

Kohlenhydrate in der Antibiotikaforschung: ein neuer Ansatz zur Resistenzbekämpfung

Thomas K. Ritter und Chi-Huey Wong*

Das große Interesse am Problem der Antibiotikaresistenz führte in letzter Zeit zur Entdeckung neuer Targets und Strategien in der Antibiotikafor- schung. Eine neue Richtung der Stra- tegien ist die Entwicklung kleiner Moleküle, die Kohlenhydratrezepto- ren und Kohlenhydrat-modifizierende Enzyme angreifen. Dieser Aufsatz stellt neuere Arbeiten auf diesem Ge-

biet vor und diskutiert den Einfluss der jeweiligen Vorgehensweisen auf das Auftreten von Resistenz. Von beson- derem Interesse sind die einzigartigen Kohlenhydrate der Zelloberfläche, die an der Peptidoglycan-Biosynthese be- teiligte Transglycosylase sowie die RNA der Bakterien. Mit zunehmen- dem Verständnis des Genoms ver- schiedener Bakterienarten und Fort-

schritten in der funktionalen Genom- forschung und Proteomforschung, ist die Entdeckung einer Vielzahl von Targets für die Entwicklung neuer Antibiotika zu erwarten.

Stichwörter: Antibiotika • Enzymin- hibitoren • Kohlenhydrate • Peptido- glycan • RNA

1. Einführung

Antibiotika sind Stoffe, die von Bakterien oder Pilzen gebildet werden und das Wachstum anderer Organismen beeinträchtigen. Heutzutage wird der Begriff Antibiotika häufig auf synthetische antibakterielle Substanzen ausge- dehnt. Seit Einführung der ersten Antibiotika, den Penicillinen, in den 40er und 50er Jahren wurden diese als Wundermittel gepriesen, die Bakterien vernichten ohne dabei den Zellen der Patienten zu schaden. Die Übersättigung des Marktes führte dazu, dass die Pharmaindustrie ihr Interesse an der Entwicklung neuer Antibiotika verlor und sich statt- dessen auf chronische Krankheiten konzentrierte. Bakterien entwickelten durch Mutationen und den Austausch von Genen Resistenz gegen ein Antibiotikum oder häufig gegen eine Vielzahl von Antibiotika.^[1, 2] Stämme von mindestens drei Bakterienarten (*Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Pseudomonas aeruginosa*), die lebensbedro- hende Krankheiten verursachen, sind resistent gegen alle verfügbaren Antibiotika. Enterokokken, die dafür bekannt sind, dass sie Resistenzgene relativ leicht austauschen, waren im Labor in der Lage, ihre Resistenz auf *Staphylococcus aureus*, einem besonders virulenten Organismus, der eine

Vielzahl von Krankheiten verursacht, zu übertragen, und es steht zu befürchten, dass ihnen das in natürlicher Umgebung ebenfalls gelingen wird.^[3] Zwei Faktoren werden als verant- wortlich für die Verschärfung dieses Problems angesehen: ein zu häufiger Gebrauch von Antibiotika von Menschen und Tieren sowie die Tatsache, dass Patienten häufig nicht die genaue Dosierung und Dauer der Behandlung einhalten.

Eine langandauernde Verabreichung niedriger Dosen oder das verfrühte Beenden einer Behandlung fördern das Wachstum resistenter Bakterienstämme. Resistenz wird durch einen oder mehrere der folgenden Mechanismen vermittelt:^[4, 5]

1. Aktiver Austritt aus der Zelle oder verminderte Aufnahme in die Zelle sowie eine Isolierung des Antibiotikums durch Binden an ein Protein können dazu führen, dass das Target nicht erreicht wird.
2. Das Antibiotikum kann durch enzymatische Modifizierung deaktiviert werden.
3. Eine Modifizierung des Targets kann zur Beseitigung oder zumindest einer Schwächung der Bindung des Antibio- tikums führen.
4. Durch eine Änderung des Stoffwechsels kann die inhibierte Reaktion umgangen werden.
5. Das Target des Antibiotikums kann überproduziert werden.

Unter diesen Mechanismen treten die ersten drei am häufigsten auf (Abbildung 1). Das weit verbreitete Auftau- chen dieser Resistenzmechanismen erneuerte das Interesse der Industrie an diesem Gebiet. Die zur Zeit verfügbaren Arzneistoffe wirken nur auf eine begrenzte Anzahl von Targets und alle stoßen auf Resistenzprobleme. Um diese zu überwinden, wird es neben einer fortlaufenden Verbesserung

* Prof. Dr. C.-H. Wong, T. K. Ritter
Department of Chemistry
and The Skaggs Institute of Chemical Biology
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 (USA)
Fax: (+1) 858-784-2409
E-mail: wong@scripps.edu

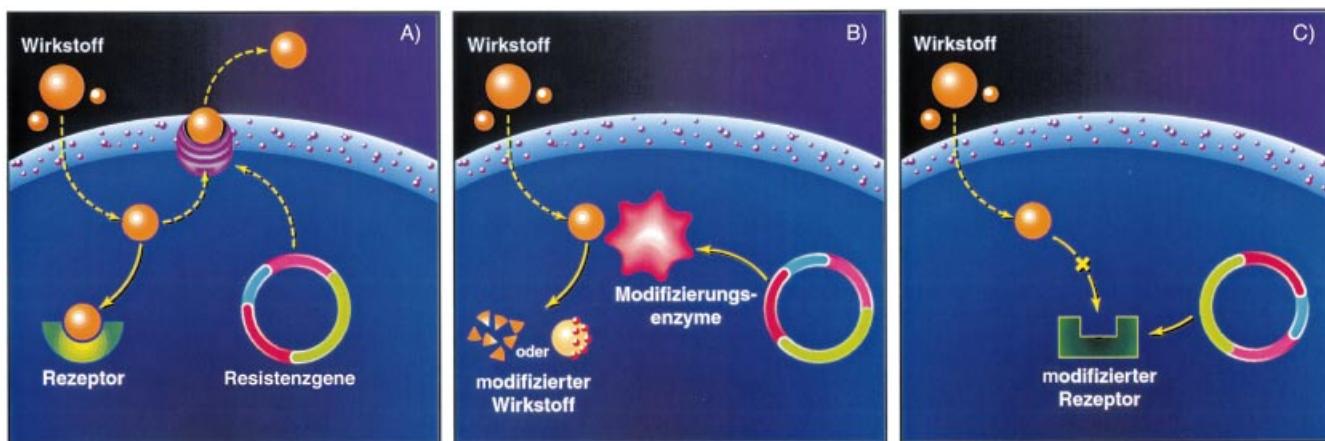


Abbildung 1. Resistenzmechanismen in Bakterien: A) aktiver Austritt, B) Modifizierung des Wirkstoffs durch Enzyme, C) Modifizierung des Targets.

der bestehenden Medikamente nötig sein, neue Targets ausfindig zu machen.

Kohlenhydrate sind in der Natur allgegenwärtig, sei es als Bestandteile des strukturellen Gerüsts von Zellen, Energiequellen des Stoffwechsels oder als Schlüsselbestandteile verschiedener interzellulärer Erkennungsprozesse.^[6, 7] Es ist daher nicht überraschend, dass die Wirkung einer Reihe bestehender Antibiotika auf Wechselwirkungen mit Kohlenhydraten basiert, d.h., sie bestehen, zumindest teilweise, aus Zuckern oder sie greifen Enzyme oder Rezeptoren an, die mit dem Aufbau, dem Stoffwechsel oder der Erkennung von Kohlenhydraten in Zusammenhang stehen. Die meisten dieser Antibiotika kommen natürlich vor oder es sind semisynthetische Antibiotika. Die Entwicklung von Kohlenhydrat-basierten Therapeutika scheint viele neue Möglichkeiten zu eröffnen, dennoch gibt es eine Reihe von Einschränkungen.^[8] Kohlenhydrate sind durch Hydroxygruppen mit vergleichbarer Reaktivität dicht funktionalisiert, was zu Schwierigkeiten bei ihrer Synthese führt. Sie binden das Target häufig nur mit schwacher Affinität. Des Weiteren

werden sie von medizinisch orientierten Chemikern als ungeeignet für die Entwicklung von Wirkstoffen betrachtet, da ihre Synthese normalerweise zu komplex für eine Prozessentwicklung im größeren Stil ist; außerdem sind Kohlenhydrate zu hydrophil für eine gute Bioverfügbarkeit. Darüber hinaus sind sie für eine orale Verabreichung meistens nicht stabil genug. Ein möglicher Ausweg ist die Entwicklung von Kohlenhydratmimetika mit verbesserten Eigenschaften in Bezug auf Stabilität, Spezifität, Affinität und synthetische Verfügbarkeit.^[9, 10] Diese Kohlenhydratmimetika könnten viele natürliche Prozesse beeinflussen, ohne dabei die Probleme auszulösen, die durch die unerwünschten Eigenschaften der Kohlenhydrate verursacht werden.

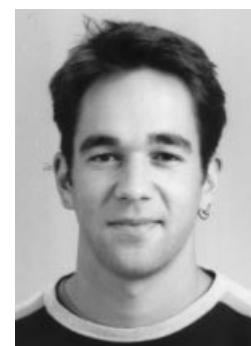
2. Wirkungsorte der Antibiotika

Antibiotika werden meistens nach Target und Wirkungsmechanismus klassifiziert. Ein Hauptziel bei der Entwicklung von Wirkstoffen sind solche Antibiotika, die die Biosynthese

Chi-Huey Wong erhielt seinen B.S.- und M.S.-Titel an der National Taiwan University und promovierte 1982 in Chemie bei G. W. Whitesides am Massachusetts Institute of Technology. Zusammen mit Professor Whitesides ging er an die Harvard University als Postdoc. Er lehrte sechs Jahre an der Texas A&M University und ist seit 1989 Professor und Inhaber des Ernest W. Hahn Chair in Chemistry am Scripps Research Institute. Seine derzeitigen Forschungsinteressen liegen auf dem Gebiet der Bioorganischen und der Synthesechemie sowie auf dem der Biokatalyse, insbesondere mit Blick auf die Entwicklung neuer Synthesemethoden unter Anwendung von enzymatischen und chemischen Reaktionen, der molekularen Glycobiologie und der rationalen, auf den Wechselwirkungsmechanismen basierenden Entwicklungen von Inhibitoren von Enzymen und Kohlenhydratrezeptoren.



C.-H. Wong



T. K. Ritter

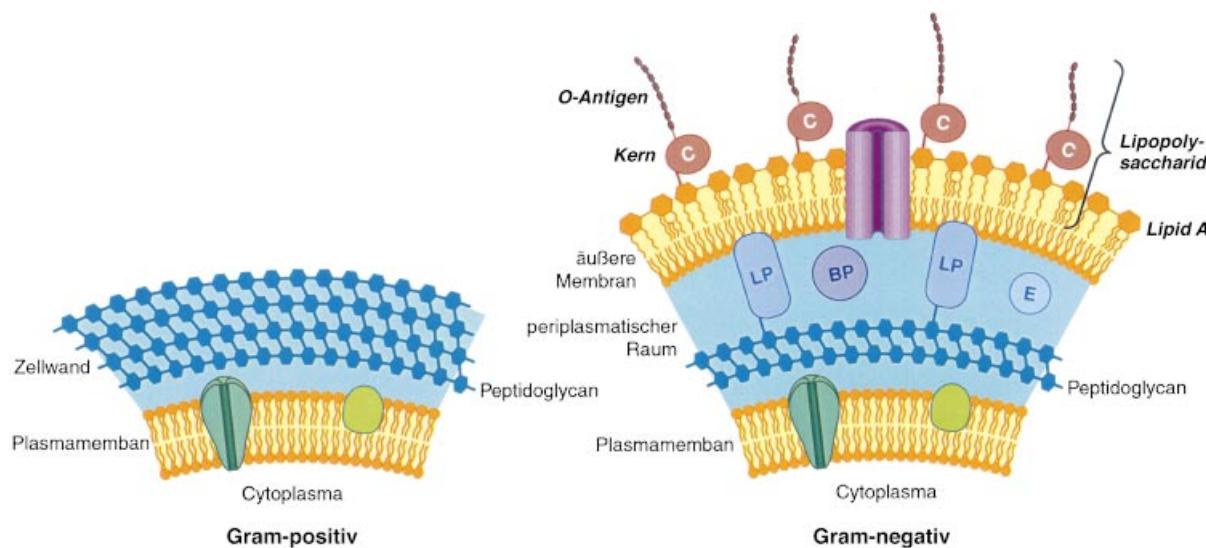


Abbildung 2. Die Zellhülle von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Gram-positive Bakterien haben eine dickere Peptidglycanschicht als Gram-negative Bakterien, aber es fehlt ihnen die äußere Membran an der Zelloberfläche.

und Funktion der bakteriellen Zellhülle beeinträchtigen. Bakterien werden nach der Struktur ihrer Zellhülle in Gram-positive und Gram-negative unterteilt (Abbildung 2). Das Cytoplasma Gram-positiver Bakterien wird von der Plasmamembran umschlossen. Diese Phospholipiddoppelschicht ist von der Zellwand umgeben, die aus einem Polysaccharid-Polypeptid-Gerüst besteht, das als Peptidglycan oder auch Murein bezeichnet wird. Die Oberfläche Gram-positiver Bakterien ist mit substituierten Phosphodiesterpolymeren (Teichonsäuren) bedeckt, an deren Ende sich häufig Lipopolysaccharide (LPS) befinden. Gram-negative Bakterien hingegen werden von zwei Phospholipiddoppelschichten (innere und äußere Membran) umschlossen, zwischen denen sich ein wässriger Bereich (periplasmatischer Raum) befindet. LPS bilden den Hauptbestandteil der äußeren Hälfte der äußeren Membran. Der periplasmatische Raum enthält neben einer Peptidglycanschicht Proteine die Zucker und andere Nährstoffe befördern. Therapeutika, die die Zellhülle angreifen, werden seit Jahrzehnten angewendet, da die Unversehrtheit der Zellhülle von großer Bedeutung für die Überlebensfähigkeit der Bakterien ist. Hierfür gibt es eine Vielzahl von Mechanismen, wobei die Inhibition der Peptidglycan-Biosynthese wahrscheinlich der wichtigste ist. Die Peptidglycanschicht ermöglicht den Bakterien durch ihre Stärke und Starrheit in hypotonischer Umgebung zu leben und verleiht ihnen ihre charakteristische Form. Durch Antibiotika ausgelöste Mängel führen dazu, dass der innere osmotische Druck zu groß wird und es kommt zur Zellyse. Des Weiteren stellt die Peptidglycan-Biosynthese ein interessantes Ziel für Antibiotika dar, da diese in den Zellen von Säugern nicht stattfindet. Andere Mechanismen, die auf eine Zersetzung der Zellhülle abzielen, sind die Inhibition der LPS-Biosynthese sowie die Bildung von Poren in den bakteriellen Membranen.

Translation in Prokaryonten ist der Zielprozess der Mehrzahl der bestehenden Antibiotika, da die komplexe Struktur der Ribosomen viele Angriffsmöglichkeiten bietet. Die Kristallstruktur der Ribosomen der Prokaryonten ist erst

vor kurzem aufgeklärt worden.^[11–13] Die Ribosomen sind aus zwei ungleichen Bestandteilen aufgebaut: Die größere 50S-Untereinheit besteht aus einer 5S- und einer 23S-rRNA und 34 Polypeptiden, während die kleinere 30S-Untereinheit eine 16S-rRNA und 21 Polypeptide enthält. Die Translation einer mRNA in ein Protein beginnt mit der Bildung des Initierungskomplexes: In Prokaryonten lagern sich die 30S- und die 50S-Untereinheit des Ribosoms sowie eine Formylmethionin-tRNA um eine mRNA. Das Ribosom verlängert dann das Polypeptid in einem mehrere Schritte beinhaltenden Reaktionskreislauf (Abbildung 3). Eine Aminoacyl-tRNA bindet an die A-Stelle; anschließend wird die wachsende Polypeptidkette von der tRNA in der P-Stelle auf die Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle übertragen. Transfer der daraus resultierenden ungeladenen tRNA aus dem Ribosom hinaus und Translokation (Verlagerung der Peptidyl-tRNA von der A-Stelle zur P-Stelle) vervollständigen den Kreislauf. Schließlich wird eine Übertragung der Peptidylgruppe auf Wasser an Stelle einer Aminoacyl-tRNA durch Binden zweier Releasing-Faktoren ausgelöst. Die Aminoglycosid- und Tetracyclinch-Antibiotika inhibieren die Translation durch Binden an die kleine Untereinheit des Ribosoms, während die Makrolid-Antibiotika, Chloramphenicol und die Oxazolidinone, eine relativ neue Klasse synthetischer Antibiotika, die große Untereinheit angreifen.

Zusätzlich zu den beiden großen Klassen der Antibiotika gibt es welche, die die RNA-Synthese beeinträchtigen (Rifamycine), DNA-Topoisomerase-Inhibitoren (Chinolone, 2-Pyridinone)^[14, 15] und die so genannten Antimetaboliten (Sulfonamide, Trimethoprim), die den Folsäure-Stoffwechsel hemmen.

3. Antibiotika, die die Zellhülle angreifen

3.1. LPS

Im Mensch und in höheren Tieren kann die Freigabe von LPS (Endotoxinen), die durch eine Behandlung mit anti-

bakteriellen Substanzen ausgelöst wird, einen septischen Schock verursachen. Dies löst in der Folge häufig Entzündungen aus, die weltweit eine Vielzahl von Todesfällen in Intensivstationen verursachen. Eine späte Behandlung mit gebräuchlichen Antibiotika führt zu einer Beschleunigung der LPS-Freigabe und daher zu einer Verschlimmerung der Krankheit. Pathophysiologische Probleme dieser Art können durch Beschränkungen der Wechselwirkungen zwischen LPS und Serum oder LPS und Zellrezeptoren (z.B. durch LPS-Antikörper oder LPS-Antagonisten) oder durch Hemmung der Produktion und Sekretion von Entzündungsmediatoren umgangen werden.^[16] Zudem können Substanzen, die die LPS-Biosynthese hemmen, Bakterien töten oder zumindest das bakterielle Wachstum beeinträchtigen und somit zu einer höheren Empfänglichkeit für andere Antibiotika führen. Des Weiteren könnten solche Wirkstoffe die Gefahr einer Gram-negativen Sepsis verringern, da sie die Menge der durch die Behandlung mit Antibiotika freigegebenen Endotoxine reduzieren.

Endotoxine oder LPSs sind aus drei Einheiten aufgebaut (Abbildung 4). Die Lipideinheit (Lipid A) besteht aus einem GlcNAc-GlcNAc-Disaccharid, welches durch Phosphatgruppen an der 1- bzw. der 4'-Position sowie durch mehrere Fettsäuren modifiziert ist. Dieses Phosphoglycolipid ist an die 3-Desoxy-D-manno-octulosonsäure (KDO) des Kernoligosaccharids gebunden, dessen Aufbau von der Bakterienart abhängig ist. Damit verknüpft ist das O-Antigen, eine sich wiederholende Oligosaccharidstruktur. Lipid A und zwei KDO-Moleküle bilden die kleinste Untereinheit der LPS, die Bakterien für ihr Wachstum benötigen. Pathologische Auswirkungen, die im Zusammen-

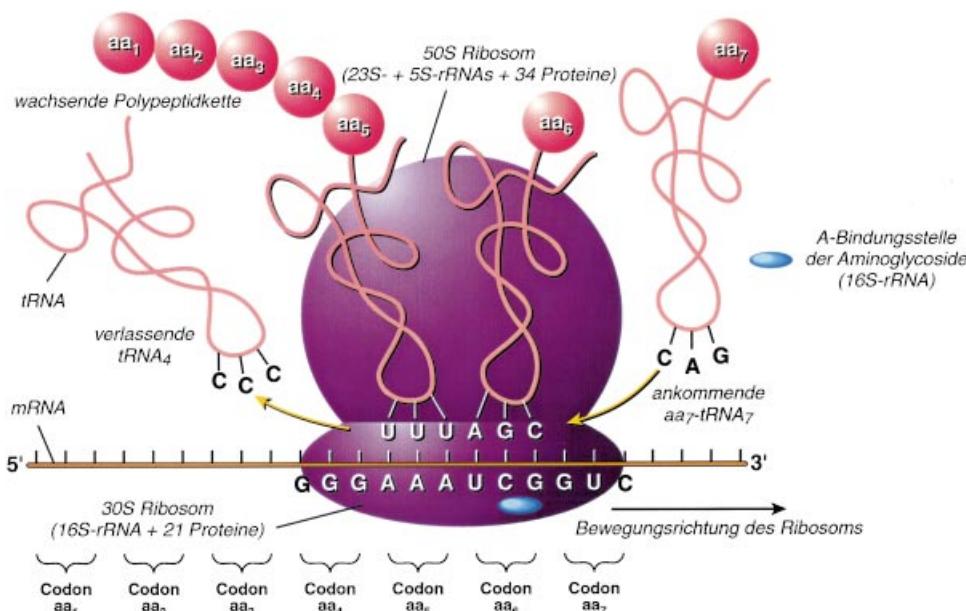


Abbildung 3. Die ribosomale Proteinsynthese und die A-Bindungsstelle der 16S-rRNA für Aminoglycoside.

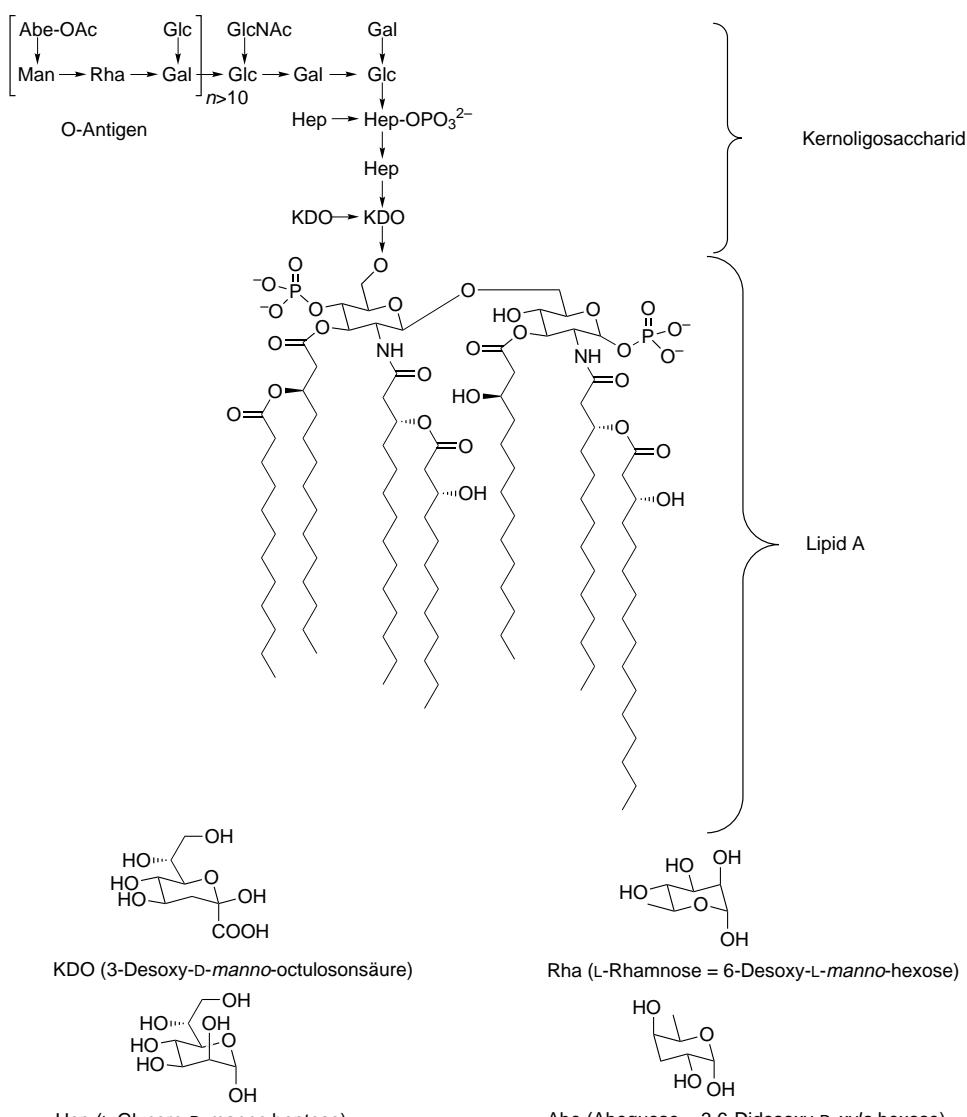
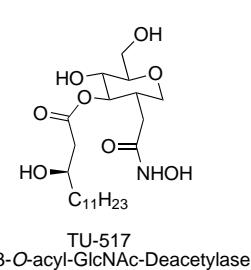


Abbildung 4. Das Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella typhimurium* (GlcNAc = N-Acetylglucosamin).

hang mit der Freigabe von LPS stehen, können durch Lipid A alleine ausgelöst werden.

Das einzigartige Enzym CMP-KDO-Synthase, das KDO als Cytdiynucleotid für die Einführung in die LPS-Schicht aktiviert, stellt einen der untersuchten Angriffspunkte zur Inhibition der LPS-Biosynthese dar. Obwohl KDO als Gemisch vier verschiedener Tautomere vorliegt, ist es nur in der β -Pyranose-Konformation ein Substrat für die CMP-KDO-Synthase.^[17] 2-Desoxy-KDO existiert ausschließlich in dieser Konformation und agiert daher als kompetitiver Hemmstoff der Synthase. 2,8-Didesoxy-8-amino-KDO, die die CMP-KDO-Synthase in vitro stärker hemmt als die einfache 2-Desoxy-KDO, wurde an Dipeptide gekuppelt, um einen Transport mit Peptid-Permeasen durch die Membran zu ermöglichen. Diese 2,8-Didesoxy-8-amino-KDO-dipeptide (Schema 1) wiesen je nach Peptid- und Bakterienart

Eine andere Vorgehensweise zur Inhibition des LPS-Aufbaus ist die Hemmung der Biosynthese von Lipid A, gegen die es mehrere Inhibitoren gibt (Schema 1). Screening und anschließende Optimierung führten zu der Entdeckung von Hydroxamsäurederivaten, die die UDP-3-O-Acyl-GlcNAc-Deacetylase (LpxC) hemmen.^[20] Es wird angenommen, dass die Hydroxamsäure durch Komplexierung eines Metallions im aktiven Zentrum, wodurch sie die Pyrophosphatgruppe des LpxC-Substrats nachahmt, die Deacetylase hemmt. Die aktivste dieser Verbindungen, L-161,240, hat eine MIC von ungefähr $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ gegen *E. coli* und heilte Mäuse von einer *E. coli* Infektion, die ohne Behandlung tödlich war. In einem mehr zielgerichteten Ansatz wurden Hydroxamsäuren an die 2-Aminogruppe von Monosacchariden, die einem Teil des LpxC-Substrats ähneln, gebunden.^[21] Verbindungen, die eine lange Alkylkette aufweisen, wie TU-517, wiesen eine größere Bandbreite antibakterieller Wirkung auf als die Hydroxamsäuren, die im einfachen Screening ermittelt wurden.

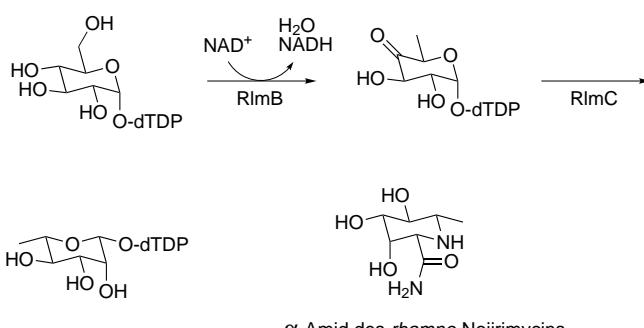


Schema 1. Inhibitoren der LPS-Biosynthese, die Targets sind in Klammern angeführt.

minimale Inhibitorenkonzentrationen (MIC) im Bereich von $5 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ auf.^[17] Da aktive Aminopeptidasen für die Aktivität dieser Konjugate benötigt werden, handelt es sich bei ihnen wahrscheinlich um Prodrugs, die den KDO-analogen Hemmstoff im Inneren der Zelle freigeben. In einer Erweiterung dieser Studie wurden C-Glycosylderivate der 2-Desoxy-KDO synthetisiert.^[18] Die Einführung jeglicher Substituenten an der C2-Position der KDO führte jedoch zu einem beinahe vollständigen Aktivitätsverlust, und es wurden seither von keinen Weiterentwicklungen dieses Ansatzes berichtet.

L-Glycero-d-manno-heptose (Hep) ist der zweite Zucker des Kernoligosaccharids, der in vielen Bakterienarten, nicht aber in Säugern, vorkommt. Die Aufklärung der Struktur der ADP-Hep-6-Epimerase, ein Enzym der Hep-Biosynthese, und die Schlussfolgerungen, die sich daraus über den Wirkungsmechanismus ableiten lassen, könnten das Design mechanismus- und strukturbasierter Hemmstoffe ermöglichen.^[19] Obwohl dieser Ansatz (Inhibition der Enzyme, die am Aufbau beteiligt sind, der Aktivierung und der Übertragung von KDO und Hep, der beiden einzigartigen Bausteine des Kernoligosaccharids) interessant ist und mit Sicherheit eine neue Richtung darstellt, hat er bisher noch nicht zu neuen Therapeutika geführt.

sich Desoxyzucker in den O-Antigenen, so ist L-Rhamnose einer der am häufigsten vorkommenden Bestandteile. Die Einbindung der L-Rhamnose in die Zellwand geschieht über ihre aktivierte Form, dTDP-L-Rhamnose, die in vier Schritten aufgebaut wird (Schema 2).^[22] Nach der Kondensation von Glucose-1-phosphat mit dTTP (Desoxothymidintriphosphat) erfolgt eine NAD⁺-abhängige 4,6-Dehydratisierung, eine Epimisierung der 3- und 5-Positionen und eine Reduktion. Die Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren, sind ein reizvoller Angriffspunkt für die Hemmung der Biosynthese, da im Menschen die dTDP-L-Rhamnose nicht vorkommt. Micromolare Konzentrationen einiger Analoga des rhamno-Nojirimycin und der verwandten Trihydroxypipocolinsäuren können die Synthese der dTDP-L-Rhamnose hemmen.^[23] Die jüngsten Studien der Strukturen des zweiten, dritten und vierten Enzyms der Biosynthese der dTDP-L-Rhamnose könnten



Schema 2. Die dTDP-L-Rhamnose-Biosynthese und einer ihrer Inhibitoren. (RlmA = Glucopyranose-1-phosphat-Thymidyl-Transferase, RlmB = dTDP-d-Glucose-4,6-Dehydratase, RlmC = 6-Desoxy-d-xylo-4-Hexulose-3,5-Epimerase, RlmD = dTDP-6-Desoxy-L-xylo-4-Hexulose Reduktase.)

bald eine strukturbasierte Vorgehensweise zur Hemmung dieser Enzyme ermöglichen.^[24–26]

Die Entwicklung von D-Peptiden, L-DNA und L-RNA als synthetische Rezeptoren ist ein relativ neuer Ansatz, der ebenfalls auf den Kohlenhydraten der Zelloberfläche basiert (Abbildung 5). Diese Enantiomere der natürlichen L-Peptide und D-Nucleinsäuren sind gegen enzymatischen Abbau resistent und daher im Kreislauf stabil. Biologische Replikations- und Evolutionsmethoden wie Phagen-Display und DNA- oder RNA-Evolution können für die Entdeckung solcher enantiomeren Oligomere genutzt werden.^[27] In einem Phagen-Display wurden kurze Peptide ausgewählt, die kleine Moleküle wie Dioxin^[28] oder Biotin^[29] mit mäßiger Affinität binden, und vielleicht ist es möglich, ähnliches für Zuckermoleküle zu erreichen. Diese Strategie wird seit kurzem angewendet, um L-Peptide, die L-Sialinsäure oder L-KDO binden, ausfindig zu machen. Die entsprechenden D-Peptide können dann chemisch synthetisiert werden und sollten die natürlichen D-Zucker binden. In einer ersten Studie wurde ein Peptid identifiziert, das Sialinsäure mit einer Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich bindet.^[30] Dieses Konzept unterscheidet sich deutlich von den Konzepten der herkömmlichen auf Kohlenhydraten basierenden Impfstoffe.^[31]

Die negative Ladung der Lipid-A-Phosphatgruppen ermöglicht Wechselwirkungen mit einer Anzahl kationischer Peptid-Antibiotika (z.B. Defensins, Magainins, Cecropins).^[32] Diese kationischen Peptide sind amphipathisch, d.h., sie haben sowohl einen hydrophoben als auch einen hydrophilen Teil. Die Gegenwart positiv geladener Seitenketten stattet sie mit einer höheren Affinität für LPS aus als die der Metallionen, die normalerweise die LPS-Phosphatgruppen binden. Dadurch wird die hydrophobe Seite dieser Antibiotika derart positioniert, dass sie die Unversehrtheit der äußeren Membran stören können, sodass die Therapeutika in die Membran eindringen und Kanäle bilden kann („self-promoted uptake“). Diese Poren fördern den Austritt aus dem periplasmatischen Raum und eine gesteigerte Aufnahme von antibakteriellen Verbindungen, die eine synergistische Wirkung mit den Peptid-Antibiotika aufweisen. Des Weiteren können Peptid-Antibiotika dank ihrer LPS-Affinität, die Toxizität von Endotoxinen reduzieren.

3.2. Peptidoglycan

Die Peptidoglycan-Biosynthese^[33] (Abbildung 6) beginnt mit dem Transfer einer Enolpyruylgruppe von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Die NADPH-abhängige Reduktion der daraus

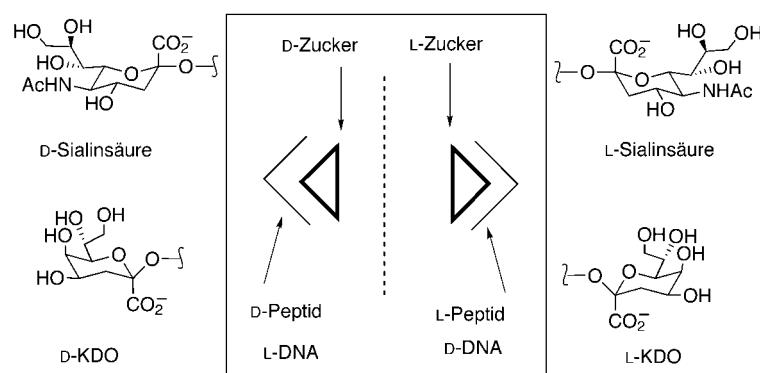


Abbildung 5. Design von D-Peptiden und L-Nucleinsäuren, die Zucker der Zelloberfläche als Target haben.

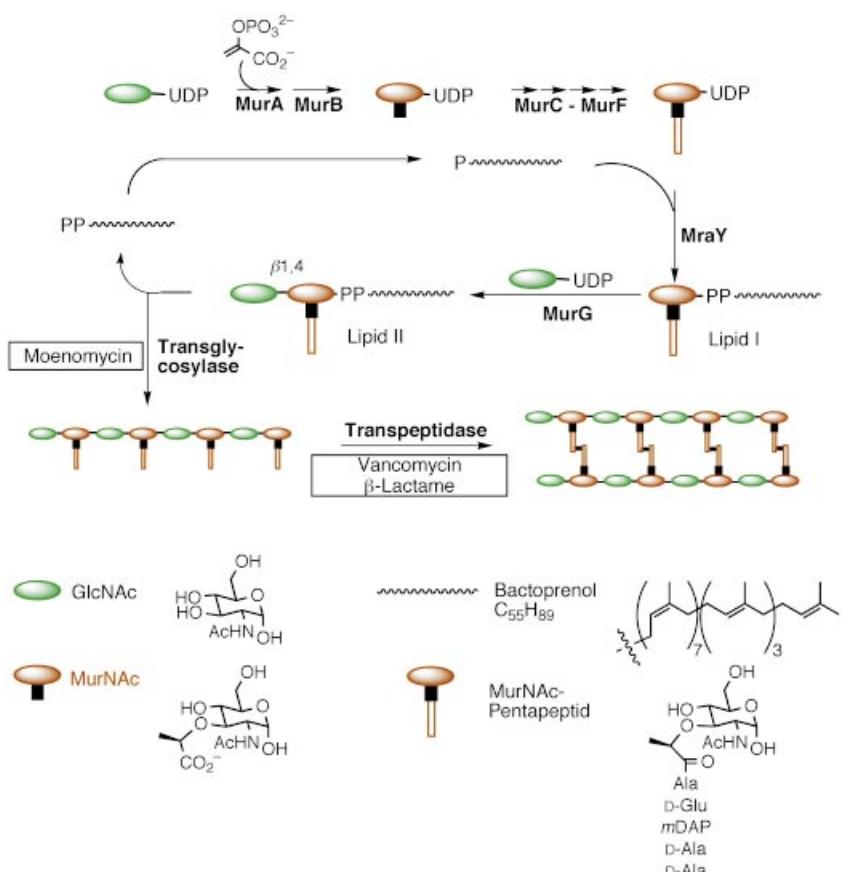
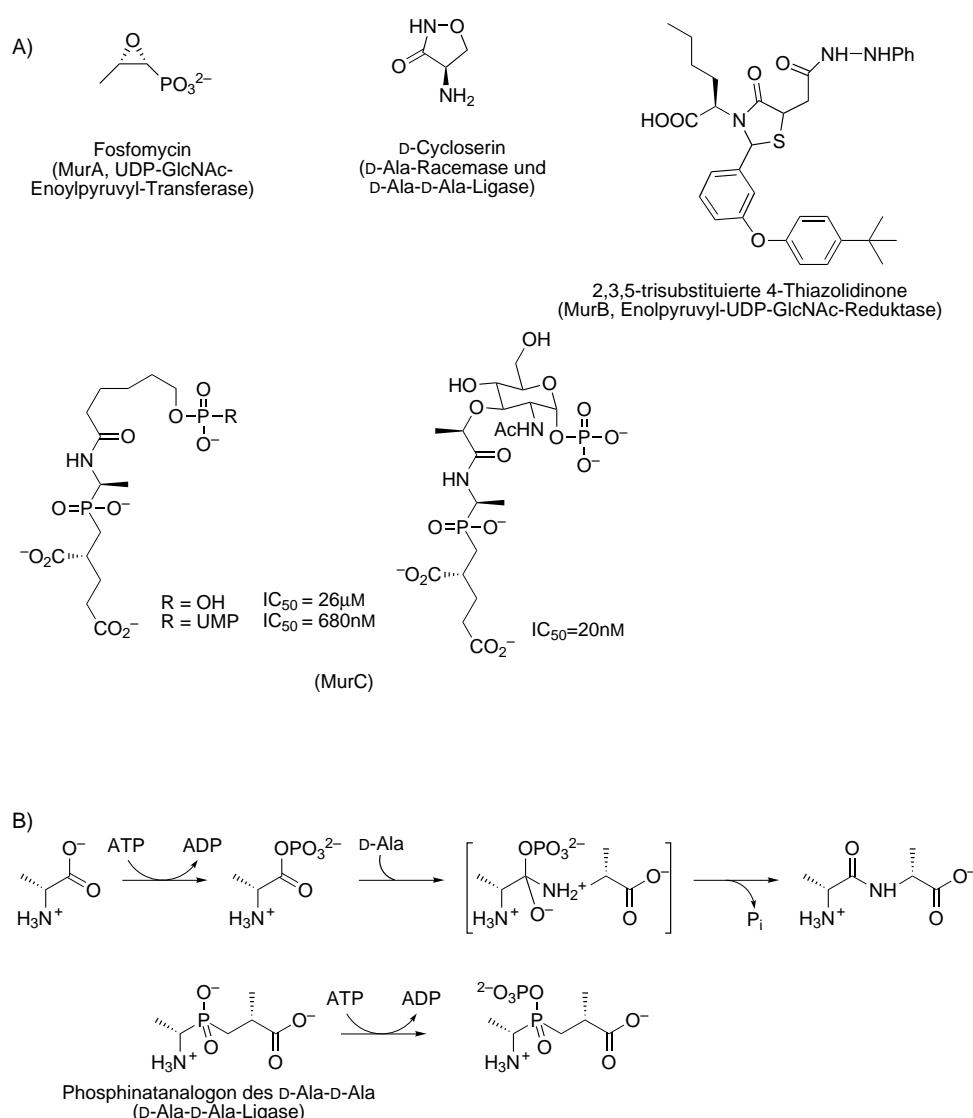


Abbildung 6. Biosynthese des Peptidglycans. UDP = Uridindiphosphat, Mur = Muraminsäure, P = Phosphatrest, MurNAc = N-Acetylmuraminsäure, MraY = Translokase, mDAP = meso-Diaminopimelinsäure.

entstehenden ungesättigten Säure ergibt UDP-N-Acetyl muraminsäure (UDP-MurNAc). Die drei Aminosäuren L-Ala, D-Glu und L-Lys (in Gram-positiven Bakterien) oder meso-Diaminopimelinsäure (mDAP in Gram-negativen Bakterien) werden schrittweise in ATP-abhängigen Reaktionen an die

Milchsäureseitenkette der UDP-MurNAc angefügt. Es folgt die Ankupplung eines vorgefertigten Dipeptids (normalerweise D-Ala-D-Ala) an das Peptidende. Die D-Aminosäuren werden aus L-Aminosäuren durch Racemasen oder aus α -Ketoglutarat durch Umsetzung mit D-Aminosäure-Transferasen gebildet. Dann wird das MurNAc-Pentapeptidphosphat von seinem UDP-Derivat auf Undecaprenylphosphat, ein in der cytoplasmatischen Membran verankertes Trägermolekül, übertragen. Ein zweites GlcNAc wird dann an die 4-Position des MurNAc-Pentapeptids gebunden. In vielen Gram-positiven Bakterien werden nach Bildung des Disaccharids mehrere Aminosäuren (normalerweise Glycine) an die ϵ -Aminogruppe des Lysins angefügt. Durch einen unbekannten Mechanismus wird dann das GlcNAc-MurNAc-Peptid durch die cytoplasmatische Membran an die Zelloberfläche befördert. Dort werden die Disaccharideinheiten durch mehrere Transglycosylasen polymerisiert. Schließlich katalysieren Transpeptidasen den Angriff der Seitenkettenaminogruppe der mDAP (Gram-negative Bakterien) oder des Aminoendes des Oligoglycins (Gram-positive Bakterien) auf die Peptidbindung zwischen den beiden D-Ala-Einheiten, was zur Vernetzung unter gleichzeitiger Abspaltung von D-Alanin führt.

Diese Enzyme sind Targets für die Entwicklung von Antibiotika, so hemmen die gebräuchlichsten Antibiotika (Penicilline und Cephalosporine) die Transpeptidase, welche für die Vernetzung verantwortlich ist. Die weitverbreitete Resistenz gegen diese Antibiotika, die durch die Induktion von β -Lactamasen hervorgerufen wird, die die Hydrolyse der β -Lactameinheit katalysieren, hat die Bedeutung der Antibiotika gesteigert, die die vorhergehenden Schritte in der Peptidoglycan-Biosynthese beeinträchtigen (Schema 3). Fosfomycin, ein Analogon des PEP, ist ein irreversibler Inhibitor der UDP-GlcNAc-Enolpyruvyl-Transferase (MurA). Die Kristallstruktur des MurA-Fosfomycin-Komplexes zeigte, dass das Antibiotikum kovalent an eine Cysteinseitenkette im aktiven Zentrum gebunden ist. Dies deutet darauf hin, dass die Inaktivierung durch Angriff des Cysteinths auf die Epoxygruppe des Fosfomycins geschieht.^[34] Der Enolpyruvyl-UDP-GlcNAc-Reduktase (MurB) wurde erst in letzter Zeit Beachtung geschenkt und eine erste Reihe von Inhibitoren ist veröffentlicht worden.^[35] Diese diastereomeren 2,3,5-trisub-



Schema 3. A) Inhibitoren der ersten Schritte der Peptidoglycan-Biosynthese, die Targets sind in Klammern angeführt, B) die D-Ala-D-Ala-Ligase-Reaktion.

stituierten 4-Thiazolidinone ähneln der Pyrophosphatgruppe des MurB-Substrats. Die Enzyme MurC–F, die für die schrittweise Kupplung der Aminosäuren an den Milchsäurerest der MurNAc verantwortlich sind, sowie die D-Ala-D-Ala-Ligase (Ddl) katalysieren die Bildung von Peptidbindungen. In einer Reihe von Hemmstoffen dieser Enzyme wurde die Peptidbindung des Reaktionsprodukts durch einen Phosphatenthaltenden Rest ersetzt, der die tetraedrische Geometrie des Zwischenprodukts nachahmt.^[36] Durch Untersuchungen der D-Ala-D-Ala-Ligase konnten der Mechanismus, mit dem ein Phosphoranalogon den Übergangszustand der Reaktion nachahmt, aufgeklärt werden.^[37] Die D-Ala-D-Ala-Racemase und die D-Ala-D-Ala-Ligase werden auch von dem Antibiotikum D-Cycloserin angegriffen.^[38] Dieses Antibiotikum weist eine kompetitive Hemmung der beiden Enzyme auf und wird daher als ein D-Alaninstrukturanalogon angesehen. Die ersten MurD- und MurE-Inhibitoren bestanden aus einer Phosphatgruppe oder UDP, die durch einen einfachen Alkyllinker mit einer Peptidgruppe, die den Übergangszu-

stand nachahmt, verbunden waren.^[39, 40] Austausch des Alkyllinkers gegen die MurNAc des natürlichen Substrats steigerte die Wirkungskraft des Inhibitors um mehrere Größenordnungen.^[41] Bacitracin, ein cyclisches Peptid, verhindert die Wiederverwertung des Trägerlipids durch Komplexierung der Pyrophosphatgruppe in der Gegenwart von Magnesiumionen.^[42]

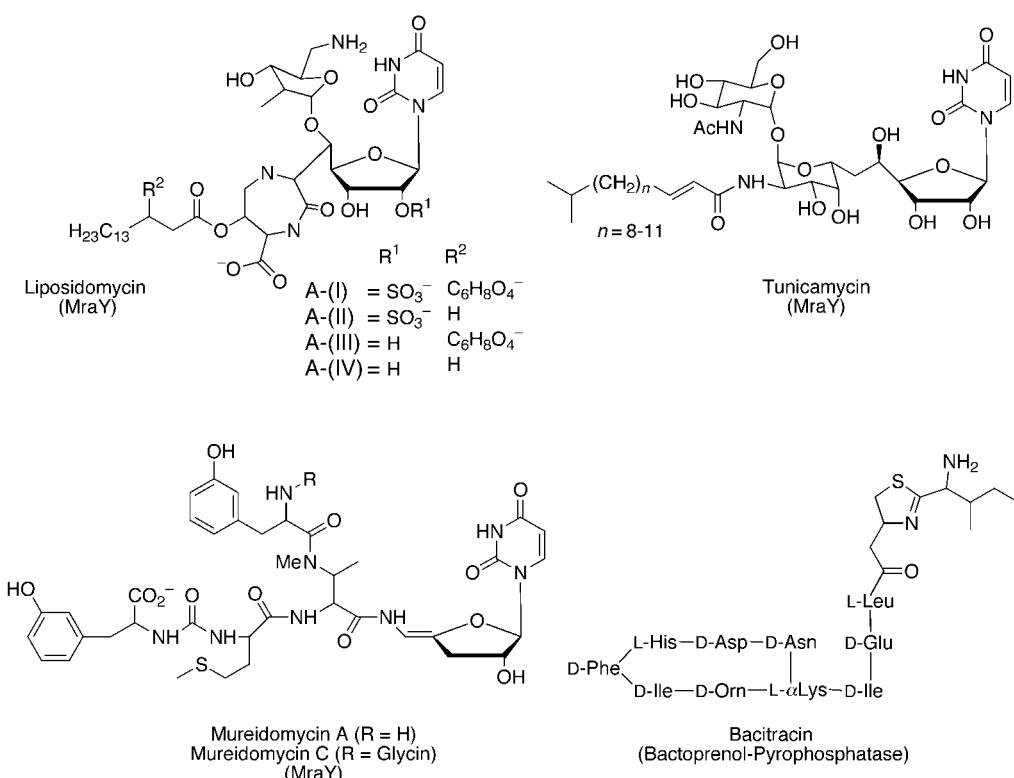
Mehrere Nucleosid-Antibiotika hemmen die Phospho-MurNAc-Pentapeptid-Translocase (MraY).^[43] Zu diesen zählen Tunicamycin, die Liposidomycine und die Mureidomycine (Schema 4). Obwohl Tunicamycin ein starker Hemmstoff ist, ist seine Selektivität für MraY gering. Tunicamycin inhibiert auch die Bildung der *N*-gebundenen Glycane, Vorstufen der Glycoproteine in Säugern, was zu Toxizitätsproblemen führt. Die Mureidomycine und Liposidomycine hingegen weisen eine ausgezeichnete Selektivität für MraY auf.^[44, 45] Trotz dieser starken In-vitro-Aktivität, wirken die Liposidomycine nur schwach gegen Bakterien. Der Transport in die Zellen mag durch die hydrophile Sulfatgruppe begrenzt sein. Durch eine Änderung der Mediumsbestandteile wurden neue Liposidomycinanaloga ohne die Sulfatgruppe und/oder ohne die 3-Methylglutaminsäure isoliert.^[46, 47] Diese neuen Analoga hemmen nicht nur selektiv MraY, sondern zeigen eine höhere Aktivität gegen Bakterien als die natürlichen hydrophileren Moleküle.^[46] Aus einer Überlagerung der energieminimalisierten Konformation der Liposidomycine mit dem Nucleosidsubstrat UDP-MurNAc-Pentapeptid ließ sich schließen, dass der Ribosaminzucker der Liposidomycine die Pyrophosphatgruppe des UDP-MurNAc-pentapeptids nachahmt.^[48] Der Nucleosidribosaminkern wurde synthetisiert und erwies sich als geeigneter Hemmstoff. Für eine vollständige Klärung der Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR)

wird es nötig sein, die Rolle aller funktionellen Gruppen der Liposidomycine zu untersuchen. Des Weiteren wurden Analoga der Mureidomycine synthetisiert, um deren Inhibititionsmechanismus aufzuklären.^[49] Die zentrale Enamidgruppe, die den Nucleosid- mit dem Peptidteil innerhalb der Mureidomycine verbindet, stellt ein einzigartiges strukturelles Merkmal dar. Enamide tautomerisieren unter sauren Bedingungen zu reaktiven *N*-Acyliminiumionen. Es wurde vermutet, dass ein nucleophiler Angriff im aktiven Zentrum zu einer kovalenten Bindung mit dem Enzym führen könnte. Da einfache Nucleosidstrukturen, die die ungewöhnliche Enamidgruppe der Mureidomycine enthalten, jedoch nicht aktiv sind, ist diese Gruppe möglicherweise nicht an der MraY-Inhibition durch die Mureidomycine beteiligt.

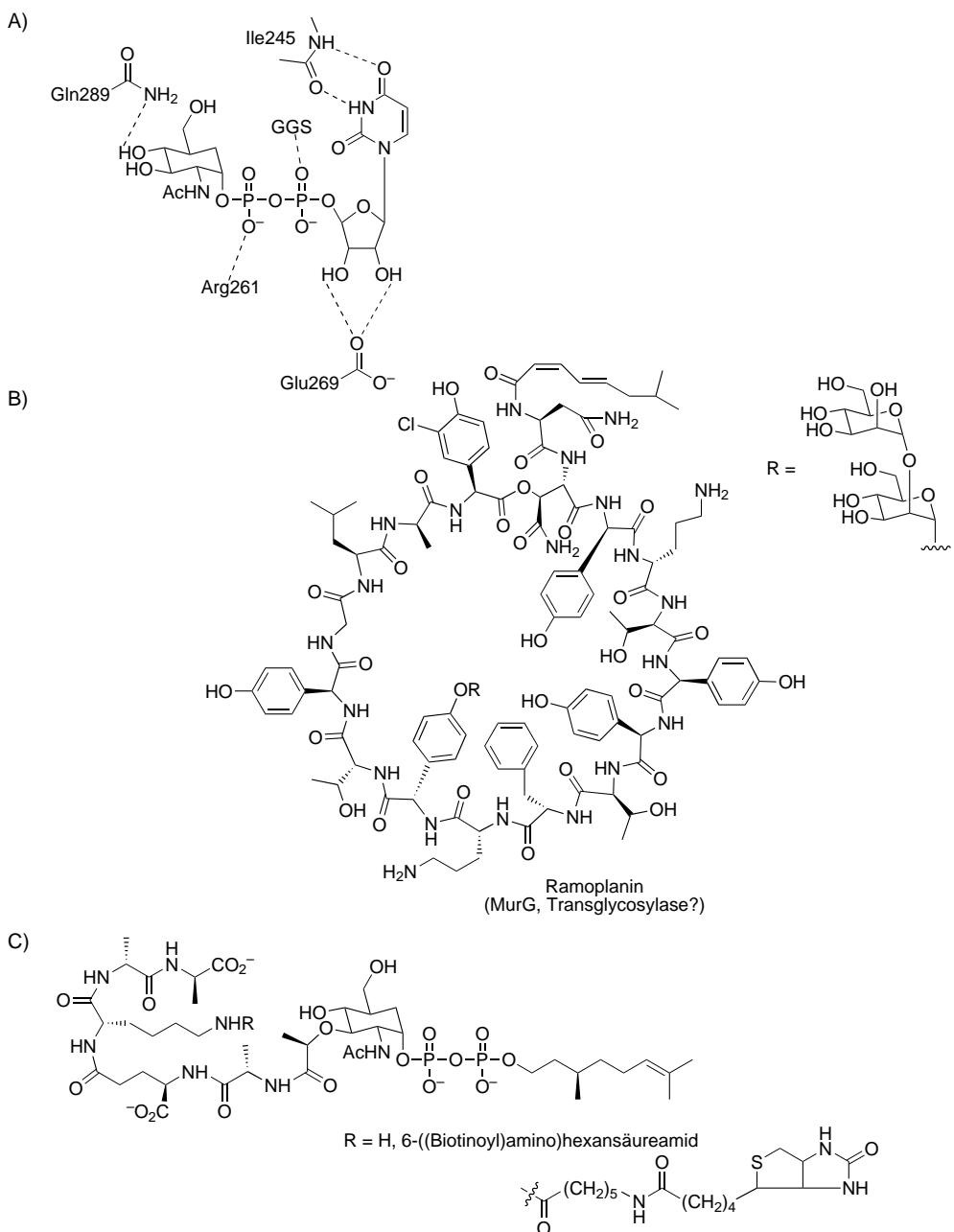
Ramoplanin, ein Glycodepsipeptid, ist der einzige bekannte natürlich vorkommende Hemmstoff der GlcNAc-Transferase (MurG) (Schema 5).^[50] Die Entwicklung synthetischer Inhibitoren dieses Enzyms wird dadurch behindert, dass es schwierig ist, MurG und sein Substrat, das in nur relativ geringen Mengen in den Zellen vorliegt, zu erhalten. Vor kurzer Zeit wurde MurG dennoch isoliert^[51] und seine Kristallstruktur aufgeklärt.^[52] Zudem konnte durch ein vereinfachtes Lipid-I-Analogon als Substrat das MurG-Testsystem stark vereinfacht werden.^[53] Das synthetische Substrat unterscheidet sich vom Lipid I nur dadurch, dass die C55-Kette durch die C10-Kette des Citrollenol ersetzt wurde. Um den Testvorgang zu vereinfachen, wurde außerdem ein Biotin-Derivat synthetisiert, das den Entwurf und die Bewertung neuer, synthetischer MurG-Inhibitoren ermöglichen sollte. Mit diesem neuen Verfahren wurde die Kinetik der MurG-Reaktion charakterisiert^[51] und der Wirkungsort des Ramoplanins neu untersucht.^[54] Die Ergebnisse zeigen, dass das

Ramoplanin in erster Linie durch die Hemmung der Transglycosylase wirkt und nicht etwa durch eine Hemmung des MurG, wie früher vermutet wurde.

Mehrere Gründe sprechen dafür, dass die Transglycosylase, die für die Polymerisierung der Disaccharideinheiten verantwortlich ist, vielleicht das interessanteste Target unter den Enzymen der Peptidoglycan-Biosynthese ist. Zum einen befindet sich dieses Enzym an der Zelloberfläche und bietet somit Wirkstoffen einen einfachen Zugang. Zum anderen wurden bisher keine Unterschiede des Polysaccharidrückgrats zwischen Wildtyp und resistenten Stämmen beobachtet. Neue Antibiotika, die den Transglycosylierungsprozess beeinflussen, könnten daher weniger anfällig für eine Resistenzbildung sein. Die



Schema 4. Inhibitoren der MraY (Translokase) und der Bactoprenol-Pyrophosphatase.



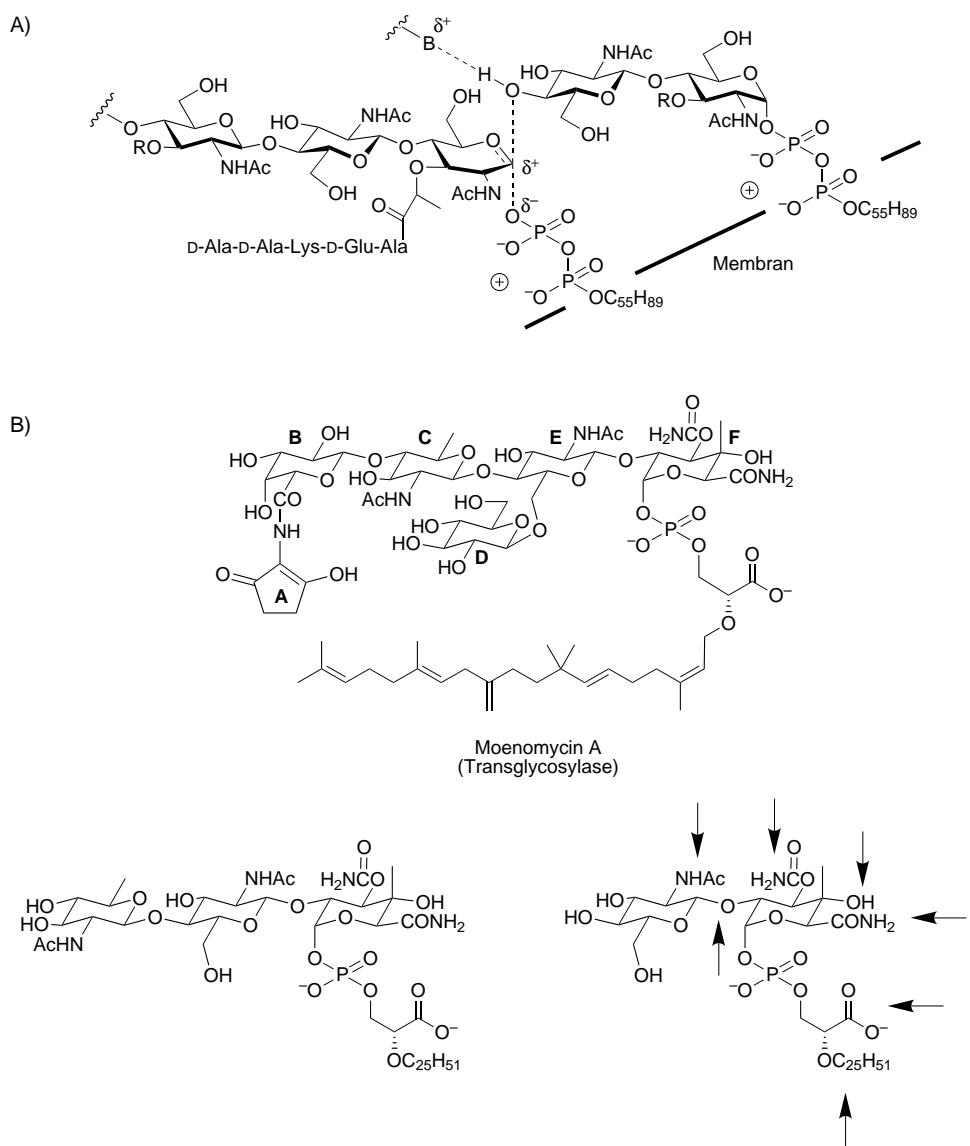
Schema 5. GlcNAc-Transferase (MurG): A) Wechselwirkungen zwischen dem Donorsubstrat und dem Enzym (durch Röntgenstrukturanalyse untersucht), B) ein MurG-Inhibitor, C) Acceptororderivat, das im MurG-Testsystem verwendet wird.

Transglycosylierung kann nicht einem einzigen Enzym zugeordnet werden. Mehrere der Penicillin-bindenden Proteine (PBP) des *E. coli* weisen eine Transglycosylaseaktivität auf. Einige der PBP katalysieren zusätzlich auch die Transpeptidierung. Eine systematische Studie der Mutanten, denen alle möglichen Kombinationen der acht PBP fehlen, bestätigte, dass wenigstens PBP1A oder PBP1B vorhanden sein müssen, um ein Überleben der Bakterien zu garantieren.^[55] Zusätzlich zu den difunktionellen PBPs gibt es monofunktionelle PBPs,^[56] deren genaue Bedeutung ist bisher aber noch unklar. Die selben Schwierigkeiten, die die Entwicklung von MurG-Inhibitoren beeinträchtigten, bestehen auch für die Transglycosylierungsreaktion.^[57] Die Aktivität gegen Transglycosy-

lasen wird im Allgemeinen in einem aufwendigen und oft mehrdeutigen Testverfahren gemessen.^[58] Es gibt zwar ein Hochdurchsatz-Screening für die Transglycosylase, da dieses aber auf einer Verdrängung des stark bindenden Phosphoglykolipids Moenomycin basiert, lassen sich mit diesem nur Substanzen mit einer starken Affinität für PBP finden.^[59]

Naturprodukte, die die Transglycosylierung hemmen (Schema 6), können in zwei Klassen eingeteilt werden. Erstens, solche, die direkt das Enzym hemmen (z.B. Moenomycin) und zweitens, solche, die das Lipid II, das Substrat der Transglycosylierung, binden (z.B. Typ-B-Lantibiotika, Glycopeptid-Antibiotika). Die dreidimensionale Struktur des Phosphoglykolipids Moenomycin, das als Wachstumsstimulator in der Tierzucht verwendet wird, wurde gelöst^[60] und detaillierte SAR-Studien wurden durchgeführt.^[61, 62] Die Moenomycine und Analoga, die aus mindestens drei der Zuckereinheiten (C, E, F) bestehen, sind *in vivo* gegen Gram-positive Bakterien aktiv. Derivate, die aus nur zwei Zuckern (E, F) bestehen haben zwar keine antibiotische Wirkung, können aber die Transglycosylase *in vitro* hemmen, falls sie das richtige Substitutionsmuster haben. Sämtliche funktionellen Gruppen des F-Rings, die Acetamidogruppe des E-Rings und der Lipidteil mit seinen Carboxy- und Phosphatgruppen werden zur Inhibition benötigt. Leider

ist es aus der Struktur des Moenomycins alleine nicht offensichtlich, auf welche Art und Weise das natürliche Substrat der Transglycosylierung durch diesen Hemmstoff nachgeahmt wird. Das Design wirksamer Antibiotika, die auf der Kernstruktur der Moenomycins basieren, ist daher nicht einfach. Es wurde jedoch eine kombinatorische Bibliothek synthetisiert, in der vier Schlüsselpositionen (die 3- und 4-Substituenten des F-Rings, der 2-Substituent des E-Rings und die Lipidseitenkette) variiert wurden (Schema 7).^[63] Diese Arbeit führte zu der Entdeckung einer neuen Disaccharidklasse mit zwei aromatischen Substituenten, die nicht nur die Peptidglycansynthese *in vitro* inhibieren, sondern auch als Antibiotika aktiv sind und ein Aktivitätsprofil



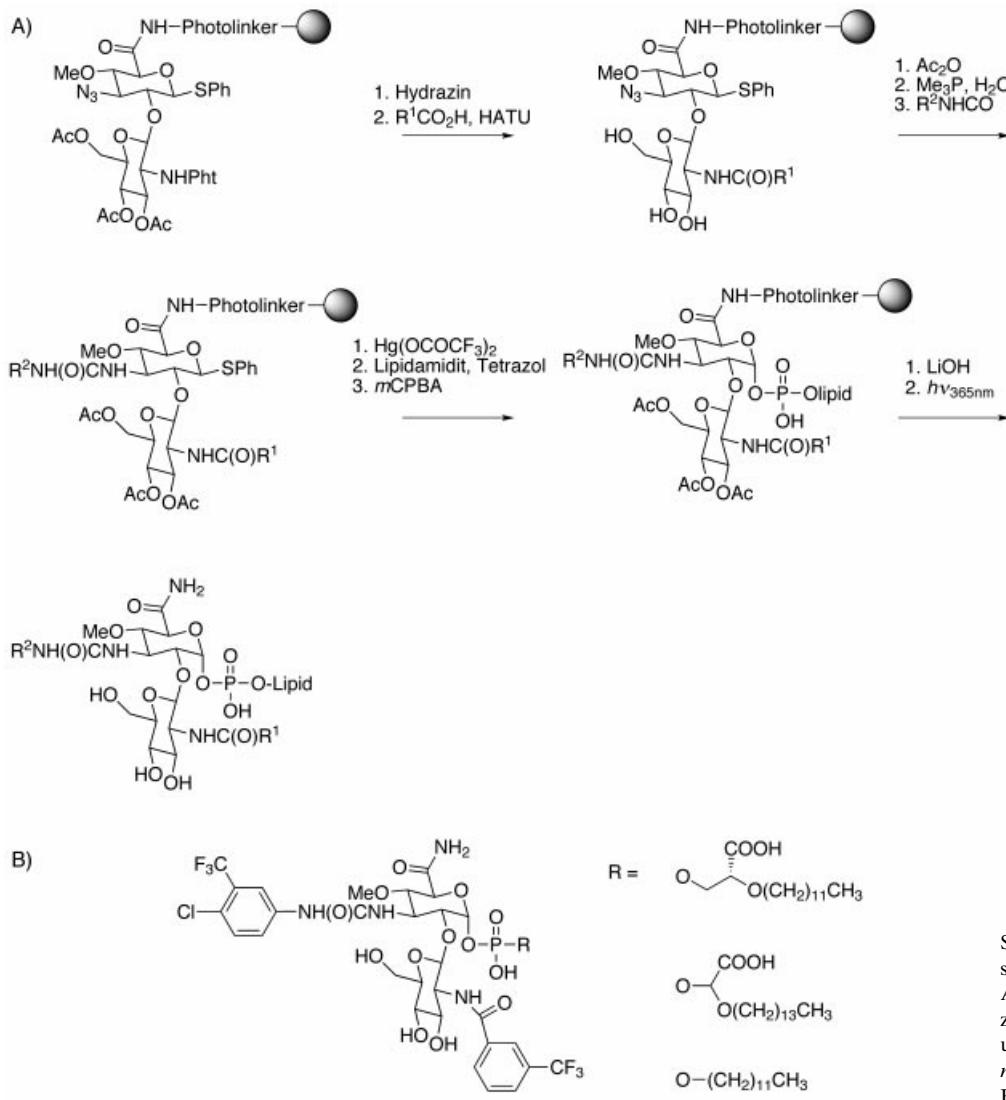
Schema 6. Die Transglycosylase-Reaktion: A) der postulierte Übergangszustand, B) Moenomycin A und zwei vereinfachte Derivate. Die Pfeile markieren die strukturellen Elemente, die sich in SAR-Studien als essentiell für die Aktivität erwiesen.

aufweisen, das sich von dem des Moenomycins unterscheidet.^[64] Eine Reihe von Inhibitoren, die alle eine lange Alkylkette enthalten, die den Membrananker des Lipid II nachahmen soll, wurden entworfen, unter ihnen sind Phosphat-,^[65, 66] Phosphonat-,^[66, 67] und Thiazolinderivate^[68] der MurNAc und des GlcNAc-MurNAc-Disaccharids zu finden, doch keines dieser Moleküle hemmt die Transglycosylierung wirkungsvoll. Dies und die SAR-Studien am Moenomycin sowie die Ergebnisse des Screenings der kombinatorischen Moenomycindisaccharid-Bibliothek deuten darauf hin, dass kleine Mono- und Disaccharide wahrscheinlich nicht genügend Angriffspunkte für eine ausreichende Zahl an Wechselwirkungen liefern, die für eine starke Bindung an die Transglycosylasen benötigt werden.

Lantibiotika sind Peptid-Antibiotika mit den ungewöhnlichen Aminosäuren Lanthionin und Methyllanthionin, die intramolekulare Thioether-Brücken bilden können (Abbildung 7).^[69, 70] Sie wechselwirken mit Molekülen, die in der

cytoplasmatischen Membran verankert sind, z.B. dem Lipid II.^[71, 72] Die Bindung wird durch D-Ala-D-Ala nicht antagonisiert, was darauf hindeutet, dass sich diese Wechselwirkung von der des Vancomycins (siehe Schema 8) unterscheidet. Die Lantibiotika können je nach Wirkungsmechanismus in zwei Klassen unterteilt werden. Typ-A-Lantibiotika, z.B. Nisin, bilden Poren in der cytoplasmatischen Membran,^[73] wohingegen Typ-B-Lantibiotika, z.B. Mersacidin, Actagardine, direkt in die Peptidoglycan-Biosynthese eingreifen, indem sie die Transglycosylierung hemmen.^[74]

Die Glycopeptid-Antibiotika wurden im letzten Jahrzehnt gründlich untersucht und eine Reihe von Aufsätzen, die sich mit dieser Molekülklasse beschäftigen, wurde veröffentlicht.^[75, 76] Zwei Glycopeptid-Antibiotika, das Vancomycin und das Teicoplanin, werden klinisch verwendet (Schema 8). Da diese in der Behandlung bakterieller Infektionen, gegen die andere Antibiotika keine Wirkung zeigen (insbesondere Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme (MRSA)), eingesetzt werden, bezeichnet man sie auch oft als einzige und letzte Rettung. Der Wirkungsmechanismus der Glycopeptid-Antibiotika ist weitgehend geklärt: Die cyclische Peptid-einheit bindet mit fünf Wasserstoffbrückenbindungen den D-Ala-D-Ala-Terminus des Lipid II und des ungereiften Peptidoglycans, wodurch die Transglycosylierung und die Vernetzung der Peptidseitenketten verhindert wird (Schema 9).^[77] Resistenz gegen Vancomycin tritt dann auf, wenn die Bakterien die Zusammensetzung des Peptidoglycanpeptidteils ändern.^[78] Es wurden resistente Stämme isoliert, die D-Lactat oder D-Serin als terminale Aminosäuren enthalten. Dies führt zu einer Verringerung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem cyclischen Peptid des Antibiotikums und dem Peptidterminus des Peptidoglycans, was wiederum zu einer Schwächung der Bindung und somit zur Resistenz führt. Obwohl die SAR der Glycopeptid-Antibiotika genau untersucht wurde,^[79] ist es nicht offensichtlich, welche Änderungen nötig sind, um ihre Affinität für den Peptidterminus Vancomycin-resistenter Bakterien zu erhöhen. Zudem ist es möglich, dass solche maßgeschneiderten Antibiotika schnell ihre Wirksamkeit verlieren könnten, wenn sich die Zusam-



Schema 7. Eine auf Moenomycin basierende kombinatorische Bibliothek.
A) Synthese (HATU = *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, *mCPBA* = *meta*-Chlorperbenzoësäure), B) einige der aktivsten Strukturen.

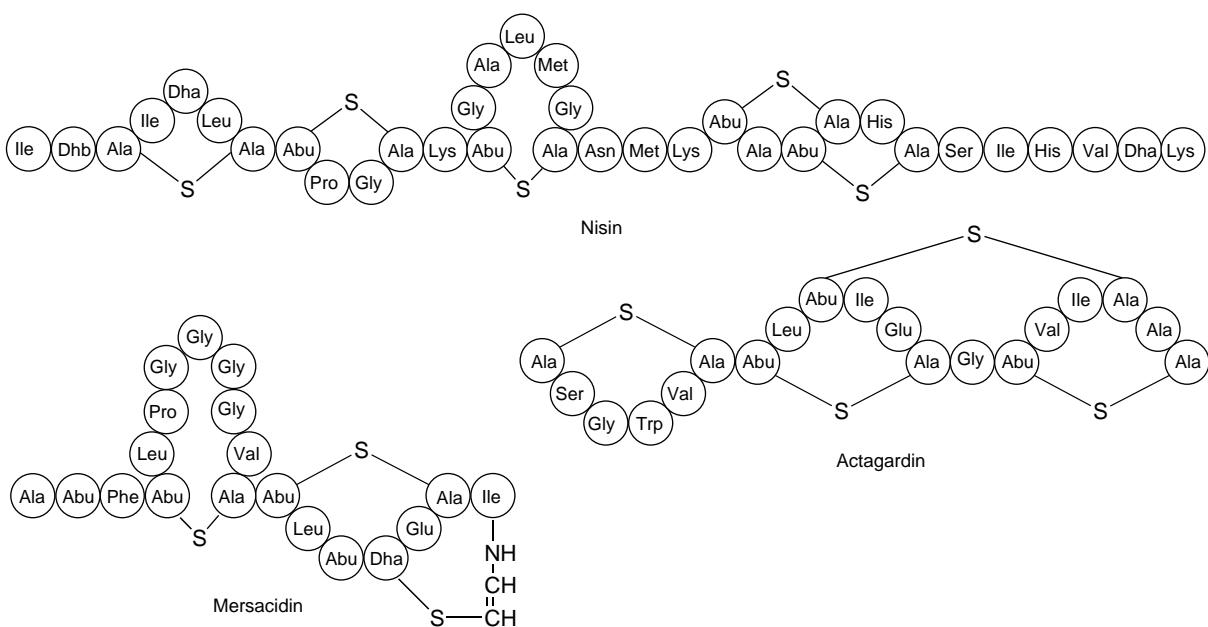
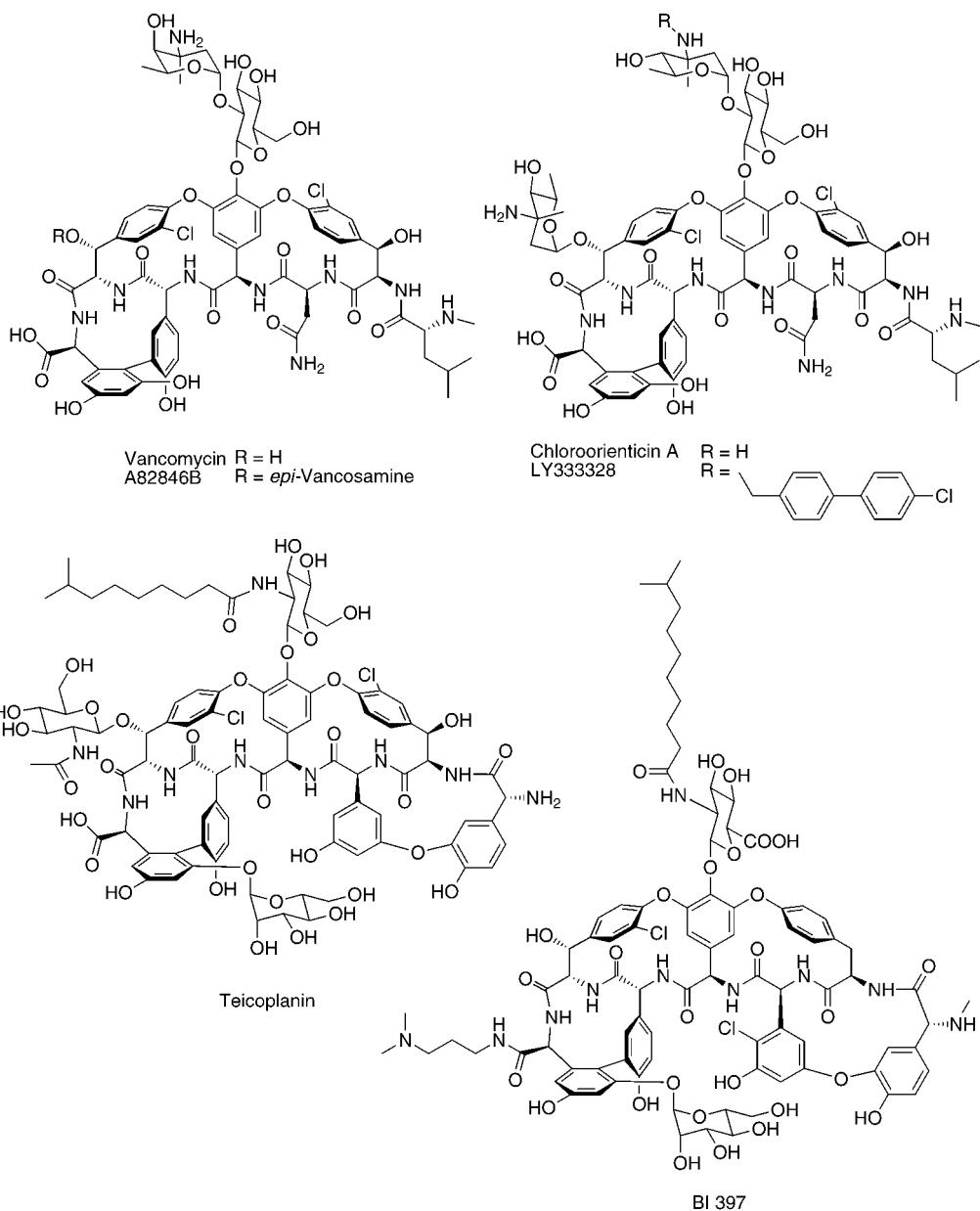


Abbildung 7. Lantibiotika (Dha = 2,3-Didehydroalanin, Dhb = 2,3-Didehydrobutyrin, Abu = α -Aminobuttersäure, Ala-S-Ala = Lanthionin, Abu-S-Ala = 3-Methyllanthionin).

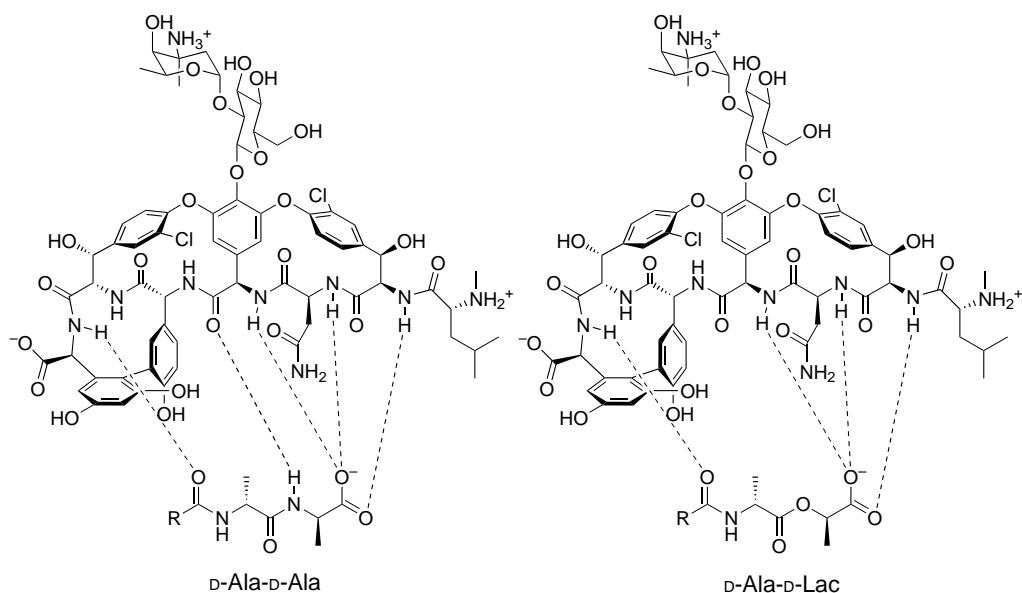


Schema 8. Wichtige Glycopeptid-Antibiotika.

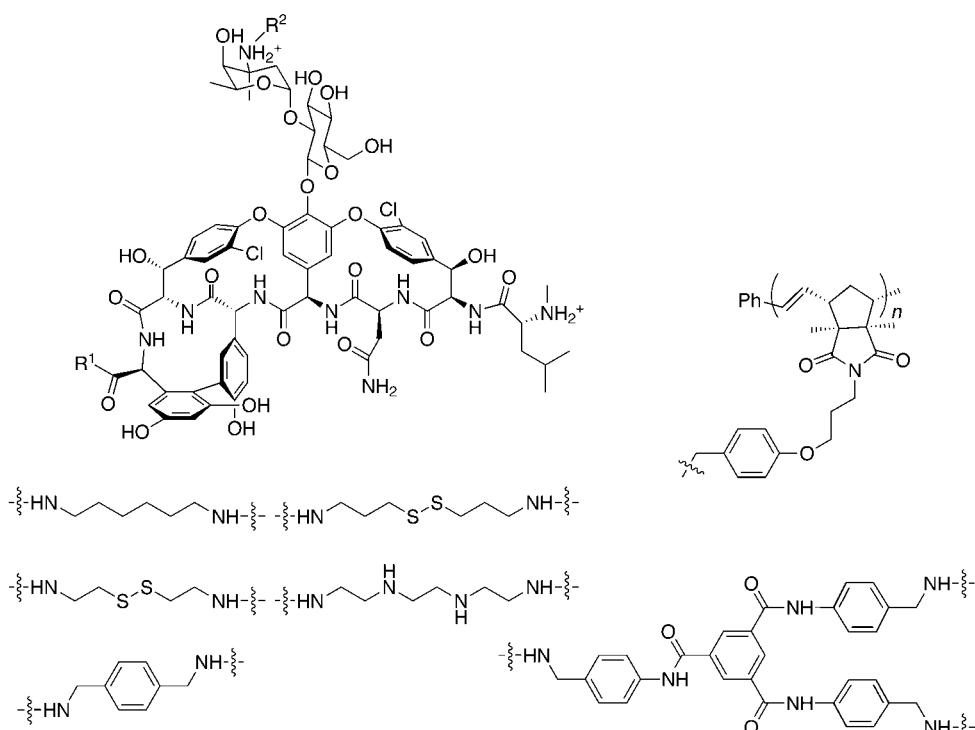
mensetzung des Peptidglycanpeptidteils durch die Evolution der Bakterien weiter verändert. Im Unterschied zum weitgehend geklärten Mechanismus der Wechselwirkungen zwischen Aglycon und Peptidglycan, ist die Rolle des Kohlenhydrateteils der Glycopeptid-Antibiotika noch unklar. Die In-vitro-Aktivität des Vancomycins wird durch eine Entfernung der Zuckersubstituenten kaum beeinflusst; die In-vivo-Aktivität hingegen sinkt drastisch, was auf die Bedeutung des Glycanteils für ein vorteilhaftes pharmacokinetisches Profil hindeutet.^[79] In einer NMR-Studie des Vancomycin und seines Aglycons wurde gezeigt, dass das Vancomycindisaccharid die Konformation des cyclischen Peptids beeinflusst. Insbesondere die Anordnung der Amidprotonen, die am Wasserstoffbrückennetzwerk mit den Zellwandvorstufen beteiligt ist, unterscheidet sich in den beiden Strukturen, was auf eine mögliche Rolle der Glycosylierung für die Beibehaltung

der bioaktiven Konformation hindeutet.^[80] Des Weiteren wurde vermutet, dass die Zucker an einer Dimerisierung beteiligt sein könnten. Glycopeptid-Antibiotika bilden Dimere, was zu einer Steigerung ihrer Aktivität durch Multivalenzeffekte führt. Die Dimerisierung und die antibiotische Aktivität sind in A82846B (Vancomycin mit einem zusätzlichen Zuckersubstituenten) stärker ausgeprägt als im Vancomycin, was die Bedeutung des Kohlenhydratsubstituenten verdeutlicht.^[81] Der Multivalenzmechanismus der Glycopeptid-Antibiotika wurde mit präparativ hergestellten kovalenten Dimeren weiter untersucht (Schema 10).^[82, 83] Diese Dimere binden nicht nur kurze Peptide, die mit D-Alanin oder D-Lactat enden, stärker als die entsprechenden Monomere, sondern sie haben auch eine stärkere Aktivität gegen Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). Ein trimeres Vancomycinanalogon, welches einen trifunktionellen Aminkern enthält, bindet ein synthetisches trimeres D-Ala-D-Ala-Peptid mit einer Dissoziationskonstante von 4×10^{-17} M, was die stärkste bekannte Assoziation unter organischen Molekülen mit geringem Molekulargewicht ist.^[84] Ein Vancomycinpolymer wurde durch Einführung eines Olefinsubstituenten und einer anschließenden Polymerisierung mit dem Grubbs-Katalysator hergestellt.^[85] Dieses Polymer wies ebenfalls eine drastisch gesteigerte Aktivität gegen VRE auf. In einer kombinatorischen Synthese^[86] wurde die vermehrte Dimerisierung des Vancomycins in Gegenwart seines Targets genutzt, um sehr aktive Dimere mit optimierter Länge des Linkers ausfindig zu machen (Schema 11).^[87] Hierzu wurden acht Verbindungen (Vancomycin, Desleucylvancomycin, β -Alanidesleucylvancomycin und Asparaginidesleucylvancomycin, jeweils mit einem olefinischen C4- oder C6-Rest am terminalen Zuckersubstituenten) mit dem Grubbs-Katalysator in Gegenwart eines Lys-D-Ala-D-Ala-Tripeptids dimerisiert. Dimere, die die natürlich vorkommende Aglykonstruktur und kurze Linker enthalten, wurden vorzugsweise gebildet, und diese Verbindungen sind auch am aktivsten gegen eine Reihe von Enterokokken und Staphy-

eines Olefinsubstituenten und einer anschließenden Polymerisierung mit dem Grubbs-Katalysator hergestellt.^[85] Dieses Polymer wies ebenfalls eine drastisch gesteigerte Aktivität gegen VRE auf. In einer kombinatorischen Synthese^[86] wurde die vermehrte Dimerisierung des Vancomycins in Gegenwart seines Targets genutzt, um sehr aktive Dimere mit optimierter Länge des Linkers ausfindig zu machen (Schema 11).^[87] Hierzu wurden acht Verbindungen (Vancomycin, Desleucylvancomycin, β -Alanidesleucylvancomycin und Asparaginidesleucylvancomycin, jeweils mit einem olefinischen C4- oder C6-Rest am terminalen Zuckersubstituenten) mit dem Grubbs-Katalysator in Gegenwart eines Lys-D-Ala-D-Ala-Tripeptids dimerisiert. Dimere, die die natürlich vorkommende Aglykonstruktur und kurze Linker enthalten, wurden vorzugsweise gebildet, und diese Verbindungen sind auch am aktivsten gegen eine Reihe von Enterokokken und Staphy-



Schema 9. Die Bindung des Vancomycins an das D-Ala-D-Ala-Ende der Zellwandvorstufen wird durch fünf Wasserstoffbrückenbindungen vermittelt. In Vancomycin-resistenten Stämmen führt die Substitution des terminalen D-Ala durch D-Lac zu einem Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung, sodass die Bindungsaffinität um das 1000fache herabgesetzt wird.



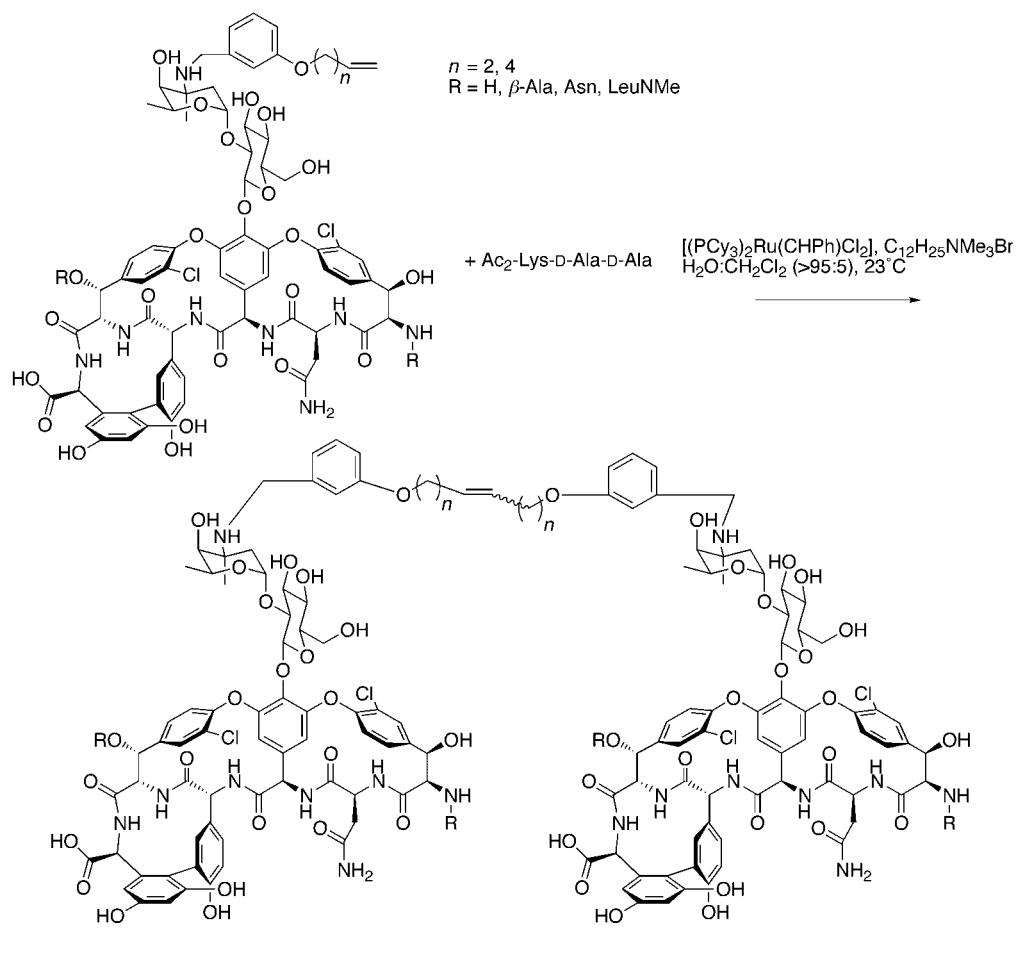
Schema 10. Vancomycindimere, -trimer und -polymer (R^1 = Anknüpfungspunkt der Linker in den Dimeren und im Trimer, R^2 = Anknüpfungspunkt des Linkers im Polymer).

lokokken. Die aktivsten Dimere weisen stark verbesserte Aktivitäten selbst gegen einen *S.-aureus*-Stamm mit intermedierer Vancomycin-Resistenz sowie gegen einen VRE-Stamm auf. Die Korrelation zwischen Dimerisierungsrate und antibiotischer Aktivität zeigt die Nützlichkeit der beschleunigten, rationalen kombinatorischen Synthese für die Vorhersage biologischer Eigenschaften.

Mehrere Studien befassten sich mit der Modifizierung des Kohlenhydratteils der Glycopeptid-Antibiotika. Hybride aus

dem Vancomycinaglykonteil und mehreren Zuckern wurden mit geklonten Glycosyl-Transferasen in vivo und in vitro gebildet.^[88] Chemische Modifikationen wurden vor allem am terminalen Zuckersubstituenten, dem Vancosamin, durchgeführt.^[89] Es ist möglich, die Aminogruppe des Vancosamins selektiv umzusetzen, ohne die restlichen funktionellen Gruppen des Vancomycins zu schützen. Im Unterschied zur N-Acylie rung hatte die N-Alkylierung eine signifikante Auswirkung. Durch die Einführung langkettiger Alkyl- und Arylsubstituenten konnte die Aktivität des Vancomycins gegen VRE deutlich verbessert werden. Diese hydrophoben Gruppen können als Anker fungieren, indem sie sich in die Plasmamembran einbetten, was zu einer effektiven

Steigerung der Konzentration der Antibiotika am Ort der Transglycosylierung führt. Der hydrophobe Substituent fördert außerdem die Dimerisierung; eine direkte Korrelation zwischen Dimerisierung und verbesserter antibiotischer Aktivität konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Aktivität eines der aktivsten N-alkylierten Analoga (Chlorbiphenyldesleucylvancomycin) ist unabhängig von der Bindung an den Peptidterminus des Peptidglycans, was ein Hinweis darauf ist, dass die Transglycosylase das Target dieses



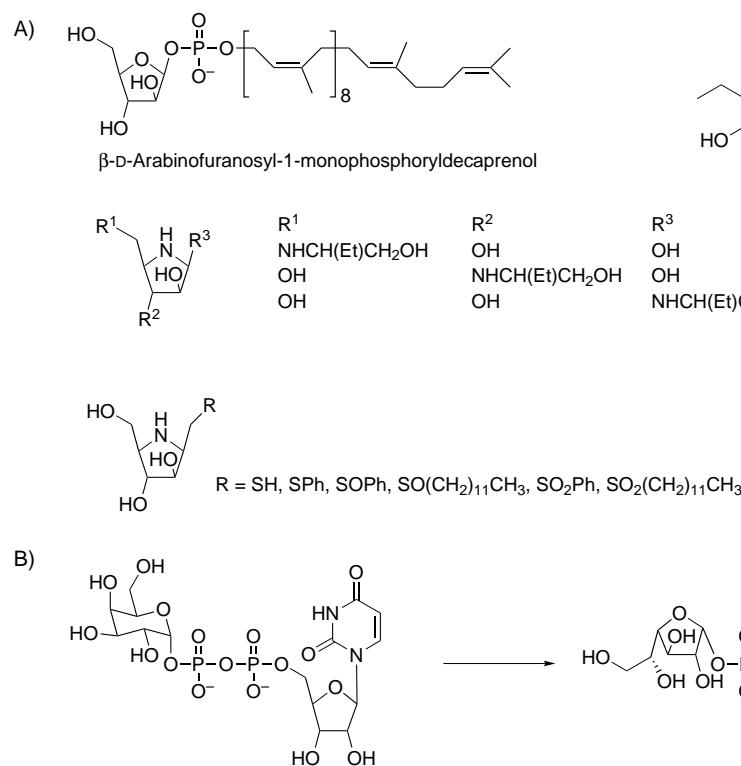
Dimere in Reihe ihrer Häufigkeit	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) gegen VRE
(LeuNMe) C_2 -(LeuNMe) C_2	2
(LeuNMe) C_2 -(β -Ala) C_2	8
(LeuNMe) C_2 -(LeuNMe) C_4	4
(β -Ala) C_4 -(β -Ala) C_4	8
(LeuNMe) C_4 -(LeuNMe) C_4	>16
(β -Ala) C_2 -(β -Ala) C_2	>16
Vancomycin	>100

Schema 11. Zielgesteuerte kombinatorische Synthese von Dimeren einiger Vancomycinanaloga.

Wirkstoffes ist.^[90] Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der modifizierte Zucker ein Schlüsselbestandteil für die Aktivität ist. Tatsächlich kann der Disaccharidteil des Chlorbiphenylvancomycins mit einem einfachen Arylsubstituenten anstelle des Aglycons die Transglycosylasreaktion – wenn auch nur schwach – inhibieren.^[91]

Das Glycopeptid-Antibiotikum LY333328, ein Vancomycin-cinderivat, das sowohl eine Chlorbiphenylseitenkette als auch den zusätzlichen Zuckersubstituenten des A82836B enthält, ist sehr wirkungsvoll gegen MRSA und VRE und wird zur Zeit klinisch getestet.^[92, 93] Das semisynthetische Teicoplanin-derivat BI 397 ist ein Komplex aus sechs verwandten Strukturen, die sich nur in der Zusammensetzung der N-Acylseitenkette des N-Acylaminoglucuronsäure-Substituenten unterscheiden. Es ist in vitro aktiver als Vancomycin und Teicoplanin gegen Staphylokokken, einschließlich einiger Teicoplanin-resistenter Stämme.^[94] Außerdem wurden gerin-

gere Dosen und eine verminderte Anzahl täglicher Verabreichungen benötigt, um die Anzahl von Staphylokokken in einer Modellinfektion zu verringern. Mycobakterien, eine Klasse Gram-positiver Bakterien, zu denen die Tuberkulose- und Lepraerreger gehören, sind gegen eine Vielzahl der gebräuchlichen Antibiotika resistent. Dies liegt an der Undurchlässigkeit ihrer Zellwand, die sich von der anderer Gram-positiver Bakterien in mehreren Beziehungen unterscheidet.^[95] Das Peptidoglycan der Mycobakterien ist kovalent durch eine Phosphodiesterbindung an das Mycolarabinogalactan (mAG) gebunden. mAG besteht aus D-Galactofuranosiden, D-Arabinofuranosiden und Mycolinsäuren (verzweigte Fettsäuren, ca. 90 C-Atome), die sich senkrecht zur Arabinogalactan-Peptidoglycanschicht ausdehnen. Oberflächen-Glycopeptide lagern sich in die Mycolinsäureschicht ein, wodurch eine Pseudolipiddoppelschicht gebildet wird. Eingeschlossen in das Mycolarabinogalactan-Peptidoglycan-Gerüst befindet sich Lipoarabinomannan (LAM), das hauptsächlich für die Virulenz und Immunoopathogenese der mycobakteriellen Infektionen verantwortlich ist. Sowohl mAG als auch LAM enthalten D-Arabinofuranose, die sonst nur sehr selten in der Natur vorkommt und somit ein gutes Target für Antibiotika ist. Ethambutol, ein natürlich vorkommender Inhibitor der Arabinosyltransferase,^[96] wird in der Behandlung der Tuberkulose verwendet und seine antibiotische Wirkung ist spezifisch für Mycobakterien (Schema 12). Da Ethambutol nur relativ schwach aktiv ist und eine Reihe von Nebenwirkungen hat, wurden synthetische Inhibitoren der Arabinosyltransferase untersucht, einschließlich einiger Ethambutol-Zucker-Hybride^[97] und aza-Analoga der Arabinofuranose.^[98] Leider waren die Verbindungen weniger aktiv als das Ethambutol. Galactofuranose, ein weiterer Bestandteil des mAG, kommt auch fast ausschließlich in Mycobakterien vor. Es wird über die aktivierte Form UDP-Galactofuranose eingebaut, die durch das einzigartige Enzym UDP-Galactopyranose-Mutase gebildet wird. Die



Schema 12. A) Der Arabinosyltransferasedonor, der natürlich vorkommende Inhibitor Ethambutol und einige synthetische Derivate, B) die UDP-Galactopyranose-Mutase-Reaktion.

Ergebnisse der Strukturuntersuchungen dieses Enzyms könnten seine Nutzung als Target für Antibiotika ermöglichen.^[99]

4. Antibiotika, die die prokaryontische Proteinbiosynthese hemmen

4.1. Macrolidantibiotika

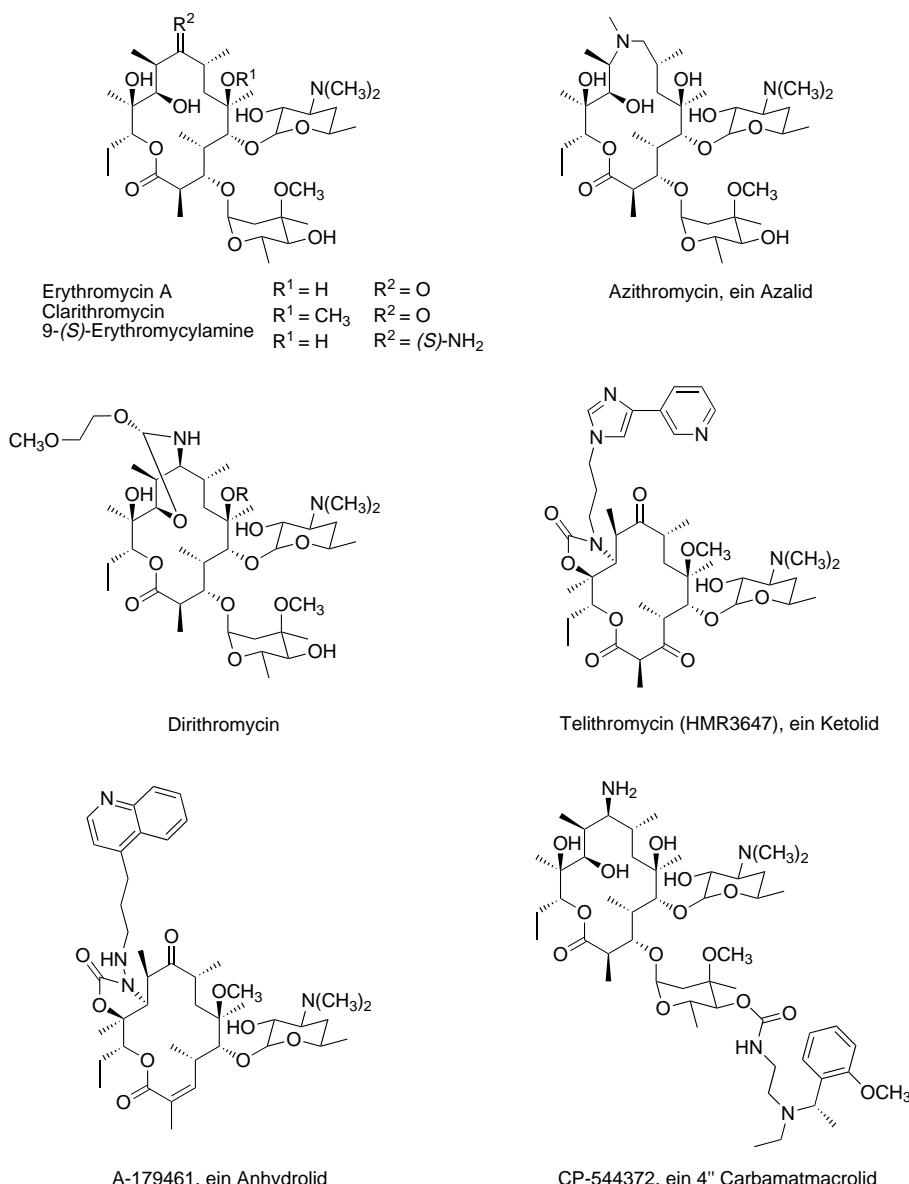
Macrolide sind Sekundärmetaboliten mit einer Vielzahl unterschiedlicher Strukturen und Aktivitäten. Sie bestehen aus langen, verzweigten Fettsäuren, die Makrocyclen bilden (Schema 13). Meistens tragen die makrocyclischen Kernstrukturen eine oder mehrere Zuckereinheiten, und diese sind häufig wichtig für die Aktivität der Makrolide. Erythromycin A, ein 14-gliedriges Makrolid, wurde vor fast fünfzig Jahren entdeckt und wird seit langer Zeit als Antibiotikum gegen Gram-positive Pathogene eingesetzt, insbesondere bei Patienten, die gegen β -Lactam-Antibiotika allergisch sind. Den Makrolid-Antibiotika wurde mit der Einführung semisynthetischer Erythromycin-A-Derivate wieder mehr Aufmerksamkeit geschenkt, z.B. sind 9-(S)-Erythromycylamine in vitro sehr aktiv gegen eine Reihe Gram-positiver Bakterien, sie werden jedoch bei oraler Verabreichung nur schwach absorbiert. Dirithromycin ist ein 9-N-11-O-Oxaziderivat, das zu Erythromycylamin metabolisiert wird. Es ist in vitro genauso aktiv wie die Erythromycylamine, hat jedoch bessere pharmacokinetische Eigenschaften.^[100] Clarithromycin (6-OMe-Erythromycin)^[101] und Azithromycin,^[102] das erste Aza-lid, sind in sauren Medien stabiler als ihre Mutterverbindung und können daher oral verabreicht werden. Mit der Einführung des Azithromycins wurde die Anwendungsbreite der

Makrolid-Antibiotika auf Gram-negative Spezies ausgedehnt. Wahrscheinlich verbinden die Makrolid-Antibiotika die 23S-Untereinheit der ribosomalen RNA, bei der sie mit der Haarnadelschleife 35 der Domäne II und dem Bereich der Domäne V, der für den Peptidtransfer verantwortlich ist, wechselwirken.^[103] Dies löst die Dissoziation der Peptidyl-tRNA vom Ribosom während der Translokation aus, was zu einer verfrühten Termination der Peptidkette führt.

Die Biosynthese der Makrolide und anderer Polyketide ähnelt der Fettsäuresynthese.^[104] Beide werden aus Acetateinheiten durch komplexe Enzymsysteme (Fettsäure- (FAS) und Polyketid-Synthase (PKS)) aufgebaut. Typ I-PKS sind riesige, multifunktionelle Proteine, die getrennte Module mit Aktivitäten, die denen der FAS ähneln, aufweisen. Jedes dieser Module besteht aus drei bis sechs katalytischen Domänen. Diese werden normalerweise nicht iterativ ver-

wendet, d.h., jedes Modul ist für die Synthese eines bestimmten Teils des Polyketids verantwortlich. Somit bestimmt die lineare Anordnung der Module die Struktur des Polyketids. Typ II-PKS bestehen aus mehreren monofunktionalen Proteinen und werden iterativ für alle synthetischen Schritte verwendet. Typ I-PKS bilden Makrolide, während Typ II-PKS für die Synthese von kondensierten aromatischen Ringsystemen (z.B. Tetracycline) verantwortlich sind. Ausnahmen sind allerdings einige Typ I-PKS aus Pilzen, die aromatische Polyketide synthetisieren. Zudem gibt es eine Reihe PKS, die für die Synthese von Polyethern und Polyenen verantwortlich ist.

Die Biosynthese der Makrolide kann in vier Phasen unterteilt werden: Priming, Initiation, Elongation und Termination.^[105] Während des Primings werden die Acyl-Carrier-Proteine (ACP) der PKS mit prosthetischen Phosphopantethein-Gruppen beladen. Diese fungieren als bewegliche Arme an deren terminalen Thiolgruppen die Monomere und die wachsende Kette gebunden sind. Das Kettenwachstum wird durch die Übertragung einer Monomereinheit von Acyl-CoA auf das erste ACP initiiert. Die Verlängerung erfolgt in Claisen-artigen Kondensationen von Acylbausteinen mit der wachsenden Kette. Jedes PKS-Modul enthält bis zu drei zusätzlichen FAS-artigen Domänen für die Ketonreduktion, die Wasserabspaltung sowie die Reduktion der daraus resultierenden konjuguierten Doppelbindung. Die An- oder Abwesenheit dieser Domänen und die Verschiedenheit der Acylbausteine ergeben die strukturelle Vielfältigkeit der Makrolide. Schließlich katalysiert eine Thioesterase einen intramolekularen Angriff, was zur Freisetzung des cyclischen Makrolactons führt. Diese Makrolidkernstruktur wird häufig durch Enzyme wie Hydroxylasen, Glycosyltrans-



Schema 13. Strukturen einiger Macrolid-Antibiotika.

ferasen und Methyltransferasen modifiziert. In Abbildung 8 ist die Biosynthese des Erythromycin A dargestellt.

Die lineare Einteilung der PKS in Module wurde für die Synthese neuer Makrolide und aromatischer Polyketide genutzt.^[106, 107] Kenntnis der Funktionen der Domänen ermöglicht die Synthese bestimmter neuer Strukturen durch Ersetzen oder Inaktivierung einzelner Domänen.^[108, 109] Eine Ausdehnung dieser Methode auf mehrere Kohlenstoffzentren in einem einzelnen Molekül ermöglichte die Synthese einer Bibliothek mit 50-gliedrigen Makroliden,^[110] was mit präparativen Methoden nur schwierig zu verwirklichen wäre.

Während die Polyketid-Biosynthese neue Derivate der Makrolidkernstrukturen liefern kann, werden Untersuchungen der Desoxyzuckereinheiten durch mehrere Hindernisse erschwert. Obwohl die Gene, die die Proteine der Desoxyzucker-Biosynthese kodieren, Teil des gesamten Makrolid-Genclusters sind, wird ihre Identifizierung dadurch kompliziert, dass sie zusammen mit Regulierungs- und Aglycomo-

difizierungsgenen über beide Enden des PKS-Clusters verteilt sind. Des Weiteren ist die Zuordnung eines Gens zu einem bestimmten Glycosylierungsenzym in Makroliden mit mehr als einem Zuckersubstituenten schwierig. Fortschritte auf dem Gebiet der Klonierung, der Überexpression und der molekularen Zusammenstellung der Gene sowie die Schlussfolgerungen, die sich daraus auf die Mechanismen der Desoxyzucker-Biosynthese ziehen lassen, sind in mehreren Übersichtsartikeln zusammengefasst.^[111–114]

Ein weiteres Hindernis in der Untersuchung der Desoxyzucker ist die aufwendige Synthese der aktivierte Nucleosiddiphosphat-Desoxyzucker, die Zwischenstufen der Biosynthese sind; Glycosyltransferasen übertragen Kohlenhydrate vom entsprechenden Zucker-nucleotid auf die Acceptorhydroxygruppe. Die Synthese der 2-Desoxyzucker-nucleotide stellt eine besondere Herausforderung dar, da die Stereochemie am anomeren Zentrum nicht durch den Nachbargruppeneffekt kontrolliert werden kann. Zudem zersetzen sich die aktivierte Zuckernucleotide relativ leicht unter Hydrolyse und 1,2-Eliminierung. Enzymatische Methoden könnten eine große Vielzahl an Zuckernucleotiden verfügbar machen, so wird z.B. die Substratspezifität einer α -D-Glucopyranosylphosphatethymidylyltransferase untersucht.^[115] Die Mehrheit der zwölf getesteten Glycosylphosphate (sämtliche α -D-Hexosen und Monodesoxy- α -D-glucosen) lieferten brauchbare Mengen der Kondensationsprodukte mit TTP und UTP. Interessanterweise schien die Sub-

stratspezifität des Enzyms von der bevorzugten Konformation der Zucker abzuhängen. Die Bedeutung dieser Arbeiten liegt darin, dass nun viele Substrate für die Entwicklung von In-vitro-Glycosylierungssystemen bereit stehen. Die Möglichkeit, nicht natürliche Zucker in Makrolid-Antibiotika einzuführen, wurde sowohl im Methymycin, ein Polyketid mit nur einem Zuckersubstituenten (Desosamin), als auch in anderen Systemen gezeigt. In *Streptomyces venezuelae* wird Desosamin durch eine Reihe von acht Genprodukten (DesI–VIII) gebildet und an das Methymycin-glycon angefügt (Schema 14). Erwartungsgemäß führte die Entfernung einer der *N*-Methyltransferasen des Methymycins zu einem Analogon, das einen Amino- statt eines Dimethylaminosubstituenten an der 3-Position des Desoxyzuckers trug.^[116] Transformation eines Aminotransferase-Gens (calH) der Calicheamicin-Biosynthese in einen Methymycin produzierenden Stamm lieferte ein Methymycin-Calicheamycin Hybrid,^[117] während die Transformation zweier Gene der Biosynthese

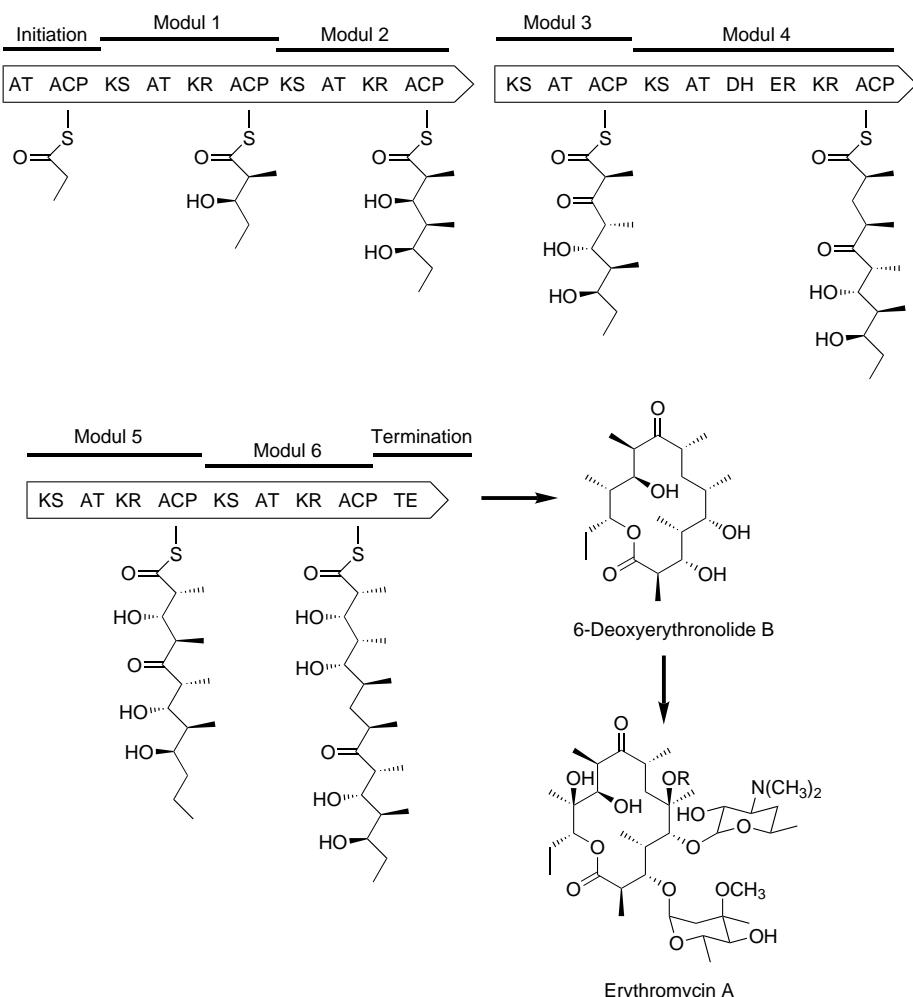


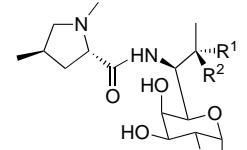
Abbildung 8. Veranschaulichung der Funktion einer modularen Polyketid-Synthetase am Beispiel der Biosynthese des Erythromycins A (AT = Acyltransferase, ACP = Acyl-Carrier-Protein, KS = Ketosynthase, KR = Ketoreduktase, DH = Dehydratase, ER = Enoylreduktase, TE = Thioesterase).

der Streptose (strM, strL) ein Methymycinanalogon mit einem L-Rhamnosesubstituenten ergab.^[118] Eine Ausweitung dieser Methode könnte bald die kombinatorische Synthese einer Vielzahl verschiedener Polyketide mit diversen Zuckersubstituenten ermöglichen.

Die Rolle, die die Desoxysubstituenten der Polyketide für deren pharmacokinetische Eigenschaften (ADME) wie Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung haben, ist seit langem bekannt. In letzter Zeit wurden zusätzliche Bedeutungen, die die Zuckersubstituenten haben könnten, untersucht. Desoxygениerte Zucker tragen hydrophile und hydrophobe Gruppen, die auf dem starren Pyranringgerüst fest angeordnet sind, was wichtig für die Targeterkennung sein könnte. Die Beteiligung der Desoxyzucker an der Erkennung von Bindungsstellen ist vor allem in Antitumorkörpern, die gegen DNA gerichtet sind, untersucht worden. DNA-Moleküle sind einfach herzustellen und stabiler als RNA. Zudem ermöglicht die helicale und relativ stabile Konformation der DNA NMR-Studien, so wurde z. B. gezeigt, dass die Oligosaccharidkette des Calicheamicin sich in die kleine Furche des DNA-Doppelstrangs einbettet, was die aktive Endiin-Einheit zur Spaltung positioniert.^[119] Die Beteiligung der Desoxyzuckersubstituenten an der Erkennung

von RNA-Sequenzen durch Makrolid-Antibiotika konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

Die Lincosamide, eine andere Klasse RNA-bindender Antibiotika, enthalten ebenfalls Kohlenhydrate. Das semisynthetische Clindamycin hat die

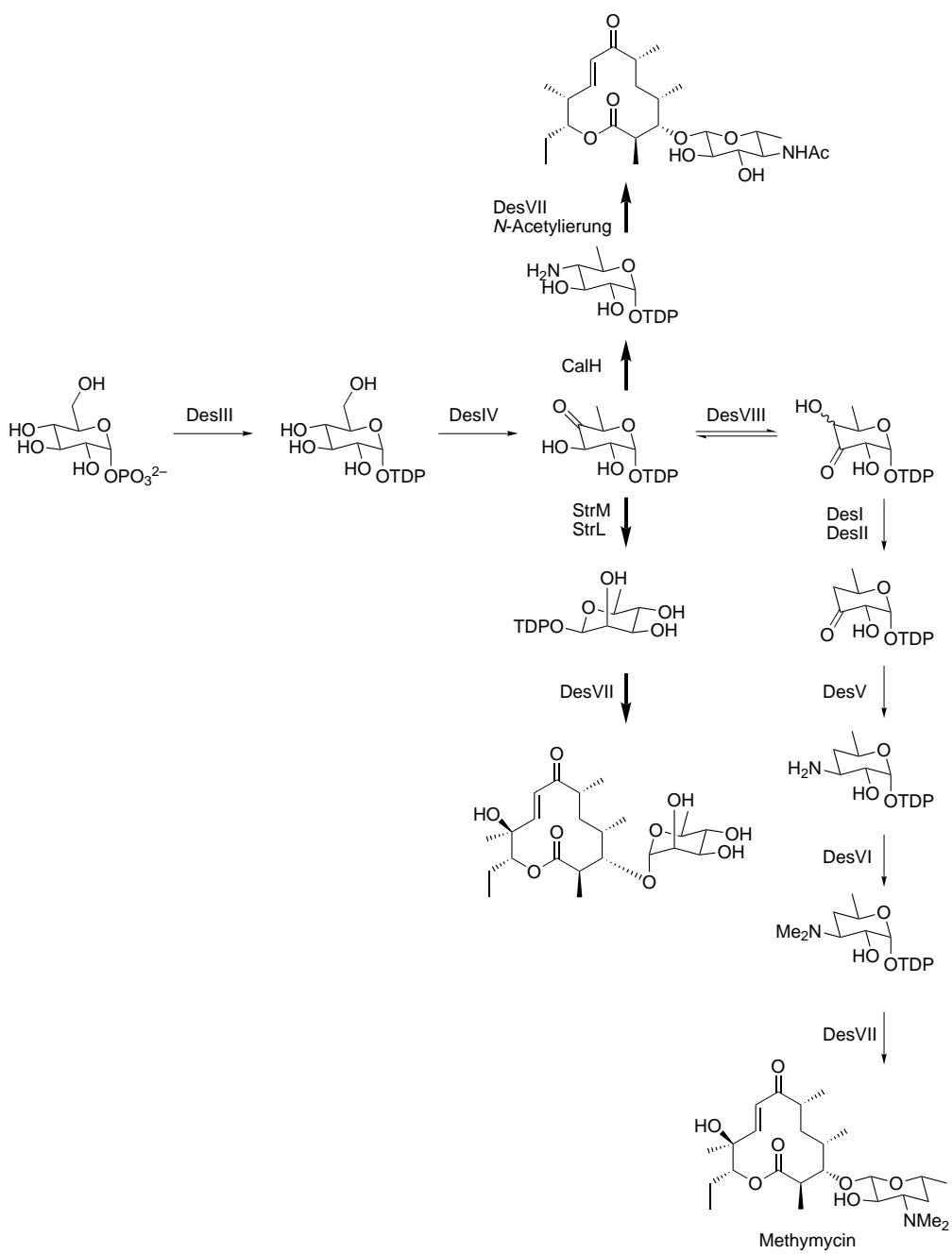


Clindamycin
R = iPr R¹ = OH R² = H
R = Et R¹ = OH R² = H
R = iPr R¹ = H R² = Cl

natürlich vorkommenden Lincomycine dank seiner stärkeren Aktivität und geringeren Nebeneffekten in der klinischen Anwendung verdrängt. Makrolide, Lincosamide und B-Gruppen-Streptogramine haben überlappende Bindungsplätze auf der ribosomalen 50S-Untereinheit. Resistenz gegen alle drei Gruppen (MLS_B-Resistenz) kann daher durch dieselbe spezifische Methylierung der 23S-RNA erlangt werden. Diese Modifizierung der ribosomalen RNA wird durch Erm(erythromycin ribosome methylation)-Methyltransferasen katalysiert.^[120] Das Screening einer großen Anzahl von Verbindungen ergab eine Gruppe von

scheinbar nicht verwandten Chemikalien, die alle ErmC inhibieren.^[121] Keiner dieser Hemmstoffe vermochte jedoch die Wirkung des Erythromycins bei der Behandlung von *S. aureus*-Infektionen in Mäusen zu steigern. In einer NMR-Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen kleinen Molekülen und Methyltransferasen der Erm-Familie, wurde eine Reihe von substituierten Triazinen identifiziert, die die Aktivität von Lincosamiden und B-Gruppen-Streptograminen steigerten.^[122] Diese Leitstrukturen wurden durch die parallele Synthese einer großen Zahl Analoga optimiert, was zu einer Inhibition der RNA-Methyltransferase im mikromolaren Bereich führte. Zwei andere Resistenzmechanismen, die nicht mit der MLS_B-Resistenz im Zusammenhang stehen, sind die chemische Modifizierung des Wirkstoffs (Phosphorylierung, Glycosylierung, Veresterung) sowie der aktive Austritt durch die Membran (*metE*-Determinante) (siehe Abbildung 1).

Ketolide sind 3-Descladinosyl-3-oxo-carbamat-Analoga des Erythromycins und des Clarithromycins, die häufig eine zusätzliche 11,12-cyclische Carbamatgruppe tragen.^[123] Das Ketolid Telithromycin, das früher als HMR-3647 bezeichnet wurde, hat nicht nur eine geringere Neigung Resistenz zu induzieren als andere Makrolid-Antibiotika, sondern es weist



Schema 14. Biosynthese von Methymycin in *Streptomyces venezuelae*. Die dicken Pfeile zeigen zwei Synthesewege für neue Makrolide mit nicht natürlichen Zuckersubstituenten.

auch ein günstiges pharmacokinetisches Profil auf und war in einer Studie an Mäusen sehr aktiv gegen Infektionen der Atemwege.^[124] Anhydrolide, in denen eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 vorliegt,^[125] und 4'' Carbamatmacrolide^[123] haben In-vitro-Aktivitäten, die mit denen der Ketolide vergleichbar sind.

4.2. Aminoglycoside

Aminoglycoside bestehen aus sechsgliedrigen, carbacyclischen Kernen (Aminocyclitolen), die eine Reihe von Zuckersubstituenten tragen (Schema 15). Dieser Kern ist nor-

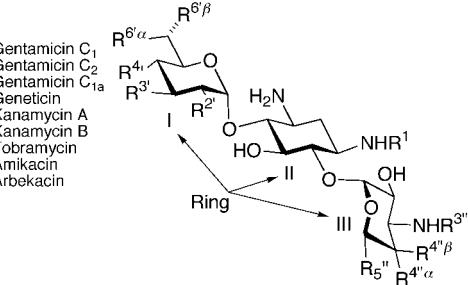
malerweise 2-Desoxystreptamin, doch auch andere Aminocyclitole wie Streptidin (Streptomycine), Actinamin (Spectinomycine) und Fortamin (Fortimicine) kommen vor. Die Aminoglycoside werden gewöhnlich nach ihren Aminozuckersubstituenten klassifiziert. In der Neomycininfamilie sind z.B. drei Aminozucker mit der zentralen 2-Desoxystreptamineinheit verbunden, wohingegen Mitglieder der Kanamycin- und Gentamycinfamilien nur zwei Zuckersubstituenten tragen. Die Aminoglycoside hemmen die Translation durch Binden der weitgehend konservierten A-Stelle der kleinen ribosomalen 30S-Untereinheit (Abbildungen 9 und 10). Die Struktur eines Komplexes des Neomycinaminoglycosids Paromomycin mit einem Haarnadelschleifenmodell an der A-Stelle konnte durch NMR-Untersuchungen aufgeklärt werden.^[126] Die Wasserstoffbrückendonoren der Aminoglycoside sind auf dem Zuckergerüst so angeordnet, dass sie mit den konservierten Nucleotiden der RNA wechselwirken können. Diese Bindung in einer Aushöhlung der großen Furche, die durch eine Adenin-Adenin-Fehlpaarung und ein einzelnes ungepaartes Adenin gebildet wird, löst eine Änderung der RNA-Konformation aus, was zu einer Stabilisierung des Komplexes aus tRNA und A-Stelle führt.^[127] Dies verhindert ein wirkungsvolles Korrekturlesen, sodass fehlerhafte

Proteine entstehen können. Eine Anhäufung mutierter Membranproteine stören dann die Integrität der Bakterienhülle, was eine verstärkte Aufnahme von Aminoglycosiden ermöglicht, die dann zur Zellyse führt. Ein Änderung der RNA-Konformation ist auch wichtig für die Wirkungsweise des Aminoglycosids Spectinomycin,^[128] durch das die Translokation der tRNA von der A- zur P-Stelle gehemmt wird, derselbe Schritt also, der auch durch das Makrolid-Antibiotikum Erythromycin inhibiert wird (siehe Abschnitt 4.1).

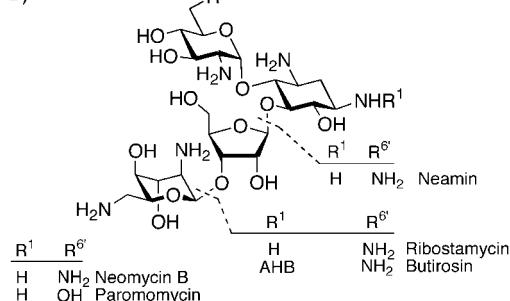
Aminoglycosiddervate wurden synthetisiert, um die Funktion und Bedeutung der einzelnen strukturellen Elemente zu untersuchen. Einfache Aminole binden eine vereinfachte Modellstruktur der A-Stelle, was darauf hindeutet, dass die

A)

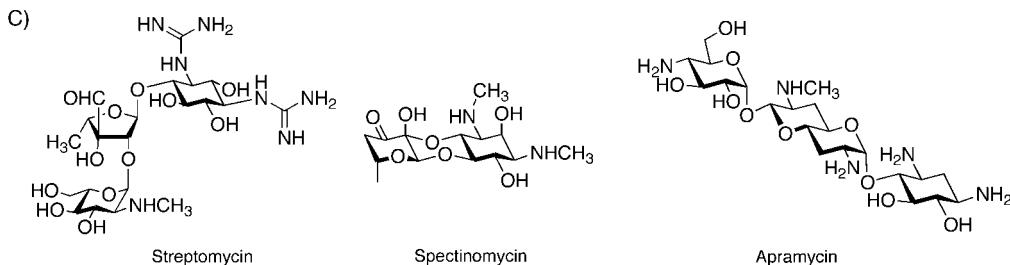
R^1	R^2	$R^{3'}$	$R^{4'}$	$R^{6'\alpha}$	$R^{6'\beta}$	$R^{3''}$	$R^{4''\alpha}$	$R^{4''\beta}$	$R^{5''}$
H	NH ₂	H	H	NHCH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	H
H	NH ₂	H	H	NH ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	H
H	NH ₂	H	H	NH ₂	H	CH ₃	CH ₃	OH	H
H	NH ₂	H	OH	OH	CH ₃	CH ₃	CH ₃	OH	H
H	OH	OH	OH	NH ₂	H	H	OH	H	CH ₂ OH
H	NH ₂	OH	OH	NH ₂	H	H	OH	H	CH ₂ OH
H	NH ₂	H	OH	NH ₂	H	H	OH	H	CH ₂ OH
AHB	OH	OH	NH ₂	H	H	H	OH	H	CH ₂ OH
AHB	NH ₂	H	NH ₂	H	H	OH	H	CH ₂ OH	



B)



C)



Schema 15. Einige natürliche und semisynthetische Aminoglycoside: A) Gentamicin- und Kanamycin-Aminoglycoside (AHB = Aminohydroxybutan), B) Neomycin-Aminoglycoside, C) andere Aminoglycoside.

1,3-Aminoleinheit das wichtigste Pharmacophor der Aminoglycoside ist.^[129, 130] Monosaccharide, die das 1,3-Hydroxyamin Substitutionsmuster der Aminoglycoside tragen, binden Phosphodiester und die Hoogsten-Seite des Guanosins,^[129] was auch schon in den Untersuchungen des Paromomycin-A-Stellen-Komplexes beobachtet wurde (Abbildung 10).^[126] Mit einer Bibliothek aus Derivaten des 6-Desoxy-6-amino-GlcNAc wurde die Aktivität des 1,3-Hydroxyaminomotivs weiter untersucht.^[131] Da die genaue Lage des Idoserings IV in der NMR-Struktur des RNA-Paromomycinkomplexes unklar ist,^[126] wurde dessen Bedeutung für die Bindung durch eine Reihe von Neomycin-B-Derivaten, die sich im Idosering unterscheiden, untersucht.^[132] Verbindungen, in denen dieser Ring durch ein Amin an einem beweglichen Linker ersetzt wurde, sind als Antibiotika genauso aktiv wie Neomycin B. Ihre Bindungsspezifität für eine isolierte Haarnadelstruktur der A-Stelle im Vergleich zu einer negativen Kontrolle ist jedoch reduziert, vermutlich ist das Idosegerüst für die korrekte Platzierung der positiven Ladung verantwortlich. Das natürlich vorkommende Neamin ist das einfachste wirkungsvolle Aminoglycosid-Antibiotikum. Es wurde als Kernstruktur in der Synthese neuer Aminoglycosidderivate verwendet.^[133] Diese Analoga tragen eine Vielzahl von

Aminosubstituenten an der 5-Position des 2-Desoxystreptamins. Obwohl einige dieser Analoga ein Modell der A-Stelle stärker binden als Neamin, sind sie dennoch schwächere Antibiotika. Ihre antibiotische Aktivität korreliert besser mit der In-vitro-Hemmung der Translation, die durch ein Luciferase-Reportergen gemessen wurde. Die Unterschiede der Affinität der Aminoglycoside für die A-Stelle, je nachdem ob sie in einem isolierten Modell der A-Stelle oder im Zusammenhang des gesamten Ribosoms gemessen werden, kann durch eine Anzahl von Faktoren verursacht werden, z. B. könnten Wechselwirkungen mit benachbarten ribosomalen Proteinen die Aminoglycosidbindung stabilisieren oder das umgebende Ribosom könnte strukturelle Auswirkungen auf die A-Stelle haben. Während der Entwicklung eines Fluoreszenztestverfahrens für die RNA-Bindung wurde beobachtet, dass Aminoglycoside, die eine fluoreszierende Reportergruppe tragen, an ein Modell der A-Stelle mit größerer Affinität binden als das ursprüngliche Molekül.^[134] Diese Steigerung der Affinität wurde mit einer Intercalation des Fluoreszenzfarbstoffs erklärt. Eine systematische Studie dieses Effekts führte zur Entdeckung eines Paromomycin-Thiazol-Orange-Hybrids, das 41-mal stärker als Paromomycin bindet und dennoch eine ausgezeichnete Spezifität für die A-Stelle aufweist.^[135]

Die Wirkungsweisen, die zur Resistenz gegen Aminoglycoside führen, beruhen auf Austrittsmechanismen und enzymatischen Modifizierungen der Wirkstoffe oder der Targets (RNA-Methylierung). Klinisch von größter Bedeutung sind die N-Acetylierung, O-Phosphorylierung und O-Nucleotidylierung, die durch Aminoglycosidacetyltransferasen (AAC), -phosphotransferasen (APH) und -adenyltransferasen (AAD) katalysiert werden.^[136] Eine große Zahl semisynthetischer Aminoglycoside wurde entwickelt, um diese Resistenzmechanismen zu bewältigen.^[137] Besonders problematisch ist die difunktionelle AAC(6')-APH(2'), die in gegen viele Antibiotika resistenten *S. aureus* und *S. epidermidis*-Stämmen zu finden ist. In Gegenwart dieses Enzyms sind die meisten Aminoglycoside wirkungslos. Arbekacin, ein semisynthetisches Derivat des Kanamycins, ist eine nennenswerte Ausnahme; eine geringe Anzahl MRSA-Stämme mit mäßiger Resistenz gegen Arbekacin wurden in klinischen

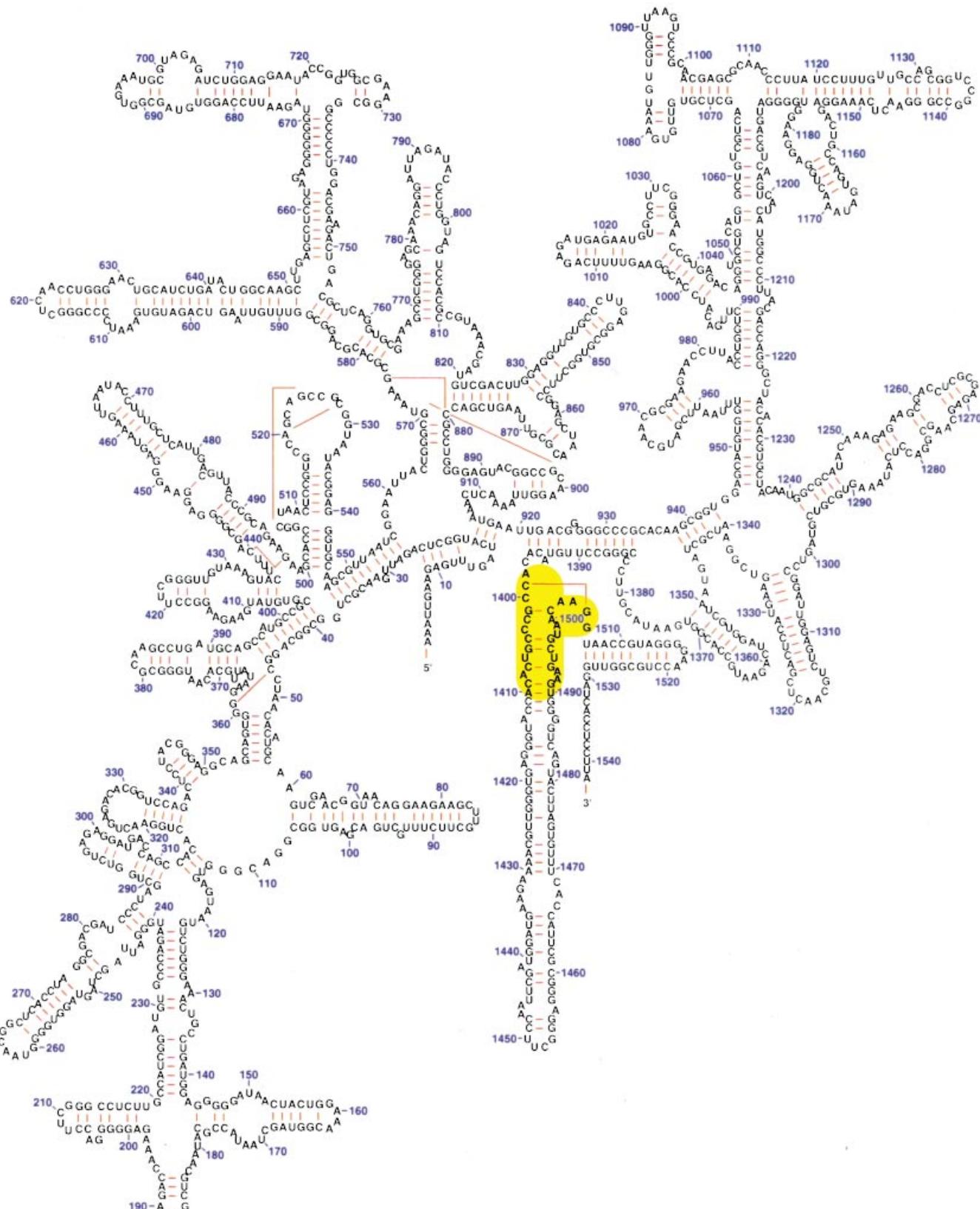


Abbildung 9. Die ribosomale 16S-RNA-Sequenz mit der A-Bindungsstelle (gelb) für Aminoglycoside.

Studien isoliert, jedoch waren keine stark resistenten Stämme dabei.^[138] Arbekacin verdankt diese geringe Empfänglichkeit für Modifizierungsenzyme nicht nur dem 1-N-Aminohydroxybutyro-Substituenten und der Abwesenheit der 3'- und 4'-

Hydroxygruppen, sondern auch der Tatsache, dass es seine Aktivität auch nach einer Acetylierung durch mehrere AAC beibehält. 2'-Nitroderivate des Neamins und des Kanamycin wurden synthetisiert, um die Inaktivierung durch APH(3') zu

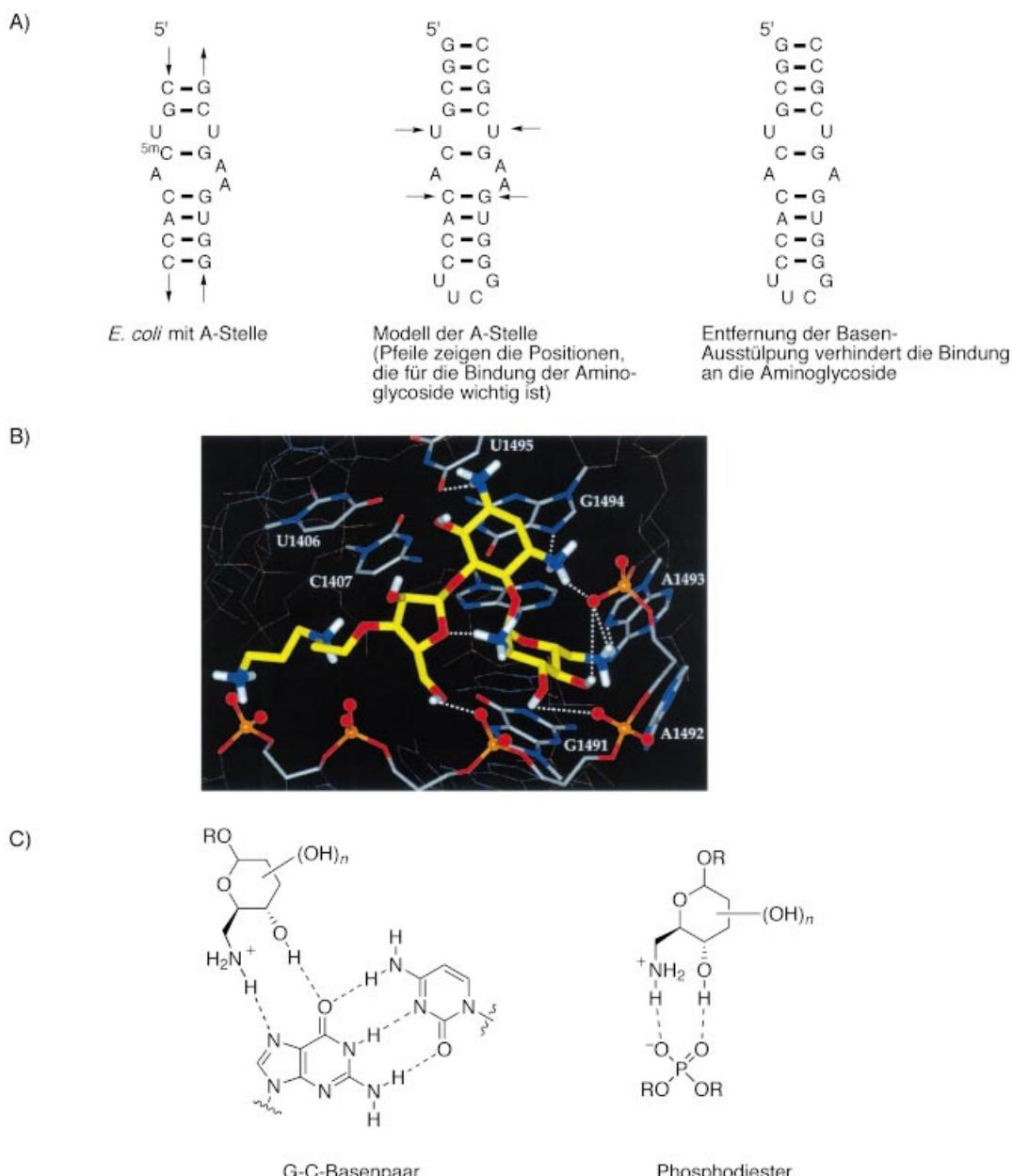
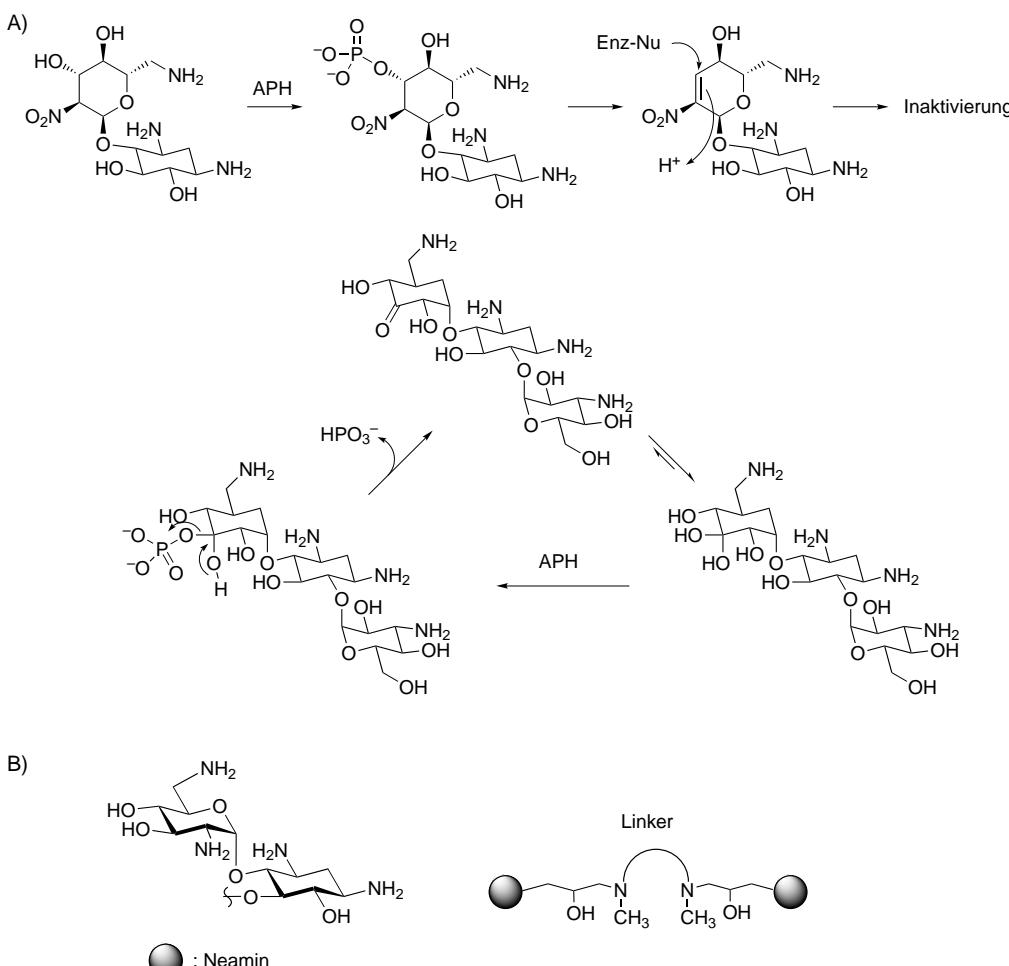


Abbildung 10. A) RNA-Sequenzen, die mit der ribosomalen A-Stelle verwandt sind, B) NMR-Struktur des Paromomycin-A-Stellen-Komplexes, C) mögliche Wechselwirkungen zwischen Hydroxylaminen und Phosphodiestern sowie der Hoogsten-Seite des GC-Basenpaares.

umgehen (Schema 16).^[139] Die 3'-phosphorylierten Verbindungen, die durch die Reaktion dieser Derivate mit Modifizierungsenzymen entstehen, eliminieren spontan zu Nitroalkenen, die dann mit einem Nucleophil in der aktiven Stelle in einer Michael-Addition reagieren. Obwohl diese Verbindungen die APH(3') hemmen, können sie dennoch die Resistenz gegen Aminoglycoside nicht umkehren. Eine Umgehung der APH(3') wurde mit der Synthese eines 3'-Oxo-Kanamycin-Derivates erlangt.^[140] Die hydratisierte Form dieses Ketons kann als Substrat für die APH(3') agieren. Das daraus entstehende 3'-Phosphoderivat ist labil und eliminiert eine Phosphatgruppe, wodurch das ursprüngliche Keton gebildet wird. Diese Modifizierung des Aminoglycosids verringerte die MIC in Gegenwart des Resistenzenzymes APH(3')-Ia um eine Größenordnung.

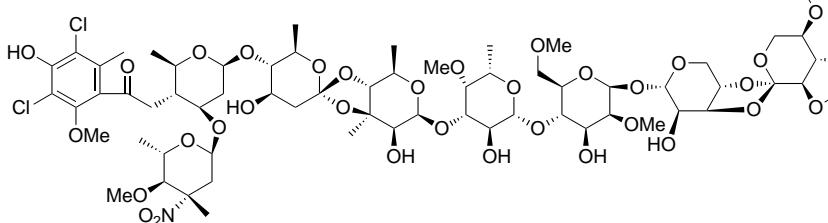
In einer Oberflächen-Plasmonen-Resonanz(SPR)-spektroskopischen Studie wurde entdeckt, dass Neamin die A-Stelle mit einer Stöchiometrie von 2:1 und einer Dissoziationskonstanten von ungefähr 10 µm für beide Stufen bindet.^[141] Um ein divalentes Aminoglycosid zu finden, das an beide Bindungsplätze der A-Stelle bindet und somit eine hohe Affinität aufweist, wurde eine Reihe von Dimeren synthetisiert. Dimere mit einem beweglichen hydrophilen Linker wiesen eine signifikant gesteigerte antibiotische Aktivität auf. Die nahezu lineare Korrelation zwischen dem IC₅₀- der Translations-Inhibition und der MIC zeigt, dass die Translation der Zielprozess dieser neuen Aminoglycosid-Antibiotikaklasse ist. Interessanterweise hemmen mehrere der Neamindimere auch die APH(2'')-Aktivität des difunktionellen APH(2'')-AAC(6')-Modifizierungsenzyms. Diese dimeren



Neaminderivate stellen daher einen neuen Ansatz zur Bekämpfung der Aminoglycosidresistenz dar.

4.3. Everninomycine

Die Everninomycine, z.B. Everninomycin 13,384-1, sind eine Klasse komplexer Oligosaccharid-Antibiotika, die gehören zur Familie der Orthosomycine, die eine oder mehrere Orthoesterbindungen haben.^[142] Ihre komplexe Struktur hat das Interesse präparativ arbeitender Chemiker auf sich

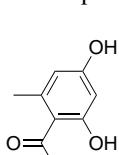


gezogen und vor kurzem gelang die Totalsynthese eines Everninomycins.^[143] Vermutlich hemmen die Everninomycine die Translation von RNA zu Proteinen durch eine Verhinderung des Aufbaus des Initiierungskomplexes. Die Everninomycine sind sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gegen MRSA und VRE aktiv, die ersten Mitglieder dieser Klasse waren jedoch toxisch. Ziracin, ein Cyclodextrinkomplex des Everninomycins 13,384-1, erwies sich *in vivo* als harmlos, und derzeit werden Analoga davon zur klinischen Prüfung entwickelt.^[144]

4.4. RNA als Target für Arzneistoffe

Das Interesse an RNA als Target für die Entwicklung neuer Therapeutika ist in letzter Zeit stark gewachsen, und Aminoglycoside dienten als Musterbeispiel für diesen Ansatz.^[145, 146] Im Allgemeinen werden die Proteinsynthese, Reifung der mRNA und die Wechselwirkungen zwischen den Ribonucleoproteinen und

der RNA als viel versprechendste Angriffsflächen gesehen. Da die funktionellen Domänen der RNA stärker konserviert sind als der Aufbau der aktiven Zentren der Enzyme, sollte sich Resistenz in RNA-Targets nur langsam bilden. Typ-I des HI-Virus (HIV-I) entwickelte z.B. sehr schnell Resistenz gegen Enzyminhibitoren. Targets, die auf RNA basieren, könnten einen möglichen Ausweg darstellen. Aminoglycoside stören die Wechselwirkung zwischen der *trans*-aktivierenden Region (TAR) und dem korrespondierenden Peptid (Tat)^[147] sowie zwischen dem viralen Transaktivatorprotein (Rev) und dem Rev-Response-Element (RRE).^[148] Diese regulierenden Wechselwirkungen sind für die Fortpflanzung der Viren notwendig. In einer Bibliothek aus Neaminderivaten, die in einer vier Komponenten Ugi-Reaktion gebildet wurde, wurden Verbindungen entdeckt, die RRE stärker binden als Neamin.^[149]



Da die Bindung des Rev-Peptids an RRE die Ausstülpung einer einzelnen Base auslöst, wurde angenommen, dass ein Hybrid aus einem Aminoglycosid und einem Intercalator eine starke Affinität für RRE haben könnte.^[150] Tatsächlich ist ein Neomy-

cin-Acradin-Konjugat der stärkste bekannte kompetitive Hemmstoff der Rev-RRE-Bindung mit einer Affinität, die nur um das Zweifache geringer als die des Rev-Peptids ist. In der zystischen Fibrose (Mukoviszidose) führt eine Punktmutation einen Stopcodon in das CFTR(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)-Gen ein. Die Zugabe von Aminoglycosiden zu einem In-vitro-Expressionssystem für mutierte CFTR führte zu einer Fortsetzung der Translation über den Stopcodon hinaus.^[151] Es wird angenommen, dass Fusionsgene, die durch chromosomal Translokation entstehen, die Ursache bestimmter Krebsarten sind. Antisense-Verbindungen gegen diese Bruchstellen hemmen das Tumorzachstum.^[152, 153] Eine Bibliothek aus Neaminderivaten wurde auf ihre Bindungsaffinitäten an zwei dieser Fusionsgene (PAX3-FKHR und Bcr-Abl) getestet.^[154] Die stärksten Bindungen wiesen polyaminsubstituierte Derivate mit einer Dissoziationskonstanten unterhalb des mikromolaren Bereichs auf. Die Affinitäten der Aminoglycoside legt die Vermutung nahe, dass diese die Expression von Genen regulieren können. Des Weiteren fungieren Aminoglycosid-Antibiotika als Hemmstoffe katalytischer RNA, wie dem Group-I-Intron,^[155] dem Hammerheadribozym^[156] und dem Ribozym des Hepatitis-Delta-Virus (HDV).^[157]

Die jetzigen und zukünftigen Fortschritte in der funktionalen Genomanalyse und der Aufklärung des Genoms verschiedener Spezies lassen erwarten, dass einzigartige RNA-Sequenzen als Targets für neue Wirkstoffe identifiziert werden können. Aminoglycoside könnten als wichtige Quelle für kleine, RNA-bindende Moleküle dienen. Die Entwicklung wirkungsvoller kombinatorischer Methoden für die Synthese von Aminoglycosiden stellt daher einen neuen wichtigen Forschungszweig dar. Die programmierbare Ein-topfsynthese von Oligosacchariden,^[158] die einen relativ einfachen Zugang zu diesen Verbindungen bietet, sollte zur Synthese von Aminoglycosid-Bibliotheken genutzt werden. Dies sollte in Kombination mit den Methoden, die in der

Genom- und Proteom-Forschung angewendet werden (Abbildung 11), für die Entdeckung und Evaluierung von RNA-bindenden Molekülen von Nutzen sein.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Entwicklung neuer Antibiotika zur Umgehung des Resistenzproblems ist ein wichtiges Teilgebiet der Wirkstoff-Forschung. Der in diesem Aufsatz beschriebene auf Kohlenhydraten basierende Ansatz stellt eine relativ neue Vorgehensweise dar, und mehrere der gefundenen Strukturen scheinen interessante Kandidaten für die Antibiotika-Entwicklung zu sein. Neue Methoden, die in letzter Zeit auf dem Gebiet der Kohlenhydratforschung entwickelt wurden, stellen nicht nur einen Fortschritt auf diesem Gebiet dar, sondern eröffnen eine neue Richtung für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Ein erweitertes Verständnis der Genome von Bakterienarten und Fortschritte in der funktionalen Genom- und Proteom-Forschung, sollten die Identifizierung weiterer Targets für Antibiotika zur Folge haben.

Eingegangen am 18. Januar 2001 [A 443]

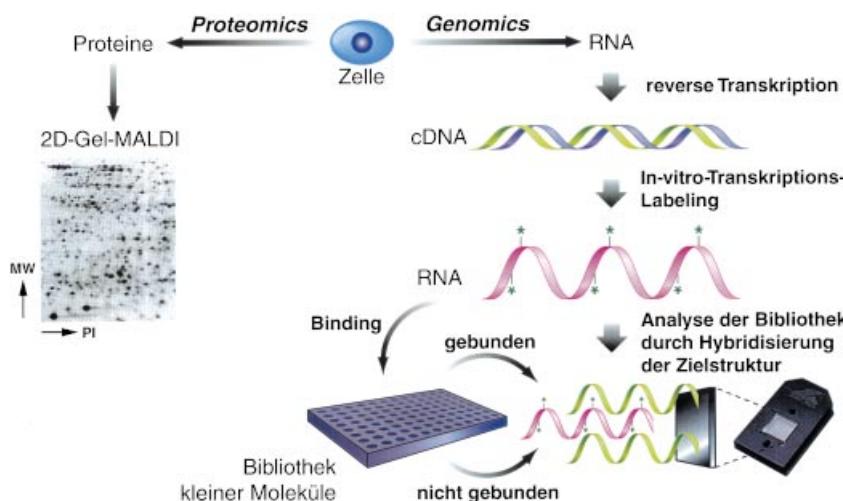


Abbildung 11. Untersuchung der Bindung an RNA mit Methoden der Proteom- und der Genom-Forschung: Das Proteom (sichtbar auf einem 2D-Gel, MW = Molekulargewicht, PI = isoelektrischer Punkt) wird vor und nach der Inkubation der Zelle mit dem zu untersuchenden Molekül verglichen. Eine Analyse der betroffenen Proteine durch MALDI-Massenspektrometrie ermöglicht die Identifizierung selektiver Translationsinhibitoren. Das Labeling der gesamten RNA einer Zelle (durch reverse Transkription und In-vitro-Transkriptions-Labeling) kann für den Nachweis spezifischer Bindung kleiner Moleküle an RNA genutzt werden.

- [1] J. Davies, *Nature* **1996**, *383*, 219–220.
- [2] S. B. Levy, *Sci. Am.* **1998**, *278*, 46–53.
- [3] J. J. Schentag, J. M. Hyatt, J. R. Carr, J. A. Paladino, M. C. Birmingham, G. S. Zimmer, T. J. Cumbo, *Clin. Infect. Dis.* **1998**, *26*, 1204–1214.
- [4] J. Davies, *Science* **1994**, *264*, 375–382.
- [5] C. Walsh, *Nature* **2000**, *406*, 775–781.
- [6] B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinaÿ, *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Part II: Biology of Saccharides*, Vol. 3: *Biosynthesis and Degradation of Glycoconjugates*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [7] B. Ernst, G. W. Hart, P. Sinaÿ, *Carbohydrates in Chemistry and Biology, Part II: Biology of Saccharides*, Vol. 4: *Lectins and Saccharide Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [8] K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 835–841.
- [9] Y. Chapleur, *Carbohydrate Mimics: Concepts and Methods*, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**.
- [10] P. Sears, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2446–2471; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2301–2324.
- [11] J. H. Cate, M. M. Yusupov, G. Z. Yusupova, T. N. Earnest, H. F. Noller, *Science* **1999**, *285*, 2095–2105.
- [12] W. M. Clemons, Jr., J. L. C. May, B. T. Wimberly, J. P. McCutcheon, M. S. Capel, V. Ramakrishnan, *Nature* **1999**, *400*, 833–840.
- [13] N. Ban, P. Nissen, J. Hansen, M. Capel, P. B. Moore, T. A. Steitz, *Nature* **1999**, *400*, 841–847.
- [14] L. L. Shen, D. T. W. Chu, *Curr. Pharm. Des.* **1996**, *2*, 195–208.
- [15] Q. Li, L. A. Mitscher, L. L. Shen, *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 231–293.
- [16] R. Chaby, *Drug Disc. Today* **1999**, *4*, 209–221.
- [17] R. Goldman, W. Kohlbrenner, P. Lartey, A. Pernet, *Nature* **1987**, *329*, 162–164.
- [18] T. Waaglund, K. Luthman, M. Orbe, A. Claesson, *Carbohydr. Res.* **1990**, *206*, 269–276.
- [19] A. M. Deacon, Y. S. Ni, W. G. Coleman, Jr., S. E. Ealick, *Structure* **2000**, *8*, 453–462.
- [20] H. R. Onishi, B. A. Pelak, L. S. Gerckens, L. L. Silver, F. M. Kahan, M.-H. Chen, A. A. Patchett, S. M. Galloway, S. A. Hyland, M. S. Anderson, C. R. H. Raetz, *Science* **1996**, *274*, 980–982.

- [21] J. E. Jackman, C. A. Fierke, L. N. Tume, M. Pirrung, T. Uchiyama, S. H. Tahir, O. Hindsgaul, C. R. H. Raetz, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 11 002–11 009.
- [22] R. Koeplin, G. Wang, B. Hoette, U. B. Priefer, A. Puehler, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 7786–7792.
- [23] J. P. Shilcock, J. R. Wheatley, R. J. Nash, A. A. Watson, R. C. Griffiths, T. D. Butters, M. Müller, D. J. Watkin, D. A. Winkler, G. W. J. Fleet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1999**, 2735–2745.
- [24] S. T. M. Allard, M.-F. Giraud, C. Whitfield, P. Messner, J. H. Naismith, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2000**, *56*, 222–225.
- [25] M.-F. Giraud, H. J. McMiken, G. A. Leonard, P. Messner, C. Whittfield, J. H. Naismith, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1999**, *55*, 2043–2046.
- [26] M.-F. Giraud, G. A. Leonard, R. A. Field, C. Berlind, J. H. Naismith, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 398–402.
- [27] T. N. M. Schumacher, L. M. Mayr, D. L. Minor, Jr., M. A. Milhollen, M. W. Burgess, P. S. Kim, *Science* **1996**, *271*, 1854–1857.
- [28] V. A. Petrenko, G. P. Smith, X. Gong, T. Quinn, *Protein Eng.* **1996**, *9*, 797–801.
- [29] I. Saggio, R. Laufer, *Biochem. J.* **1993**, *293*, 613–616.
- [30] I. A. Kozlov, S. Mao, Y. Xu, X. Huang, L. Lee, P. S. Sears, C. Gao, A. Coyle, K. D. Janda, C.-H. Wong, *ChemBioChem*, in press.
- [31] R. K. Sood, A. Fattom, V. Pavliak, *DDV* **1996**, *1*, 381–387.
- [32] R. E. W. Hancock, *Lancet* **1997**, *349*, 418–422.
- [33] J. Van Heijenoort, *New Compr. Biochem.* **1994**, *27*, 39–54.
- [34] T. Skarzynski, A. Mistry, A. Wonacott, S. E. Hutchinson, V. A. Kelly, K. Duncan, *Structure* **1996**, *4*, 1465–1474.
- [35] C. J. Andres, J. J. Bronson, S. V. D'Andrea, M. S. Deshpande, P. J. Falk, K. A. Grant-Young, W. E. Harte, H.-T. Ho, P. F. Misco, J. G. Robertson, D. Stock, Y. Sun, A. W. Walsh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 715–717.
- [36] P. K. Chakravarty, W. J. Greenlee, W. H. Parsons, A. A. Patchett, P. Combs, A. Roth, R. D. Busch, T. N. Mellin, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1886–1890.
- [37] C. Fan, P. C. Moews, C. T. Walsh, J. R. Knox, *Science* **1994**, *266*, 439–443.
- [38] H. Kleinkauf, H. Von Doehren, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *192*, 1–15.
- [39] M. E. Tanner, S. Vaganay, J. Van Heijenoort, D. Blanot, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1756–1760.
- [40] B. Zeng, K. K. Wong, D. L. Pompliano, S. Reddy, M. E. Tanner, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 10081–10085.
- [41] L. D. Gegnas, S. T. Waddell, R. M. Chabin, S. Reddy, K. K. Wong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1643–1648.
- [42] G. Siewert, J. L. Strominger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *57*, 767–773.
- [43] P. E. Brandish, K.-I. Kimura, M. Inukai, R. Southgate, J. T. Lonsdale, T. D. H. Bugg, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 1640–1644.
- [44] M. Inukai, F. Isono, A. Takatsuki, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 980–983.
- [45] M. Muroi, K.-i. Kimura, H. Osada, M. Inukai, A. Takatsuki, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 103–104.
- [46] K.-i. Kimura, Y. Ikeda, S. Kagami, M. Yoshihama, K. Suzuki, H. Osada, K. Isono, *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 1099–1104.
- [47] K.-i. Kimura, S. Kagami, Y. Ikeda, H. Takahashi, M. Yoshihama, H. Kusakabe, H. Osada, K. Isono, *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 640–646.
- [48] C. Dini, P. Collette, N. Drochon, J. C. Guillot, G. Lemoine, P. Mauvais, J. Aszodi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1839–1843.
- [49] C. A. Gentle, T. D. H. Bugg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1999**, 1279–1286.
- [50] E. A. Somner, P. E. Reynolds, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 413–419.
- [51] S. Ha, E. Chang, M.-C. Lo, H. Men, P. Park, M. Ge, S. Walker, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8415–8426.
- [52] S. Ha, D. Walker, Y. Shi, S. Walker, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1045–1052.
- [53] H. Men, P. Park, M. Ge, S. Walker, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 2484–2485.
- [54] M.-C. Lo, H. Men, A. Branstrom, J. Helm, N. Yao, R. Goldman, S. Walker, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3540–3541.
- [55] S. A. Denome, P. K. Elf, T. A. Henderson, D. E. Nelson, K. D. Young, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 3981–3993.
- [56] M. Di Berardino, A. Dijkstra, D. Stueber, W. Keck, M. Gubler, *FEBS Lett.* **1996**, *392*, 184–188.
- [57] R. C. Goldman, D. Gange, *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 801–820.
- [58] J. Van Heijenoort, M. Derrien, J. Van Heijenoort, *FEBS Lett.* **1978**, *89*, 141–144.
- [59] W. Vollmer, J.-V. Holtje, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 1181–1185.
- [60] M. Kurz, W. Guba, L. Vertesy, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *252*, 500–507.
- [61] S. Vogel, A. Buchynsky, K. Stembera, K. Richter, L. Hennig, D. Muller, P. Welzel, F. Maquin, C. Bonhomme, M. Lampilas, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1963–1965.
- [62] N. Ei-Abadla, M. Lampilas, L. Hennig, M. Findeisen, P. Welzel, D. Müller, A. Markus, J. Van Heijenoort, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 699–722.
- [63] M. J. Sofia, N. Allanson, N. T. Hatzenbuhler, R. Jain, R. Kakarla, N. Kogan, R. Liang, D. Liu, D. J. Silva, H. Wang, D. Gange, J. Anderson, A. Chen, F. Chi, R. Dulina, B. Huang, M. Kamau, C. Wang, E. Baizman, A. Branstrom, N. Bristol, R. Goldman, K. Han, C. Longley, S. Midha, H. R. Axelrod, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3193–3198.
- [64] R. C. Goldman, E. R. Baizman, A. A. Branstrom, C. B. Longley, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2251–2254.
- [65] S. J. Hecker, M. L. Minich, K. Lackey, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4904.
- [66] G. Brooks, P. D. Edwards, J. D. I. Hatto, T. C. Smale, R. Southgate, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 7999–8014.
- [67] L. Qiao, J. C. Vederas, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3480–3482.
- [68] T. K. Ritter, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 615–618.
- [69] G. Jung, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1067–1084; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1051–1068.
- [70] R. W. Jack, G. Jung, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 310–317.
- [71] H. Brotz, G. Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds, H.-G. Sahl, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 154–160.
- [72] E. Breukink, I. Wiedemann, C. Van Kraaij, O. P. Kuipers, H. G. Sahl, B. De Kruijff, *Science* **1999**, *286*, 2361–2364.
- [73] H. Brotz, M. Josten, I. Wiedemann, U. Schneider, F. Gotz, G. Bierbaum, H.-G. Sahl, *Mol. Microbiol.* **1998**, *30*, 317–327.
- [74] H. Brotz, G. Bierbaum, P. E. Reynolds, H.-G. Sahl, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 193–199.
- [75] K. C. Nicolaou, C. N. C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2230–2287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2097–2152.
- [76] D. H. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1264–1286; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1173–1193.
- [77] J. C. J. Barna, D. H. Williams, *Annu. Rev. Microbiol.* **1984**, *38*, 339–357.
- [78] C. T. Walsh, S. L. Fisher, I. S. Park, M. Prahalad, Z. Wu, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 21–28.
- [79] R. Nagarajan, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1181–1195.
- [80] S. G. Grdadolnik, P. Pristovsek, D. F. Mierke, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2090–2099.
- [81] J. P. Mackay, U. Gerhard, D. A. Beauregard, R. A. Maplestone, D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4573–4580.
- [82] U. N. Sundram, J. H. Griffin, T. I. Nicas, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 13 107–13 108.
- [83] J. Rao, L. Yan, J. Lahiri, G. M. Whitesides, R. M. Weis, H. S. Warren, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 353–359.
- [84] J. Rao, J. Lahiri, R. M. Weis, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2698–2710.
- [85] H. Arimoto, K. Nishimura, I. Hayakawa, T. Kinumi, D. Uemura, *Chem. Commun.* **1999**, 1361–1362.
- [86] J.-M. Lehn, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 2455–2463.
- [87] K. C. Nicolaou, R. Hughes, S. Y. Cho, N. Winssinger, C. Smethurst, H. Labischinski, R. Endermann, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3981–3986; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3823–3828.
- [88] P. J. Solenberg, P. Matsushima, D. R. Stack, S. C. Wilkie, R. C. Thompson, R. H. Baltz, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 195–202.
- [89] A. Malabarba, T. I. Nicas, R. C. Thompson, *Med. Res. Rev.* **1997**, *17*, 69–137.
- [90] R. C. Goldman, E. R. Baizman, C. B. Longley, A. A. Branstrom, *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *183*, 209–214.
- [91] M. Ge, Z. Chen, H. R. Onishi, J. Kohler, L. L. Silver, R. Kerns, S. Fukuzawa, C. Thompson, D. Kahne, *Science* **1999**, *284*, 507–511.

- [92] F. Biavasco, C. Vignaroli, R. Lupidi, E. Manso, B. Facinelli, P. E. Varaldo, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 2165–2172.
- [93] M. J. Rodriguez, N. J. Snyder, M. J. Zweifel, S. C. Wilkie, D. R. Stack, R. D. G. Cooper, T. I. Nicas, D. L. Mullen, T. F. Butler, R. C. Thompson, *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 560–569.
- [94] G. Candiani, M. Abbondi, M. Borgonovi, G. Romano, F. Parenti, *J. Antimicrob. Chemother.* **1999**, *44*, 179–192.
- [95] D. Chatterjee, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 579–588.
- [96] R. E. Lee, K. Mikusova, P. J. Brennan, G. S. Besra, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11829–11832.
- [97] R. C. Reynolds, N. Bansal, J. Rose, J. Friedrich, W. J. Suling, J. A. Maddry, *Carbohydr. Res.* **1999**, *317*, 164–179.
- [98] J. A. Maddry, N. Bansal, L. E. Bermudez, R. N. Comber, I. M. Orme, W. J. Suling, L. N. Wilson, R. C. Reynolds, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 237–242.
- [99] S. A. McMahon, G. A. Leonard, L. V. Buchanan, M.-F. Giraud, J. H. Naismith, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1999**, *55*, 399–402.
- [100] F. T. Counter, P. W. Ensminger, D. A. Preston, C. Y. E. Wu, J. M. Greene, A. M. Felty-Duckworth, J. W. Paschal, H. A. Kirst, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35*, 1116–1126.
- [101] P. B. Fernandes, R. Bailey, R. Swanson, C. W. Hanson, E. McDonald, N. Ramer, D. Hardy, N. Shipkowitz, R. R. Bower, E. Gade, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1986**, *30*, 865–873.
- [102] J. Retsema, A. Girard, W. Schelkly, M. Manousos, M. Anderson, G. Bright, R. Borovoy, L. Brennan, R. Mason, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, *31*, 1939–1947.
- [103] L. H. Hansen, P. Mauvais, S. Douthwaite, *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 623–631.
- [104] D. A. Hopwood, D. H. Sherman, *Annu. Rev. Genet.* **1990**, *24*, 37–66.
- [105] D. E. Cane, C. T. Walsh, C. Khosla, *Science* **1998**, *282*, 63–68.
- [106] C. R. Hutchinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 3336–3338.
- [107] P. F. Leadlay, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 162–168.
- [108] S. Donadio, J. B. McAlpine, P. J. Sheldon, M. Jackson, L. Katz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 7119–7123.
- [109] M. Oliynyk, M. J. B. Brown, J. Cortes, J. Staunton, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 833–839.
- [110] R. McDaniel, A. Thamchaipenet, C. Gustafsson, H. Fu, M. Betlach, M. Betlach, G. Ashley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1846–1851.
- [111] D. A. Johnson, H.-W. Liu, *Compr. Nat. Prod. Chem.* **1999**, *3*, 311–365.
- [112] A. Trefzer, A. Bechthold, J. A. Salas, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 283–299.
- [113] D. A. Johnson, H.-W. Liu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 642–649.
- [114] A. Kirschning, A. F. W. Bechthold, J. Rohr, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *188*, 1–84.
- [115] J. Jiang, J. B. Biggins, J. S. Thorson, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6803–6804.
- [116] L. Zhao, D. H. Sherman, H.-W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10256–10257.
- [117] L. Zhao, J. Ahlert, Y. Xue, J. S. Thorson, D. H. Sherman, H.-W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9881–9882.
- [118] H. Yamase, L. Zhao, H.-W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12397–12398.
- [119] S. L. Walker, A. H. Andreotti, D. E. Kahne, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 1351–1360.
- [120] M. Arthur, A. Brisson-Noel, P. Courvalin, *J. Antimicrob. Chemother.* **1987**, *20*, 783–802.
- [121] J. Clancy, B. J. Schmieder, J. W. Pettpas, M. Manousos, J. A. Williams, J. A. Faiella, A. E. Girard, P. R. McGuirk, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1273–1279.
- [122] P. J. Hajduk, J. Dinges, J. M. Schkeryantz, D. Janowick, M. Kaminski, M. Tufano, D. J. Augeri, A. Petros, V. Nienaber, P. Zhong, R. Hammond, M. Coen, B. Beutel, L. Katz, S. W. Fesik, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3852–3859.
- [123] D. T. W. Chu, *Annu. Rep. Med. Chem.* **2000**, *35*, 145–155.
- [124] A. Denis, C. Agouridas, J.-M. Auger, Y. Benedetti, A. Bonnefoy, F. Bretin, J.-F. Chantot, A. Dussarat, C. Fromentin, S. G. D'Ambrieres, S. Lachaud, P. Laurin, O. Le Martret, V. Loyau, N. Tessot, J.-M. Pejac, S. Perron, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3075–3080.
- [125] R. L. Elliott, D. Pireh, G. Griesgraber, A. M. Nilius, P. J. Ewing, M. H. Bui, P. M. Raney, R. K. Flamm, K. Kim, R. F. Henry, D. T. W. Chu, J. J. Plattner, Y. S. Or, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 1651–1659.
- [126] D. Fourmy, M. I. Recht, S. C. Blanchard, J. D. Puglisi, *Science* **1996**, *274*, 1367–1371.
- [127] D. Fourmy, S. Yoshizawa, J. D. Puglisi, *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 333–345.
- [128] M. F. Brink, G. Brink, M. P. Verbeet, H. A. de Boer, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 325–331.
- [129] M. Hendrix, P. B. Alper, E. S. Priestley, C.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Engl. Ed.* **1997**, *109*, 95–98; *Angew. Chem. Int. Engl. Ed.* **1997**, *36*, 119–122.
- [130] J. B. H. Tok, R. R. Rando, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8279–8280.
- [131] C.-H. Wong, M. Hendrix, D. D. Manning, C. Rosenbohm, W. A. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8319–8327.
- [132] P. B. Alper, M. Hendrix, P. Sears, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1965–1978.
- [133] W. A. Greenberg, E. S. Priestley, P. S. Sears, P. B. Alper, C. Rosenbohm, M. Hendrix, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6527–6541.
- [134] Y. Wang, K. Hamasaki, R. R. Rando, *Biochemistry* **1997**, *36*, 768–779.
- [135] J. B. H. Tok, J. Cho, R. R. Rando, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 5741–5758.
- [136] G. D. Wright, *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 499–503.
- [137] S. Kondo, K. Hotta, *J. Infect. Chemother.* **1999**, *5*, 1–9.
- [138] K. Hotta, A. Sunada, Y. Ikeda, S. Kondo, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 1168–1174.
- [139] J. Roestamadjii, I. Grapsas, S. Mobashery, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 80–84.
- [140] J. Haddad, S. Vakulenko, S. Mobashery, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11922–11923.
- [141] S. J. Suchek, A. L. Wong, K. M. Koeller, D. D. Boehr, K.-a. Draker, P. Sears, G. D. Wright, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5230–5231.
- [142] D. E. Wright, *Tetrahedron* **1979**, *35*, 1207–1237.
- [143] K. C. Nicolaou, H. J. Mitchell, R. M. Rodriguez, K. C. Fylaktakidou, H. Suzuki, S. R. Conley, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 3149–3165.
- [144] M. Chu, R. Mierzwa, M. Patel, J. Jenkins, P. Das, B. Pramanik, T. M. Chan, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6689–6693.
- [145] Y. Tor, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1681–1685; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1579–1582.
- [146] S. J. Suchek, C.-H. Wong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 678–686.
- [147] H.-Y. Mei, M. Cui, A. Heldsinger, S. M. Lemrow, J. A. Loo, K. A. Sannes-Lowery, L. Sharman, A. W. Czarnik, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14204–14212.
- [148] M. L. Zapp, S. Stern, M. R. Green, *Cell* **1993**, *74*, 969–978.
- [149] W. K. C. Park, M. Auer, H. Jaksche, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10150–10155.
- [150] S. R. Kirk, N. W. Luedtke, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 980–981.
- [151] H. C. Dietz, A. Hamosh, D. M. Bedwell, M. Howard, R. A. Frizzell, *Nat. Med.* **1996**, *2*, 608–609.
- [152] C. Szczylit, T. Skorski, N. C. Nicolaides, L. Manzella, L. Malaguarnera, D. Venturelli, A. M. Gewirtz, B. Calabretta, *Science* **1991**, *253*, 562–565.
- [153] M. Bernasconi, A. Remppis, W. J. Fredericks, F. J. Rauscher III, B. W. Schaefer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13164–13169.
- [154] S. J. Suchek, W. A. Greenberg, T. J. Tolbert, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1122–1126; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1080–1084.
- [155] U. von Ahsen, J. Davies, R. Schroeder, *Nature* **1991**, *353*, 368–370.
- [156] T. K. Stage, K. J. Hertel, O. C. Uhlenbeck, *RNA* **1995**, *1*, 95–101.
- [157] J. Rogers, A. H. Chang, U. von Ahsen, R. Schroeder, J. Davies, *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 916–925.
- [158] Z. Zhang, I. R. Ollmann, X.-S. Ye, R. Wischnat, T. Baasov, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 734–753.