruppe gebildet werden, während sich die aktive Eisen-Oxo-Species bildet. Das Auffangen der Eisen-3-Oxo-Zwischenstufe erfolgt regiospezifisch am Benzylkohlenstoffatom unter Bildung des Endprodukts (*S*)-4-Hydroxymandelsäure.



Schema 11. Gegenüberstellung der Reaktionsmechanismen von HppD und HmaS.

Das Homologe der Mandelsäure-Oxidase (Orf 22) setzt (*S*)-4-Hydroxymandelsäure zu 4-Hydroxybenzoylformiat um und wurde als 4-Hydroxymandelsäure-Oxidase (Hmo) bezeichnet. Hmo ist ein Flavoenzym mit Flavinmononukleotid (FMN) als Cofaktor und ist für Substrate mit *S*-Konfiguration spezifisch.<sup>[74]</sup>

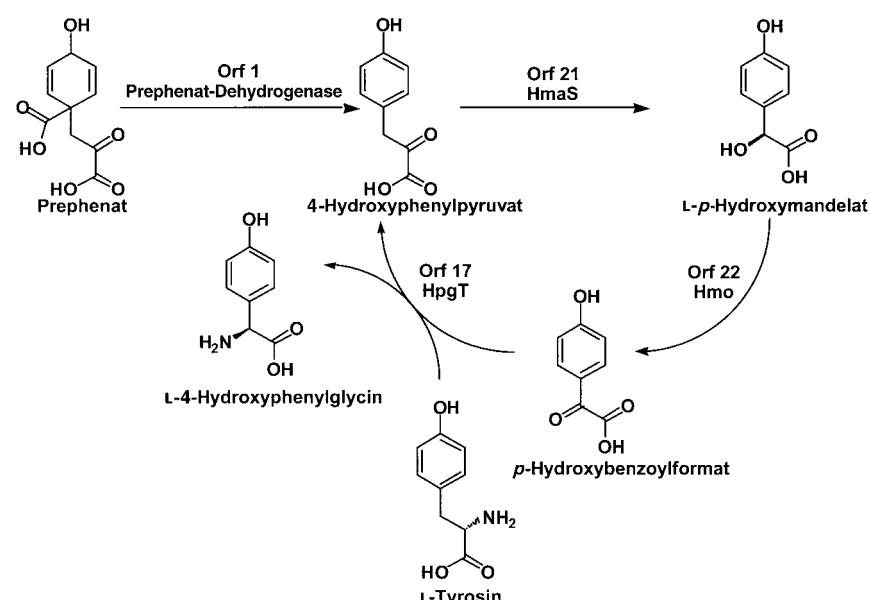
Das Aminotransferase-Homologe im Chloreremomycin-Cluster (Orf 17) ist ein Pyridoxalphosphat-abhängiges Enzym, das 4-Hydroxybenzoylformiat mit L-Tyrosin als Aminodonor in L-4-Hydroxyphenylglycin umwandelt.<sup>[74]</sup> Die Aminotransferase erhielt die Bezeichnung L-Hydroxyphenylglycin-Transaminase (HpgT). Durch die Umsetzung von L-Tyrosin mithilfe der HpgT wird die Umwandlung von Prephenat und L-Tyrosin zu L-Hpg über den in Schema 12 gezeigten Zyklus möglich. Dieser Zyklus ist katalytisch in Bezug auf Prephenat und stöchiometrisch für L-Tyrosin.

Die Gene, die PD (=Prephenat-Dehydrogenase), HmaS, Hmo und HpgT kodieren, finden sich im Cluster für calciumabhängige Antibiotika (CDA) und für Complestatin. Beide Verbindungen enthalten Hpg (Schema 13). Das HpgT-Enzym aus dem Complestatin-Gencluster wurde charakterisiert; es setzt L-Hpg und 3,5-Dichlor-L-4-hydroxyphenylglycin in umgekehrter Richtung um.<sup>[61]</sup> Man nimmt an, dass diese vier Enzyme den Stoffwechselweg festlegen, nach dem Hpg für alle Glycopeptid-Antibiotika und alle anderen Hpg-haltigen Verbindungen (z. B. Ramoplanin, Nocardicin) synthetisiert wird.

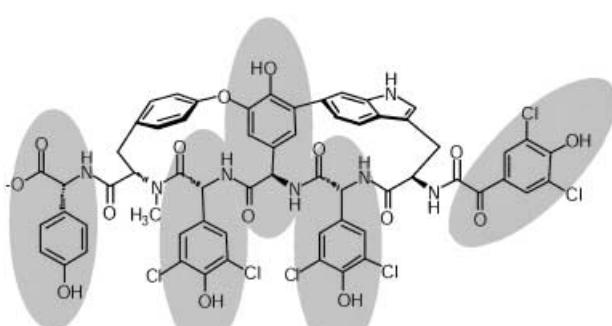
### 9.2. 3,5-Dihydroxyphenylglycin

Vancomycin und Teicoplanin enthalten die nichtproteinoogene Aminosäure 3,5-Dihydroxyphenylglycin in Position 7 bzw. den Positionen 3 und 7. Erste Fütterungsexperimente ergaben, dass alle Kohlenstoffatome des 3,5-Dihydroxyphenylglycin in den Verbindungen Avoparcin, Vancomycin, Aradacin und Ristocetin aus Acetat stammen; dies ließ als Basisreaktion eine Polyketid-Synthasereaktion vermuten.<sup>[69–71,76]</sup> Der Stoffwechselweg vom hypothetischen Tetraketid zur Aminosäure allerding war unklar.

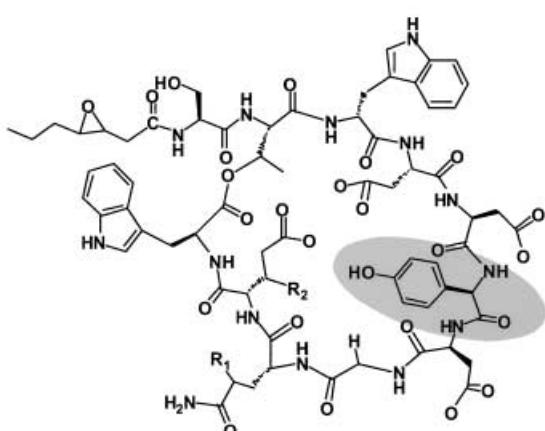
Im Chloreremomycin-Cluster werden vier *orfs* (orf 27, 28, 29 und 30) mit der Biosynthese von 3,5-Dihydroxyphenyl-



Schema 12. Biosynthese von L-Hpg.



Complestatin

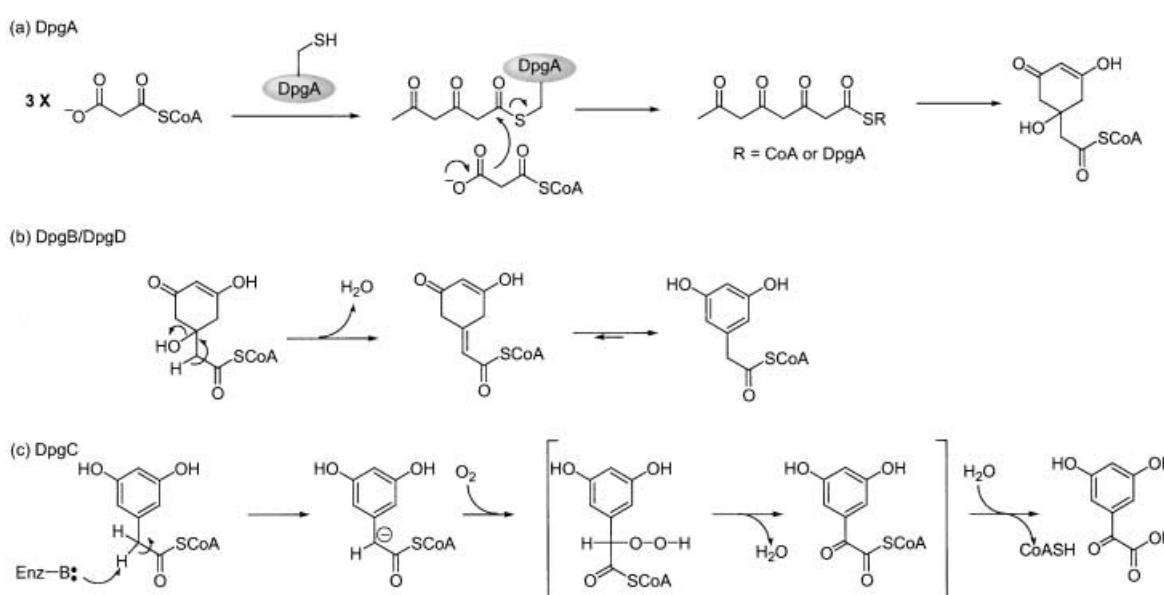


Calcium-abhängiges Antibiotikum

**Schema 13.** Hpg-Reste in Complestatin und einem Calcium-abhängigen Antibiotikum (Chloreremomycin).

glycin in Verbindung gebracht. *Orf27* ist zur Chalcon-Synthase homolog, die zur Familie der Typ-III-Polyketid-Synthasen gehört, und die *orfs* 28–30 gehören zur Crotonase-Superfamilie. Der Mechanismus der Chalcon-Synthase, ein Enzym der Pflanzenflavonoid-Bildung, dient als Vorbild für *Orf 27*. Die *Orfs* 28–30 gehören zur Crotonase-Superfamilie, einer der vielfältigsten Enzym-Superfamilien, in der über 15 verschiedene Reaktionen zusammengefasst sind.<sup>[77]</sup> Darunter fallen Hydratisierungen/Dehydratisierungen, Isomerisierungen, Knüpfungen und Brüche von Kohlenstoff-Bindungen und Bildung von Thioestern.

Der Vorschlag für die Biosynthese von 3,5-Dihydroxyphenylglycin ist in Schema 14 illustriert. DpgA (*Orf 27*) wandelt 4 Malonyl-CoA-Einheiten in ein lineares Polyketid um und steuert die Decarboxylierung und regiospezifische Cyclisierung.<sup>[78]</sup> Durch die Expression von DpgA–D in *E. coli* wurden die Reinigung der Enzyme und erste mechanistische Untersuchungen möglich.<sup>[79]</sup> DpgB und DpgD haben beide eine Enoyl-CoA-Hydrataseaktivität, wobei sie physiologisch vermutlich eine Dehydratase-Reaktion katalysieren. Werden DpgB und DpgD zu Testansätzen mit DpgA und Malonyl-CoA gegeben, nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung von 3,5-Dihydroxyphenylacetyl-CoA um mehr als das Dreißigfache zu. DpgC allein ist in der Lage, dieses Zwischenprodukt in 3,5-Dihydroxyphenylglyoxalat umzuwandeln, welches dann durch HpgT (siehe Abschnitt 9.1) zu 3,5-Dihydroxyphenylglycin transaminiert wird.<sup>[78,79]</sup> Die DpgC-Reaktion umfasst eine  $O_2$ -abhängige Vier-Elektronen-Oxidation der  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>-Gruppe des Phenylacetyl-CoA-Skeletts zur C=O-Gruppe des Phenylglyoxalyl-CoA und die anschließende Hydrolyse des Thioesters zum Phenylglyoxalat.<sup>[79]</sup>



**Schema 14.** Vorschlag für die Biosynthese von L-3,5-Dihydroxyphenylglycin (L-Dpg).

9.3.  $\beta$ -Hydroxytyrosin

An den Positionen 2 und 6 in Vancomycin und Teicoplanin befinden sich  $\beta$ -Hydroxy-Tyrosinreste. Dabei wird Position 2 vom 2R,3R-3-OH-Diastereomeren eingenommen, während sich in Position 6 das 2S,3R-3-OH-Isomere befindet. Wie in Abschnitt 10 beschrieben ist, wird für die CepA-Untereinheit des NRPS-Reaktionspfads eine Epimerase (E) in Modul 2 vorhergesagt (NRPS = nichtribosomal Peptid-synthetase); dies setzt voraus, dass ein 2S,3R-3-OH-Tyr-S-T<sub>2</sub>-Acyl-Enzym-Intermediat vor der Kettenelongation epimerisiert wird (T = Thiol-Domäne). Daraus wiederum würde folgen, dass die A-Domänen in den beiden Modulen 2 und 6 das L- $\beta$ -OH-Tyrosin (2S,3R) aktivieren; interessant ist dann die Frage, wie und wann die  $\beta$ -Oxygenierung erfolgt.

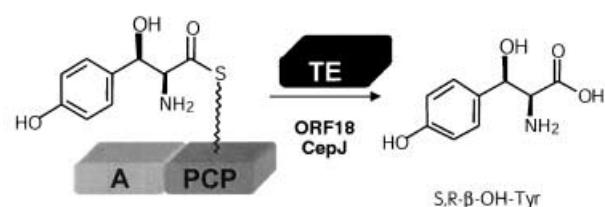
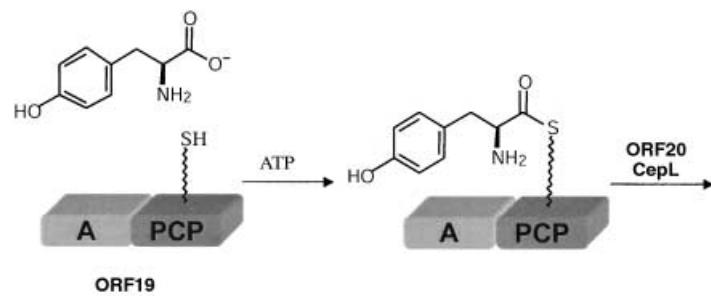
Die drei *orf*s, *cep* 18, 19, 20, die in dem Cep-Biosynthesecluster nebeneinander liegen, weisen auf einen Reaktionspfad von L-Tyr zu L- $\beta$ -OH-Tyr hin. Orf 19 ist eine alleinstehende Untereinheit aus zwei Domänen zur Adenylierung und Thiolierung (A-T); ihr wird die Aktivierung von L-Tyr als Tyr-AMP und die Überführung in das kovalente Thioesterintermediat L-Tyr-S-T-Domäne zugeschrieben (Schema 15; AMP = Adenosinmonophosphat). Nach den Ergebnissen einer Computer-Analyse sollte Orf 20 ein Hämprotein sein; dies wurde durch Expression in *E. coli* und anschließende Reinigung verifiziert (Hubbard und Walsh, unveröffentlichte Ergebnisse). Orf 20 ist wahrscheinlich die  $\beta$ -Hydroxylase, die den Tyrosylthioester von Orf 19 zum gebundenen  $\beta$ -OH-Tyr-S-Orf 19-Produkt umsetzt. Orf 20 sollte eine Thioesterase-Aktivität haben und das  $\beta$ -OH-Tyr für die weitere Reaktion zum Einbau in das Heptapeptid (katalysiert durch die Untereinheiten CepA und CepB) freisetzen.

Diese Funktionszuordnung zu Cep 18–20 wird durch Ergebnisse gestützt, nach denen zwei Homologe von Orf 19 und 20, NovH und NovI im Biosynthesecluster von Novobiocin<sup>[80,81]</sup> tatsächlich die ersten beiden Schritte des in Schema 16 dargestellten Reaktionsweges katalysieren und das kovalente 2S-3R-3-OH-Tyr-S-NovI-Zwischenprodukt auf dem Weg zum Aminocumarinring bilden.<sup>[81]</sup> Auch im Biosynthesecluster des antimykotischen Nikkomycin Z (Schema 17)<sup>[82,83]</sup> gibt es drei *orf*s, *nikP1*, *nikQ* und *nikP2*, die mit *cep* 18–20 homolog sind. Diese drei Nikkomycin-Proteine wurden nach heterologer Expression in *E. coli* gereinigt und ihre vorhergesagte Funktion betätigt. NikP1 stellt ein kovalentes His-S-Enzym-Zwischenprodukt an seiner T-Domäne her, die Hämprotein-Hydroxylase NikQ setzt es zu  $\beta$ -OH-His-S-NikP1 um und die Thioesterase NikP2 setzt das  $\beta$ -Hydroxyhistidin frei.<sup>[83]</sup>

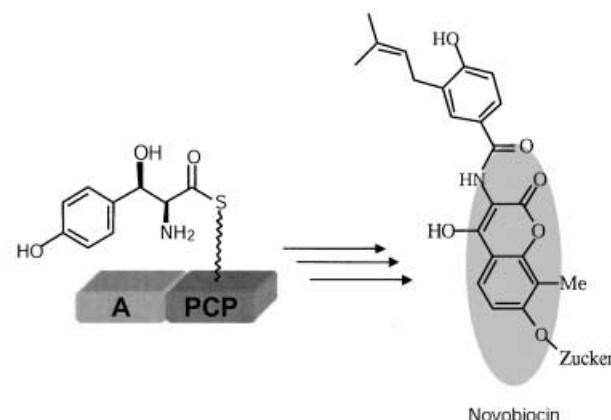
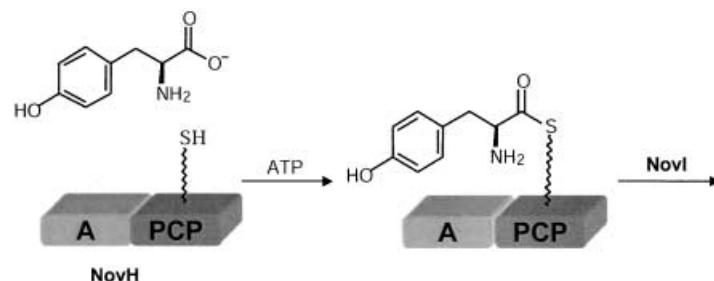
Cep 18–20 ist eine Kassette aus drei Enzymen, die einen Teil des L-Tyr-Pools regio- und stereospezifisch mit O<sub>2</sub> hydroxyliert und dann L- $\beta$ -OH-Tyr für den NRPS-Stoffwechselweg freisetzt.

9.4. Chlorierung von  $\beta$ -Hydroxytyrosin

Die beiden  $\beta$ -Hydroxytyrosine in den Positionen 2 und 6 von Vancomycin und Teicoplanin sind in 3-Stellung des

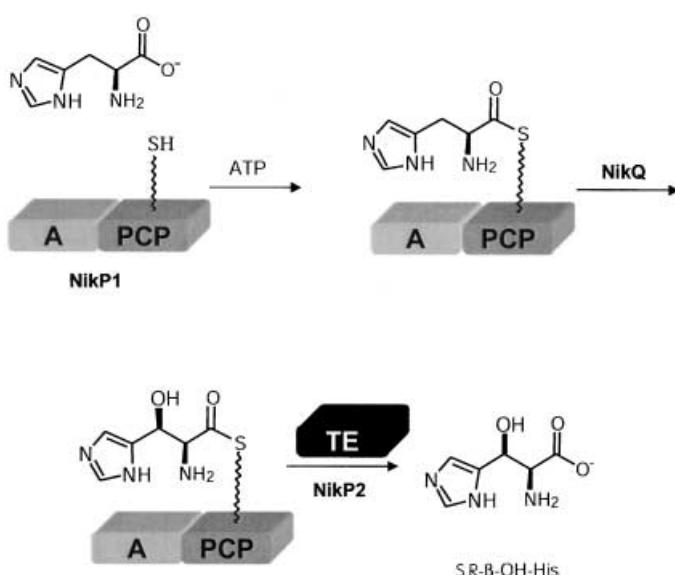


Schema 15. Vorschlag für die Biosynthese von S,R- $\beta$ -Hydroxy-L-tyrosin in Chloreremomycin.



Schema 16. Biosynthese von S,R- $\beta$ -Hydroxy-L-tyrosin in Novobiocin.

Arylringe neben der phenolischen OH-Gruppe chloriert. Das überbrückte Heptapeptidgerüst von Vancomycin ist ein einzelnes Atropisomer an der 2-4- und der 4-6-Diaryletherbindung. Über den Mechanismus und Zeitpunkt der biosynthetischen Chlorierung ist weder bei diesem Stoffwechselweg noch bei der Biosynthese von Complestatin mit den 3,5-Dichlor-4-hydroxyphenylglycinresten im fertig vernetzten Antibiotikum viel bekannt. Im Cep-Cluster (Orf 10 oder



**Schema 17.** Biosynthese von *S,R*- $\beta$ -Hydroxy-*L*-histidin in Nikkomycin X.

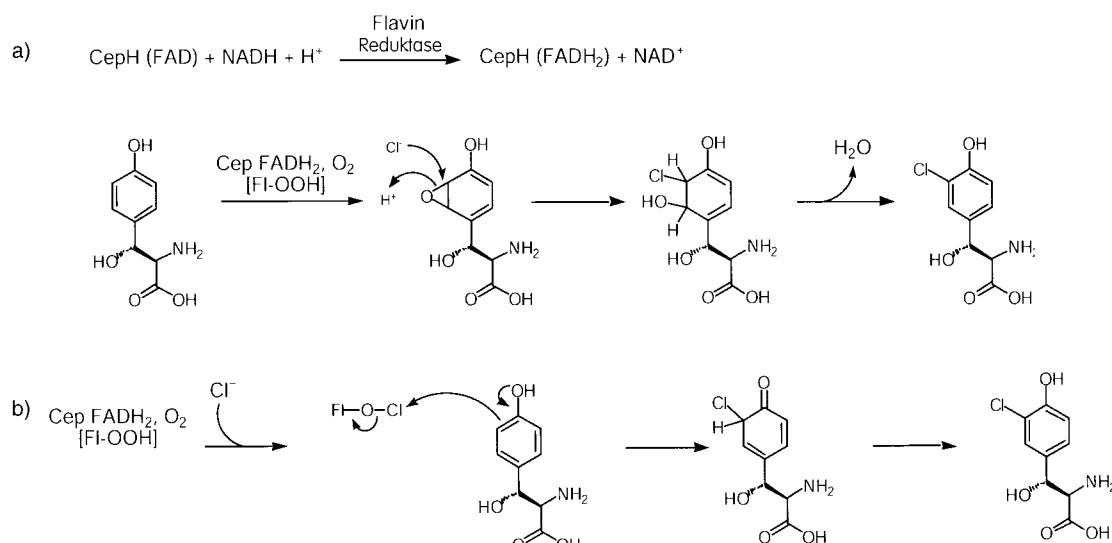
CepH) und im Com-Cluster (Orf 9 oder ComH) gibt es je ein Protein, dem wegen einer Homologie zu anderen Nicht-Häm-Halogenasen Halogenasenfunktion zugeschrieben wird.<sup>[84-86]</sup> vor allem zu einem Protein in der Chlortetracyclin-Biosynthese.<sup>[87]</sup> Bei der Reinigung werden CepH und ComH beide wegen des stöchiometrisch gebundenen Flavin-Coenzys gelb; keines der beiden Enzyme enthält Eisen in nachweisbaren Mengen (M. Burkart und C. Walsh, unveröffentlichte Ergebnisse). Wenn diese tatsächlich katalytisch aktive Komponenten einer Halogenase mit einer Spezifität für Arylringe sind, scheint der von Pee et al.<sup>[88]</sup> vorgeschlagene Mechanismus plausibel, nach dem die Flavoenzyme als Epoxidasen der elektronenreichen phenolischen Ringe der Tyr- oder Hpg-Seitenketten reagieren (Schema 18); das vorübergehend entstehende Epoxycyclohexadien würde dann durch ein

Chloridion geöffnet und zum Endprodukt 3-Chlortyrosin dehydratisiert.

Eine andere Möglichkeit wäre die Bildung eines Flavinhydroperoxids durch die FADH<sub>2</sub>-Form von Orf 10 (FAD = Flavinadenindinucleotid); dabei würde als direkt chlorierendes Agens Flavinhypochlorid (Fl-OCl) entstehen. Es ist unklar, wann die Chlorierung erfolgt, ob an der freien Aminosäure (z. B. L- $\beta$ -OH-Tyr), an den Aminoacyl-S-T-Domänen des NRPS-Synthesepfads (z. B.  $\beta$ -OH-Tyr-S-T<sub>2</sub>), nach dem Zusammenbau der nichtlinearen Heptapeptidkette oder nach der Freisetzung der Verbindung. Wahrscheinlich findet die Chlorierung der Arene vor der Verknüpfung der Seitenketten statt, die in Abschnitt 11 diskutiert wird, denn in Mutanten, deren enzymatische Vernetzung blockiert ist, häuft sich das chlorierte, lineare Heptapeptid an.<sup>[62]</sup>

## 10. Der nichtribosomale Peptidsynthetase-Multienzymkomplex

Wenn die nichtrproteinogenen Aminosäuremonomere für das Heptapeptid erst einmal vorliegen und die Voraussetzungen für die Vancomycin-Synthese damit geschaffen sind, kommt die nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS) ins Spiel. Das Cep-Gencluster kodiert drei benachbarte große offene Leserahmen (*orf3-5*) für die drei Untereinheiten CepA, CepB und CepC (Abbildung 8), aus denen sich die Heptapeptid-Synthetase zusammensetzt. Mit einer angenommenen Stöchiometrie von 1:1:1 machen CepA (336 kDa), CepB (436 kDa) und CepC (200 kDa) zusammen einen Multienzymkomplex von fast einem Megadalton (972 kDa) aus (Abbildung 8). Der Organisationsplan dieses NRPS-Pfads scheint dem Schema einer NRPS mit einem zentralen Thioester zu folgen.<sup>[89-91]</sup> Sieben Aminosäuren müssen aktiviert werden, jede von einer der sieben Adenylierungsdomänen (A), deren Platzierung in der Reaktionsfolge die Sequenz des Heptapeptids bestimmt, das am Ende freigesetzt wird.



**Schema 18.** Mögliche Reaktionsmechanismen von ComH. a) Direkte Epoxidierung und Ringöffnung mit Chlorid als Nucleophil. b) Erzeugung eines elektrophilen Chlorids für eine elektrophile aromatische Substitution.

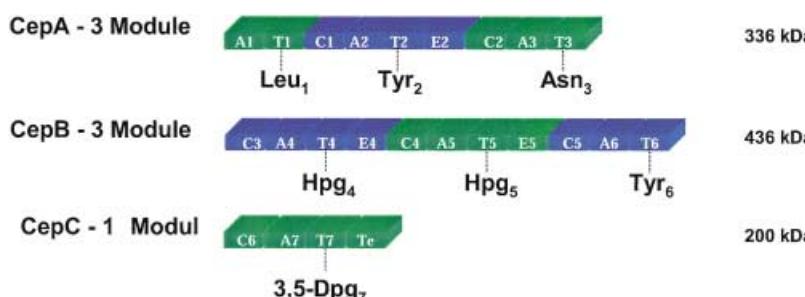
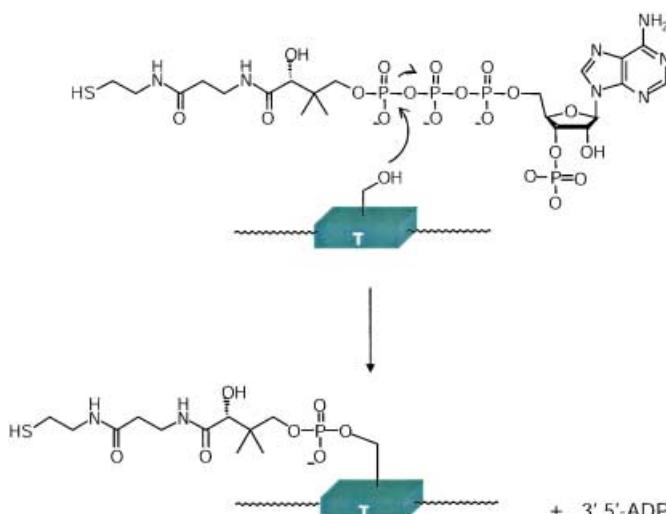


Abbildung 8. NRPS-Multienzymkomplex für Chloreremomycin.



Schema 19. Phosphopantethenyl-Übertragung auf die Thiol-Domäne.

Alle A-Domänen selektieren eine spezifische Aminosäure, aktivieren sie als Aminoacyl-AMP und transferieren dann den Aminoacylrest auf eine gepaarte Peptidyl-Carrierprotein-Domäne, auch Thiol-Domäne (T) genannt wegen des posttranslational eingeführten Phosphopantethinylarms, der mit einem Cysteamin-Thiolrest endet; dieser reagiert als Nucleophil mit dem Aminoacyl-AMP zur Aminoacyl-S-T-Domäne (Schema 19). Die sieben gepaarten A-T-Domänen aktivieren also Aminosäuren und binden sie als kovalente Aminoacyl-S-Enzym-Zwischenprodukte (Abbildung 9). Im CepA/CepB/CepC-Komplex sind die sieben Module verteilt wie 3:3:1; Leu<sub>1</sub>,  $\beta$ -OH-Tyr<sub>2</sub> und Asn<sub>3</sub> werden an CepA aktiviert, Hpg<sub>4</sub> und Hpg<sub>5</sub> an den Modulen 4 und 5 sowie  $\beta$ -OH-Tyr<sub>6</sub> an Modul 6 befinden sich in CepB. CepC trägt das siebte Modul, das mit Dpg<sub>7</sub> in Form des Thioesters beladen wird.

Für die sechs Peptidbindungen, die in einem Heptapeptid geknüpft werden müssen, gibt es sechs Kondensationsdomänen (C), zwei in CepA, drei in CepB und eine in CepC. Jedes Mal, wenn eine C-Domäne eine Peptidbindung knüpft, wird die wachsende Kette von der T-Domäne auf die nächste stromabwärts liegende T-Domäne übertragen. So bilden beispielsweise zwei Kettenelongations-Schritte, die durch die C-Domänen in Modul 2 und 3 katalysiert werden, einen Tripeptidyl-S-T<sub>3</sub>-Rest am C-Terminus von CepA. Der nächste Schritt, in dessen Verlauf eine Peptidbindung geknüpft wird, umfasst auch die Übertragung der Peptidkette in *trans*-

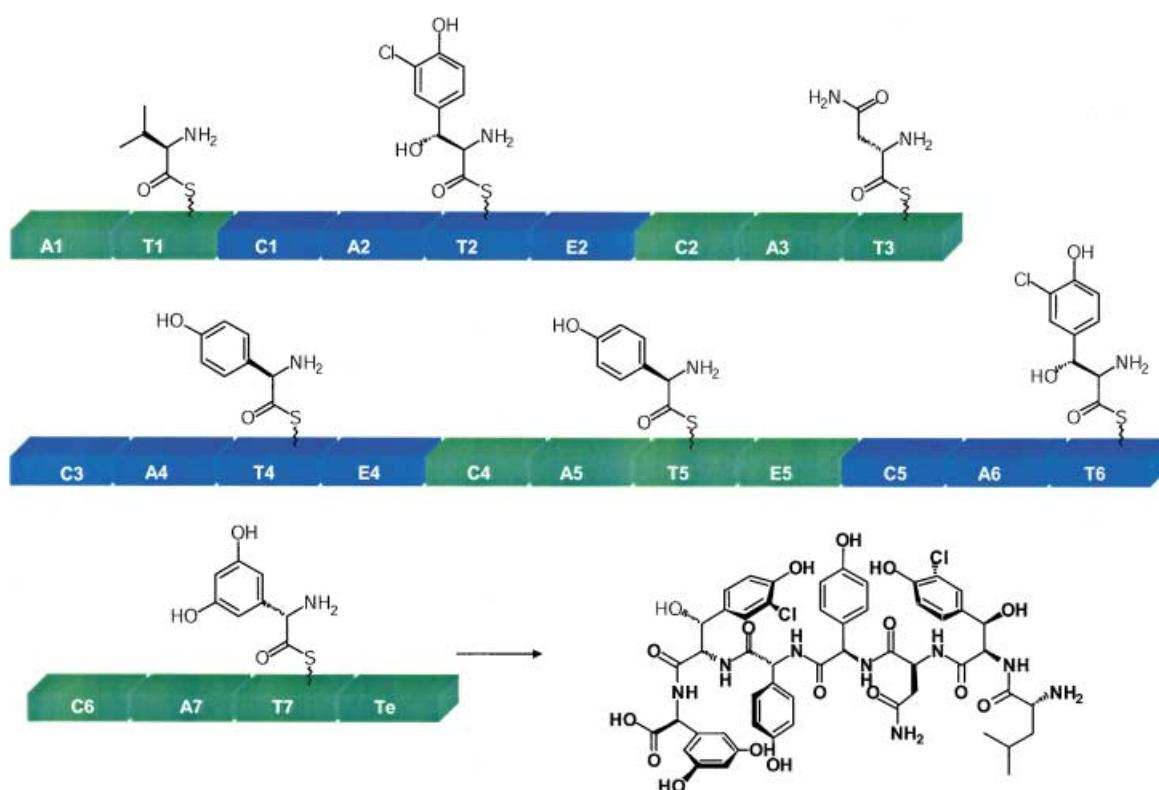


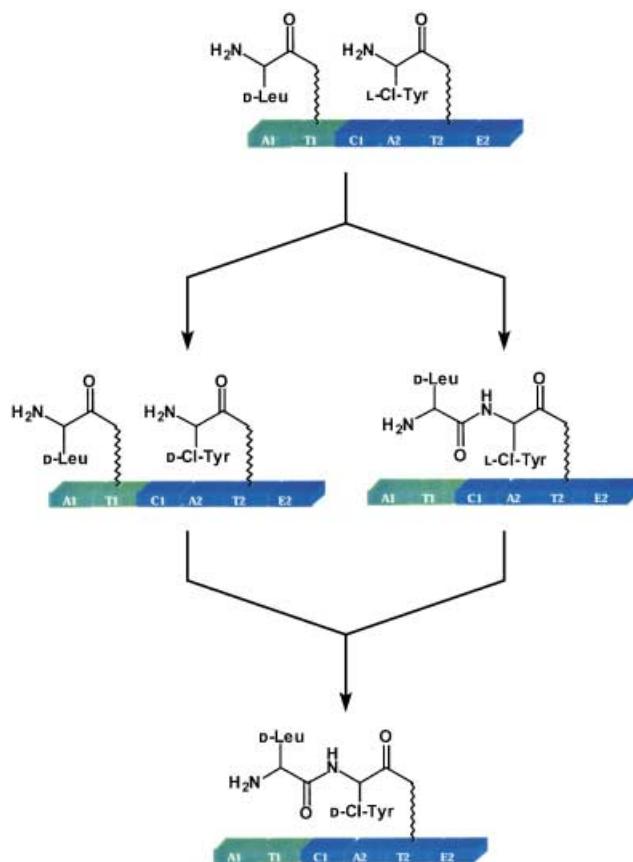
Abbildung 9. NRPS-Multienzymkomplex für Chloreremomycin mit aktivierten Aminosäuren an den Thiol-Domänen.

Stellung zum Hpg-S-T<sub>4</sub>-Rest über die Grenzfläche zwischen CepA und CepB. Das Wachstum der Peptidkette an einem solchen NRPS-Multienzymkomplex umfasst eine Kaskade länger werdender Peptidyl-S-Enzym-Zwischenprodukte, die vor der zufälligen Hydrolyse durch Wasser während des gesamten Reaktionsweges geschützt werden.

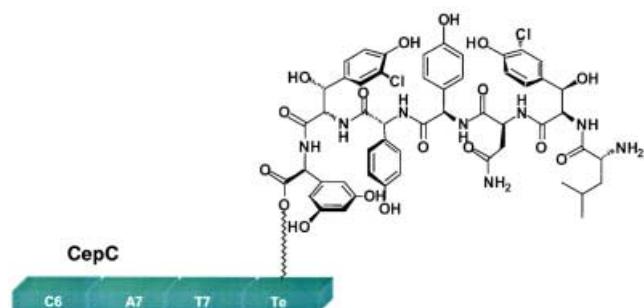
Die Heptapeptide von Vancomycin und Teicoplanin haben die Konfiguration D-D-L-D-D-L-L. Im Allgemeinen sind sogar in Bakterienzellen nur die L-Aminosäuren in nennenswerten Konzentrationen verfügbar, es sei denn, es gibt spezielle Aminosäureracemasesen, so wie für Alanin am Anfang der Peptidoglycansynthese.<sup>[92,93]</sup> Auch die Hpg-Reste, die durch die Orfs 21, 22 und 17 produziert werden, liegen in der L-Form vor, obwohl es sich um nichtproteinogene Aminosäuren handelt.<sup>[74]</sup> Die gemeinsame Lösung für die Bildung von D-Aminosäuren für nichtribosomal synthetisierte Peptid-Antibiotika ist eine In-situ-Epimerisierung am NRPS-Enzymkomplex durch spezielle Epimerasedomänen (E).<sup>[94,95]</sup> E-Domänen befinden sich in Modulen, in denen eine L-Aminoacyl-S-T-Acyl-Enzymdomäne in eine D-Aminoacyl-S-T-Domäne epimerisiert wird (Abbildung 9). Dies kann an den freien Aminoacyl-S-T-Intermediaten geschehen, bevor die Peptidbindung durch die C-Domäne geknüpft wird, oder im Anschluss an die Reaktion der C-Domäne; in diesem Fall muss die Peptidyl-S-T-Domäne epimerisiert werden, bevor die wachsende Kette auf das nächste stromabwärts liegende Modul übertragen wird (Schema 20). Bei Überprüfung des CepA/CepB/CepC-Komplexes ließen sich die drei erwarteten E-Domänen in den Modulen 2, 4 und 5 in der richtigen regiospezifischen Anordnung nachweisen, um D-β-OH-Tyr<sub>2</sub>, D-Hpg<sub>4</sub> und D-Hpg<sub>5</sub> während der Kettenelongation zu bilden. Mit Modul 1 ist allerdings keine E-Domäne assoziiert,<sup>[60]</sup> was die Frage aufwirft, wie dieses D-konfigurierte Zentrum gebildet wird. In das heterolog in *E. coli* exprimierte CepA-Modul 1 können L-Leu und D-Leu als Leu-S-T-Acyl-Enzymkomplex aktiviert und eingebaut werden.<sup>[96]</sup> Wenn dieser Weg im Produzenten *A. orientalis* aktiv ist, impliziert dies eine Leucin-Epimerase, die bislang noch nicht identifiziert wurde.

Wurde die vollständige D-D-L-D-D-L-L-Heptapeptidylkette dann auf die letzte Thiol-Station T<sub>7</sub> übertragen, muss der kovalente Heptapeptidyl-Thioester gespalten werden, um die Enzymkette für den nächsten Katalysezyklus freizumachen. Fast alle NRPS-Komplexe haben als letzte C-terminale Domäne eine spezialisierte Thioesterase (TE) und eine solche findet man auch als letzte der 24 Domänen in der Cep-Synthase, am C-Terminus von CepC. Alle TE-Domänen haben im aktiven Zentrum Serinreste, die als Nucleophile die Acylkette übertragen; dabei entsteht das Heptapeptidyl-O-Ser-TE-Acyl-Enzym (Schema 21). TE-Domänen können spezifische Cosubstrate für die Deacylierung beispielsweise so verwenden, dass eine Makrocyclisierung mit einer nucleophilen Gruppe im Inneren der Acylkette abläuft; im vorliegenden Fall wird das Acyl-O-Zwischenprodukt intermolekular hydrolysiert und das D-D-L-D-D-L-L-Heptapeptid als einziges Produkt der Gesamtreaktion freigesetzt.<sup>[97]</sup>

Zwei weitere Eigenschaften des speziellen NRPS-Reaktionspfads für das Vancomycin/Chloreremomycin-Heptapeptidgerüst bedürfen einer Anmerkung. Gegenwärtig noch unbekannt ist der Zeitpunkt der β-Hydroxylierung und



**Schema 20.** Zwei mögliche Wege für den Zeitpunkt der Epimerisierung. Der obere Weg zeigt die Epimerisierung vor der Knüpfung der Peptidbindung. Der untere Weg zeigt die Knüpfung der Peptidbindung vor der Epimerisierung.



**Schema 21.** Fixierung des linearen Chloreremomycin-Heptapeptids über eine Thioesterbindung an die Thiodomäne von CepC vor der Abspaltung.

Ringchlorierung von Tyr<sub>2</sub> und Tyr<sub>6</sub>. Solange die Module 2 und 6 nicht (heterolog) exprimiert und ihre A-Domänen getestet sind, ist nicht klar, ob Tyr, β-OH-Tyr oder 3-Chlor-Tyr das bevorzugte Substrat ist. In Abschnitt 9.3 diskutierten wir die wahrscheinliche Hydroxylierung von Tyr durch die Orfs 18, 19 und 20 und vermuteten 2S-3R-3-OH-Tyr als Substrate für die Domänen A<sub>2</sub> und A<sub>6</sub>.

Außerdem noch offen ist die Stereospezifität der C-Domänen als Peptidsynthetasen, die von der zeitlichen Koordinierung der Domänen E<sub>2</sub>, E<sub>4</sub> und E<sub>5</sub> abhängt. Falls

die freien Aminoacyl-S-T-Intermediate (2S-3R-3-OH-Tyr-S-T<sub>2</sub>, 2S-Hpg-T<sub>4</sub> und 2S-Hpg-S-T<sub>5</sub>) alle vor der Knüpfung der Peptidbindungen epimerisiert werden, ist die C<sub>1</sub>-Peptid synthase-Domäne D/D-spezifisch für Donor und Acceptor, die C<sub>4</sub>-Domäne ist L/D-spezifisch und die C<sub>5</sub>-Domäne ist D/D-spezifisch (Tabelle 7). Wenn die E-Domänen in den Modu-

**Tabelle 7:** Spezifität der Kondensationsdomänen in Chloreremomycin.

Kondensations- Domäne	Peptidyl-Donor- Spezifität	Aminoacyl-Acceptor- Spezifität
C <sub>1</sub>	D	D
C <sub>2</sub>	D	L
C <sub>3</sub>	L	D
C <sub>4</sub>	D	D
C <sub>5</sub>	D	L
C <sub>6</sub>	L	L

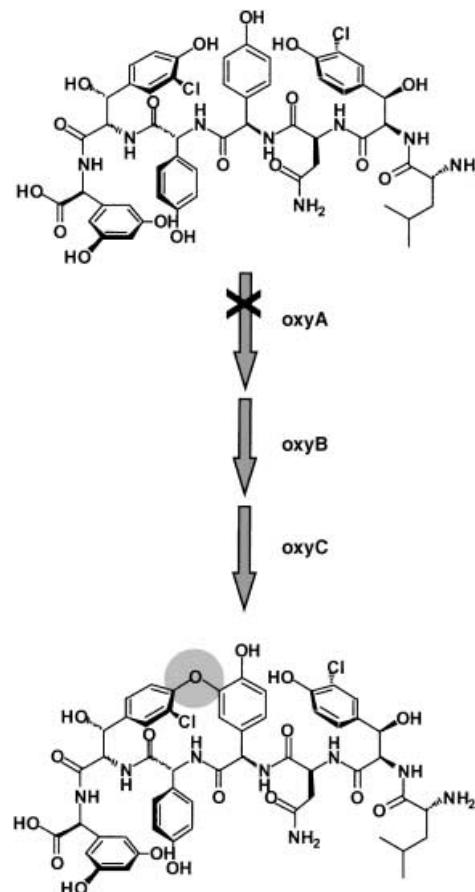
len 2, 4 und 5 nach dem Kondensationsschritt durch die C-Domäne reagieren, ist die C<sub>2</sub>-Domäne D/L-spezifisch, die C<sub>6</sub>-Domäne L/L-spezifisch und die C<sub>5</sub>-Domäne D/L-spezifisch. Für alle kombinatorischen Biosyntheseschemata, in denen Bibliotheken von C-Domänen erstellt werden sollen, müssen die stereochemischen Präferenzen von Donor und Acceptor bekannt sein. Unabhängig vom Reaktionszeitpunkt der Epimerisierungsdomänen müssen die C<sub>2</sub>- und C<sub>5</sub>-Domäne D/L-spezifisch sein, während die C<sub>6</sub>-Domäne L/L-spezifisch ist. Falls die C<sub>1</sub>- und C<sub>4</sub>-Domänen D/D-spezifisch wären, wären sie auffällige Peptid synthasekomponenten in einer Enzymsbibliothek.

## 11. Nachbearbeitung des Heptapeptides

### 11.1 Vernetzung der Reste 2-4-6 und 5-7 in Vancomycin

Ist die Synthese des vollständigen, chlorierten acyclischen Heptapeptides durch CepA, CepB und CepC beendet, beginnen die Nacharbeiten zur Vernetzung der Seitenketten und damit zur Versteifung des Moleküls. Es ist bisher nicht bekannt, ob eine oder mehrere der Brückenbindungen auf der Stufe des Heptapeptidyl-S-CepC-Acyl-Enzym-Intermediats geknüpft werden oder ob die Freisetzung der Kette der Erkennung durch die brückenbildenden Hämproteine vor ausgeht. Das Cep-Cluster und das teilweise sequenzierte Balhimycin-Cluster,<sup>[62]</sup> die beide die Synthese identischer Heptapeptidgerüste kodieren, enthalten drei benachbarte *orf*s (z. B. Cep 7, Cep 8, Cep 9), die wegen ihrer Homologie zu Cytochrom-P450-Enzymen als Hämprotein-Gene angesehen werden.<sup>[60, 62]</sup> Eine vergleichbare Sequenz aus dem A47934-Cluster aus *S. toyocaensis* zeigt, dass für ein Heptapeptidgerüst vom Teicoplanintyp mit einer vierten Brücke zwischen den Resten 1 und 3 vier P450-Orfs vorhergesagt werden können.<sup>[145]</sup> Die Reinigung von Cep 7, Cep 8 und Cep 9 in *E. coli*-Expressionssystemen lieferte vollständig beladene Hämproteine (Hubbard und Walsh, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine In-vitro-Rekonstitution der Brückenbildungen der Arylseitenketten zwischen den Resten 2-4, 4-6 und 5-7 wurde bislang noch nicht publiziert; aus einer Knock-out-

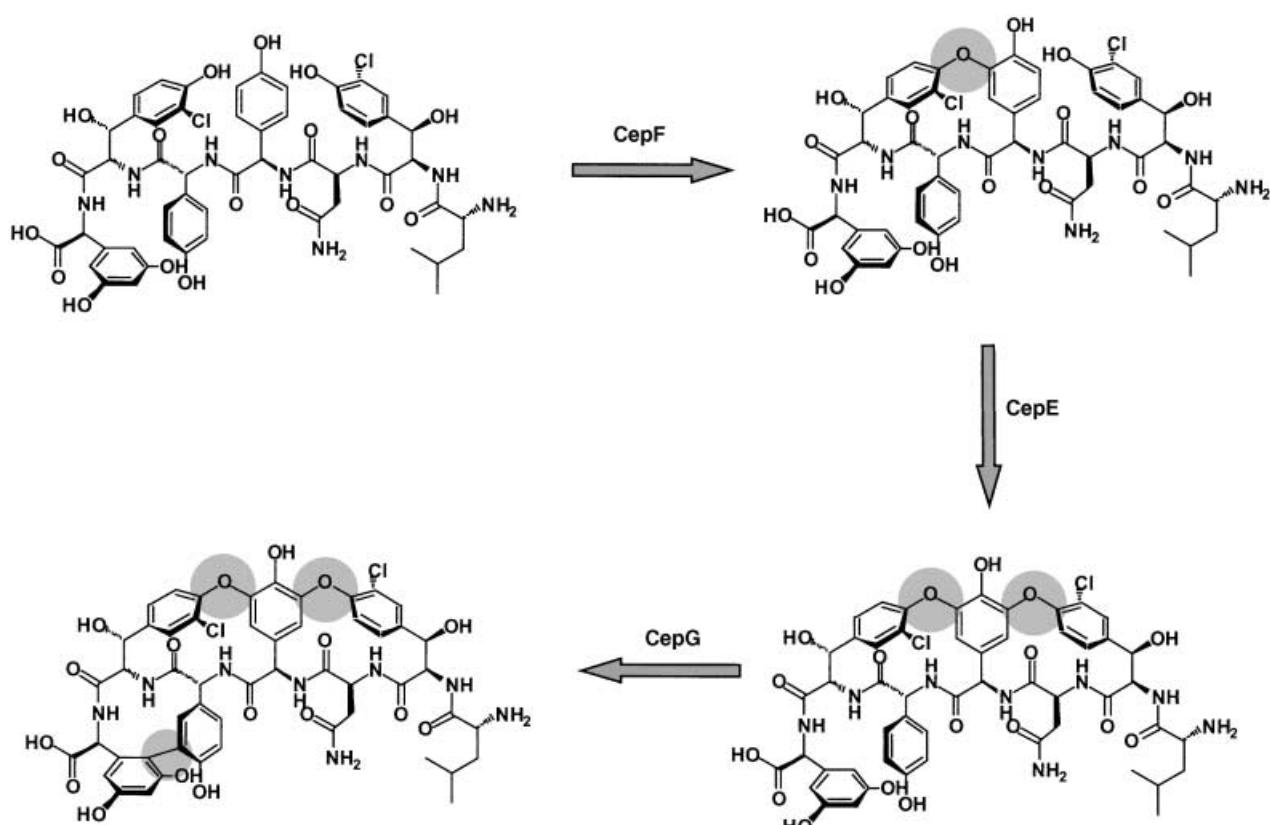
Mutante des Balhimycin-*orf*-7 (*oxyA*, das dem *cepE* entspricht) wurde jedoch ein partiell cyclisiertes Aglycon mit intakter 4-6-Brücke isoliert (Schema 22).<sup>[58]</sup> Demnach werden die Diarylether-Bindung zwischen β-OH-3-Cl-Tyr<sub>6</sub> und 4-OH-PheGly<sub>4</sub> als erste gebildet, und die drei Hämproteinoxi-



**Schema 22:** Bildung eines einfach überbrückten Heptapeptids durch die selektive Ausschaltung von *oxyA* im Balhimycin-Cluster.

dasen reagieren regiospezifisch und führen somit die einzelnen Brückenbindungen in festgelegter Reihenfolge ein. Diese Schlussfolgerung wurde durch die nachfolgende Beobachtung gestützt, dass die Ausschaltung von *oxyC* aus dem Balhimycin-Cluster (das dem *cepG* entspricht) zu einem Glycopeptid mit zwei von drei gebildeten Brückenbindungen führte (2-4 und 4-6); die 5-7-C-C-Bindung wird also als Letzte geschlossen. Dies ermöglicht die Zuordnung einer spezifischen Reihenfolge und Chemoselektivität zu den drei Hämproteinen (Schema 23). OxyB (entspricht dem CepF) katalysiert die 4-6-Bindungsbildung, OxyA (entspricht CepE) die 2-4-Brückenbildung und OxyC (entspricht CepG) die 5-7-Brückenbildung.<sup>[59]</sup> Unklar ist noch, wie bei der Substraterkennung diese Reihenfolge der drei Hämproteine bestimmt wird. Für Teicoplanin und A47934 muss noch geklärt werden, ob die 1-3-Bindung als Erste oder als Letzte eingeführt wird.

Die Häm-Cofaktoren von Cep 7-9 lassen einen radikalischen Mechanismus für die Bindungsknüpfung vermuten, bei dem die elektronenreichen „phenolischen Ringe“ der Seiten-



**Schema 23.** Mögliche Reaktionswege für die Bildung der Brücken im Chloreremomycin-Heptapeptid durch CepE, CepF und CepG.

ketten der Reste 2, 4, 5, 6 und 7 mit Ein-Elektronen-Schritten oxidiert werden. Mögliche Wege für die Bildung der Diarylether (z. B. zwischen Rest 4 und 6) und die direkte Aryl-Aryl-Kupplung (Reste 5 und 7) sind in Schema 24 skizziert. Wahrscheinlich kanalisiert das Häm-Eisen im aktiven Zentrum der Oxidasen für jede geknüpfte Bindung den Übergang der beiden Elektronen (eines von jedem der an der Bindung beteiligten Ringe) auf das Cosubstrat O<sub>2</sub>. Es ist bisher nicht bekannt, welche Anforderungen das Konformer der linearen Heptapeptidkette erfüllen muss, um ein Einpassen ins aktive Zentrum der ersten Hämprotein-Oxidase zu gewährleisten, aber die  $\beta$ -OH-Substituenten an Tyr<sub>2</sub> und Tyr<sub>6</sub> könnten wichtige sterische Einschränkungen sein, um die entsprechenden Konformere auszuwählen. Der N-Me-Tyr<sub>6</sub>-Rest an der linearen Vorstufe zum Complestatin kann bei der Ausrichtung der Konformation hin zur Cyclisierung eine ähnliche Rolle spielen. Auch die Chlorreste an den Tyr<sub>2</sub>- und Tyr<sub>6</sub>-Ringen könnten die Cyclisierung beeinflussen, z. B. indem sie das Redoxpotential so verschieben, dass Ein-Elektronen-Schritte bei der Diarylether-Bildung begünstigt sind.

Teicoplanin hat eine weitere Brückenbindung. Dies ist möglich, da sich an den Positionen 1 und 3 der Teicoplaninvorstufe 4-OH-PheGly<sub>1</sub> und 3,5-(OH)<sub>2</sub>-PheGly<sub>3</sub> befinden anstelle von Leu<sub>1</sub> und Asn<sub>3</sub> im Vancomycin. Eine vierte benachbarte Hämprotein-Oxidase in diesem Cluster wurde im A47934-Cluster nachgewiesen.<sup>[145]</sup> Die Bildung der beiden Brückenbindungen, die in das Complestatingerüst eingefügt

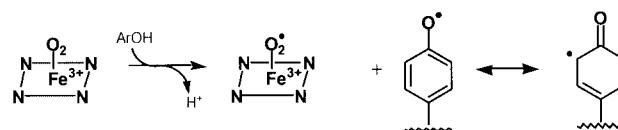
werden, werden von zwei Hämproteinen im Com-Cluster katalysiert (Tabelle 6 und Abbildung 7).

### 11.2 N-Methylierung von D-Leu<sub>1</sub>

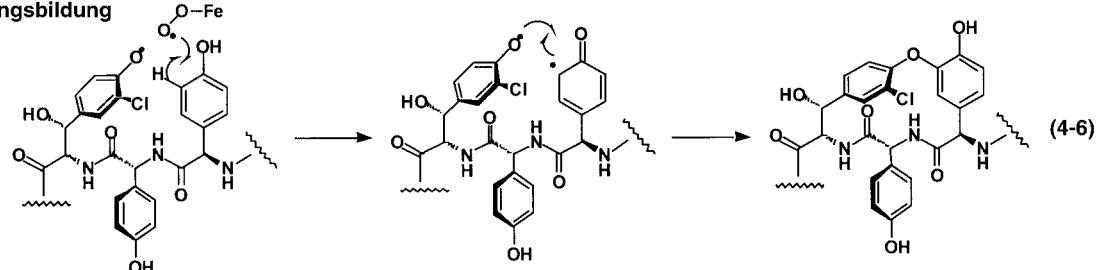
Die N-Methylierung von D-Leu<sub>1</sub> wird von Orf 16 (MtfA) katalysiert, das gereinigt wurde und dessen N-Methyltransferaseaktivität (wenngleich mit niedriger spezifischer Aktivität) gegenüber dem Aglycon und gegenüber linearen Formen nachgewiesen wurde.<sup>[63]</sup> Wenn Mutanten im Balhimycin-Syntheseweg lineare oder partiell vernetzte Vorstufen akkumulieren, sind diese noch nicht N-methyliert; dieser Schritt scheint also zu einem späten Zeitpunkt abzulaufen, vielleicht am vollständig überbrückten Peptid unmittelbar vor der Glycosylierung. Die Funktion der N-Methylierung ist noch wenig verstanden.

### 12. Glycosylierung durch Thymidindiphospho-Zucker-Donoren

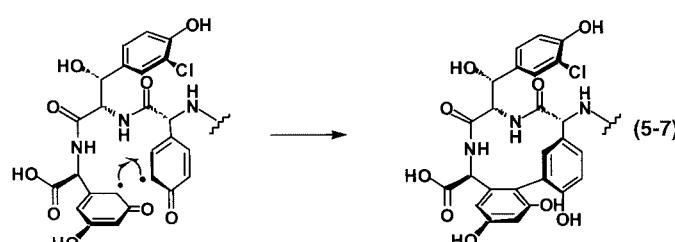
Die Vancomycin- und Teicoplanin-Unterfamilien sind Glycopeptide; die Glycosylierung erfolgt am Schluss der Antibiotika-Synthese am überbrückten Peptidgerüst. Die Position und Struktur der Zuckersubstituenten am Aglycon sind unterschiedlich. In der Vancomycin/Chloreremomycin/Balhimycin-Gruppe ist ein Glycosylrest an das phenolische



## C-O-C-Bindungsbildung



## C-O-C-Bindungsbildung



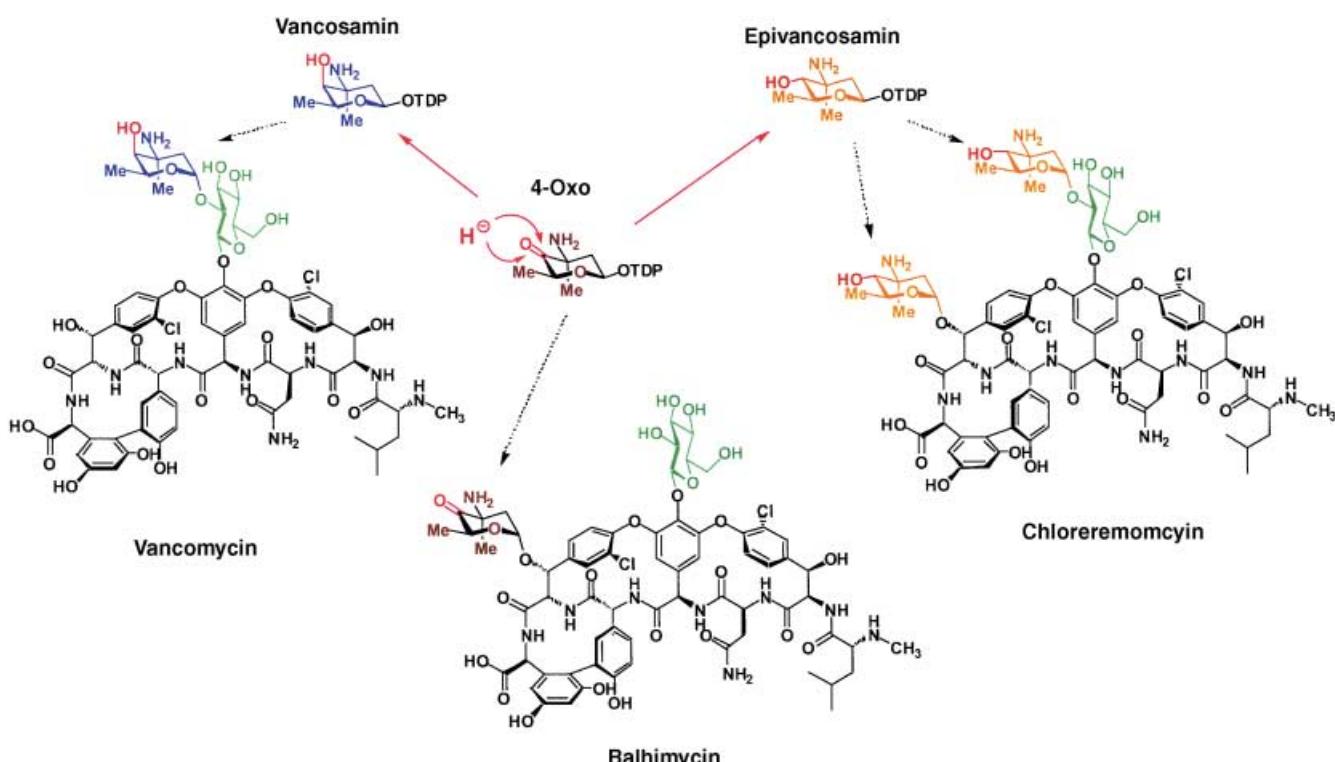
**Schema 24.** Mögliche Mechanismen der Häm-katalysierten oxidativen Kupplungen durch CepE, CepF und CepG.

Sauerstoffatom des 4-OH-PheGly<sub>4</sub> angehängt und daran eine L-Aminodesoxyhexose aus der Vancosaminreihe in 1,2-Bindung. Der Substituent in Position 4 des Vancosamin-Zuckers variiert von 4-Oxo in Balhimycin X über 4-OH (axial) in Vancomycin bis zu 4-OH (äquatorial) in Chloreremomycin. Wahrscheinlich gibt es für die Biosynthese einen gemeinsamen Weg (Schema 25). In anderen Glycopeptiden gibt es auch 3-Hydroxy- und 3-Amino-Epimere.<sup>[98-101]</sup> In Chloreremomycin ist ein zweiter L-Epivancosaminrest an das benzylische Sauerstoffatom von  $\beta$ -OH-Tyr<sub>6</sub> angehängt. In der Teicoplanin-Gruppe gibt es keine vergleichbaren Aminodesoxyzucker, stattdessen verbreiterte Zucker des Primärstoffwechsels, 2-N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) und D-Mannose (Schema 1). Bei dem GlcNAc-Rest, der an dem entsprechenden phenolischen Sauerstoffatom (4-OH-PheGly<sub>4</sub>-Rest) des Teicoplanin-Aglycons eingeführt wird, wurde die kurze Acetylketten durch eine verzweigte C<sub>10</sub>-Fettsäure-Acylgruppe ersetzt.

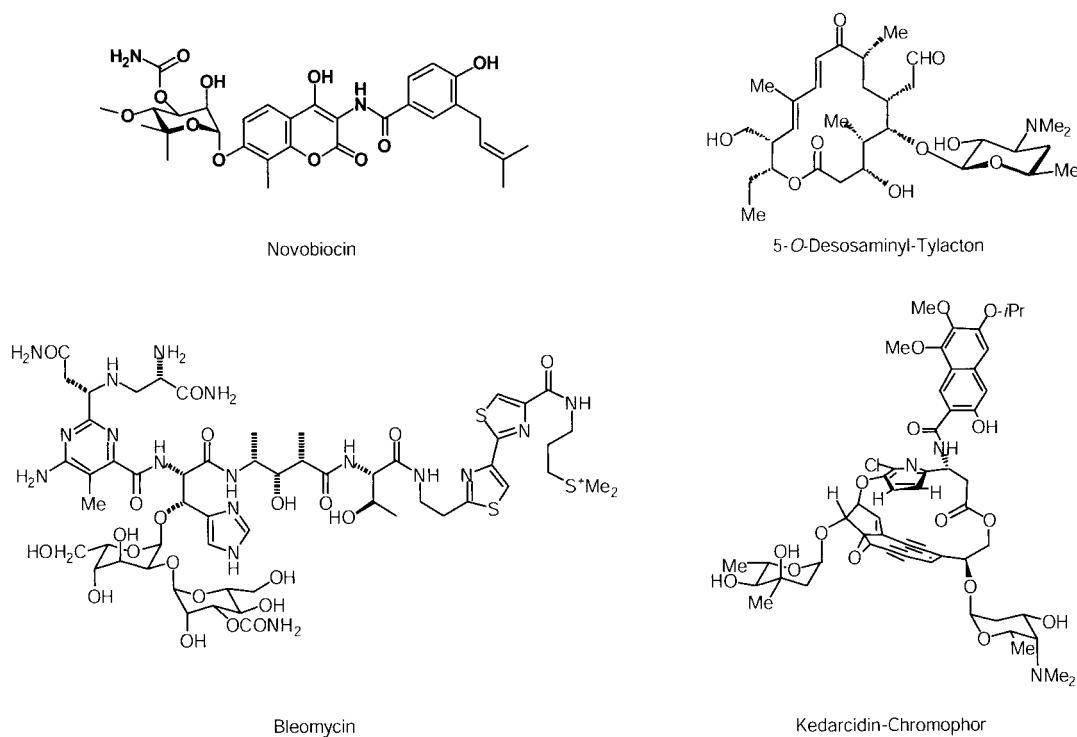
Desoxyzucker und/oder Aminodesoxyzucker sind übliche Komponenten anderer natürlicher Antibiotika, darunter die Noviosezucker in den Cumarin-Inhibitoren der DNA-Gyrase,<sup>[80]</sup> den Makrolid-Antibiotika (z. B. D-Desosamin und L-Mycarose) und den Zuckern der tumortherapeutisch wirksamen Antibiotika-Klassen Enediyne und Bleomycin (Schema 26).<sup>[102,103]</sup> Die Mischung aus Desoxy-Zentren, Methylgruppen, Aminogruppen und den übriggebliebenen Hydroxyl-Substituenten ergibt einen gemischt hydrophob-hydrophilen Charakter bei den Desoxyzucker-Komponenten der Antibiotika, der kritisch für die Erkennung sein kann. Bei den

Glycopeptiden haben Williams et al.<sup>[104,105]</sup> Rücken-an-Rücken-Dimerisierungsgleichgewichte (Abbildung 10) analysiert, die über einen weiten  $K_D$ -Bereich gehen und von Wasserstoffbrücken der Desoxyzucker abhängen und beeinflusst werden. Diese Gleichgewichte sollen mit der antibiotischen Wirksamkeit korrelieren. Die Zucker sind mit Sicherheit wichtig, um den hydrophoben Aglyconen Wasserlöslichkeit zu vermitteln, und zwar bei Glycopeptiden genauso wie bei Makrolid-Antibiotika. Das Erythromycin-Aglycon hat eine vernachlässigbare antibiotische Aktivität. Die Addition von Mycarose etabliert die Wechselwirkungen, die für die Bindung an die ribosomale 50S-Untereinheit notwendig ist (Schema 27) und stellt damit die Antibiotika-Wirkung her. Es ist auch wahrscheinlich, dass die Glycosylierung ein Teil des Mechanismus ist, mit dem sich Antibiotika-produzierende Bakterien selbst schützen. So inaktiviert eine zusätzliche Glycosylierung während der Oleandomycin-Biosynthese das Makrolid, das erst nach dem Export und eine extrazelluläre Glycosidasereaktion reaktiviert wird.<sup>[106]</sup> Bei Mutanten des Balhimycinproduzenten werden akkumulierte teilcyclisierte Peptidzwischenprodukte zufällig glycosyliert, vielleicht zum Selbstschutz und/oder zur Erleichterung des Exports.<sup>[58,59]</sup>

Die allgemeine Strategie der Biosynthese von Desoxy- und Amino/Desoxyzucker-Komponenten von Antibiotika ist inzwischen gut verstanden.<sup>[107-109]</sup> Zunächst werden alle modifizierten Hexosen als Nucleosiddiphospho-Zucker (NDP-Zucker) mit der Pyrophosphatbindung des NDP am C<sub>1</sub> der Hexose bereitgestellt; damit wird der Zucker für den Angriff eines nucleophilen Cosubstrats bei der folgenden Glycosyl-



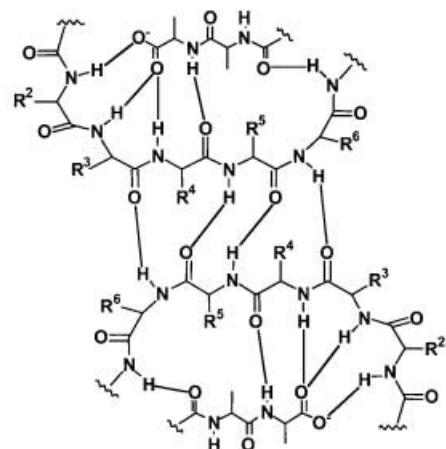
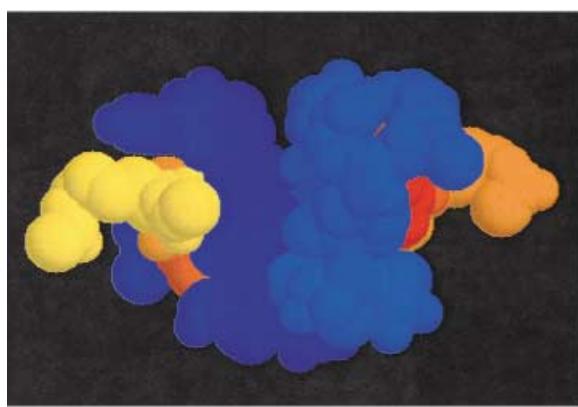
**Schema 25.** Biosynthese von Vancosamin und Epivancosamin aus 4-Oxovancosamin und Einbau in Vancomycin, Chloreremomycin und Balhimycin.



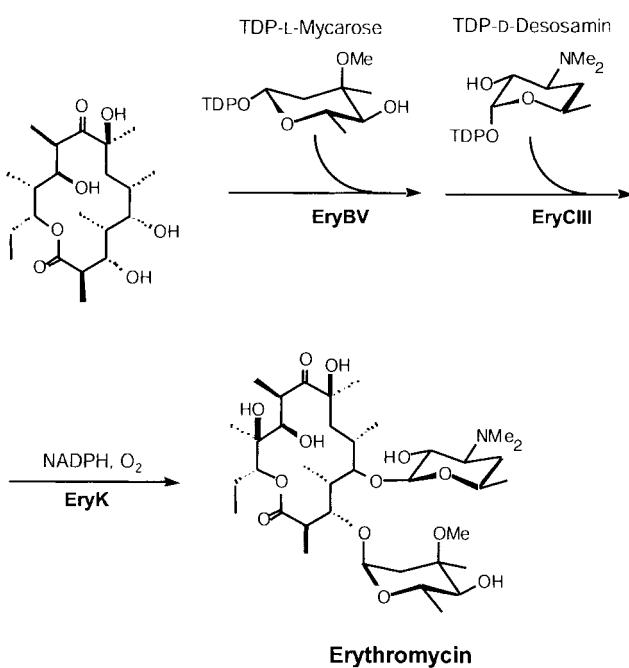
**Schema 26.** Stukturformeln von Novobiocin, 5-O-Desosaminy-Tylacton, Bleomycin und dem Chromophor Kedarcidin.

transferase-Katalyse aktiviert. Bei den Antibiotika-Produzenten aus der Gruppe der Streptomykten und Actinoplanes sind die NDP-Desoxyzucker Uridindiphospho(UDP)- oder Thymidindiphospho(TDP)-Zucker. Alle enzymatischen Umsetzungen zur Bildung der TDP-Desoxyzucker, die für die

Antibiotika-Synthese erforderlich sind, beginnen mit der einfach verfügbaren aktivierten TDP-Glucose. In Schema 28 sind die enzymatischen Schritte für die Umwandlung von TDP-Glucose zu TDP-L- $\beta$ -Epivancosamin aufgeführt, dazu die Einstellung des Redoxstatus und/oder der Substituenten



**Abbildung 10.** Rücken-an-Rücken-Dimerisierung von Vancomycin: raumfüllendes Modell (gebunden an N<sub>2,6</sub>-Bis(acyl)-L-Lys-d-Ala-d-Ala und die zu gehörigen Wasserstoffbrückenbindungen).



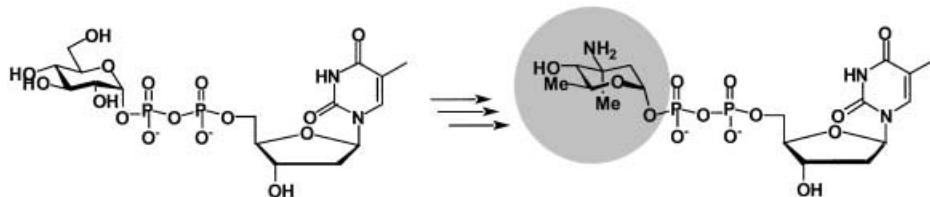
**Schema 27.** Einbau der (Thymidindiphosphat)TDP-Zucker bei der Erythromycin-Biosynthese.

und Konfiguration an jedem Kohlenstoffatom, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, um damit auf die zielgerichtete Bearbeitung des TDP-Zucker-Donors aufmerksam zu machen. Das andere allgemeine Merkmal der Biosynthesewege von Antibiotika ausgehend von Zuckern ist, dass die kodierenden Gene beispielsweise für die Umsetzungen, die in Schema 28 zusammengefasst sind, mit den übrigen Genen für die Biosynthese der Glycopeptide in einem Cluster vorliegen (Abbildung 6 und Tabelle 4). Im Cep-Gencluster katalysieren die Produkte der fünf *orf*s 23, 25, 14, 26 und 24 nacheinander in dieser Reihenfolge die Umwandlung von TDP-4-Keto-6-desoxyglucose in TDP-L-Epivancosamin (Schema 29).<sup>[110,111]</sup> Das Zusammenfassen der Biosynthesegene für NDP-Desoxyzucker in Operons für die Antibiotika-Produktion ermöglicht eine koordinierte Regulation und eine bedarfsorientierte Biosyn-

these der Schlüsselmonomere während der Antibiotika-Produktion.

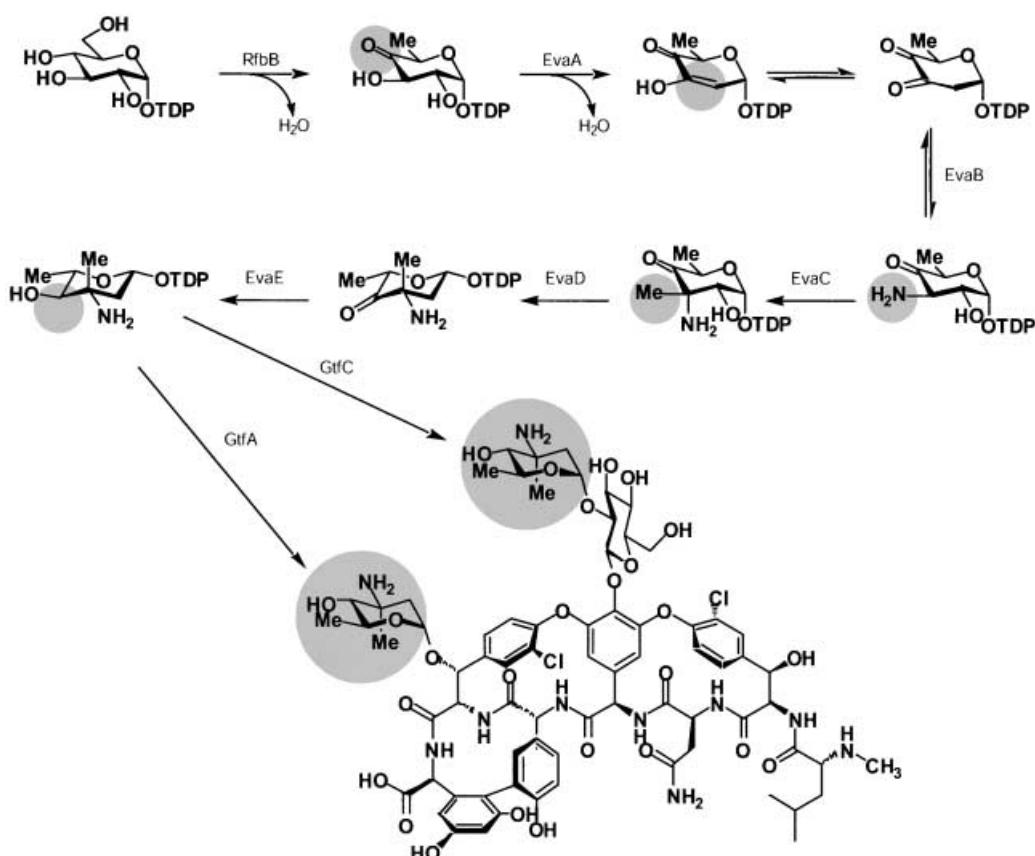
In Schema 29 sind die spezifischen enzymatischen Schritte zusammengefasst, die durch Reinigung der fünf beteiligten *orf*s aus Abbildung 6 geklärt werden konnten. Die Enzyme wurden inzwischen als EvaA, EvaB, EvaC, EvaD und EvaE (Eva = 4-L-Epivancosamin) bezeichnet. Das Enzym, das den ersten Schritt katalysiert, d.h. die Umsetzung der TDP-Glucose zur 4-Ketoverbindung, gefolgt von der Dehydratisierung zum 4-Keto-6-en und der Reduktion des konjugierten Olefins zum 6-Methylzucker, und so das TDP-4-Keto-6-desoxyglucose-Substrat für EvaA bereitstellt, ist nicht im Cep-Cluster kodiert. Die Enzymreaktion ist wohlbekannt und gut untersucht, sie steht wahrscheinlich am Anfang mehrerer Biosynthesewege; das Enzym ist von allgemeinerer Bedeutung für den Zuckerstoffwechsel in Bakterienzellen und daher nicht Teil des speziellen, der Antibiotika-Synthese dienenden Genclusters.<sup>[112,108]</sup>

EvaA katalysiert die Bildung des 3,4-Diketo-Zuckers als Teil des Reaktionsweges zur Desoxygenierung von C2 durch Entfernung des C3-H, das durch die Nachbarschaft zur 4-Ketogruppe acidifiziert wird, und durch Eliminierung des C2-OH. Das entstehende 2,3-en ist die Enolform des 3,4-Diketo-6-desoxyzucker-Nucleotids. Die Ketogruppe an C3 wird durch EvaB reduktiv aminiert; das Enzym ist eine Pyridoxalphosphat-abhängige Aminotransferase, die regio- und stereoselektiv die Aminogruppe äquatorial in Position 3 einführt. EvaC ist eine S-Adenosylmethionin-abhängige C-Methyltransferase, die die Methylgruppe unter Inversion der Konfiguration einführt, wenn sie vom Carbanion des C3-Aminozyklers angegriffen wird. Nun ist C3 aminiert und C-methyliert, und damit ist die Konfiguration fixiert. An dieser Stelle greift EvaD an, ein Mitglied der TDP-Zucker-3- und 5-Epimerasefamilie. Nur C5 trägt noch ein acides Wasserstoffatom, das durch EvaD enolisiert und mit der L-Konfiguration an C5 äquilibriert werden kann. So entsteht das TDP-L-β-4-Oxovancosamin. Diese Verbindung wird als der 4-Oxovancosamin-Donor bei der Balhimycin-Biosynthese angesehen (Schema 2). Abschließend katalysiert EvaE noch die stereospezifische Reduktion der 4-Oxo-Gruppe durch Hyd-



Position	Änderung	Typ	Gen
Konformation	Umklappen des Rings	$^4C_1 \rightarrow ^1C_4$	
C-2	Deoxygenierung	$-\text{OH} \rightarrow -\text{H}$	EvaA
C-3	Methylierung	$-\text{H} \rightarrow -\text{Me}$	EvaC
C-3	Aminierung	$-\text{OH} \rightarrow \text{NH}_2$	EvaB
C-4	Epimerisierung	$\text{S} \rightarrow \text{R}$	EvaE
C-5	Epimerisierung	$\text{R} \rightarrow \text{S}$	
C-6	Deoxygenierung	$-\text{OH} \rightarrow \text{H}$	RfbB

**Schema 28.** Transformationsreaktionen bei der Biosynthese von TDP-L-Epivancosamin aus TDP-Glucose.



**Schema 29.** Biosynthese von TDP-L-Epivancosamin und die Übertragung auf Chloreremomycin.

ridaddition von NADPH zur äquatorialen 4-OH-Gruppe des TDP-Epivancosamin und vollendet damit die Umwandlung von TDP-Glucose (Schema 29). Bei der TDP-L- $\beta$ -Vancosamin-Biosynthese ist nur der letzte Schritt anders; ein Homologes von EvaE führt ein Hydridion von der gegenüberliegenden Seite der 4-Keto-Gruppe ein, wodurch die 4-OH-Verbindung mit axialer Orientierung entsteht.

Bei anderen Zuckern in der Vancomycin-Familie (Tabelle 8) sind vergleichbare Enzyme zur Prozessierung der NDP-Zucker (Desoxygenierung an C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>; Aminierung und Methylierung an C<sub>3</sub>; Epimerisierung der Hydroxy-Konfiguration an C<sub>3</sub> und C<sub>5</sub>) wahrscheinlich. Gut dokumentierte Präzedenzfälle sind hierbei die Biosynthese von TDP-D-Desosamin, TDP-L-Mycarose und TDP-Daunosamin.<sup>[113-115]</sup>

**Tabelle 8:** Einige Zucker aus der Vancomycin-Familie.

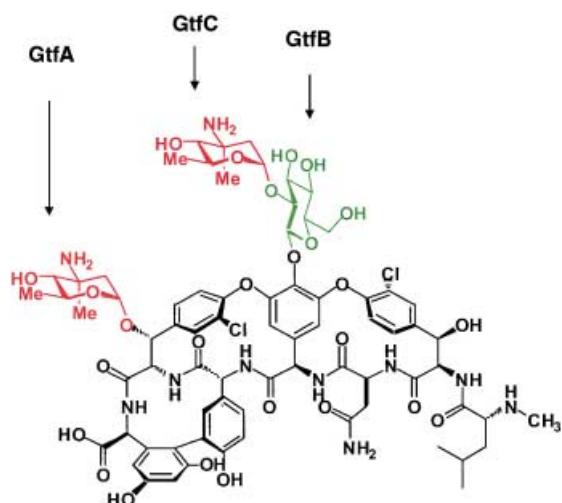
Zucker	Formel	Antibiotikum
L-Olivose		Orienticin B
L-Rhodinose		UK69542
L-Acosamin		Actinoidin A, MM47767, MM55256
L-Actinosamin		Actinoidin, MM47767, MM55256
L-Ristosamin		Actaplanin, Avoparcin, Chloropolysporin A-C, Galacardin, Symnonicin A-C, Helvecardin, Ristocetin A-B
L-Vancosamin		A42867, A51568 B, M43, Dechlorvancomycin, Demethylvancomycin, Vancomycin, Vancomycin CDP-I
3-Epi-L-vancosamin		A35512 B
L-Eremosamin		Chlororienticin, Dechloreremomycin, Eremomycin, MM47761, MM49721, Orienticin
4-Oxovanacosamin		A83850, Balhimycin, Balhimycin V, Dechlorbalhimycin V, Deglucobalhimycin, Demethylbalhimycin, Methylbalhimycin

gien zu Glycosyltransferasen haben. Nach heterologer Expression und Reinigung zur Homogenität erwiesen sich die drei Proteine als die Glycosyltransferasen GtfA, GtfB und GtfC.<sup>[60,116]</sup> In Schema 30 ist die Spezifität der drei Cep-Gft-Proteine zusammengestellt: GtfA nutzt TDP-L- $\beta$ -Epivancosamin als Glycosyldonor und das benzyliche Sauerstoffatom von 2S-3R-3-OH-Tyr<sub>6</sub> als nucleophiles Substrat. GtfB ist die Glycosyltransferase, die das aktivierte C1 von TDP-Glucose auf das angreifende phenolische Sauerstoffatom des 4-OH-PheGly<sub>4</sub>-Rests im überbrückten Aglycon überträgt. GtfC erkennt wie GtfA TDP-L- $\beta$ -Epivancosamin, überträgt es aber auf eine andere Position am Antibiotikum, nämlich die 2-OH-Gruppe des Glycosylrests, und synthetisiert so den Epivancosaminyl-1,2-glycosyldisaccharidrest. Bekannt ist, dass reines GtfB das Aglycon und GtfC das Monoglycosylprodukt umsetzen (Schema 31); offen ist noch, ob die GtfA-vermittelte Reaktion zuerst oder zuletzt abläuft.<sup>[116]</sup> In Analogie dazu findet man bei Vancomycin mit seinen beiden Zuckern zwei Glycosyltransferasen, GtfD und GtfE, die zu GtfB und GtfC homolog sind; sie setzen TDP-Glucose bzw. TDP-L- $\beta$ -Vancosamin,<sup>[117,60]</sup> zum vergleichbaren Vancosaminyl-1,2-glucosydisaccharidrest am 4-OH-PheGly<sub>4</sub> des überbrückten Aglycongerüsts um. Die Struktur von GtfB im Kristall wurde inzwischen bestimmt (Abbildung 11); es handelt sich um ein zweiflügeliges Enzym, dessen beide Domänen nur von einem Proteinstrang verbunden werden. GtfB gleicht in seiner Anordnung der MurG-Transglycosylase, die an der Peptidoglycan-Biosynthese beteiligt ist, und einer Phagen-DNA-Glycosyltransferase.<sup>[118-120]</sup> GtfA, GtfC, GtfD, GtfE und andere Glycosyltransferasen der Antibiotika-Biosynthese haben Sequenzhomologien

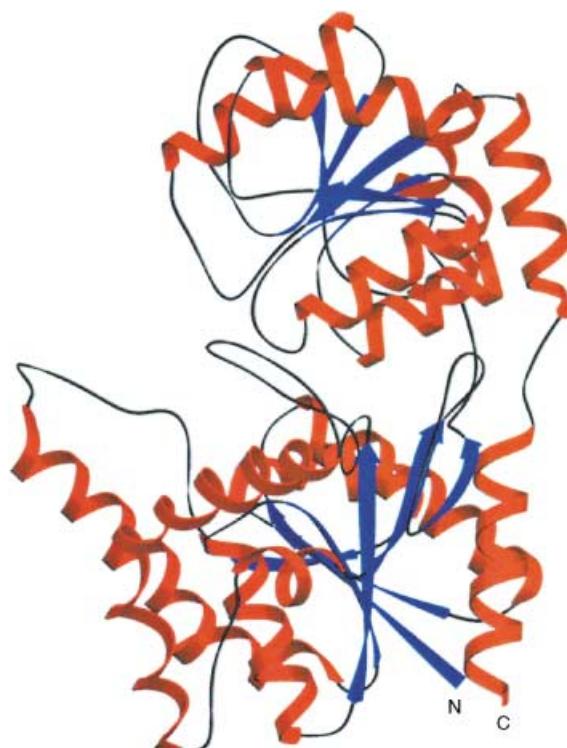
## 13. Glycosylierung durch Peptid-Antibiotika-Glycosyltransferasen

### 13.1. *GftA*, *GftB*, *GftC* im Cep-Cluster; *GftD*, *GftE* im Van-Cluster

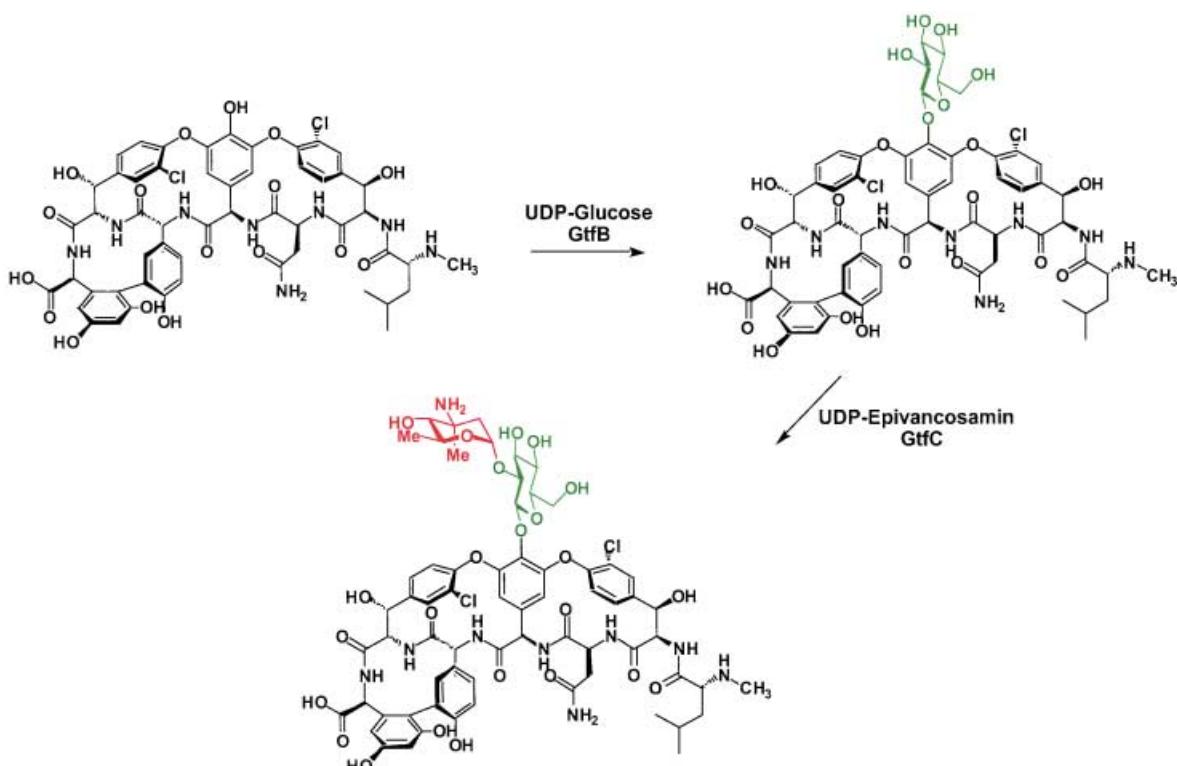
Gemäß Abbildung 6 und Tabelle 4 gibt es drei benachbarte Gene, die *orfs* 11–13 im Cep-Gencluster, die Homolo-



**Schema 30.** Funktion von GtfA, GtfB und GtfC.



**Abbildung 11.** Struktur von GtfB im Kristall.



**Schema 31.** Reihenfolge der Addition von Uridindiphosphat(UDP)-Glucose und UDP-L-Epivancosamin durch GtfB und GtfC.

mit GtfB, gehören also wahrscheinlich alle zur gleichen architektonischen Superfamilie.<sup>[62]</sup>

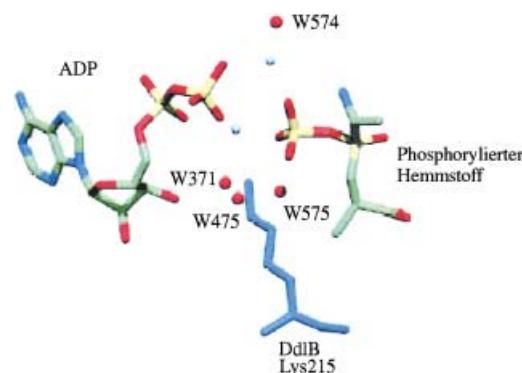
Die entsprechenden zwei oder drei Glycosyltransferasen der Teicoplaninsynthese (eines der Enzyme könnte ein GlcNAc auf die beiden Positionen 4 und 6 übertragen) wurden noch nicht charakterisiert. Da die TDP-Zucker nicht ungewöhnlich sind, wird es interessant sein, welche Gemeinsamkeiten die Teicoplanin-Glycosyltransferasen mit den oben beschriebenen Enzymen aus der Vancomycin-Unterfamilie haben. Der Zeitpunkt der Glucosamin-Acylierung in Teicoplanin mit der 10-Methylundecanoylgruppe ist unbekannt, und auch die Acyltransferase ist noch nicht identifiziert. Eine mögliche Parallele ist die zweistufige enzymatische Umwandlung von GlcNAc-Resten während der Lipid-A-Biosynthese zu langketigen 3-OH-Acyldeutschen, wobei eine Zink-abhängige Deacetylase eine freie Aminogruppe erzeugt, die dann durch ein Enzym reacyliert wird, dem ein 3-OH-Myristoyl-S-Acyl-Carrierprotein(CP) als Substrat dient.<sup>[121]</sup> Im Falle des Teicoplanin könnte das 10-Methylundecanoyl-S-ACP ein Acyl-Thioesterzwischenprodukt sein, das aus der normalen Fettsäurebiosynthese des Teicoplanin-Produzenten abgezweigt wurde.

Die Glycosyltransferasen in Clustern anderer Antibiotika-Typen wurden hauptsächlich anhand von Homologien und Knock-out- oder Komplementation-Untersuchungen zugeordnet. Bei der Synthese des Erythronolid-Aglycons wird zunächst die L-Mycarosyl-Einheit von EryBV an das C3-OH angehängt und anschließend das D-Desosamin von EryCIII (Schema 27). Im Polyketid-Antibiotikum Megalomycin gibt es einen dritten Zucker am C6-OH.<sup>[122]</sup> Analoge Glycosyltransferasen wurden u. a. in den Clustern für Novobiocin, Bleomycin und Daunomycin entdeckt.<sup>[80,103,123]</sup>

## 14. Ansätze zur Behandlung vancomycinresistenter Bakterien

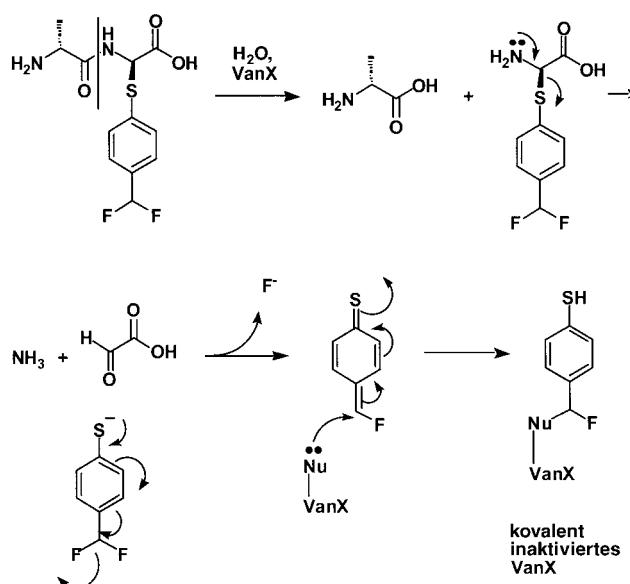
### 14.1. Inhibitoren von VanS, VanR, VanH, VanA und VanX

Nachdem das molekulare Prinzip der Vancomycinresistenz in den klinischen Phänotypen VanA und VanB geklärt ist, werden dringend neue Wirkstoffe gegen VRE und effiziente Entwicklungsmethoden benötigt, diesen Phänotyp unschädlich zu machen. Ein Ansatz ist, Inhibitoren gegen jedes der fünf Proteine herzustellen, das regulatorische, aus zwei Komponenten bestehende Paar VanS und VanR, und die drei Enzyme VanH, VanA und VanX.<sup>[40,41]</sup> Die Strukturen (Abbildung 12) der D-Ala-D-Ala-Ligase VanA mit einem Phosphorylphosphat-Analogon des gebundenen D-Dipep-



**Abbildung 12.** Struktur von VanA im Komplex mit einem phosphorylierten Hemmstoff.

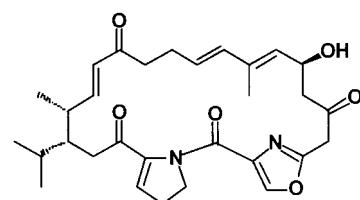
tidsubstrates und der D-D-Dipeptidase VanX mit einem gebundenen Phosphinat-Hemmstoff wurden röntgenographisch bestimmt und sollten beim Design von Liganden hilfreich sein.<sup>[124,125]</sup> Das Phosphinat ist ein potenter Hemmstoff von VanX und ein Substratanalogon von VanA, da es in jedem Fall ein fest gebundenes Phosphanylphosphat bildet; Bakterienzellen allerdings sind für das anionische Phosphinat undurchlässig, sodass diese Verbindungen gegen intakte Bakterien nicht aktiv sind. Es wurde auch ein Hemmstoff von VanX beschrieben, der vom Reaktionsmechanismus abgeleitet ist und an dem nach der Spaltung einer Peptidbindung durch die Peptidase eine reaktive Gruppe freigelegt wird (Schema 32).<sup>[126]</sup> Bisher sind keine Inhibitoren der regulatorischen Komponenten bekannt, doch gibt es Verbindungen, die als Hemmstoffe anderer Sensorsysteme aus zwei Komponenten wirken.<sup>[127,128]</sup> Wahrscheinlich wirken diese, indem sie die Membranstruktur stören und/oder als unspezifische Oberflächenagentien, die den Transmembransensor unterbrechen. Unter der Voraussetzung, dass die intrazellulären Domänen von VanS und anderen Sensorproteinen bakterieller Zwei-Komponenten-Regulationssysteme Histidin-Autokinasen sind, sollte es möglich sein, mithilfe der wachsenden Zahl bekannter Proteinkinase-Inhibitoren, die mit ATP konkurrieren, Leitstrukturen gegen diese Eigenschaft von VanS zu finden.<sup>[129]</sup>



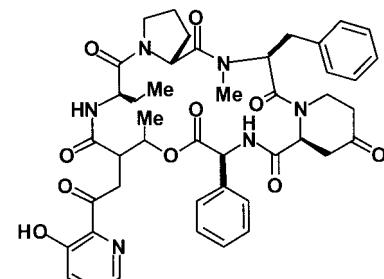
Schema 32. Inaktivierung von VanX durch einen Mechanismus-gestützten Hemmstoff.

#### 14.2. Antibiotika, die gegen VRE aktiv sind

Zwei Antibiotika haben während der klinischen Entwicklung eine gewisse Wirkung gegen VRE gezeigt. Das erste ist Synercid, eine Kombination der synergistisch wirkenden Pristinamycine I und II (Schema 33). Diese gehören zu einer Klasse von Antibiotika, die historisch auch als Virginiamycine und Streptogramine bekannt sind. Die Pristinamycine werden von *Streptomyces pristinaespiralis* gebildet, wobei



Pristinamycin I



Pristinamycin II

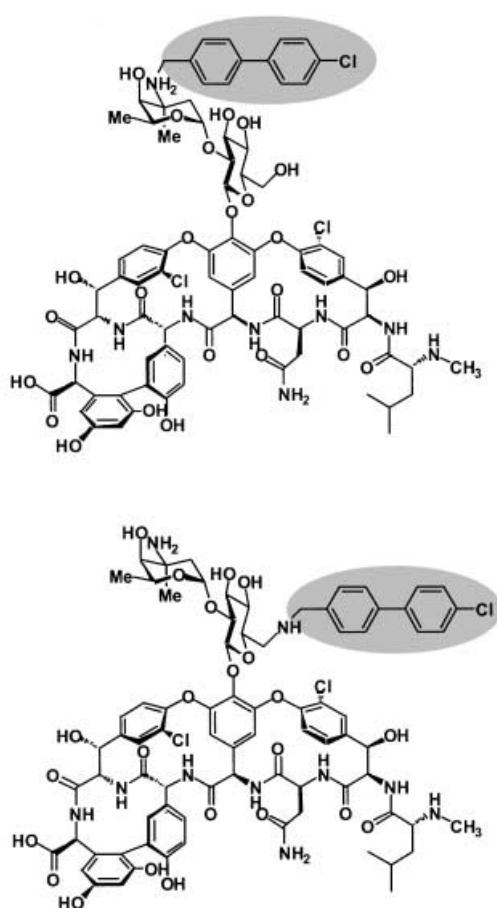
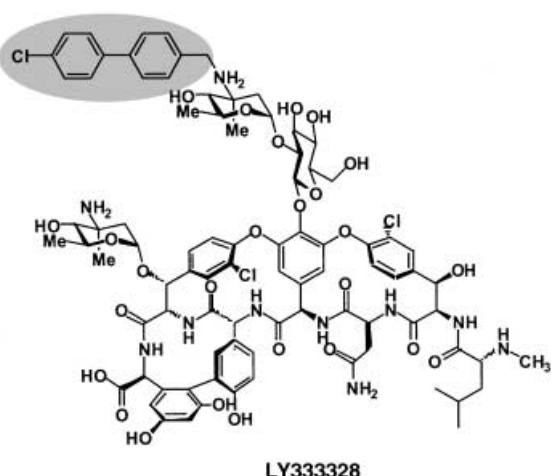
Schema 33. Strukturformeln von Pristinamycin I und Pristinamycin II.

Pristinamycin I (Handelsname Dalfopristin) und Pristinamycin II (Handelsname Quinupristin) semisynthetische Varianten sind, die zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit modifiziert wurden. Pristinamycin II ist ein nichtribosomal synthetisiertes Hexapeptid, während Pristinamycin I ein Hybrid ist, das von einem Polyketid-Synthase-Komplex und drei NRPS-Modulen synthetisiert wird.<sup>[130-131]</sup> Beide Pristinamycin-Derivate wirken auf die gleiche Stelle der ribosomalen 50S-Untereinheit wie Erythromycin und blockieren die Proteinbiosynthese.<sup>[132]</sup>

Das zweite Antibiotikum, das gegen VRE wirkt, ist Linezolid. Linezolid ist die erste Verbindung einer neuartigen synthetischen Antibiotika-Klasse, der Oxazolidinone, die auch die Proteinbiosynthese am Ribosom blockieren.<sup>[133]</sup>

#### 14.3. Semisynthetische Glycopeptide, die gegen VRE wirken

Als die ersten klinischen VRE-Isolate auftauchten, wurden sie zum Screening auf neue Antibiotika gegen sensitive und resistente Enterococcus-Stämme genutzt. Halbsynthetische Derivate von Vancomycinen und Chloreremomycinen mit Lipidresten an der Aminogruppe von Vancosamin oder Epivancosamin waren aktiv gegen VRE (Schema 34). Als Vertreter dieser Gruppe sei das N-Chlorbiphenyl-Derivat von Chloreremomycin mit der Laborbezeichnung LY333328 genannt, dessen Aktivität auf das 80-fache zunahm (nach einem Aktivitätsverlust gegen VRE um den Faktor 1000) und das sich inzwischen in der klinischen Prüfung befindet.<sup>[134,135]</sup> Dieser und verwandte N-Aryl- und N-Alkylsubstituenten werden durch reduktive Alkylierung der 3-Aminogruppen des Vancosamin oder Epivancosamin eingeführt. Sie ähneln der N-Acylkette im Teicoplanin und führen möglicherweise zu einer Vorkonzentrierung der Lipoglycopeptide an der



**Schema 34.** Semisynthetische, gegen VRE aktive Derivate von Vancomycin.

äußeren Oberfläche der Cytoplasmamembran in der Nachbarschaft sowohl der Lipid-II-Substrate als auch der Transpeptidasen und Transglycosylasen, die die letzten Schritte des Peptidoglycanaufbaus katalysieren. Auch nach einer Verschiebung der lipophilen Chlorbiphenylgruppe an verschiedene Positionen des Disaccharidendes von Antibiotika der Vancomycingruppe blieb die Aktivitätszunahme gegenüber VRE erhalten. Wenn beispielsweise ein 6-Aminoglycosyl-

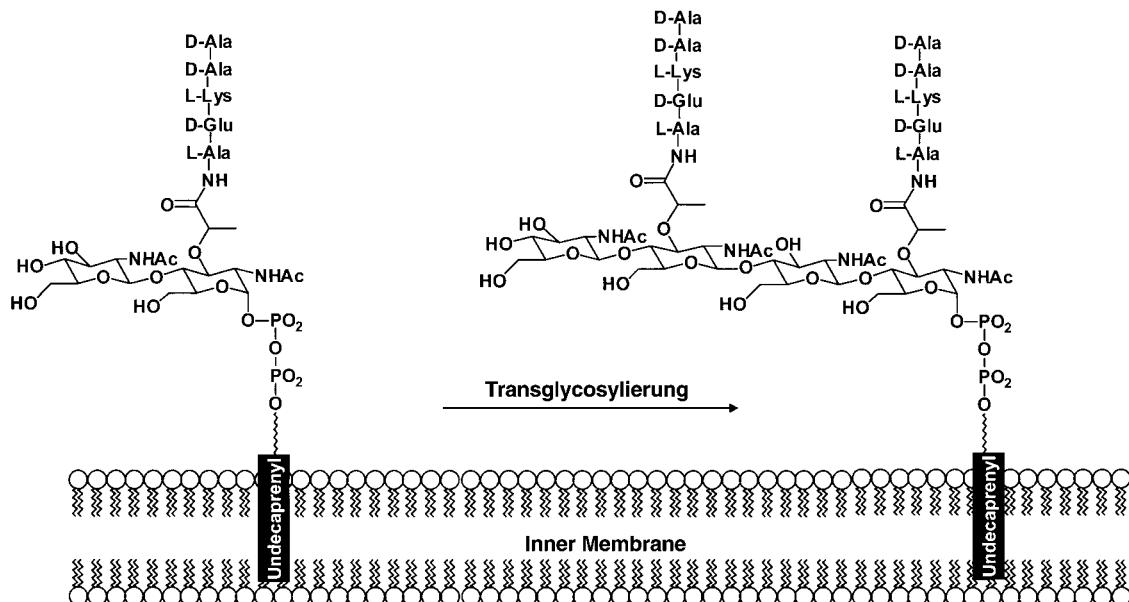
Analogon der Vancomycin-Disaccharideinheit synthetisch hergestellt und danach N-aryliert wurde, hatte dieses Regioisomere eine gute Aktivität gegen VRE,<sup>[136]</sup> was vermuten lässt, dass die Aktivität durch einen Lipidanker und nicht durch eine spezifische Struktur des Liposaccharids hervorgerufen wurde.

Die Bindungsaffinität von LY333328 und seiner Analoga gegen *N*-Acyl-D-Ala-D-Lac ist nicht erhöht, was dafür spricht, dass der Aktivitätsgewinn gegen VRE zumindest zum Teil auf einen andersartigen Mechanismus zurückgeht. Außerdem blieb die Aktivität gegen VRE auch in Chlorbiphenylanaloga erhalten, in denen die Bindestelle für *N*-Acyl-D-Ala-D-Ala durch die Entfernung von *N*-Methyl-D-Leu-1 zerstört wurde.<sup>[136]</sup> Kahne et al. vermuteten, dass membrangebundene Transglycosylasen (Abbildung 13) die Zielmoleküle für diese modifizierten Lipoglycopeptide sein könnten.<sup>[136,137]</sup> Sollte sich diese Annahme als allgemeingültig bewahrheiten, stünden neuartige Zielmoleküle und Struktur-Wirkungs-Beziehungen zur Verfügung, um den klinischen VRE-Phänotypen bei lebensbedrohlichen Infektionen zu begegnen.

#### 14.4 Kombinatorische Biosynthese von Glycopeptid-Antibiotika

Eine mögliche Ergänzung der Anstrengungen, die natürlichen Glycopeptidgrundgerüst synthetisch zu modifizieren, um Antibiotika mit weiteren nützlichen Eigenschaften herzustellen, ist ein kombinatorischer Biosynthese-Ansatz. Dieser würde auf dem Wissen aufbauen, das in den Abschnitten 8–13 dieses Aufsatzes zusammengefasst ist. Ein Weg wäre, zusätzliche Aminosäure-Monomere für den Einbau in das Heptapeptidgerüst durch den Produktionsorganismus bereitzustellen. Dies könnte klassisch durch Verfütterung anderer Aminosäuren, besonders nichtproteinogener Verbindungen, geschehen, doch gibt es noch keine Daten über die Verfügbarkeit und Aufnahme dieser Aminosäurevarianten. Eine andere Möglichkeit ist, den Biosyntheseweg für die De-novo-Synthese einer gewünschten Aminosäure in den Organismus einzuführen und diesen Stoffwechselweg bei höherer Konzentration zu exprimieren. Die Actinoplanes als ursprüngliche Produktionsorganismen sind in dieser Hinsicht nicht besonders nutzerfreundlich, aber *Streptomyces toyocaensis*, der Produzent von A47934, wäre für solche Manipulationen geeignet.<sup>[29]</sup>

Eine zweite Möglichkeit für die Umprogrammierung des Biosynthesewegs wäre der NRPS-Synthesepfad des Heptapeptids. Zwei Ansätze scheinen gegenwärtig machbar. Zum einen könnte die Selektivität einer der Adenylierungsdomänen durch Mutation einiger Seitenketten verändert werden, die die Aminosäureauswahl und -aktivierung steuern.<sup>[138,139]</sup> Beispielsweise könnte man Modul 1 und/oder Modul 3 umprogrammieren, um eine andere Aminosäure anstelle von Leu1 oder Asn3 einzubauen. Dies sind die beiden Positionen, die nicht an den Brückenbindungen beteiligt sind. Ob für Position 1 eine D-Aminosäure supplementiert werden muss, bleibt noch zu klären. Die VanC-VRE-Varianten exprimieren eine Serin-Racemase und das kodierende *vanT*-Gen könnte in einen mutierten Produzenten eingeführt werden, der in Position 1 oder 3 für Serin kodiert.<sup>[140]</sup> Eine Variante dieses



**Abbildung 13.** Vorschlag für membrangebundene Transglycosylasen als Zielmoleküle für modifizierte Lipoglycopeptide.

Ansatzes wäre, die E-Domäne in Modul 2, 3 oder 4 durch Mutation eines hochkonservierten Histidinrestes zu inaktivieren.<sup>[94]</sup> Jedoch: würde eine E<sub>5</sub>-Mutante noch immer das Heptapeptid in voller Länge synthetisieren, jetzt allerdings in D-D-L-D-L-L-L-Konfiguration und würden noch immer die Brückenbindungen geknüpft, die Glycosylierung ausgeführt und die antibiotische Aktivität erhalten werden? Ein zweiter Ansatz ist, Domänen oder Module zu mischen, um die Identität und Position aller sieben Aminosäuren zu ändern. Marahiel et al. haben begonnen, Regeln für den Austausch von Domänen und Modulen bei dem Tyrocidin-Synthesepfad aufzustellen; diese könnten dann auf die Cep-, Van- und Teicoplanin-NRPS-Enzymkomplexe angewendet werden.<sup>[141]</sup> Würde so der Ersatz des Dpg-aktivierenden Moduls 3 in der Teicoplaninsynthetase oder der A47934-Synthetase durch ein Modul für Hpg ein vollständiges Teicoplanin-Analogon ergeben?

Eine dritte Interventionsmöglichkeit zur Umprogrammierung wäre im Anschluss an die NRPS-Reaktionen bei den enzymatischen Schritten zur Modifizierung des Heptapeptids einschließlich der *N*-Methylierung oder den P450-Hämprotein-Genen, die für die Brückenbindungen verantwortlich sind.

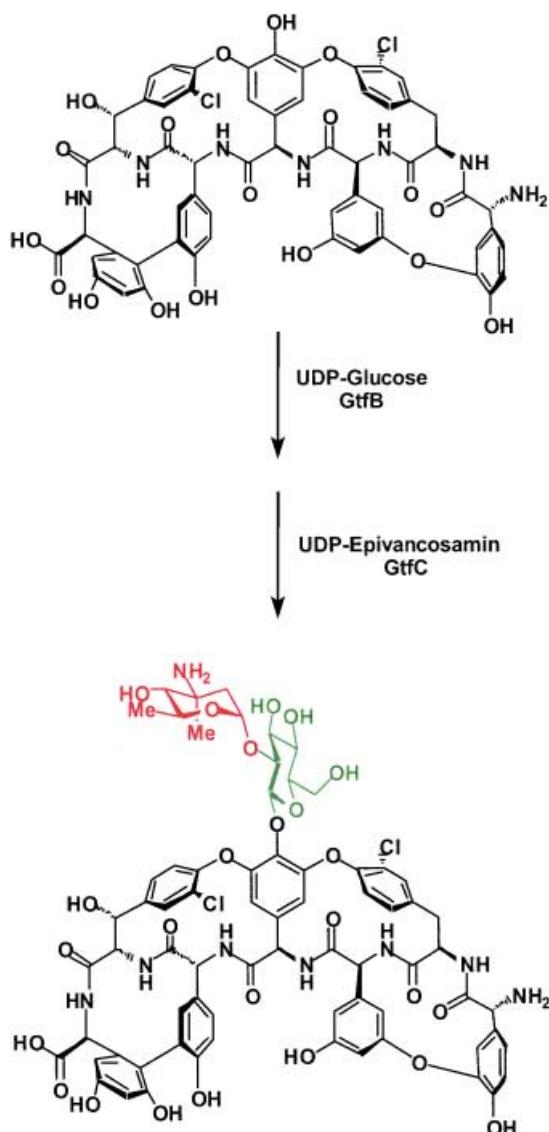
Die vierte Eingriffsmöglichkeit ist, Enzyme des TDP-Desoxyzucker-Stoffwechsels zu tauschen oder zu ersetzen. Wahrscheinlich ist das Oxovancosamin in den Balhimycinen dafür ein natürliches Vorbild, in dem die abschließende Reduktase defekt ist oder fehlt. Würde TDP-Daunosamin oder TDP-Mycarose von den Glycopeptid-Produzenten gebildet und von den Glycosyltransferasen eingebaut werden? Inzwischen gibt es bei den Polyketid-Makrolid-Biosynthesen wegen einige Beispiele für die Umprogrammierung der Desoxyzucker-Biosynthese und die Verwendung der neuartigen Zucker durch Gtfs, sodass schließlich Produkte mit veränderter Glycosylierung entstehen.<sup>[142-144]</sup> Diese Strategie hängt davon ab, dass Gtfs wie Gtfa-E unspezifisch genug

sind, um andere TDP-Desoxyhexosen zu akzeptieren und GtfB/C oder GtfD/E die veränderten Substrate oder Zwischenprodukte weiterverarbeiten. Wir haben dies für die Synthese von Epivancosamin mit GtfB und GtfC und – was noch überzeugender ist – für die Einführung der Epivancosaminyl-1,2-glycosyl-Kette in das Teicoplanin-Aglycon gezeigt.<sup>[116]</sup> Für diese Kombination gibt es keinen Präzedenzfall in der Natur (Schema 35). Es könnte möglich sein, Chimären aus solchen Antibiotika-modifizierenden Gtfs herzustellen, die die aus zwei Schleifen bestehende Struktur des GtfB haben (Abbildung 11), wobei die obere Schleife den TDP-Zucker erkennt und die untere Schleife das Aglycon. Durch die kombinatorische Chimärisierung solcher Gtfs ließen sich Bibliotheken erzeugen, mit denen man die Aglycone mischen und mit TDP-Desoxy- und -aminozuckern effektiv glycosylieren kann.

## 15. Schlussfolgerungen

Die Bakteriengenomik hat inzwischen Dutzende von Genclustern für nichtribosomale Peptid-Antibiotika, Polyketide und Hybrid-Antibiotika aus Peptiden und Polyketiden geklärt und die Logik offengelegt, die dieser Matrizen-gesteuerten Syntheseform zugrunde liegt. Sogar für so komplexe Antibiotika wie Chloreremomycin und Vancomycin kann die Strategie nun aus Bioinformatik-gestützten Vorhersagen erschlossen und im Experiment geprüft werden.

Die Zusammenfassung aller oder fast aller Gene, die zur Kodierung eines bestimmten Stoffwechselwegs zu einem Sekundärmetaboliten erforderlich sind, ermöglicht eine koordinierte Regulation von Gentranskription, Proteinsynthese und Aufbau niedermolekularer Verbindungen, die als Bausteine erforderlich sind. Die 29 Gene im Chloreremomycin-Cluster lassen sich in drei funktionelle Phasen einteilen, die typisch für diese Klassen bioaktiver Naturstoffe sind.



**Schema 35.** Neuartige Funktionen von GtfB und GtfC: Übertragung von UDP-Glucose und UDP-L-Epivancosamin auf das Teicoplanin-Aglycon.

Die erste Phase, vor dem Zusammenfügen der Aminosäuren, ist die enzymatische Bildung eines Pools distinkter kleiner Molekülmonomere, die einer produktionssynchronen („just-in-time“) Bestandssteuerung unterliegen und die als Substrate für die nachfolgenden Reaktionswege dienen. Für die Glycopeptid-Antibiotika der Vancomycinklasse bedeutet dies die Herstellung von drei nichtproteinogenen Aminosäuren aus insgesamt fünf Monomeren des Heptapeptidgerüsts. Ungefähr zwölf der 29 Gene lassen sich der Produktion dieser drei Aminosäuren zuordnen. Das andere zugehörige Monomer ist das aktivierte L-Aminodesoxyzucker-Nucleotid TDP-L-β-Epivancosamin, zu dessen Synthese weitere fünf Gene erforderlich sind.

Phase II ist der Reaktionspfad für den Zusammenbau der Monomere. Bei den Glycoheptapeptid-Antibiotika besteht der NRPS-Komplex aus 24 Domänen, verteilt auf drei Pro-

teinuntereinheiten. Die Identität und Lokalisierung der einzelnen Domänen dient der Kontrolle der Monomerauswahl und -aktivierung bei der Kettenelongation, wobei im Verlauf der Kettenelongation von den insgesamt sieben Aminosäureresten vier D-Aminosäuren eingebaut werden müssen, und schließlich die hydrolytische Kettenterminierung. Das Wachstum der Peptidkette erfolgt gerichtet vom N- zum C-Terminus über eine Elongationskaskade, die an kovalent fixierten Aminoacyl- und Peptidyl-S-Enzym-Intermediates gebunden ist.

Die anschließende dritte Phase umfasst das „Zurechtschneidern“ des freigesetzten Heptapeptids. Oxidationen und Glycosylierungen sind typische Reaktionen, und N-Methylierungen sind nicht ungewöhnlich. Alle drei Transformationsarten kommen hier vor, katalysiert von sieben speziellen Enzymen. Die auffälligste architektonische und chemische Eigenschaft der Vancomycin/Teicoplanin-Antibiotika ist die Verknüpfung der Seitenketten über Phenolgruppen. Die Steuerung durch katalytisch wirkende Hämprotein-Oxidasen ist inzwischen geklärt, während Zeitpunkt der Reaktion, Spezifität und Mechanismus noch bestimmt werden müssen.

Die Regeln, nach denen die Natur die Glycopeptid-(Vancomycin) und Lipoglycopeptid-Antibiotika (Teicoplanin) aufbaut, werden zunehmend geklärt und abgesichert. Dies öffnet Möglichkeiten für Umprogrammierungsstrategien auf der Ebene veränderter Monomere, durch Verschiebungen beim Peptidaufbau und durch verschiedene Enzyme zur Nachbearbeitung des Aglycons.

Eingegangen am 16. Juli 2001 [A486]  
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

---

- [1] E. M. Scholar, W. B. Pratt, *The Antimicrobial Drugs*, 2. Aufl., Oxford University Press, New York, **2000**, 7–10.
- [2] *Antimicrobial Chemotherapy*, 4. Aufl. (Hrsg.: H. Greenwood), Oxford University Press, New York, **2000**, S. 223–387.
- [3] H. S. Gold, R. C. Moellering, Jr., *N. Engl. J. Med.* **1996**, 335, 1445–1453.
- [4] A. J. Salter, *Rev. Infect. Dis.* **1982**, 4, 196–236.
- [5] E. M. Scholar, W. B. Pratt, *The Antimicrobial Drugs*, 2. Aufl., Oxford University Press, New York, **2000**, Kap. 7.
- [6] P. Kloss, L. Xiong, D. L. Shinabarger, A. S. Mankin, *J. Mol. Biol.* **1999**, 294, 93–101.
- [7] H. C. Neu, *Science* **1992**, 257, 1064–1073.
- [8] C. Walsh, *Nature* **2000**, 406, 775–781.
- [9] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, 289, 905–920.
- [10] D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Cell* **2000**, 103, 1143–1154.
- [11] P. Nissen, J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Science* **2000**, 289, 920–930.
- [12] A. Maxwell, *Trends Microbiol.* **1997**, 5, 102–109.
- [13] L. Ferrero, B. Cameron, J. Crouzet, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, 1554–1558.
- [14] B. G. Spratt, *Science* **1994**, 264, 388–393.
- [15] B. G. Spratt, K. D. Cromie, *Rev. Infect. Dis.* **1988**, 10, 699–711.
- [16] J. M. Ghuyse, *Annu. Rev. Microbiol.* **1991**, 45, 37–67.
- [17] J. R. Knox, P. C. Moews, J. M. Frere, *Chem. Biol.* **1996**, 3, 937–947.
- [18] D. H. Williams, *Nat. Prod. Rep.* **1996**, 13, 469–477.

*Angew. Chem.* **2003**, 115, 752–789

[19] D. H. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1264–1286; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1172–1193.

[20] D. H. Williams, M. P. Williamson, D. W. Butcher, S. J. Hammond, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 1332–1339.

[21] J. C. Barna, D. H. Williams, *Annu. Rev. Microbiol.* **1984**, *38*, 339–357.

[22] *Bacterial Cell Wall* (Hrsg.: J.-M. Ghysen, R. Hakenbeck), Elsevier, Amsterdam, **1994**.

[23] K. K. Wong, D. L. Pompiano, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *456*, 197–217.

[24] *Glycopeptide Antibiotics* (Hrsg.: R. Nagarajan), Marcel Dekker, New York, **1994**.

[25] K. C. Nicolaou, C. N. C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2230–2287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2096–2152.

[26] J. Davies, *Science* **1994**, *264*, 375–382.

[27] I. T. Paulsen, M. H. Brown, R. A. Skurray, *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 575–608.

[28] M. Putman, H. W. van Veen, W. N. Konings, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 672–693.

[29] C. G. Marshall, I. A. Lessard, I. Park, G. D. Wright, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 2215–2220.

[30] M. Sosio, A. Bianchi, E. Bossi, S. Donadio, *Antonie Van Leeuwenhoek* **2000**, *78*, 379–384.

[31] C. T. Walsh, S. L. Fisher, I. S. Park, M. Prahalad, Z. Wu, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 21–28.

[32] M. N. Swartz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 2420–2427.

[33] B. E. Murray, *N. Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 710–721.

[34] D. Hoeffler, U. Zimmermann, *Lancet* **1997**, *350*, 739.

[35] M. Arthur, P. Courvalin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 1563–1571.

[36] S. Dutka-Malen, C. Molinas, M. Arthur, P. Courvalin, *Gene* **1992**, *112*, 53–58.

[37] M. Fines, B. Perichon, P. Reynolds, D. F. Sahm, P. Courvalin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 2161–2164.

[38] V. L. Healy, I. A. Lessard, D. I. Roper, J. R. Knox, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, R109–R119.

[39] T. D. Bugg, G. D. Wright, S. Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1991**, *30*, 10408–10415.

[40] M. Arthur, C. Molinas, P. Courvalin, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 2582–2591.

[41] T. R. Holman, Z. Wu, B. L. Wanner, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4625–4631.

[42] A. Haldimann, S. L. Fisher, L. L. Daniels, C. T. Walsh, B. L. Wanner, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 5903–5913.

[43] M. Arthur, F. Depardieu, P. Reynolds, P. Courvalin, *Mol. Microbiol.* **1996**, *21*, 33–44.

[44] M. Baptista, F. Depardieu, P. Courvalin, M. Arthur, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 2291–2295.

[45] I. S. Park, C. H. Lin, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10040–10044.

[46] F. Navarro, P. Courvalin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 1788–1793.

[47] N. Mani, P. Sancheti, Z. D. Jiang, C. McNaney, M. DeCenzo, B. Knight, M. Stankis, M. Kuranda, D. M. Rothstein, P. Sancheti, B. Knighti, *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 471–479.

[48] D. A. Evans, C. J. Dinsmore, A. M. Ratz, D. A. Evrard, J. C. Barrow, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3417–3418.

[49] D. A. Evans, C. J. Dinsmore, A. M. Ratz, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3189–3192.

[50] D. A. Evans, J. C. Barrow, P. S. Watson, A. M. Ratz, C. J. Dinsmore, D. A. Evrard, K. M. DeVries, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3419–3420.

[51] D. A. Evans, M. R. Wood, B. W. Trotter, T. I. Richardson, J. C. Barrow, J. L. Katz, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2868–2872; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2704–2708.

[52] 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.

[53] 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*, 2714–2717.

[54] 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.

[55] K. C. Nicolaou, H. J. Mitchell, N. F. Jain, N. Winssinger, R. Hughes, T. Bando, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 253–255; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 240–244.

[56] K. C. Nicolaou, H. J. Mitchell, N. F. Jain, T. Bando, R. Hughes, N. Winssinger, S. Natarajan, A. E. Koumbis, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2648–2667.

[57] D. L. Boger, S. Miyazaki, S. H. Kim, J. H. Wu, O. Loiseleur, S. L. Castle, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3226–3227.

[58] D. Bischoff, S. Pelzer, A. Holtzel, G. J. Nicholson, S. Stockert, W. Wohlleben, G. Jung, R. D. Süßmuth, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1736–1739; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1693–1696.

[59] D. Bischoff, S. Pelzer, B. Bister, G. J. Nicholson, S. Stockert, W. Wohlleben, G. Jung, R. D. Süßmuth, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4824–4827; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4688–4691.

[60] A. M. van Wageningen, P. N. Kirkpatrick, D. H. Williams, B. R. Harris, J. K. Kershaw, N. J. Lennard, M. Jones, S. J. Jones, P. J. Sølenberg, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, 155–162.

[61] H.-T. Chiu, B. K. Hubbard, A. N. Shah, J. Eide, R. A. Fredenburg, C. T. Walsh, C. Khosla, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8548–8553.

[62] S. Pelzer, R. Süßmuth, D. Heckmann, J. Recktenwald, P. Huber, G. Jung, W. Wohlleben, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1565–1573.

[63] D. P. O'Brien, P. N. Kirkpatrick, S. W. O'Brien, T. Staroske, T. I. Richardson, D. A. Evans, A. Hopkinson, J. B. Spencer, D. H. Williams, *Chem. Commun.* **2000**, 103–104.

[64] H. Seto, T. Fujioka, K. Furihata, I. Kaneko, S. Takahashi, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4987–4990.

[65] K. Matsuzaki, H. Ikeda, T. Ogino, A. Matsumoto, H. B. Woodruff, H. Tanaka, S. Omura, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 1173–1174.

[66] K. Matsuzaki, T. Ogino, T. Sunazuka, H. Tanaka, S. Omura, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 66–69.

[67] K. Tachikawa, K. Hasumi, A. Endo, *Thromb. Haemostasis* **1997**, *77*, 137–142.

[68] C. M. Harris, T. M. Harris, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4293–4295.

[69] S. J. Hammond, M. P. Williamson, D. H. Williams, L. D. Boeck, G. G. Marconi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 344–346.

[70] S. J. Hammond, D. H. Williams, R. V. Nielsen, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1983**, 116–117.

[71] M. J. Zmijewski, Jr., B. Briggs, R. Logan, L. D. Boeck, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, *31*, 1497–1501.

[72] S. K. Chung, P. Taylor, Y. K. Oh, C. DeBrosse, P. W. Jeffs, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 642–651.

[73] T. I. Nicas, R. D. G. Cooper in *Biotechnology of Antibiotics* (Hrsg.: W. R. Strohl), Marcel Dekker, New York, **1997**, S. 363–392.

[74] B. K. Hubbard, M. G. Thomas, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 931–942.

[75] O. W. Chorba, D. H. Williams, J. B. Spencer, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5389–5390.

[76] W. J. McGahren, J. H. Martin, G. O. Morton, R. T. Hargreaves, R. A. Leese, F. M. Lovell, G. A. Ellestad, E. O'Brien, J. S. E. Holker, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 1671–1684.

[77] H. M. Holden, M. M. Benning, T. Haller, J. A. Gerlt, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 145–157.

[78] V. Pfeifer, G. J. Nicholson, J. Ries, J. Recktenwald, A. B. Schefer, R. M. Shawky, J. Schröder, W. Wohlleben, S. Pelzer, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38370–38377.

[79] H. Chen, C. C. Tseng, B. K. Hubbard, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 14901–14906.

[80] M. Steffensky, A. Mühlenweg, Z. X. Wang, S. M. Li, L. Heide, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 1214–1222.

[81] H. Chen, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 301–312.

[82] B. Lauer, R. Russwurm, C. Bormann, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1698–1706; B. Lauer, R. Russwurm, W. Schwarz, A. Kalmanczelyi, C. Bruntner, A. Rosemeier, C. Bormann, *Mol. Gen. Genet.* **2001**, *264*, 662–673.

[83] H.-W. Chen, B. K. Hubbard, S. O. O'Connor, C. T. Walsh, unveröffentlichte Ergebnisse.

[84] S. Kirner, S. Krauss, G. Sury, S. T. Lam, J. M. Ligon, K. H. van Pee, *Microbiology* **1996**, *142*, 2129–2135.

[85] P. E. Hammer, D. S. Hill, S. T. Lam, K. H. van Pee, J. M. Ligon, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 2147–2154.

[86] K. Hohaus, A. Altmann, W. Burd, I. Fischer, P. E. Hammer, D. S. Hill, J. M. Ligon, K. H. van Pee, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2102–2104; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2012–2013.

[87] T. Dairi, T. Nakano, K. Aisaka, R. Katsumata, M. Hasegawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 1099–1106.

[88] S. Keller, T. Wage, K. Hohaus, M. Holzer, E. Eichhorn, K.-H. van Pee, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 2380–2382; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2300–2302.

[89] M. A. Marahiel, T. Stachelhaus, H. D. Mootz, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2651–2673.

[90] H. von Doehren, U. Keller, J. Vater, R. Zocher, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2675–2705.

[91] T. Stein, J. Vater, V. Kruft, A. Otto, B. Wittmann-Liebold, P. Franke, M. Panico, R. McDowell, H. R. Morris, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 15428–15435.

[92] C. T. Walsh, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 2393–2396.

[93] K. Hoffmann, E. Schneider-Scherzer, H. Kleinkauf, R. Zocher, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12710–12714.

[94] T. Stachelhaus, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5775–5787.

[95] L. Luo, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2001**, *40*, 5329–5337.

[96] J. W. Trauger, C. T. Walsh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 3112–3117.

[97] J. W. Trauger, R. M. Kohli, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, C. T. Walsh, *Nature* **2000**, *407*, 215–218.

[98] A. Klemer, H. Wilbers, *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 815–823.

[99] G. Fronza, C. Fuganti, P. Grasselli, G. Pedrocchi-Fantoni, *J. Carbohydr. Chem.* **1983**, *2*, 5073–5076.

[100] G. Fronza, C. Fuganti, P. Grasselli, G. Pedrocchi-Fantoni, *J. Carbohydr. Chem.* **1983**, *2*, 5073–5076.

[101] R. Greven, P. Jutten, H.-D. Scharf, *Carbohydr. Res.* **1995**, *275*, 83–93.

[102] J. Thorson, B. Shen, R. Whitman, H.-W. Liu, Y. Li, J. Ahlert, *Bioorg. Chem.* **1999**, *27*, 172–188.

[103] L. Du, C. Sanchez, M. Chen, D. J. Edwards, B. Shen, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 623–642.

[104] J. P. Mackay, U. Gerhard, D. A. Beauregard, R. A. Maplestone, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4573–4580.

[105] U. Gerhard, J. P. Mackay, R. A. Maplestone, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 232–237.

[106] L. M. Quiros, I. Aguirre-Zabalaga, C. Olano, C. Mendez, J. A. Salas, *Mol. Microbiol.* **1998**, *28*, 1177–1185.

[107] R. Kornfeld, S. Kornfeld, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 631–664.

[108] H. W. Liu, J. S. Thorson, *Annu. Rev. Microbiol.* **1994**, *48*, 223–256.

[109] A. Kirschning, A. F.-W. Bechtold, J. Rohr, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *188*, 1–84.

[110] H. Chen, M. G. Thomas, B. K. Hubbard, H. C. Losey, C. T. Walsh, M. D. Burkart, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11942–11947.

[111] P. N. Kirkpatrick, W. Scaife, T. M. Hallis, H.-W. Liu, J. B. Spencer, D. H. Williams, *Chem. Commun.* **2000**, 1565–1566.

[112] A. D. Hegeman, J. W. Gross, P. A. Frey, *Biochemistry* **2001**, *40*, 6598–6610.

[113] S. Gaisser, G. A. Bohm, J. Cortes, P. F. Leadlay, *Mol. Gen. Genet.* **1997**, *256*, 239–251.

[114] S. Gaisser, G. A. Bohm, M. Doumith, M. C. Raynal, N. Dhillon, J. Cortes, P. F. Leadlay, *Mol. Gen. Genet.* **1998**, *258*, 78–88.

[115] L. Katz, S. Donadio, *Genetics and Biochemistry of Antibiotic Production*, Butterworth-Heinemann, Boston, **1995**, S. 385–420.

[116] H. C. Losey, M. W. Peczu, Z. Chen, U. S. Eggert, S. D. Dong, I. Pelczer, D. Kahne, C. T. Walsh, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4745–4755.

[117] P. J. Solenberg, P. Matsushima, D. R. Stack, S. C. Wilkie, R. C. Thompson, R. H. Baltz, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 195–202.

[118] A. M. Mulichak, H. C. Losey, C. T. Walsh, R. M. Garvito, *Structure* **2001**, *9*, 547–557.

[119] S. Ha, D. Walker, Y. Shi, S. Walker, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1045–1052.

[120] A. Vrielink, W. Ruger, H. P. Driessens, P. S. Freemont, *EMBO J.* **1994**, *13*, 3413–3422.

[121] J. E. Jackman, C. R. Raetz, C. A. Fierke, *Biochemistry* **1999**, *38*, 1902–1911.

[122] Y. Volchegursky, Z. Hu, L. Katz, R. McDaniel, *Mol. Microbiol.* **2000**, *37*, 752–762.

[123] C. R. Hutchinson, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2525–2535.

[124] D. I. Roper, T. Huyton, A. Vagin, G. Dodson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8921–8925.

[125] D. E. Bussiere, S. D. Pratt, L. Katz, J. M. Severin, T. Holzman, C. H. Park, *Mol. Cell* **1998**, *2*, 75–84.

[126] R. Araoz, E. Anhalt, L. Rene, M. A. Badet-Denisot, P. Courvalin, B. Badet, *Biochemistry* **2000**, *39*, 15971–15979.

[127] J. F. Barrett, J. A. Hoch, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 1529–1536.

[128] K. Stephenson, Y. Yamaguchi, J. A. Hoch, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 38900–38904.

[129] G. McMahon, L. Sun, C. Liang, C. Tang, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **1998**, *1*, 131–146.

[130] N. Bamas-Jacques, S. Lorenzon, F. Massey, G. deSwetschin, I. DeCourt, G. Sezonov, J. L. Permodet, A. Friedmann, M. Vuilhorgne, M. Couder, D. Thabaut, J. F. Desnotes, *Xth International Symposium on Biology of Actinomycetes. Abstract 2P11.*, Beijing, **1997**.

[131] L. Du, C. Sanchez, B. Shen, *Metab. Eng.* **2001**, *3*, 78–95.

[132] C. Coccito, *Microbiol. Rev.* **1979**, *43*, 145–198.

[133] P. Kloss, L. Xiong, D. L. Shinabarger, A. S. Mankin, *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 93–101.

[134] F. Biavasco, C. Vignaroli, R. Lupidi, E. Manso, B. Facinelli, P. E. Varaldo, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 2165–2172.

[135] E. Hershberger, J. R. Aeschlimann, T. Moldovan, M. J. Rybak, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 717–721.

[136] R. Kerns, S. D. Dong, S. Fukuzawa, J. Carbeck, J. Kohler, L. Silver, D. Kahne, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12608–12609.

[137] R. C. Goldman, E. R. Baizman, C. B. Longley, A. A. Branstrom, *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *183*, 209–214.

[138] T. Stachelhaus, H. D. Mootz, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 493–505.

[139] G. L. Challis, J. Ravel, C. A. Townsend, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 211–224.

[140] C. A. Arias, M. Martin-Martinez, T. L. Blundell, M. Arthur, P. Courvalin, P. E. Reynolds, *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 1653–1664.

[141] U. Linne, M. A. Marahiel, *Biochemistry* **2000**, *39*, 10439–10447.

[142] S. Gaisser, J. Reather, G. Wirtz, L. Kellenberger, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Mol. Microbiol.* **2000**, *36*, 391–401.

[143] H. Yamase, L. Zhao, H.-W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12397–12398.

[144] L. Zhao, J. Ahlant, Y. Zue, J. S. Thorson, D. H. Shermann, H.-W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9881–9882.

[145] J. Pootoolal, M. G. Thomas, C. G. Marshall, J. M. Neu, B. K. Hubbard, C. T. Walsh, G. D. Wright, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 8962–8967.

08612083\_gu

Green, M.M. / Wittcoff, H.A.  
**Organic Chemistry  
Principles and  
Industrial Practice**

Juni 2003. Ca. 280 S.,  
ca. 200 Abb., Br.  
Ca. € 34,90/sFr 60,-  
ISBN 3-527-30289-1

Nylon, Golfbälle, Penicillin und Plexiglas. Jeder kennt diese Alltagsprodukte, aber welche Chemie verbirgt sich dahinter?

In diesem Lehrbuch werden industrielle Prozesse mit Prinzipien der organischen Chemie verknüpft und in kompakten Kapiteln präsentiert. Das Buch bietet eine Quelle von sonst nur schwer zugänglichen Informationen über bekannte chemische Verfahren und ihre Entwicklung, aber auch persönliche Anekdoten aus dem Erfahrungsschatz der Autoren machen es zu einem "Muss" für jeden Studenten, Dozenten oder Lehrer, für die organische Chemie nicht nur graue Theorie ist.

Mark M. Green, Harold A. Wittcoff  
**Organic Chemistry  
Principles and  
Industrial Practice**  
Neu

Wiley-VCH · Postfach 10 11 61 · D-69451 Weinheim · Tel: +49 (0) 62 01-60 64 00  
Fax: +49 (0) 62 01-60 61 84 · e-mail: service@wiley-vch.de · Internet: www.wiley-vch.de

**WILEY-VCH**