

Röntgenstrukturuntersuchungen an Glycopeptid-Antibiotika und ihren Komplexen mit Zellwandpeptiden Gram-positiver Bakterien

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Christopher Lehmann
aus Lüneburg

Göttingen 2000

D 7

Referent: Prof. G. M. Sheldrick, Ph. D.

Korreferent: Prof. Dr. J. Magull

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2000

„Mehr Licht!“
Goethe

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. G. M. Sheldrick für die interessante Aufgabenstellung und die vielen Ratschläge, die er mir in ausführlichen Diskussionen nicht nur bezüglich meines Projektes, sondern auch bei Fragen allgemeinerer Art gegeben hat.

Ich danke der gesamten Abteilung für die gute Zusammenarbeit und ständige Hilfsbereitschaft.

Für die Durchsicht und Korrektur des Manuskriptes danke ich Herrn T. Pape, Frau Dipl. Chem. V. König und Frau Dipl. Soziologin Betriebswirtin (BA) B. Lüdecke.

Herrn Dr. L. Vértesy sei für das Überlassen von Peptid- und Antibiotikaproben gedankt. Die Reinheit dieser Substanzen hat maßgeblich zum Erfolg dieses Projektes beigetragen.

Frau Dr. M. Schäfer danke ich für die vorangegangenen Arbeiten an diesem Projekt und für den Aufbau des Kristallisationslabors.

Frau Dr. M. Dauter möchte ich für das Kristallisieren von Decaplaninproben in Brookhaven, New York, U.S.A., und Herrn Dr. Z. Dauter für das Aufnehmen der hervorragenden Datensätze von Decaplanin danken.

Meiner Mutter sei, neben all dem Anderen, für die Finanzierung meines Studiums gedankt.

Abkürzungsverzeichnis

Ac	Acetat
Abb.	Abbildung
Aufl.	Auflösung
CCD	<i>charge coupled device</i>
ca.	circa
Cit	Citrat
CSD	Cambridge structural database
D-Ala-D-Ala	D-Alanin-D-Alanin
esd.	<i>estimated standard deviation</i> (geschätzte Standardabweichung)
FFT	<i>fast Fourier transformation</i>
FOM	<i>figure of merit</i>
Glu	Glutamat
Lys	Lysin
M	Anzahl an Mol eines Stoffes in einem Liter Lösungsmittel
MAD	<i>multi wavelength anomalous diffracton</i>
MIR	<i>multiple isomorphous replacement</i>
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MR	<i>molecular replacement</i>
MRSA	<i>Metzthicillin resistant stppholococcus aureus</i>
MWPC	<i>Multiwire propotional counter</i>
NCS	<i>non crystallographic symmetry</i>
Nr.	Nummer
NMR	<i>nulclear magnetic resonance</i> (magnetische Kernresonanz)
o.g.	oben genannte
p.a.	per analysis
PDB	<i>Protein Database</i> (Proteindatenbank)
PEG	Polyethylenglycol
PFE	Perfluorpolyether
r.m.s.	<i>root mean square</i> (mittlere quadratische Abweichung)
SAS	<i>single wavelength anomalous scattering</i>
SAD	<i>single wavelength anomalous disperion</i>
sog.	sogenannte
TM	Trademark
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)aminoethan

u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
u.v.m.	und viele mehr
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Inhalt

1.	Motivation	1
2.	Grundlagen	4
2.1.	Kristallogenese	4
2.1.1.	Gasdiffusion	5
2.1.2.	<i>Batch</i> -Methode	6
2.1.3.	Weitere Kristallisationsmethoden	8
2.2.	<i>seeding</i>	8
2.3.	<i>loops</i>	8
2.4.	Kryokristallographie	9
2.5.	Erzeugung von Röntgenstrahlung	11
2.5.1.	Kathodenstrahlung	11
2.5.2.	Synchrotron-Strahlung	11
2.6.	Detektierung von Bragg-Reflexen	12
2.6.1.	CCD-Zähler	12
2.6.2.	<i>Multi-Wire</i> -Proportional-Zähler	13
2.6.3.	<i>Image Plate</i>	13
2.7.	Strukturlösungsmethoden	14
2.7.1.	<i>Ab initio</i>	15
2.7.2.	Anomale Streuung	16
2.7.3.	<i>Molecular Replacement</i>	18
2.7.4.	Phasenerweiterung	19
2.9.	Elektronendichte-Darstellungen	20
2.10.	Verfeinerung	21
2.11.	Biologischer Hintergrund	22
3.	Strukturen	26
3.1.	Balhimycine	26
3.1.1.	Allgemeiner Aufbau	26
3.1.2.	Dipeptidkomplexe	28
3.1.2.1.	Deglucobalhimycin im Komplex mit D-Ala-D-Ala	32
3.1.2.2.	Balhimycin im Komplex mit D-Ala-D-Ala	40
3.1.3.	Balhimycin im Komplex mit D-Ala-D-Ala-Lys	45
3.1.4.	Deglucobalhimycin im Komplex mit D-Ala-D-Ala-Lys-D-γGlu-Ala	51

3.1.5.	Zusammenfassung der Peptidkomplexe	54
3.2.	Decaplanin	56
3.2.1.	Decaplanin (P2 ₁ -Modifikation / erste Form)	56
3.2.2.	Decaplanin (P2 ₁ -Modifikation / zweite Form)	58
3.2.3.	Decaplanin (P6 ₁ 22-Modifikation / erste Form)	60
3.2.4.	Decaplanin (P6 ₁ 22-Modifikation / zweite Form)	65
3.2.5.	Vergleich der Strukturlösungsmethoden	74
4.	Literaturverzeichnis	75
5.	Publikationsliste	80
6.	Lebenslauf	81

1. Motivation

Die Kenntnis des räumlichen Aufbaus von Systemen ist für das Verständnis von Funktionen hilfreich bis notwendig. Dies gilt im Besonderen bei zunehmender Größe der Systeme und Komplexität ihrer funktionalen Zusammenhänge. Anhand von Beispielen sollen die Größenverhältnisse biologischer Systeme erläutert werden. Die CC-Einfachbindungslänge in Alkanen beträgt ca. 1.54 Å, der Durchmesser einer *E. coli*-Zelle ca. 2.5 µm. Zwischen beiden liegen vier Größenordnungen, d.h. biologische Systeme sind im Bezug auf ihren atomaren Aufbau als sehr groß anzusprechen. Wenn man sich vor Augen hält, welche Schwierigkeiten eine analytische Beschreibung chemischer Reaktionen wie z.B. der homolytischen Spaltung einer CC-Bindung bereitet und versucht die Menge chemischer Einzelreaktionen abzuschätzen, die während der Zell-Mitose ablaufen, dann läßt sich behaupten, daß biologischen Systemen eine äußerst komplexe Kinetik zugrunde liegt. Es gibt nun je nach Fragestellung eine Vielzahl möglicher Methoden, um sich dem räumlichen Aufbau und den Funktionalitäten in biologischen Systemen zu nähern. In der vorliegenden Arbeit soll sich mit der Röntgenstrukturanalyse von Einkristallen auseinandergesetzt werden. Diese ursprünglich in der Mineralogie beheimatete Methode ist in den letzten Jahren zu einer der Standardmethoden der Biologie avanciert. Sie besticht durch die Möglichkeit der Bestimmung von Atomkoordinaten auch in äußerst großen Systemen wie z.B. der Hülle von Viren oder Ribosomen. Die Röntgenstrukturanalyse hat im Wesentlichen zwei Probleme zu überwinden:

- Zwischen den gemessenen Signalen, den Intensitäten von Bragg-Reflexen, und den Koordinaten der Atome in der Elementarzelle liegt ein großer Rechenaufwand, der u.a. die Lösung des kristallographischen Phasenproblems beinhaltet.
- Das zu untersuchende System muß im kristallinen Zustand vorliegen.

Auf dem Weg von der Fragestellung, über die Wahl des zu untersuchenden Systems, hin zur Elektronendichte als Funktion räumlicher Koordinaten ist eine Vielzahl weiterer Arbeitsschritte nötig, die keineswegs immer durch Automatismen bewerkstelligt werden können und häufig sehr fallspezifisch sind. Als Beispiele seien hier genannt:

- das Aufsuchen geeigneter Kryobedingungen, um den Kristall bei tiefen Temperaturen (meist 100 K) untersuchen zu können.
- die Bestimmung von Zellmetrik und Raumgruppe unter Berücksichtigung möglicher Verzwilligungen.

- besonders bei MAD-, MIR- und SAD-Experimenten die Wahl möglicher Schwermetallsubstrate und einer geeigneten Meßstrategie.
- die Wahl einer geeigneten Verfeinerungsmethode und der bei niedriger Auflösung korrekte Umgang mit *model bias*.

So kann gesagt werden, daß das Anfertigen einer Röntgenstrukturanalyse trotz aller Bemühungen zur Automatisierung keine Routineaufgabe darstellt. Von Fall zu Fall kann ein enormer Aufwand an Kosten, Material und Zeit nötig sein bis die gewünschten Koordinaten vorliegen, anhand derer bei geeigneter Systemwahl dann Fragestellungen beantwortet werden können.

In dieser Dissertation soll der räumliche Aufbau von Glycopeptid-Antibiotika vom Vancomycin-Typ untersucht werden. Ein tieferes Verständnis der 3D-Struktur dieser Stoffgruppe ist mit besonderem Hinweis auf die Problematik der Antibiotikaresistenz von Bakterien wünschenswert. In diesem Zusammenhang wurden die Antibiotika nicht nur in ihrem nativen Zustand untersucht, sondern nach Möglichkeit zusammen mit ihrer biologischen Zielstruktur, der nascenten Zellwand Gram-positiver Bakterien^[1].

In letzter Zeit nehmen die aus der medizinischen Praxis gemeldeten Fälle von Antibiotikaresistenzen und ungewöhnlichem physiologischen Verhalten von Patienten bei Antibiotikagabe zu^[2]. Die Resistenz ist die evolutive Antwort der Bakterienstämme auf das Antibiotikum. Es gilt als gesichert, daß bei jeder Aufnahme derartiger Chemotherapeutika durch den Menschen quellenunabhängig Resistenzen auftreten können, und daß es eine Korrelation zwischen Häufigkeit von Expositionen und der Anzahl auftretender Resistenzen gibt. Es zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Zahl gemeldeter Resistenzen in verschiedenen Ländern und der freien Zugänglichkeit verschiedener Antibiotika in Apotheken und Drogerien. Als anthropogene Quellen sind in erster Linie die direkte Gabe im medizinischen Bereich und die indirekte Aufnahme durch die Nahrung zu nennen.

Hält man sich den schlimmsten Fall, den völligen Verlust der Wirksamkeit sämtlicher Antibiotika vor Augen, so wird leicht verständlich, warum dieses Thema immer häufiger Einzug in die auf die Vermittlung von Ängsten und Befürchtungen spezialisierten Massenmedien findet^[3]. Aber auch die Politik ist sich der wachsenden Probleme ausgelöst durch Infektionskrankheiten zunehmend bewußt. So war eines der zentralen Anliegen des Präsidenten der U.S.A., W. J. Clinton bei seinem Besuch in Europa (Mai / Juni 2000), den Kampf gegen Infektionskrankheiten auf internationaler Ebene zu koordinieren^[4]. Ein zentrales Problem bei der Erfüllung solcher Forderungen ist wie so oft der finanzielle Rahmen. So ist es auf der einen Seite in einigen Teilen der Welt ein unüberwindbares finanzielles Problem, kranke Menschen mit Antibiotika zu behandeln, auf der anderen Seite ist die Grundlagenforschung auf diesem Gebiet, gemessen an den finanziellen Ansprüchen des *Shareholder Values*, als eher unattraktiv zu bewerten. Dies führt dazu,

daß ein nennenswerter Teil der Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet aus dem Umfeld altruistisch motivierter, fremdfinanzierter Forschung stammt.

Auch wenn der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit nicht im methodischen zu suchen ist, soll hier auf die Bedeutung der Methodenentwicklung hingewiesen werden. Es soll an dieser Stelle nicht verschwiegen werden, daß die biologisch-medizinische Relevanz dieser Verbindungsklasse nicht der einzige Grund für ihre Auswahl gewesen ist. Verbindungen mittlerer Größe (mehrere hundert Atome) liefern mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit Kristalle, die zu atomarer Auflösung streuen und sich gleichzeitig durch eine für *ab initio* Strukturlösung interessante, relativ große Anzahl unabhängiger Parameter auszeichnen. So konnten die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Molekülstrukturen durch Tests verschiedener neuer Algorithmen an ungelösten, neuen Strukturen indirekt zur Methodenentwicklung beitragen. Erst die Erprobung an unbekanntem Strukturen gilt in Fachkreisen als Beleg für die Funktionstüchtigkeit neuer Methoden. Einige der verwendeten Methoden wie z.B. SAS-Experimente werden in letzter Zeit häufiger angewendet, sind aber noch weit davon entfernt, Routineexperimente zu sein.

Die Antibiotikaresistenz ist ein kleiner Teil des gewaltigen Spektrums an Fragestellungen, denen man sich mit Hilfe der Analyse von Molekülstrukturen nähern kann. Der Bogen spannt sich von den Materialwissenschaften über die Molekülchemie bis hin zur Medizin.

2. Grundlagen

2.1. Kristallogenese

Ein Kristall ist eine regelmäßige, diskontinuierliche Anordnung von Materie. Regelmäßig heißt hier, daß Materie sich in einer der 230 möglichen Raumgruppen zusammenfindet, die den mathematisch definierten Regeln von Gruppen gehorchen, diskontinuierlich, daß die Materie aus Atomen bzw. Molekülen aufgebaut ist, die zu einer definierten, nicht stetigen Verteilung von Elektronendichte im Kristall führen.

Jede Messung diskreter Bragg-Reflexe setzt voraus, daß die zu untersuchende Substanz als Kristall ausreichender Größe und Qualität vorliegt. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Einkristalle wurden ausnahmslos mit Gasdiffusionsmethoden erhalten. Es sollen aber auch andere weitverbreitete Verfahren zur Herstellung von Einkristallen vorgestellt werden.

Eine erfolgreiche Kristallisation hängt im wesentlichen von drei Faktoren ab:

- der Reinheit der Proben
- der vorhandenen Gesamtmenge an Substanz
- der reproduzierbaren Zusammensetzung von Aliquots.

Die Erfahrung lehrt, daß Stoffe um so bereitwilliger kristallisieren, je reiner sie sind. Eine größere Substanzmenge ermöglicht es, viele optionale Kristallisationsbedingungen zu testen. Es zeigt sich, daß auch Stoffe, die nur in Spuren zugegen sind, für den Kristallisationsprozess im Besonderen bei der Kristallkeimbildung bedeutsam sein können. In diesem Zusammenhang sei die Koordinationssphäre von Schwermetallen erwähnt, welche in der Lösung Oligomere bilden können, die dem Aufbau des Kristallverbandes vorausgehen. Eine qualitative Überlegung soll zeigen, wie schnell die Reproduzierbarkeit der Kristallisation verloren gehen kann:

Ein normaler Reaktionsansatz eines Kristallisationsexperimentes hat ein Volumen von einigen μl . Wenn nun z.B. mit dem Hausstaub eine geringe Menge an Schwermetallsalzen in dieses System gelangen so liegt eine Schwermetallionenlösung von nennenswerter Konzentration vor. Sollten bei diesem Experiment Kristalle erhalten werden, bei deren Bildung die vorhandenen Schwermetalle eine Rolle spielten, so ist eine Reproduktion nahezu unmöglich.

Es wurde im Rahmen dieser Arbeit immer auf eine reproduzierbare Zusammensetzung der verwendeten Lösungen geachtet. Es kamen nur Chemikalien zur Anwendung, die auch für chemische Analysen geeignet sind (p.a.). Als Lösungsmittel wurde ausschließlich zweifach destilliertes Wasser verwendet.

Besonderes Augenmerk ist in diesem Zusammenhang auf die interdisziplinäre Zusammenarbeit zu legen. Reinheit und Menge bedeuten im biologischen Umfeld etwas anderes als in der Kristallographie. So ist in der Praxis des Naßlabors ein Protein rein, wenn es z.B. bei einer Gelelektrophorese lediglich eine Bande aufweist, im Kristallisationslabor bedeutet Reinheit Molenbrüche von mehr als 99.9%^[5]; beim biologischen bzw. chemischen Arbeiten kann die Herstellung einiger µg einer Substanz dieser Reinheit mit einem erheblichen Aufwand einhergehen, ein Kristallisationsprojekt mit einer Gesamtmenge von weniger als 10 mg Substanz ohne bekannte Kristallisationsbedingungen zu beginnen, ist nahezu aussichtslos.

2.1.1. Gasdiffusion ^[6-9]

In einem geschlossenen System befinden sich zwei flüssige Phasen, die durch eine Gasphase voneinander getrennt sind. Die beiden flüssigen Phasen sind in der Regel wässrige Lösungen, die unterschiedliche Konzentrationen verschiedener Stoffe enthalten, die Gasphase ist üblicherweise Luft. Weisen die beiden flüssigen Phasen verschiedene chemische Potentiale auf, so ist ihr Dampfdruck unterschiedlich. Dies führt solange zum Transport flüchtiger Stoffe über die Gasphase bis der Dampfdruck beider flüssiger Phasen gleich ist; das System ist equilibriert.

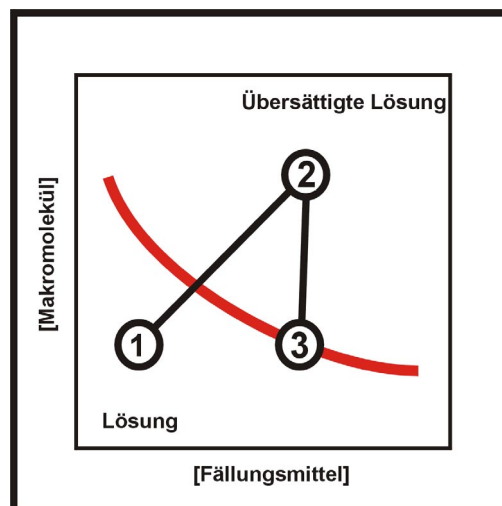


Abb. 1: Phasendiagramm zur Gasdiffusion

Das System ist in Größe und Zusammensetzung so zu wählen, daß es den in Abbildung 1 schematisierten Verhältnissen entspricht. Die Konzentration des zu kristallisierenden Stoffes (Kristallinat) wird mittels Gasdiffusion in den Nichtgleichgewichtszustand der übersättigten Lösung überführt. Dies entspricht der Strecke von Punkt 1 nach Punkt 2. Bei günstiger Wahl von Konzentration und Zusammensetzung der Lösung kommt es dann am Punkt 2 zur Kristallkeimbildung. Es schließt sich so lange Kristallwachstum an, bis die Konzentration des Kristallinates die Löslichkeitsgrenze (rote Linie) erreicht hat. Dieser Zustand ist am Punkt 3 erreicht. Es ist hier der häufige Fall einer Substanz dargestellt, deren Löslichkeit sich mit der Konzentration der zugesetzten Stoffe verringert. Da es sich bei diesen Fällungsmitteln häufig um Salze handelt, spricht man von Aussalzen (*salting out*). Auch der umgekehrte Fall ist bekannt, Stoffe, die sich mit zunehmender Salzkonzentration besser lösen. Der Bereich der übersättigten Lösung wird dann unter Umkehrung der Diffusionsrichtung und Abnahme der Salzkonzentration erreicht. Man spricht hier von Einsalzen (*salting in*).

Es gibt eine Reihe technischer Realisierungen dieses Verfahrens. Die häufigsten sind die *sitting-* und *hanging-drops*. Neue Aspekte ergeben sich durch die Nutzung von Mikrogravitation in Weltraumstationen.

2.1.2. Batch-Methode ^[10,11]

Bei dieser Methode wird direkt der dem Punkt 2 des in Abb. 1 skizzierten Phasendiagramms entsprechende Zustand erreicht. Besonders in Bezug auf Reproduzierbarkeit und den Einsatz geringer Substanzmengen ist die *Batch*-Methode vorteilhaft. Es werden im Bereich der makromolekularen Kristallographie große Anstrengungen unternommen möglichst alle bei einer Kristallstruktur anfallenden Arbeitsschritte zu automatisieren. Auf dem Weg zu einer automatischen Kristallogense wurden *Microbatch*-Automaten, siehe Abb. 2, entwickelt^[12].

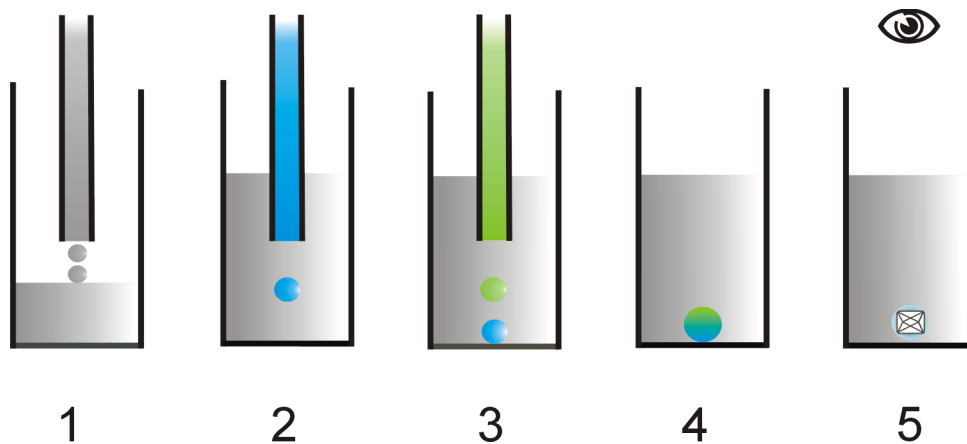


Abb. 2: Arbeitsschritte eines *Microbatch*-Automaten

Die Kristallisation mittels *Microbatch*-Automaten lässt sich in fünf essentielle Arbeitsschritte unterteilen:

1. Ein Roboter füllt die Gefäße einer Matrixanordnung mit einer inerten, gasdurchlässigen Flüssigkeit, die einen geeigneten Brechungsindex aufweist, z.B. Paraffin.
2. Es wird ein Tropfen der Proteinlösung in die Flüssigkeit gegeben.
3. Ein zweiter Tropfen, der Puffer, PEG und Salze gewünschter Konzentration enthält, wird in die Flüssigkeit gegeben.
4. Beide Tropfen mischen sich unter Ausbildung des Zustandes, der Punkt 2 in Abb. 1 entspricht.
5. Beobachtung und Bewertung von Niederschlagsbildung und Kristallwachstum.

Die einzelnen Reaktionsansätze werden automatisch mit einer CCD-Kamera observiert. Die Ergebnisse von *Batch*-Methode und Gasdiffusion sind äquivalent, was eine wechselseitige Verwendung beider Methoden ermöglicht. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß eine automatische Bewertung der Bilddaten Schwierigkeiten bereitet. Diese sind nicht so sehr im Auffinden von Kristallen begründet, als vielmehr in der Einstufung von Niederschlägen in Bezug auf ihre Nähe zu Kristallisationsbedingungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zu Testzwecken, nach der *Batch*-Methode kristallisiert.

2.1.3. Weitere Kristallisationsmethoden

Zwei weitere, verbreitete Kristallisationsmethoden sind die Dialyse und die Flüssig-flüssig-Diffusion.

Bei der Dialyse^[13] macht man sich den gerichteten Stofftransport durch eine semipermeable Membran gegebener Porengröße entlang eines Konzentrationsgradienten zunutze. Mittels Dialyse lassen sich sehr gezielt einzelne Kristallisationsparameter variieren.

Bei der Flüssig-flüssig-Diffusion in Kapillaren^[13] werden zwei Lösungen verschiedener Zusammensetzung in der Reihenfolge abnehmender Dichte überschichtet. Entlang des eindimensionalen Konzentrationsgradienten kommt es zum Stofftransport in beide Richtungen. An der Stelle, an der das Kristallisat in übersättigter Konzentration vorliegt, kann es nach Keimbildung zum Wachstum von Kristallen kommen.

2.2. Seeding ^[14-16]

Der Begriff des *seedings* (seed, engl. Saat) bezieht sich, nicht ganz korrekt, auf die Eigenschaft von Kristallen, daß sie, einmal erzeugt, ähnlich wie einige Pflanzen mittels Ablegern vermehrt werden können. Hierzu wird ein Stück Kristall in eine Lösung gegeben, die in etwa dem Punkt 2 in Abb. 1 entspricht, mit dem Unterschied, daß die Bedingungen so gewählt werden, daß Keimbildung unterbleibt. Dies erreicht man z.B. durch Equilibrieren einer an Kristallisat ärmeren Lösung. Man unterscheidet je nach Größe der "Kristallsaat" zwischen *micro-* und *makro-seeding*. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Möglichkeit des *cross-seedings*. Bei dieser Technik werden Kristalle einer Substanz dazu verwendet, einer anderen als Saat zu dienen.

2.3. Loops ^[17]

Beim Umgang mit Proteinkristallen ist ihrer geringen mechanischen Stabilität Rechnung zu tragen. Ein geeignetes Werkzeug zur Handhabung von Proteinkristallen ist der *loop* (engl. Schleife). Er besteht aus einem Faden, der schleifenförmig in einer Kapillare befestigt wird. Mit *loops* können Kristalle mitsamt der sie umgebenden Flüssigkeit bewegt werden, um sie z.B. von einer Lösung in eine andere oder auf eine Meßvorrichtung zu bringen.

Man unterscheidet je nach Funktion mehrere Arten von Lösungen.

- Die Mutterlösung ist die Lösung in der Kristalle gewachsen sind.
- Kristalle werden in einer Ernte-Lösung (engl. *harvesting solution*) aufbewahrt.

Die zum Einfrieren von Kristallen verwendeten Lösungen heißen Kryopuffer^[19].

2.4. Kryokristallographie^[18-20]

Es ist aus verschiedenen Gründen von Vorteil, Kristalle bei der Siedetemperatur von Stickstoff $T_{\text{sdp.}}(\text{N}_2) = 77.33 \text{ K}$ zu lagern und bei 100 K im Stickstoffstrom zu vermessen. Bei diesen Temperaturen ist davon auszugehen, daß alle Diffusionsvorgänge in Kristall und Lösung soweit verlangsamt sind, daß sie vernachlässigt werden können.

Beim Bestrahlen von Kristallen mit intensiver Röntgenstrahlung kann es bei geeigneter Wellenlänge der Strahlung und Energie der Bindung zur homolytischen Bindungsspaltung kommen. Man spricht von Strahlenschäden und unterscheidet zwischen primären und sekundären Strahlenschäden^[21].

- Bei primären Strahlenschäden werden Bindungen, direkt am Protein oder den umgebenden Lösungsmittelmolekülen gespalten.
- Entstehen bei den o.g. Bindungsspaltungen bewegliche Radikale, so sind diese befähigt, weitere Reaktionen an Protein- und Wassermolekülen auszulösen. Man spricht von sekundären Strahlenschäden.

Vor allem primäre Strahlungsschäden sind weiterhin ein Problem, da sich der Kristall während der Messung verändert. Man spricht hier von einem Verlust an Isomorphie. Dieser Isomorphieverlust wirkt sich vor allem bei der Strukturlösung aber auch bei der Verfeinerung nachteilig aus. Bei den hochenergetischen Röntgenpulsen moderner undulator *beamlines* kann es temporär zur Erwärmung des Kristalls und somit auch zu sekundären Strahlenschäden kommen.

Ziel der Kryokristallographie ist es, Bedingungen zu finden, unter denen es möglich ist, Kristalle auf o.g. Temperaturen unter möglichst geringer Zunahme der Mosaizität zu kühlen. Dabei sollte die den Kristall umgebende Flüssigkeit glasartig, also im Zustand einer unterkühlten Flüssigkeit erstarren. Andernfalls würde Wasser in Form kleiner Kristalle anfallen, welche ihrerseits zur Beugung befähigt wären und die Genauigkeit der Messung verringern würden. Es gibt eine Vielzahl von Substanzen, die diesen Voraussetzungen genügen. Man bezeichnet sie als Kryoprotektanden, einige mögliche Beispiele sind:

- Niedere Alkohole wie z.B. Propanol, Ethanol, MPD, Glycerol.
- PEG verschiedener Kettenlänge, z.T. als Monomethylether derivatisiert.
- Hochkonzentrierte Salzlösungen wie z.B. Na-Malonat.
- Saccharide.

Mittels Kryokristallographie ist es möglich die Ursache sekundärer Strahlenschäden, den Transport von Radikalen, bis zur Bedeutungslosigkeit zu verlangsamen. Natürlich ist Diffusion auch bei diesen Temperaturen noch vorhanden. Einmal bestrahlte Kristalle können aus diesem Grund nicht unbegrenzt gelagert werden.

Ein weiterer wichtiger Vorteil von Tieftemperaturmessungen ist die verringerte thermische Bewegung von Atomen, wodurch die zeitlich gemittelte Elektronendichte wesentlich höher ist. Es können Röntgenquanten zu höherer Auflösung gebeugt werden als es bei höheren Temperaturen der Fall ist. Außerdem sind die so erhaltenen Koordinaten mit geringeren Fehlern (*esds*) behaftet.

2.5. Erzeugung von Röntgenstrahlung^[22,23]

Bevor Bragg-Beugung gemessen werden kann, muß erst monochromatische Röntgenstrahlung geeigneter Wellenlänge zur Verfügung stehen. Man bedient sich hierbei im wesentlichen zweier Methoden.

2.5.1. Kathodenstrahlung

Mit einer Glühkatode erzeugte Elektronen werden mittels Hochspannung beschleunigt und treffen auf ein als Anode geschaltetes, hochreines Metall, z.B. Molybdän oder Kupfer. Beim Eintritt in das Anodenmaterial werden diese an den Elektronenhüllen des Metallgitters gebremst und ihre kinetische Energie geht in Gitterschwingung über. Von dieser Phononenenergie wird ein Teil als sog. Bremsstrahlung emittiert. Haben die freien Elektronen eine ausreichende Energie, um Elektronen eines Metallatoms zu promovieren, so treten im Spektrum der austretenden Röntgenstrahlung zusätzlich neben der kontinuierlichen Bremsstrahlung diskrete Strahlungsbe- reiche auf, deren Energien den beteiligten Elektronenübergängen entsprechen. Ein monochro- matischer Teil dieser Strahlung kann mittels Beugung an Graphit-Einkristallen erhalten werden. Leider geht bei dieser Vorgehensweise der größte Teil, der ursprünglich eingesetzten Energie verloren. So wird ein großer Teil der ursprünglichen kinetischen Energie als Wärme beim Auf- treffen der Elektronen auf die Anode frei, welche über eine Kühlvorrichtung abgeführt werden muß. Es wird nur die Strahlung eines Elektronenüberganges verwendet, die anderen und beina- he die gesamte Bremsstrahlung gehen verloren. Bei der Monochromatisierung mittels Graphit- Einkristallen kann letztendlich nur die Intensität eines Bragg-Reflexes niedriger Beugungsord- nung genutzt werden. Nimmt man alle diese Verlustquellen zusammen, so wird klar, warum nur relativ geringe Intensitäten an Röntgenstrahlung auf diese Weise erhalten werden können. Eine Erhöhung der kinetischen Energie der Elektronen oder ihrer Anzahl, der Intensität des Katho- denstrahles, stößt ab einem gewissen Punkt auf unüberwindbare technische Probleme. Das Schmelzen der Anode kann in sogenannten Drehanoden, bei denen der Brennfleck der Elektro- nen auf einer innen gekühlten Anode seinen Ort ständig ändert, zu höheren Leistungen verlagert werden.

2.5.2. Synchrotron-Strahlung^[24]

Die Tatsache, daß beschleunigte Elektronen Strahlung emittieren, kann auch in Synchrotrons ausgenutzt werden. In evakuierten Röhren werden Elektronen, aus technischen Gründen Positronen, auf einer Kreisbahn beschleunigt. Es können Geschwindigkeitsbeträge nahe der Lichtgeschwindigkeit erreicht werden. Hierbei werden die Teilchen mittels starker Magneten auf ihrer Bahn gehalten. Trotz des Hochvakuums kommt es vereinzelt zu Wechselwirkungen zwischen Positronen und Materie, weshalb nach einiger Zeit neue Positronen erzeugt werden müssen. Mit dieser Versuchsanordnung lassen sich Röntgenstrahlen wesentlich höherer Intensität und Brillanz erzeugen. Die Wellenlänge der Röntgenstrahlung ist hier eine Funktion der Beschleunigung und kann anders als in obigen Röntgengeneratoren relativ frei gewählt werden. Zusätzlich zu der Beschleunigung auf der Kreisbahn des Synchrotrons sind bei modernen Synchrotrons sog. *wiggler*- und *undulator beamlines* vorhanden. Hierbei passiert der Positronenstrahl eine Reihe abwechselnd als Nord- und Südpol geschalteter, starker Magneten. Dies führt zu weiterer Beschleunigung in Richtung der Magneten. Die Geschwindigkeit der Elektronen, der Krümmungsgrad des Synchrotronringes und die Feldstärke und Anordnung des Undulators führen zu unterschiedlichen Energieprofilen bei verschiedenen *beamlines* und Synchrotrons.

2.6. Detektierung von Bragg-Reflexen

Das bei einer Röntgenbeugung zu messende Signal, die Intensität diskreter Bragg-Reflexe kann auf verschiedene Arten bestimmt werden. Um eine möglichst große Anzahl an Reflexen gleichzeitig zu detektieren, haben sich Flächenzähler durchgesetzt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Datensätzen wurden drei Arten von Flächenzählern verwendet.

2.6.1. CCD-Zähler^[25]

Hier werden die eintreffenden Röntgenquanten mittels einer phosphoreszierenden Substanz in sichtbares Licht umgewandelt und anschließend durch eine Faseroptik einem CCD-Detektor zugeführt. Eine gute Quantenausbeute der phosphoreszierenden Schicht, sowie eine verlustarme Faseroptik sind hierbei von essentieller Bedeutung. Von Nachteil ist im besonderen die relativ geringe Größe des Zählers, welche durch die Anzahl an Pixeln auf dem CCD-Chip begrenzt wird sowie ein immer vorhandenes Eigenrauschen des Chips. Das Eigenrauschen eines

CCD-Chips kann verringert werden, indem dieser bei tieferen Temperaturen betrieben wird. Der hier zur Anwendung gekommene CCD-Chip weist eine Betriebstemperatur von etwa $-54\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf. Als Vorteil ist die kurze Auslesezeit zu nennen, die im μs -Bereich liegt.

2.6.2. **Multi-Wire-Proportional-Zähler^[26] (MWPC)**

Dieser Zählertyp entspricht vom Grundprinzip einem Geiger-Müller-Zählrohr. Im Falle eines MWPC wird der Ort eines eintreffenden Röntgenquants mittels mehrerer Schichten von parallel und senkrecht zueinander verlaufenden Drähten detektiert. MWPCs zeichnen sich durch eine, über die an den Drähten anliegende Hochspannung einstellbare, gute Energiediskriminierung und ein geringes Rauschen aus. Außerdem wird ohne Auslesezeit detektiert. Von Nachteil ist auch hier die relativ geringe Größe des Zählers und die pro Zeiteinheit limitierte Menge detektierbarer Röntgenquanten. Der Grund liegt in der Natur der Zählmethode: es wird immer nur ein Röntgenquant pro Zeiteinheit erfaßt. Bei starker Röntgenbeugung kann es vorkommen, daß die Menge an eintreffenden Quanten pro Zeit die Kapazität des Zählers überschreiten. In solchen Fällen muß dafür Sorge getragen werden, daß die Zahl der Röntgenquanten verringert wird. Dies kann durch die Auswahl eines kleineren Kristalls geschehen oder z.B. durch Verringerung der Intensität des Primärstrahls.

2.6.3. **Image Plate^[27] (IP)**

In einem IP dient eine mit Europium aktivierte und mit BaFBr dotierte Phosphorschicht als temporäre Photoplatte. Diese Schicht arbeitet nach dem Prinzip der photostimulierten Lumineszenz (PSL). Die Phosphorkristalle sind in der Lage, temporär einen Teil der absorbierten Röntgenquanten in Form quasistabiler Farbzentren zu speichern. Im anschließenden Lesevorgang wird diese Schicht mit einem Helium-Neon-Laser erneut stimuliert und die PSL kann mit Hilfe eines Photomultipliers detektiert werden. Nach dem Auslesen wird die Photoschicht mit weißem Licht bestrahlt und kann daraufhin erneut genutzt werden. Ein großer Vorteil von IPs ist ihre nicht limitierte Größe und ihr relativ einfacher Aufbau. Ein Nachteil ist die mit mehreren zehn Sekunden relativ lange Auslesezeit. IPs kommen an den meisten Synchrotronen zum Einsatz. Ihr großes Gewicht spielt bei der Einkreisgeomtrie, wie sie an den meisten *beamlines* anzutreffen ist eine untergeordnete Rolle. Da bei größeren Proteinen Belichtungszeiten in der Größenordnung mehrerer Minuten keine Seltenheit sind, macht die Auslesezeit nur einen Bruchteil der Bruttostrahlzeit aus. Anders ist dies an modernen undulator *beamlines*. Hier reichen häufig Belichtungszeiten von wenigen Sekunden aus. Eine halbe Minute Auslesezeit ist unter diesen

Bedingungen nicht akzeptabel. Aus diesem Grund kommen an solchen *beamlines* verstärkt CCD-Detektoren zum Einsatz.

2.7. Strukturlösungsmethoden

In einem Diffraktionsexperiment werden die Intensitäten I_{hkl} von Reflexen gemessen. Um die Elektronendichte in einem Kristall berechnen zu können, werden die Strukturformfaktoren F_{hkl} benötigt.

$$\rho_{(x,y,z)} = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F_{hkl} \exp(-2\pi i(hx + ky + lz)) \quad (1)$$

Diese sind komplexe Größen und setzen sich aus den Amplituden $|F_{hkl}|$ und den dazugehörigen Phasen φ_{hkl} zusammen.

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| \exp(i\varphi_{hkl}) \quad (2)$$

Die gemessene Intensität I_{hkl} eines Reflexes ist dem Quadrat der Amplitude $|F_{hkl}|$ proportional. Leider geht beim Meßvorgang die gesamte Information über die Phase φ_{hkl} verloren. Die Strukturformfaktorgleichung

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^N f_j \exp(2\pi i(hx + ky + lz)) \quad (3)$$

ist eine Summation über die Streufaktoren f_j von N Atomen in einer Elementarzelle. Der Verlust der Phaseninformation wird das kristallographische Phasenproblem genannt. Die Rekonstruktion der Phaseninformation wird als Strukturlösung bezeichnet. Es gibt verschiedene Wege sich diesem Problem zu nähern.

2.7.1. *Ab initio*-Strukturlösung^[28-31] (Direkte Methoden)

Bei *ab initio*- oder auch sog. Direkten Methoden wird davon ausgegangen, daß Moleküle aus punktförmigen räumlich voneinander getrennten Atomen aufgebaut sind. Dies ist aus der Sicht der Röntgenstrukturanalyse keineswegs immer der Fall. Nach dem Bragg'schen Gesetz ergibt sich die Auflösung d nach:

$$d = \lambda / 2 \sin \theta(\max). \quad (4)$$

Bei gegebener Wellenlänge λ und gegebenem Diffraktionswinkel θ entspricht d etwa dem minimalen Abstand, den zwei Atome haben dürfen, wenn sie in einer Elektronendichtedarstellung gerade noch als zwei unterscheidbare Maxima in Erscheinung treten. Atomare Auflösung ist also keine feste Größe, sondern hängt von den in einer Molekülstruktur auftretenden Bindungsabständen ab. Bei Proteinen ist in der Regel davon auszugehen, daß der kürzeste Bindungsabstand der zwischen dem Carbonylkohlenstoff- und seinem Sauerstoffatom ist, also ca. 1.25 Å. Trotzdem wird von atomarer Auflösung häufig dann gesprochen, wenn Daten um 1.00 Å vorliegen. Im Umfeld biologischer Publikationen wird von atomarer Auflösung auch dann gesprochen, wenn anhand einer Röntgenstrukturanalyse Aussagen über die Koordinaten einzelner Aminosäuren oder der Sekundärstruktur von Proteinen gemacht werden können. Dies soll die Strukturen bis ca. 3 Å von anderen, weniger aussagekräftigen, strukturellen Ergebnissen abgrenzen, wie sie z.B. mit Hilfe der Elektronenmikroskopie (bis 10 Å) erhalten werden können.

Klassische Direkte Methoden bedienen sich statistischer Annahmen wie der Tripelphasenbeziehungen^[32-34], der Tangensformel^[35,36] und der negativen Quartettbeziehungen^[37-39]. In dem Programm SHELXS^[40] kommt die sog. *Multisolution*-Methode zur Phasenbestimmung zur Anwendung. Zu allen E -Werten, die einen vorgegebenen Grenzwert von z.B. 1.2 überschreiten, werden die Tripelphasen und die negativen Quartettbeziehungen unter Berücksichtigung der Raumgruppensymmetrie gesucht und mittels einer iterativen Verfeinerung mit einer modifizierten Tangensformel wird eine Phasenerweiterung durchgeführt. E -Werte sind normierte Intensitäten. Die beste Lösung wird einer E -Fouriersynthese unterzogen, aus der auf die Elektronendichteverteilung im Kristall geschlossen werden kann. Diese Vorgehensweise ermöglicht es, Strukturen bis ca. 200 Nicht-Wasserstoffatome routinemäßig zu lösen. Ab dieser Molekülgröße wird die Anzahl der auf diese Weise gelösten Strukturen gering. Neueren Algorithmen ist gemeinsam,

daß sie den klassischen Direkten Methoden auf verschiedene Arten sozusagen den „richtigen Weg zeigen“.

Es werden z.B. wechselseitige Verfeinerungen im realen und im Phasenraum vorgenommen, wobei im Phasenraum z.B. die oben genannten statistischen Methoden zur Anwendung kommen. Anschließend wird im realen Raum eine Auswahl auf die Weise vorgenommen, daß lediglich Peaks, die weiter als z.B. ein Å voneinander entfernt sind Atome sein können. Ein weiterer Ansatz zielt auf die Möglichkeit, eine bekannte Substruktur, wie z.B. das sich wiederholende Muster von α -Helices in einer sechsdimensionalen MR-Suche (2.7.3.) oder einer Dichtemodifikation (2.8.) zu verwenden. Die so erhaltenen Phaseninformationen können dann zur Unterstützung der Direkten Methoden verwendet werden.

Substrukturen können auch auf andere Weisen verwendet werden. Viele dieser Methoden zielen auf die Auswertung von anomaler Dispersion zur Lösung einer Schweratomsstruktur.

2.7.2. Anomale Dispersion^[41-43]

Es gibt mehrere Möglichkeiten der Wechselwirkung zwischen Röntgenquanten und der Elektronenhülle von Atomen. Hierbei können neben der elastischen Streuung, deren Wahrscheinlichkeit proportional zu den Streufaktoren f_0 ist, auch andere Prozesse ablaufen. Es sind im Wesentlichen zwei weitere Effekte zu berücksichtigen, die die Intensität der gemessenen Bragg-Reflexe beeinflussen.

1. Die Energie des Röntgenquants wird von den Atomen absorbiert und ohne Zeitverlust unter Energieerhalt wieder emittiert. Die Wahrscheinlichkeit für diesen Prozess ist proportional zu f' .
2. Die Energie des Röntgenquants wird von den Atomen absorbiert und zeitverzögert unter Energieerhalt wieder emittiert. Die Wahrscheinlichkeit für diesen Prozess ist proportional zu f'' .

Der Gesamtstrefaktor F ergibt sich als Funktion der Wellenlänge λ aus der Summe der Strukturfaktoren der Einzelprozesse.

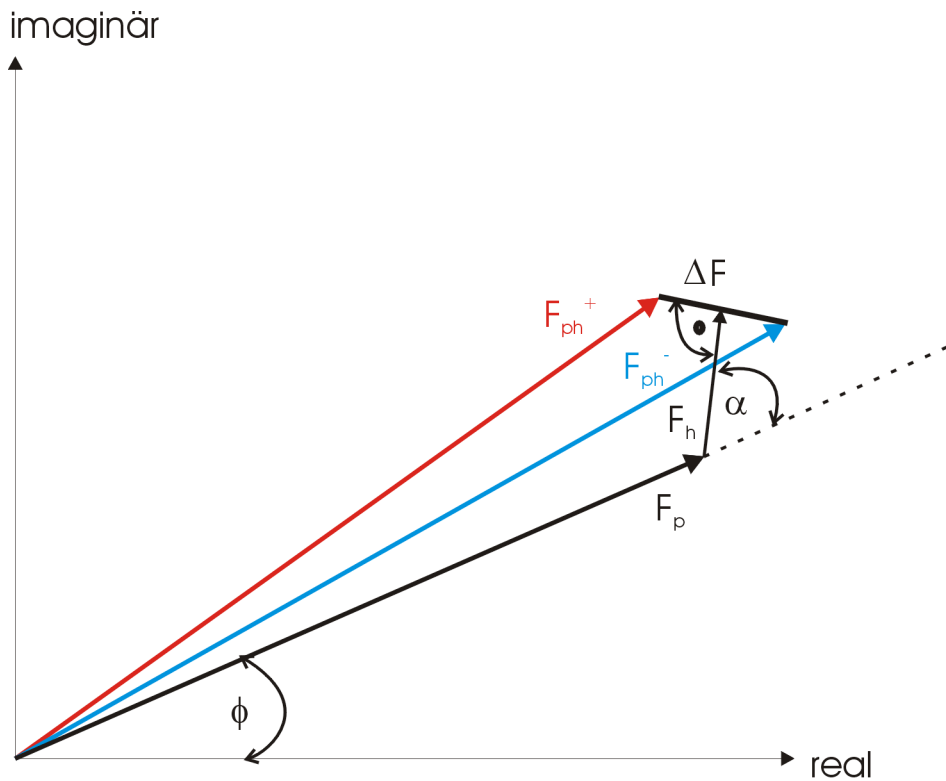
$$F = f_0 + f'(\lambda) + if''(\lambda) \quad (5)$$

Eine wesentliche Folge dieses Streuverhaltens ist, daß in nicht-zentrosymmetrischen Raumgruppen bei nicht verschwindendem Imaginäranteil if'' des Streufaktors das Friedelsche Gesetz.

$$F(\vec{h}) = F(-\vec{h}) \quad (6)$$

seine Gültigkeit verliert. Hierbei entsprechen die Vektoren \mathbf{h} und $-\mathbf{h}$ den reziproken Gittervektoren und F^+ und F^- den jeweiligen Struktur Faktoren.

Abb. 3: Ermittlung von Phasen mit MAD-Experimenten



F_{ph}^+ und F_{ph}^- sind durch eine Messung zugänglich. Anhand eines MAD-Experimentes können unter Berücksichtigung des rechten Winkels zwischen F_h und ΔF ($F_{ph}^+ - F_{ph}^-$) und Zuhilfenahme der Gleichung (5) Werte für die Strukturfaktoranteile des anomalen Streuers F_h erhalten werden. Da die Beträge von F_h in Relation zu F_p und F_{ph} klein sind, kann die Phase des Struktur factors des Proteins näherungsweise der von F_{ph} gleichgesetzt werden. Es ist hierbei anzumerken, daß die Differenz zwischen F^+ und F^- , ΔF , im Bereich von fünf Prozent des gesamten, meßbaren Signals, den Strukturfaktorquadraten von F_{hp}^+ und F_{hp}^- liegt, und der Gesamtfehler eines

solchen Experimentes im Idealfall bei ca. drei Prozent liegt. Anhand dieses Vergleiches ist zu ersehen, daß sehr genaue Messungen nötig sind, um eine interpretierbare Elektronendichte zu erhalten. Dieser Sachverhalt hat zu größeren Veränderungen bei der Konstruktion von MAD-*beamlines* mit variabler Wellenlänge und den zugehörigen Synchrotronen geführt.

2.7.3. Molecular Replacement^[44-47] (MR)

In einer Pattersonfunktion (2.9.) entspricht das Auftreten eines Signals einem interatomaren Abstand. Es wird nun die Pattersonfunktion P im Raum um eine Rotationsmatrix C gedreht und mit sich selbst multipliziert. Anschließend wird über das Volumen integriert. Die so erhaltene Funktion R nennt man Selbstrotations-Patterson.

$$R(C) = \int_{\mathcal{V}} P(\vec{r}) \cdot P(C\vec{r}) d\vec{r} \quad (7)$$

Treten in R Signale bei Verwendung bestimmter Rotationsmatrizen auf, so können diese als vorhandene NCS interpretiert werden.

Andererseits kann auf diese Weise auch die Pattersonfunktion einer bekannten Molekülstruktur gegen die einer ähnlichen, unbekanntes Struktur gedreht werden. So kann die Rotationsmatrix bestimmt werden, mit der die bekannte in die unbekanntes Struktur überführt werden kann.

Zur vollständigen Beschreibung der Orientierung einer Molekülstruktur bezüglich eines anderen Moleküls im Raum ist aber nicht nur die Rotationsmatrix, sondern auch ein Translationsvektor nötig. Es gilt für einen beliebigen Ortsvektor \vec{r}' :

$$\vec{r}' = C\vec{r} + \vec{t} \quad (8)$$

Es müssen also noch alle in der Elementarzelle möglichen Translationsvektoren untersucht werden. Man spricht hier davon, daß eine sechsdimensionale MR-Suche in zwei dreidimensionale Suchen aufgeteilt wurde. Noch vor wenigen Jahren schien es undenkbar, in einer angemessenen Zeit eine sechsdimensionale Molekülsuche erfolgreich durchzuführen. Wegen des enormen Fortschreitens der Computergeschwindigkeit sind heute sechsdimensionale MR-Suchen möglich.

Es wird hier häufig so vorgegangen, daß mittels Maximierungsalgorithmen wie *simulated annealing* oder genetischen Algorithmen bestimmte FOMs maximiert werden. Hier sind zum Beispiel der R-Wert oder der Korrelationskoeffizient zu nennen.

Der Korrelationskoeffizient $CC^{[48]}$ ist definiert als:

$$CC = \frac{\sum wE_o^2 E_c^2 \sum w - \sum wE_o^2 \sum wE_c^2}{\sqrt{\left[\sum wE_o^4 \sum w - \left(\sum wE_o^2 \right)^2 \right] \left[\sum wE_c^4 \sum w - \left(\sum wE_c^2 \right)^2 \right]}} \quad (9)$$

Im Rahmen dieser Arbeit sind die in EPMR^[49] implementierten genetischen Algorithmen zur Anwendung gekommen.

2.8. Phasenerweiterung

Es ist häufig der Fall, daß eine Strukturlösung bei niedriger Auflösung mit relativ großen Phasenfehlern vorliegt. Ein übliches Problem ist nun, die erhaltenen Phasen zu höherer Auflösung zu erweitern und zu verbessern, um zu einer interpretierbaren Elektronendichte zu gelangen. In den hier vorliegenden Fällen wurde so vorgegangen, daß die Phasen der Schweratomsubstruktur mit dem Programm SHARP^[50] (*statistical heavy atom refinement and phasing*) verfeinert wurden. Der zentrale Algorithmus dieses Programms ist die sog. *likelihood*-Funktion. Die dieser Funktion zugrunde liegenden Konzepte sind Teil der Wahrscheinlichkeitstheorie und basieren auf dem Bayesschen Theorem,

$$p(\text{Modell}, \text{Daten}) = \frac{p(\text{Modell})p(\text{Daten}, \text{Modell})}{p(\text{Daten})} \quad (10)$$

sowie einer in der statistischen Thermodynamik analog definierten Größe, die daran angelehnt Entropie heißt. Mit SHARP können Positionen von Schweratomlösungen, Besetzungsfaktoren, anisotrope Auslenkungsparameter sowie eine Reihe weiterer Größen verfeinert werden, um die Güte der Phasen der Substruktur (oder ihrer vermuteten Fehler) zu verbessern.

Mit den so verbesserten Phasen bzw. Phasenwahrscheinlichkeiten kann mit dem Programm dm^[51] eine sog. Dichtemodifikation durchgeführt werden. Hierbei wird im realen Raum einer Elektronendichteverteilung der Tatsache Rechnung getragen, daß das Protein und die es um-

gebende Wasserhülle unterschiedliche Dichten haben. Gerade bei Strukturen, die einen hohen Anteil an Wasser aufweisen, führt dm zu einer Verbesserung der Phasen. Die Funktionsweise von dm soll anhand eines Diagramms erläutert werden.

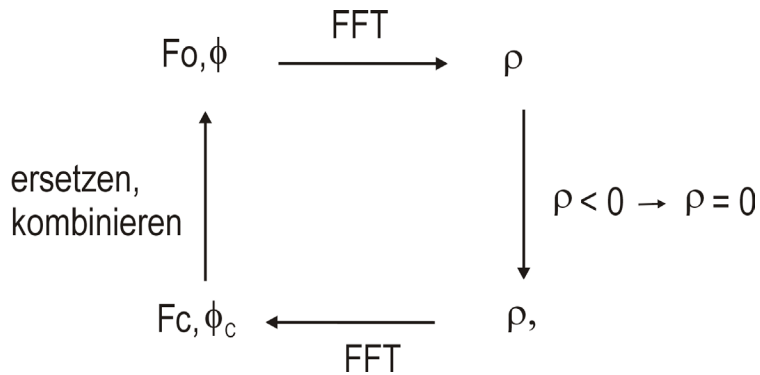


Abb. 4: Dichtemodifikation

In der Domäne der Elektronendichte wird jede Dichte, die einen negativen Wert hat, als Wasser interpretiert und es wird ihr ein neuer Wert von null zugewiesen. Dann werden nach einer FFT die berechneten Phasen ϕ und Strukturfaktoren F_c mit den gemessenen verglichen. Diese werden miteinander kombiniert oder wechselseitig ersetzt. Anschließend kann nach Übergang auf die Elektronendichtedomäne erneut eine Dichtemodifikation vorgenommen werden. dm hat eine Reihe weiterer Funktionen, die zum Teil in dieser Arbeit Verwendung fanden, hier aber nicht besprochen werden sollen.

2.9. Elektronendichtedarstellungen^[52]

Zur Beurteilung und Darstellung von Modellen werden verschiedene Arten von Fouriersynthesen herangezogen. Eine sehr wichtige Darstellung der Daten ist die sogenannte Pattersonfunktion. Hierbei handelt es sich um eine Fourier-Synthese der gemessenen Intensitäten ohne Phaseninformation. Die Intensität ist den Strukturfaktorquadraten proportional:

$$I \propto F^2. \quad (11)$$

Anhand der Pattersonfunktion können viele kristallographische Probleme behandelt und gelöst werden. Ein Spezialfall ist die in 2.7.3. beschriebene Rotationspatterson.

Häufig tritt das Problem, eine anfängliche Lösung des Phasenproblems zur Interpretation darzustellen, auf. Zu diesem Zweck werden experimentelle Phasen mit einer F_o - oder einer mit Phasenwahrscheinlichkeit w gewichteten $w \cdot F_o$ -Fouriersynthese betrachtet.

Zur Beurteilung der Vollständigkeit und Richtigkeit eines Modells wird die sog. Differenzfouriersynthese, $||F_o| - |F_c||$ herangezogen, wobei die F_o und F_c mit verschiedenen Gewichten versehen werden können.

Es gibt weitere Möglichkeiten, observierte und berechnete Strukturfaktoren sowie Phasen miteinander zu kombinieren und zu visualisieren. Es sei hier erwähnt, daß das Phasenproblem auch als die Darstellung einer interpretierbaren Elektronendichte verstanden werden kann.

Um die Interpretierbarkeit einer Elektronendichte zu verbessern wird das *real-space-averaging* angewendet. Hierbei wird die dargestellte Elektronendichte über vorhandene NCS gemittelt. Es kann auch über lokal auftretende Symmetrie gemittelt werden, wie sie z.B. die einzelnen Windungen einer α -Helix oder Basenpaare eines DNA-Stranges darstellen.

2.10. Verfeinerung^[53]

Alle hier behandelten Strukturen wurden mit dem Programm SHELXL^[54] gegen F^2 verfeinert. Bei Makromolekülstrukturen sind häufig sehr viele schwache Daten und zusätzlich ein sehr schlechtes Daten-Parameter-Verhältnis vorhanden, so daß es gerade dort wichtig ist, alle gemessenen Daten mit in die Verfeinerung einzubeziehen. Bei der hier verwendeten Minimierung der Fehlerquadrate dürfen nur Daten in die Verfeinerung einbezogen werden, die gewisse Fehlergrenzen nicht überschreiten. In der Regel werden Daten mit einem mittleren R_{merge} über 30 % oder einem I/σ kleiner eins verworfen.

Die Funktion, die in der Verfeinerung minimiert wird, lautet folgendermaßen:

$$M = \sum [w(F_o^2 - F_c^2)^2] + \sum \left[\frac{1}{\sigma^2} (y_t - y)^2 \right] \quad (12)$$

Die Meßwerte y_t ist ein vorgegebener Zielwert der Größe y , σ ist die dazugehörige Standardabweichung. Der ungewichtete Residualwert R -Wert wird für die Reflexe mit $F > 4\sigma$ angegeben.

$$R = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|} \quad (13)$$

Bei großen Strukturen sollte in SHELXL nach dem *conjugate gradient* Algorithmus verfeinert werden, der zuerst von Hendrickson und Konnert^[55] beschrieben wurde. Dieser Algorithmus ist pro Zyklus sehr viel schneller als die normale *least-squares* Verfeinerung, benötigt allerdings etwas mehr Zyklen bis zur Konvergenz. Ein Nachteil dieser Methode ist, daß keine *esds* berechnet werden können. Das Ende einer Verfeinerung sollte deshalb nach Möglichkeit mit der *least-squares* Methode durchgeführt werden.

Bei Makromolekülen ist das Verhältnis von gemessenen Daten zu den zu bestimmenden Parametern häufig sehr schlecht (kleiner als 10:1). Eine einfache Möglichkeit, dieses Verhältnis künstlich zu verbessern, stellt das Ausnutzen von chemischen Informationen dar. In Form von *restraints* können diese zusätzlichen "Daten" in die Verfeinerung einbezogen werden. Es werden u.U. Zielwerte vorgegeben, die innerhalb einer bestimmten Standardabweichung durch die Verfeinerung erreicht werden sollen.

Die wichtigsten im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *restraints* sind:

- SAME/SADI: Chemisch äquivalente 1,2- und 1,3-Bindungsabstände werden aneinander angeglichen.
- DFIX: 1,2- und 1,3-Bindungsabstände werden einem vorgegebenen Wert angenähert. Bekommt der Zielwert ein negatives Vorzeichen, so wirkt DFIX als *antibumping restraint*.
- BUMP: Soll verhindern, daß z.B. Lösungsmittelmoleküle einem Molekülfragment oder anderen Lösungsmittelmolekülen zu nahe kommen. Wassermoleküle können mit CONN 0 aus der Konnektivitätsliste der Atome entfernt werden. SHELXL setzt dann automatisch *antibumping-restraints*, wenn der vorgegebene Mindestabstand von Atomen unterschritten wird.
- CHIV/FLAT: Das chirale Volumen eines Atoms kann auf einen bestimmten Wert gesetzt. Wird dieser Wert auf 0 gesetzt, verfeinert man effektiv vier Atome in einer Ebene. FLAT funktioniert nach dem selben Algorithmus, es können aber beliebig viele Atome als *planar restrained* werden.
- SIMU: Innerhalb einer vorgegebenen Umgebung eines Atoms werden die isotropen und anisotropen Auslenkungsparameter einander angeglichen.
- DELU: Die anisotropen Auslenkungsparameter entlang einer Bindung, bzw. entlang dem Vektor einer 1,3-Bindung werden einander angeglichen.^[56-58]
- ISOR: Die anisotropen Auslenkungsparameter werden auf ein eher isotropes Verhalten verfeinert. Dieser *restraint* eignet sich besonders für nicht kovalent gebundenes Lösungsmittel wie Wasser. ISOR muß aber mit einer großen Standardabweichung versehen

werden, da gerade Lösungsmittel in Wirklichkeit oft sehr anisotrope Auslenkungsparameter aufweisen.

Für alle Wassermoleküle wurden automatisch *antibumping restraints* erzeugt, diese tragen für die Einhaltung eines Mindestabstandes Sorge.

Bei keiner Struktur, außer den mit MAD und SAS gelösten war es allein aus den Daten möglich, die absolute Struktur zu bestimmen.^[59,60]

2.1.1. Medizinischer Hintergrund

Die Glycopeptid-Antibiotika greifen in die Zellwandbiosynthese von Bakterien ein^[61,62]. Sie zeigen antibakterielle Aktivität gegen Gram-positive Mikroorganismen, einschließlich der wichtigen Krankheitserreger wie *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, zahlreiche *Streptococci*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile* u.v.m. Gegen Gram-negative Mikroorganismen zeigen die Glycopeptide so gut wie keine antibakterielle Aktivität, weil diese eine intakte äußere Membran besitzen. Eine Passage dieser Membran erfolgt in der Regel lediglich durch die Poren von Membranproteinen.

Die Wirkungsweise der Glycopeptid-Antibiotika wird folgendermaßen erklärt: Das Makromolekül, aus welchem sich die Zellwand zusammensetzt, heißt Peptidoglykan. Es besteht aus linearen Polysaccharidketten, die durch Peptide quervernetzt sind. Diese Pentapeptideinheiten der Sequenz D-Ala-D-Ala-Lys-D-γGlu-Ala werden durch einen Lysin-ε-NH₂-Angriff an das D-Ala-D-Ala-Ende eines benachbarten Stranges verknüpft, wobei ein Molekül D-Ala-D-Ala freigesetzt wird. (siehe Abb. 5)

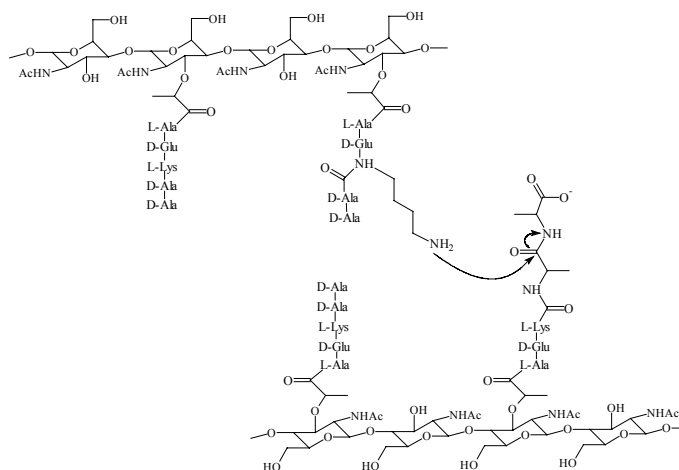


Abb. 5: Quervernetzung der Bakterienzellwand

Die Glycopeptid-Antibiotika binden mit einer hohen Affinität an die D-Ala-D-Ala-Sequenz dieser Pentapeptide und inhibieren die Quervernetzung der Polysaccharidstränge.

Penicillin war bis in die frühen 50er Jahre das meist verwendete Antibiotikum gegen *staphylococcale* Infekte^[63,64]. Seit seinem Einsatz sind die Bakterienstämme in der Lage ein Enzym, β -Lactamase zu produzieren, das Penicillin hydrolysiert. Die einzigen bekannten Alternativen stellten Erythromycin und Tetracyclin dar, gegen die aber ebenfalls eine steigende Zahl an Resistenzen zu beobachten war. 1956 wurde das erste Glycopeptid-Antibiotikum in einer Bodenprobe aus Borneo entdeckt^[65]. Es zeigte gegen alle Arten von *Staphylococcus* sowie gegen viele Gram-positiven Bakterien antibakterielle Aktivität. Diese Verbindung bekam den Namen Vancomycin.

1958 wurde Vancomycin erstmals klinisch eingesetzt, aber schon 1960 durch die Einführung von Methicillin, einem halbsynthetischen, *antistaphylococcalen* Penicillinderivat verdrängt. Gründe hierfür waren die aufgrund seiner Verdaulichkeit notwendige intravenösen Zufuhr sowie die gegenüber Penicillin erhöhten Herstellungskosten^[66-71]. Es fand allerdings Anwendung bei Patienten mit Penicillin-Allergien sowie als Reserveantibiotikum in der Intensivmedizin. Seit Anfang der 80er Jahre Methicillin resistente Bakterienstämme (MRSA) aufkamen, war Vancomycin das Mittel der Wahl, um Infektionen mit diesen Bakterienstämmen zu behandeln. Aber auch gegen das Vancomycin sind Bakterienstämme entstanden. Das *National Nosocomial Infections Surveillance System* berichtet z.B., daß in den USA in den Jahren von 1989 bis 1993 die Zahl der gegen das Vancomycin resistenten *enterococcalen* Bakterien von 0,3% auf 7,9% angestiegen ist.^[72,73]

Ein Mechanismus der Resistenzentwicklung der Bakterien gegen das Vancomycin ist vor allem von der Arbeitsgruppe um C. Walsh untersucht worden^[74-79]. Resistente Bakterien besitzen ein Gen (Van S), welches für ein Protein kodiert, das die Anwesenheit des Antibiotikums detektiert, ein entsprechendes Signal aussendet und dadurch ein Regulationsprotein aktiviert. Ein weiteres Gen (Van R) löst die Transkription von anderen Proteinen aus (Van H, Van A, Van X), was letztendlich zu der Synthese eines Depsipeptids D-Alanin-D-Lactat (Abb. 6) führt, welches an die Stelle von D-Ala-D-Ala in die Zellwand eingebaut wird.

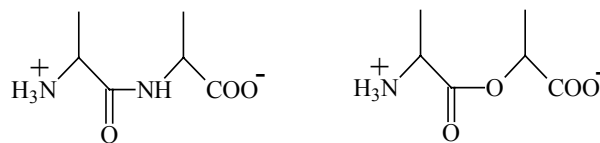


Abb. 6: D-Alanin-D-Alanin vs. D-Alanin-D-Lactat

D.H. Williams und Mitarbeiter sowie andere Arbeitsgruppen konnten mit Hilfe von spektroskopischen Untersuchungen zeigen, daß das Vancomycin und verwandte Antibiotika eine Bindungstasche besitzen, durch die die D-Ala-D-Ala-Sequenz des Pentapeptids selektiv gebunden wird^[80-88]. Dabei werden fünf Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Antibiotikum und dem D-Ala-D-Ala ausgebildet (siehe Abb. 6). Im D-Lactat ersetzt der Sauerstoff die Amingruppe

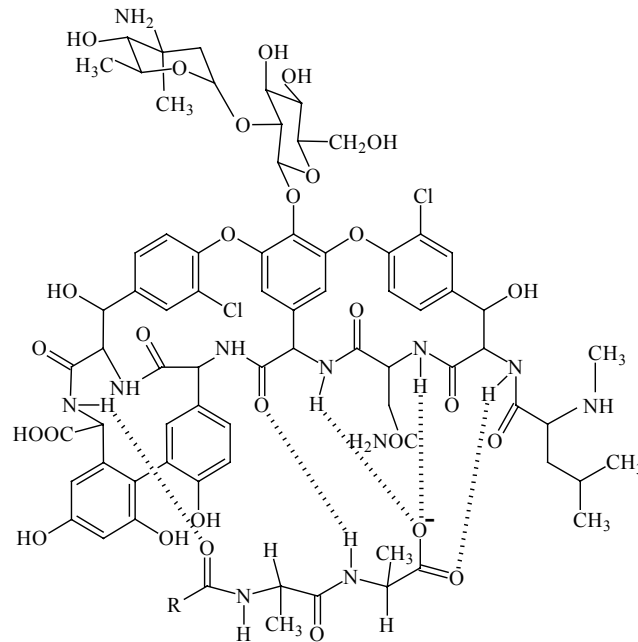


Abb. 7: Bindung zwischen Vancomycins und Zellwandpeptid

des D-Alanins; dieser kann keine Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylgruppe des Antibiotikums ausbilden.

3. Strukturen

3.1. Balhimycine

3.1.1. Allgemeiner Aufbau

Die Antibiotika vom Vancomycintyp leiten sich von einem Heptapeptidgrundgerüst ab, das durch einen großen Anteil an Arylglycinen auffällt. Dieses Grundgerüst ist je nach Antibiotikum mit unterschiedlichen Sacchariden und anderen Gruppen derivatisiert.

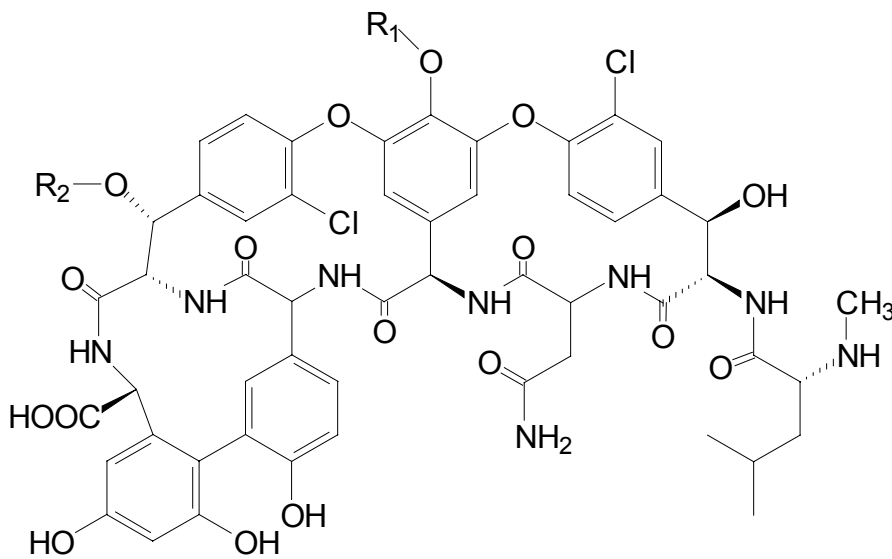


Abb. 8: Das Glycopeptid Grundgerüst

Tabelle 1: Substituenten der verwendeten Glycopeptide

	R1	R2
Deglucobalhimycin ^[100]	H	4-Oxovancosaminyll
Balhimycin ^[100]	Glucosyl	4-Oxovancosaminyll
Decaplanin ^[101]	Rhamnosyl-glucosyl	α -L-4-epi-vancosamyl

R1 und R2 stehen je nach Verbindung für verschiedene Zuckermoleküle oder Wasserstoffatome (siehe Tabelle 1). Im Falle des Decaplanins ist nur das Chloratom Cl1 (siehe Abb. 9) vorhanden. Bei der Bestimmung der Peptidsequenz, stößt man auf das Problem, entscheiden zu müssen, welche Atome und Atomgruppen welcher Aminosäure zuzuordnen sind. Es hat sich aus diesem Grund durchgesetzt, das Vancomycingerüst als ganzes in der PDB^[89] zu hinterlegen. Dabei finden folgende Atomnummern Verwendung:

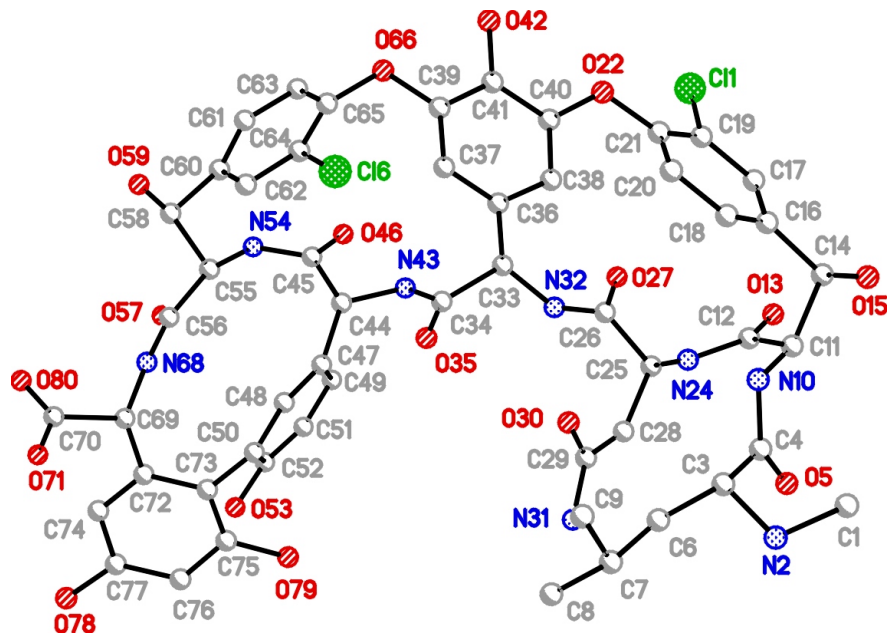


Abb. 9: Numerierung der Atome bei den Glycopeptiden

Grundsätzlich wäre eine Benennung der Aminosäuren nach ihrem biologisch-historischen Aufbau möglich. Um eine einfache Handhabung und Vergleichbarkeit mit den bereits vorhandenen Strukturen zu gewährleisten, soll aber davon abgesehen werden und analog den in der PDB^[89] vorhandenen Strukturen verfahren werden.

3.1.1. Peptidkomplexe

Es hat sich als nicht als zweckmäßig erwiesen, Vancomycin selbst als Zielstruktur für die Komplexierung mit Zellwandpeptiden zu wählen. Hier sind hauptsächlich zwei Gründe zu nennen:

1. Vancomycin weist mehr, flexible Zuckersubstituenten auf, welche aufgrund ihrer Flexibilität das Kristallisationsverhalten verschlechtern.
2. Vancomycin liegt als Hydrochlorid vor, was eine Neutralisation bedingt hätte und die Anzahl an Substanzen bzw. Verunreinigungen während der Kristallisation erhöht hätte. Bei den Decaplaninstrukturen wird gezeigt, daß das Cl⁻-Anion mit möglichen anderen Substraten um die Bindungstasche konkurriert.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Aufklärung von acht unterschiedlichen Glycopeptidstrukturen vom Vancomycintyp. Es kamen unterschiedliche Glycopeptide, Substrate und Kristallisationsbedingungen zur Anwendung. Der größte Teil der Strukturen wurde bis zu atomarer Auflösung, hier unter 1 Å, bestimmt. Es wurden unterschiedliche Methoden zur Strukturlösung verwendet.

Eine ähnlich große Zahl an verwandten Strukturen findet sich in der PDB^[99] und der CSD^[98]. Vergleicht man diese Strukturen untereinander unter Verwendung von Differenzdistanzmatrizen^[99], so kann festgestellt werden, daß diese sich je nach Kristallform und Substraten stark unterscheiden. Hierbei kann kein größerer Bereich des Moleküls ausgemacht werden, der in allen Strukturen innerhalb der durch die esds vorgegebenen Fehlergrenzen unverändert vorliegt. Es läßt sich also sagen, daß das Molekülgerüst der Glycopeptidantibiotika sehr flexibel ist. Dieser Befund läßt sich auch anhand der gemessenen B-Werte der Atome stützen. Eine farbkoodierte Darstellung der B-Werte des Decaplanins in der P2₁-Form zeigt, wie die Beweglichkeit der peripheren Atome zunimmt. Eine Darstellung dieser Struktur ist besonders zweckmäßig, da sie Struktur bei atomarer Auflösung geringe esds aufweist und mit einer relativ großen Anzahl an Zuckersubstituenten dem Vancomycin am ähnlichsten ist.

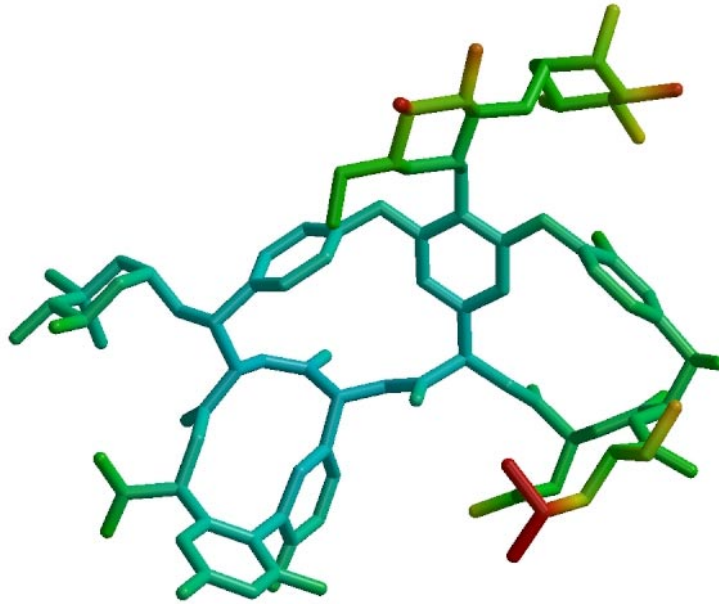


Abb. 10: B-Werte des Decaplanin (3.2.1.)

Die B-Werte sind so codiert, daß sich ein Farbverlauf von dunkelblau für $B = 0 \text{ \AA}^2$ über grün zu rot mit $B = 20 \text{ \AA}^2$ ergibt.

Auffällig ist die Beweglichkeit der gesamten rechten Domäne in Abb. 10, die die äußerst flexible Isobutylgruppe (C6 – C9) enthält. Dieser Teil des Moleküls hat den größten Anteil an der Komplexbildung mit dem Zellwandpeptid. Es wird bei den entsprechenden Strukturen beschrieben werden, wie eine Komplexierung die Beweglichkeit dieser Gruppe verringert und so zu einer Verbesserung der Kristallbildung führt.

Um nun die bekannten Strukturen miteinander vergleichen zu können, wurde ein in allen Strukturen invarianter Bereich ausgewählt. Es handelt sich hierbei um den zentralen Aromaten, der sich aus C36 bis C41 aufbaut sowie der drei an ihn gebundenen Sauerstoffatome O22, O42 und O66. Alle konformativen Änderungen im Molekül sollen bezüglich dieses Kerns diskutiert werden.

Die Kristallisation der Peptidkomplexe basiert in allen Fällen auf dem gleichen Prinzip. Es wurde davon ausgegangen, daß der C-Terminus der Zellwandpeptide im neutralen bis alkalischen Milieu deprotoniert vorliegt, und so Wasserstoffbrücken zu den Amidprotonen des Peptidgerüsts ausbilden kann. Diesbezüglich zeigte sich, daß beim Versetzen einer äquimolaren Lösung von Deglucobalhimycin und D-Ala-D-Ala mit 0.1 M Natriumcitrat Lösung ein voluminöser weißer Niederschlag ausfällt.

Dieses Verhalten wurde als erheblich geringere Löslichkeit des D-Ala-D-Ala-Komplexes gegenüber dem Citratkomplex interpretiert. Der Citratkomplex weist durch die höhere Anzahl an Carboxylatgruppen eine deutlich höhere Ladung auf, was seine Löslichkeit in Wasser erhöhen sollte. Wenn nun der Komplexligand im Überschuß eingesetzt wird, kann davon ausgegangen werden, daß nahezu ausschließlich der Peptidkomplex erhalten wird.

Dies ist aus der Sicht der Kristallogenie besonders wichtig, da sich Stoffgemische wie Verunreinigte Substanzen verhalten. So sind Fälle hochreiner Proteine bekannt, in denen Selbstaggregation eine Kristallisation vereitelte. Dieses Verhalten ist zwanglos über das chemische Potential einer Mischung im Vergleich zu dem eines reinen Stoffes zu beschreiben.

Kristalle des Citratkomplexes des Deglucobalhimycins konnten erhalten werden, wurden aber wegen unzureichender Qualität der Kristalle und des bereits bekannten Citratkomplexes des Balhimycins nicht weiter untersucht.

Versuche, nach dieser Methode einen Komplex mit D-Alanin herzustellen, scheiterten vermutlich an der reduzierten Affinität des D-Alanins zu den Glycopeptiden. Es läßt sich aber nicht ausschließen, daß solche Komplexe kristallisierbar sind. Hierbei ist auf Komplexe zwischen Vancomycin und schwach bindenden Komplexliganden zu verweisen, die über andere Wege der Kristallisation zugänglich sind.^[90]

Auf die Kristallisation des Tetrapeptidkomplexes wurde aus Kosten- und Zeitgründen verzichtet. Vermutlich ist dieser aber auf dem gleichen Weg zu erhalten.

Ausgangspunkt der Kristallisationsbemühungen waren die Kristallisationsbedingungen des reinen Deglucobalhimycins bzw. Balhimycins. Unter Variation dieser Bedingungen konnten alle hier beschriebenen Peptidkomplexe erhalten werden.

Es ist aus kristallographischer Sicht interessant, daß teilweise bei nur geringen Veränderungen an Substrat, Antibiotikum oder Zusammensetzung der Kristallisationslösung völlig unterschiedliche Kristallformen erhalten werden konnten. So änderte sich im Fall der beiden monoklinen Decaplaninformen (3.2.1. und 3.2.2.) lediglich die Packung der Dimere unter Erhalt der Raumgruppe $P2_1$. Beim Übergang vom Tripeptidkomplex zum Pentapeptidkomplex allerdings änderte sich der gesamte Kristallaufbau. Der Tripeptidkomplex kristallisiert in der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12$ mit acht Molekülen in der asymmetrischen Einheit. Im Falle des Pentapeptidkomplexes sind es drei Moleküle, die sich in der Raumgruppe $P3_121$ zusammenfinden. Später wird gezeigt, daß sich diese drastische Veränderung auf eine Änderung des pH-Werts zurückführen läßt.

Bei Untersuchungen an Proteinen wird sehr häufig ein einmal etabliertes Kristallisationssystem für sehr viele Strukturen verwendet. Indem relativ kleine Veränderungen an Substrat oder Aminosäuresequenz des Proteins vorgenommen werden, können strukturelle Aussagen unter Erhalt von Raumgruppe und Kristallpackung gewonnen werden. Dies vereinfacht das Arbeiten an solchen Systemen erheblich, da ein großer Teil des Aufwandes beim Anfertigen solcher Kristallstrukturen in das Aufsuchen von Kristallisationsbedingungen, das Lösen des Phasenproblems und in das Verfeinern der Struktur fließt. Bei der skizzierten Arbeitsweise an Proteinen müssen häufig lediglich geringe Teile der Struktur verfeinert werden. Dies führt dazu, daß kombinatorische Untersuchungen mit einem sehr hohen Durchsatz von Strukturinformation pro Zeiteinheit möglich werden.

Ein weiteres Problem bei der Untersuchung dieser Komplexe ist es, Veränderungen am Antibiotikum selbst vorzunehmen. Anders als bei vielen Proteinsystemen reicht es nicht, die Aminosäuresequenz zu verändern, da die Verknüpfung der Arylglycine nur unter Beteiligung einer relativ großen Anzahl von Enzymen zu bewerkstelligen ist. Die Ausbeuten, die durch Methoden der präparativen^[91] organischen Chemie erhalten werden, machen eine Kristallisation unwahrscheinlich, einen medizinischen Einsatz in größerem Rahmen unmöglich. Will man Glycopeptide modifizieren, so geht man in der Regel so vor, daß die nativen, biologisch gewonnenen Antibiotika nachträglich mit Methoden der organischen Synthese derivatisiert werden. Dies schränkt die Möglichkeiten, "maßgeschneiderte" Antibiotika zu erzeugen, erheblich ein.

3.1.2. Dipeptidkomplexe

Es wurden Deglucobalhimycin und Balhimycin im Komplex mit D-Ala-D-Ala kristallisiert.

3.1.2.1. Deglucobalhimycin im Komplex mit D-Ala-D-Ala

a) Kristallisation

Eine nach dem zuvor beschriebenen Verfahren hergestellte Lösung des Komplexes zwischen Deglucobalhimycin und D-Ala-D-Ala wurde nach der *hanging-drop*-Methode zur Kristallisation gebracht. Hierbei enthielt die Stammlösung 0.1 M NaAc-Puffer (pH 4.0), 0.2 M NaCit und 30 % 1,2-Propandiol.

Man lasse sich nicht durch den angegebenen pH-Wert irritieren, der durch die Zugabe von NaCit resultierende pH-Wert liegt deutlich über dem genannten Wert von pH 4.

Es ist in diesem Zusammenhang auch zu erwähnen, daß die Glycopeptide als multifunktionale organische Moleküle Amphotere sind und in den vorliegenden Proben als Citrat oder Acetat und wahrscheinlich auch mit Hydrochlorid verunreinigt vorlagen. Dies führt dazu, daß der pH-Wert bei solchen Kristallisationsexperimenten nur anhand einer Messung zu bestimmen ist und sich u.U. während der Kristallisation ändern kann. Dies gilt auch für die durch die Firma Hampton Research^[105] hergestellten Kristallisationslösungen. Es ist unter anderem diesem Sachverhalt zu verdanken, daß publizierte Kristallisationsbedingungen häufig nicht einfach reproduzierbar sind. Eine erfolgversprechende Vorgehensweise bei der Reproduktion von Kristallisationsbedingungen ist es, nicht nur exakt die angegebene Vorschrift zu befolgen, sondern die Konzentrationen der einzusetzenden Substanzen, sowie den pH-Wert um diese Originalbedingungen zu variieren.

Die o.g. Kristallisationsbedingungen sind diejenigen, die zu dem Kristall führten, der die vorliegenden Daten lieferte. Es wurden isometrische, hexagonale Prismen erhalten, die Größen bis über 1 mm aufwiesen. Diese Kristalle konnten über weite Bereiche der Citratkonzentration, des pH-Werts und der Konzentration an 1,2-Propandiol erhalten werden. Auch das reine Deglucobalhimycin kristallisiert unter den hier genannten Bedingungen. Die Kristalle waren aber wesentlich kleiner und zeigten eine hohe bis extrem hohe Mosaizität (mehrere Grad) sowie über einen großen Teil des o.g. Spektrums an Kristallisationsbedingungen erhebliche Verwachsungen und Risse.

b) Datensammlung

Die in der Mutterlösung vorhandene Konzentration von 1,2-Propandiol reichte als Kryoprotektand aus, um einen Kristall mit den Kantenlängen 0,3 mm x 0,3 mm x 0,3 mm im Stickstoffstrom eines Oxford Cryostreams^[92] bei einer Temperatur von 100 K zu frieren.

An der Beamline X11 am EMBL c/o DESY^[93] konnte ein nahezu vollständiger Datensatz gesammelt werden. Hierzu wurde die Datensammlung in drei Auflösungsbereiche unterteilt. Die äußersten Daten konnten aufgrund der Beamlinekonstruktion lediglich bis 0.89 Å gesammelt werden. Anhand des $\langle I/\sigma \rangle$ (siehe Tabelle 2) in der letzten Auflösungsschale läßt sich aber ersehen, daß eine Datensammlung zu signifikant höherer Auflösung möglich gewesen wäre.

Bei der Sammlung der innersten Daten wurde der Röntgenstrahl mittels handelsüblicher Aluminiumfolie abgeschwächt, um eine Sättigung des Zählers durch die intensivsten Reflexe zu vermeiden. Dies ist nötig, da die Schrittmotoren des φ -Kreises bei höheren Geschwindigkeiten Ungenauigkeiten aufweisen und im Dauerbetrieb mit $\Delta\varphi > 1^\circ / \text{min}$ überhitzen können.

Es kam ein Mar345 IP in verschiedenen Betriebsmodi zur Anwendung. Die diesbezüglichen Spezifikationen sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Es ist möglich, die belichteten IPs mit verschiedenen Auflösungen auszulesen. Hierbei wird der Zähler mittels einer Lochmaske in quadratische Bereiche unterteilt, die den Pixeln eines CCD-Zählers ähnlich sind. Es wurde bei allen hier behandelten Strukturen eine Lochmaske der Größe 150 μm verwendet. Kleinere Lochmasken sind bei sehr kleinen Reflexen einzusetzen, um eine adäquate Verfeinerung der Reflexprofile zu erhalten.

Tabelle 2: Datensammlung Deglucobalhimycin

	hohe Aufl.	mittlere Aufl.	niedrige Aufl.
Auflösung [Å]	3.00 - 0.89	6.00 – 2.00	29.96 – 2.45
Detektordurchmesser [mm]	345	180	180
Detektorabstand [cm]	95	100	230
Scanwinkel [°]	0.5	1.0	2.0
Frames / Gesamtwinkel [°]	268 / 134	127 / 127	50 / 100

Die Daten der drei Auflösungsbereiche wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK^[94] hexagonal integriert und skaliert. Bei den beiden hochaufgelösten Datensätzen wurden Reflexe, die den Zähler sättigten, verworfen.

In diesem, sowie im Falle aller bis zu höherer Auflösungen als 1 Å gemessenen Datensätze weisen die äußersten Reflexe stark in die Länge gezogene Profile auf. Der Grund hierfür ist in der Geometrie des Einkreis-Diffraktometers zu suchen, die zu streifendem Einfall der Reflexe hoher Beugungsordnung auf den Zähler führt. Es können zwar mit der oben genannten Datenreduktionssoftware elliptische Reflexprofile definiert werden, diese haben aber invariante Halbachsen. Bei streifendem Einfall liegen nur in erster Näherung elliptische Reflexprofile vor und die Lage ihrer Halbachsen ist eine Funktion der Position auf dem Detektor. Dieses Problem wurde durch die Wahl überhöhter Werte für die in DENZO angenommenen Reflexgrößen mit den Befehlen SPOT oder SPOT ELLIPTICAL behandelt. Diese Vorgehensweise hat den Nachteil, daß ein größerer Anteil an Untergrund dem Signal zugeschlagen wird.

Es wurden mit SCALEPACK die Zellkanten a und c sowie die Mosaizität des gesamten Kristalls verfeinert. Die so erhaltene Mosaizität wurde mit 1.1 multipliziert und in einer zweiten endgültigen Integration als angenommene Mosaizität vorgegeben. Der Faktor 1.1 ist eine Erfahrungsgröße.

Eine Anpassung der aus χ^2 -Tests über verschiedene Auflösungsbereiche und für die gesamte Datenmenge erhaltenen Fehlerschemata wurde folgendermaßen vorgenommen:

Zuerst wurde der für die gesamte Datenmenge angenommene Fehler verfeinert, im Anschluß die Fehler über verschiedene Auflösungsbereiche. Besonders bei den Daten der hohen Auflösung neigt diese Methode zum "Überfitten". Das heißt, daß bei einer Erhöhung des angenommenen Fehlers der χ^2 -Wert steigt und umgekehrt. Sollte dies geschehen, so sind die Einzelwerte wieder auf den von den Programmautoren angegebenen Startwert zurückzusetzen und es ist erneut bei der Verfeinerung des Gesamtfehlers über alle Daten zu beginnen. Werden die Einzelfehler so gewählt, daß sie dem Gesamtfehler ähnlich sind, sind die Verfeinerungen stabiler und weniger zeitaufwendig.

Die drei einzelnen Datensätze wurden mit dem Programm XPREP^[96] gemischt und isotrop skaliert. Hierbei wurden die hochaufgelösten Daten als Referenz verwendet. Es wurden alle Intensitäten mit dem Faktor

$$K \cdot \exp [B (\sin\theta/\lambda)^2] \quad (14)$$

multipliziert.

Anschließend wurde in XPREP eine erneute Normalisierung der Intensitätsunsicherheit σ vorgenommen. Fünf Prozent der erhaltenen Daten wurden zur Berechnung des freien R-Wertes separiert. Die Auswahl der Reflexe für R_{free} wurde in dünnen Schalen vorgenommen.

Tabelle 3: Kristallographische Daten zu Deglucobalhimycin

Zellmetrik / Raumgruppe	Hexagonal / $P6_3$
Zelldimensionen	$a = 48.424 (0.007), c = 42.807 (0.009)$
Auflösung min / max [Å]	29.96 / 0.89
Wellenlänge [Å]	0,9076
R_{merge} [%]	2.42
Vollständigkeit % ($P6_3$)	97.9
$\langle I/\sigma \rangle / \langle I/\sigma \rangle$ (0.90 Å - 0.89 Å)	29.96 / 10.61
Daten _{gesamt} / Daten für R_{free}	84043 / 4169
R_{work} [%]	9.28
R_{free} [%]	10.98

Bei Datensammlungen an Diffraktometern mit Einkreisgeometrien ist ein besonderes Augenmerk auf die Kristallorientierung zu legen. Sollte ein Kristall in Richtung seiner Raumgruppenachsen orientiert sein, so ist es ohne eine Umorientierung, nicht möglich einen kompletten Datensatz zu erhalten. Dieser Effekt der sogenannten *blind-region*, tritt besonders bei hoher Auflösung auf. Der hier vorliegende Datensatz wies einige fehlende Reflexe bei sehr hoher Auflösung auf, was auf dieses Phänomen zurückzuführen ist. Es ist prinzipiell möglich, diese Daten aus einer anderen Messung mit den vorhandenen zu mischen und zu skalieren. Auf diese Vorgehensweise wurde aber verzichtet, da sonst die Daten zweier Kristalle, die möglicherweise nicht vollständig isomorph sind und bei nicht identischen Wellenlängen gemessen wurden zur Mischung gekommen wären. Außerdem sind die vorhandenen Daten sowohl im Bezug auf die Menge als auch auf die Qualität zur Strukturbestimmung ausreichend. Das Aussehen der *blind-region* in Abb. 11 an den Daten der reziproken Gitterebene $h = 0$ zu ersehen. In dieser Abbildung markieren die beiden Ringe die Auflösungsgrenzen von 1.5 bzw. 1 Å.

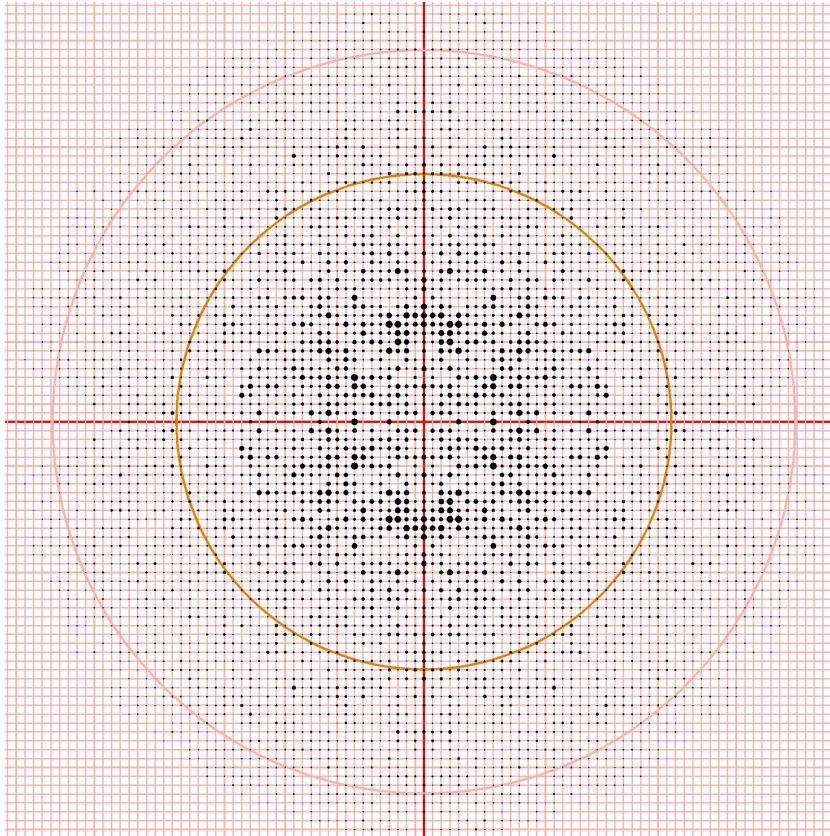


Abb. 11: Reziproker Ebenenschnitt der Deglucobalhyomicindaten bei $h = 0$

c) Strukturlösung

Die Strukturlösung wurde von Prof. G. M. Sheldrick mit Direkten Methoden in der Raumgruppe $P6_322$ vorgenommen. Hierbei kam eine nicht distribuierte Version des Programms SHELXD^[102] zur Anwendung. Die Lösung zeigte zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit auf. Beide Bindungstaschen waren mit vollständig lokalisierten D-Ala-D-Ala-Molekülen besetzt. Des Weiteren befand sich in der Lösung ein Molekül 1,2-Propandiol sowie einige Wassermoleküle bzw. Natriumkationen.

d) Verfeinerung

In einer ersten Verfeinerung wurde in $P6_322$ bis zu einem R_{work} von 10.81 % und einem R_{free} von 12.77 % verfeinert. Hierbei ist sowohl die Größe der R-Werte als auch die Differenz zwischen R_{work} und R_{free} für eine Struktur mit weniger als 500 Atomen bei einer Auflösung von unter 1 Å und einem sehr guten Verhältnis von I zu σ unverdächtig.

Die Struktur wies aber eine Fehlordnung auf, die sich mit fortschreitender Verfeinerung auf das Ringgerüst eines der beiden Moleküle ausweitete. Eine Fehlordnung größerer Teile des Moleküls ist chemisch nicht sinnvoll.

Es konnten keine der üblichen Warnzeichen einer Verzwilligung gefunden werden. Der Mittelwert von $|E^*(E-1)|$ war mit 0.753 unauffällig und auch der R_{int} in den beiden Raumgruppen ($P6_3$ und $P6_322$) wies eine Differenz von lediglich 0.01 % auf. Da die Raumgruppen der höheren hexagonalen Lauegruppe dafür bekannt sind, häufig meroedrisch verzwilligt zu sein und das Glycopeptid-Homodimer (siehe Abb. 13) eine zweizählige Eigensymmetrie aufweist, wurde entschieden, eine Verfeinerung in $P6_3$ unter Annahme einer Verzwilligung in $P6_322$ zu testen. Die Matrix der Verzwilligung über die zweizählige kristallographische Achse lautet:

$$\begin{pmatrix} 0 & +1 & 0 \\ +1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}$$

Es konnte problemlos in $P6_3$ verfeinert werden, wobei die zweizählige Achse über weite Bereiche der asymmetrischen Einheit erhalten blieb.

Eine Fehlordnung wie in der $P6_322$ -Verfeinerung wurde in $P6_3$ nicht gefunden. Diese Tatsache, sowie die niedrigeren Absolutwerte, als auch Differenz der FOMs ($R_{\text{work}} = 9.28\%$, $R_{\text{free}} = 10.98\%$) sind Argumente für das Vorliegen einer Verzwilligung. Das Verhältnis der beiden Zwillingdomänen zueinander wurde mit 0.500 (0.001) bestimmt. Es soll an dieser Stelle noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass keiner der oben genannten Zahlenwerte einen zwingenden Beweis für eine Verzwilligung darstellt. Einzig das Verschwinden besagter Fehlordnung ist nur mit einer meroedrischen Verzwilligung über die zweizählige Achse der Dimerie zu erklären.

e) Strukturbeschreibung

Der Dipeptidkomplex von Deglucobalhimycin weist in $P6_3$ vier Moleküle in der asymmetrischen Einheit auf. Die Bindungstaschen der Glycopeptide sind mit jeweils einem Molekül D-Ala-D-Ala besetzt. Es konnten keine Hinweise für eine Teilbesetzung von D-Ala-D-Ala gefunden werden.

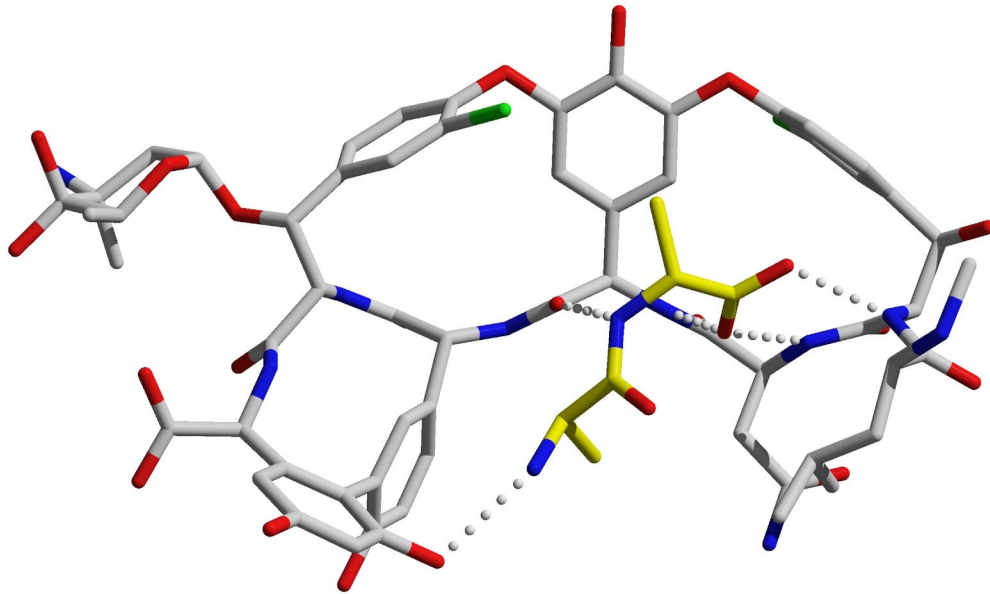


Abb. 12: Deglucobalhimicin im Komplex mit D-Ala-D-Ala

Die Carboxylatgruppe am C-Terminus des Dipeptids bildet drei Wasserstoffbrückenbindungen mit den Amidprotonen von N10, N24 und N32 aus. In allen drei Fällen stellen die Amidstickstoffatome Wasserstoffdonoren dar. Eine weitere Wasserstoffbrücke ist zwischen dem Amidproton des C-Terminus des Dipeptids und dem Carbonylsauerstoff O35 aufzufinden. Bis zu diesem Punkt entspricht dieser Dipeptidkomplex den Erwartungen, die sich aus den vorausgegangenen Untersuchungen ergaben. Da das Dipeptid am N-Terminus nicht mit einer Schutzgruppe versehen ist, kann eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen dem Stickstoff des N-Terminus und dem Phenolatsauerstoff O79 auftreten.

Ob ein solcher Komplex auch in biologischen Systemen von Bedeutung ist, kann anhand der vorliegenden Daten nicht geklärt werden. Es wären in diesem Fall *in vivo*-Untersuchungen an den entsprechenden Bakterienstämmen notwendig. Es soll hier aber ausdrücklich auf die vermutlich große Komplexbildungskonstante des sowie auf die Tatsache, daß D-Ala-D-Ala während des Zellwandaufbaus tatsächlich als Dipeptid vorliegt, hingewiesen werden. Des Weiteren kann auch eine Spaltungsreaktion des Pentapeptids unter Einwirkung eines als sauer anzusprechenden phenolischen Protons von O79 nicht ausgeschlossen werden.

Die Moleküle bilden die für Glycopeptide vom Vancomycintyp typischen Homodimere (siehe Abb. 13) aus.

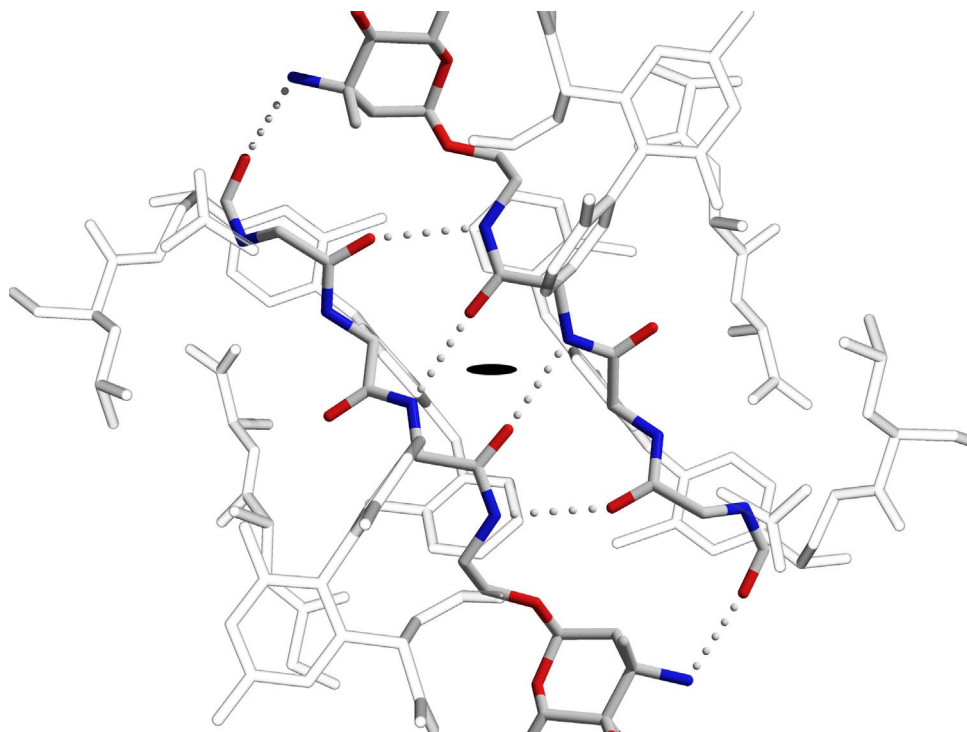


Abb. 13: Aufbau der Glycopeptidhomodimere

Im Falle des Balhimycins und des Deglucobalhimycins kommt es wegen des vorhandenen 4-Oxovancosaminy-Substituenten zur Ausbildung von sechs Wasserstoffbrückenbindungen. Daran sind die folgenden Atome in der Reihenfolge Donor-Akzeptor beteiligt: N54-O27, N43-O46 und N8'-O13 des Zuckers (Tabelle 1). Die zweizählige NCS ist in Abb. 13 durch eine schwarze Ellipse symbolisiert.

Außerdem befinden sich zwei Natriumkationen auf speziellen Lagen ($1/3, 2/3, 0.89452$ und $1/3, 2/3, 0.60679$). Diese werden oktaedrisch von jeweils drei 1,2-Propandiolen koordiniert. Zwei weitere Natriumkationen werden durch Stickstoffatome des Deglucobalhimycins koordiniert. Ein speziell liegendes 1,2-Propandiol konnte auf drei Lagen fehlgeordnet verfeinert werden. Es wurden die Sauerstoffatome von 104 Wassermolekülen gefunden. Diese weisen U-Werte bis zu 0.6 \AA^2 auf. Der U- und der B-Wert lassen sich folgendermaßen ineinander umrechnen:

$$B = 8\pi^2 U. \quad (15)$$

3.1.2.2. Balhimycin im Komplex mit D-Ala-D-Ala

a) Kristallisation

Eine nach eingangs genanntem Verfahren hergestellte Lösung des Komplexes zwischen Balhimycin und D-Ala-D-Ala wurde nach der *sitting-drop*-Methode zur Kristallisation gebracht. Die Stammlösung enthielt 0.1 M NaCit-Puffer (pH = 4.0), 0.1 M NaCit und 25 % MPD. Es konnten isometrische, monokline Kristalle erhalten werden, welche Kantenlängen bis zu 0.5 mm aufwiesen.

Es sei an dieser Stelle darauf verwiesen, daß natives Balhimycin unter ähnlichen Bedingungen in $P2_1$ und mit ähnlichen Zellvolumen ($a = 20.48 \text{ \AA}$, $b = 43.93 \text{ \AA}$, $c = 27.75 \text{ \AA}$, $\beta = 100.5^\circ$) kristallisiert. Diese Kristallisation wurde von Dr. Martina Schäfer aus 0.1 M HEPES (pH = 7.0), 0.1 M NaCit und 25 % MPD durchgeführt.^[95] Die erhaltenen Kristalle waren sehr dünne Plättchen mit Kantenlängen von unter 10 μm in ihrer kleinsten Dimension. Die Komplexierung mit D-Ala-D-Ala führte zu einer erheblichen Verbesserung der Kristallqualität. Dieser Befund wird durch die nun vorliegenden Strukturinformationen gestützt. So ist die Tatsache, daß die Glycopeptide häufig mit mehreren Molekülen in der asymmetrischen Einheit kristallisieren unter anderem durch das bewegliche Molekülgerüst zu erklären. Durch die Komplexierung wird dieses Molekülgerüst mit einer relativ großen Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen fixiert. (siehe Abb. 12) Die so in ihrer Beweglichkeit eingeschränkten Moleküle können leichter geordnete Aggregate bilden.

b) Datensammlung

Die in der Mutterlösung enthaltene Konzentration von MPD reichte als Kryopuffer aus, um einen Kristall mit Kantenlängen von 0.25 mm x 0.25 mm x 0.20 mm im Stickstoffstrom bei 100 K zu frieren.

An der Beamline X11 am EMBL c/o DESY^[93] wurde ein bis ein \AA „vollständiger“ Datensatz aufgenommen. Hierbei wurde die Datensammlung in drei Auflösungsbereiche unterteilt. Bei der Sammlung der Daten niedriger Beugungsordnung wurde der Strahl mittels handelsüblicher Aluminiumfolie abgeschwächt, um eine Sättigung des Zählers durch die intensivsten Reflexe zu verhindern.

Es wurde ein Mar345 Flächenzähler in verschiedenen Betriebsmodi verwendet. Aufgrund der kleinen Zellkanten von bis zu 44.37 \AA und einer Mosaizität von weniger als 0.3° konnte bei jeder

Aufnahme um einen relativ hohen Winkelbetrag in φ gedreht werden, ohne daß die einzelnen detektierten Reflexe einander überlappten. Einzelheiten sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 4: Datensammlung Balhimycin

	hohe Aufl.	mittlere Aufl.	niedrige Aufl.
Auflösung [Å]	2.30 - 0.88	7.00 – 1.38	27.91 – 3.00
Detektordurchmesser [mm]	345	300	180
Detektorabstand [cm]	95	190	285
Scanwinkel [°]	2.0	3.0	4.0
Frames / Gesamtwinkel [°]	99 / 198	44 / 132	59 / 236

Die einzelnen Datensätze wurden mit dem Programmen DENZO und SCALEPACK^[94] in der monoklinen Raumgruppe $P2_1$ integriert und skaliert. Reflexe, die den Zähler sättigten, wurden, um komplette Daten bei niedriger Auflösung zu erhalten, bei der Messung mit größtem Zählerabstand in die Skalierung einbezogen. Die drei einzelnen Datensätze wurden mit dem Programm XPREP^[96] gemischt und isotrop skaliert. Anschließend wurde in XPREP eine Normalisierung der Intensitätsfehler σ vorgenommen.

Bezüglich der genauen Modalitäten der Datenreduktion wurde wie in 3.1.2.2. verfahren.

Tabelle 5: Kristallographische Daten Balhimycin

Zellmetrik / Raumgruppe	Monoklin / $P2_1$
Zelldimensionen	$a = 22.68 (0.02)$, $b = 27.91 (0.04)$, $c = 44.37 (0.03)$, $\beta = 93.23^\circ (0.05)$
Auflösung [Å]	27.91 / 0.89
Wellenlänge [Å]	0. 9076
R_{merge} %	4.04
Vollständigkeit [%]	99.3
$\langle I/\sigma \rangle / \langle I/\sigma \rangle (1.00 \text{ \AA} - 0.89 \text{ \AA})$	27.68 / 17.68
Daten _{gesamt} / Daten für R_{free}	82392 / 4252
R_{work} [%]	8.22
R_{free} [%]	10.04

c) Strukturlösung

Die Strukturlösung wurde von Prof. G. M. Sheldrick mit Direkten Methoden in der Raumgruppe $P2_1$ mit einer nicht distribuierten Version des Programms SHELXD vorgenommen. In der asymmetrischen Einheit konnten vier Moleküle des Balhimycinkomplexes gefunden werden. Die Bindungstaschen waren mit vollständig lokalisierten D-Ala-D-Ala-Molekülen besetzt. Des Weiteren befanden sich einige Wassermoleküle in der Lösung.

Die im Verfeinerungsverlauf gefundenen, fehlgeordneten Citratanionen waren zum Teil in der Peakliste der Lösung vorhanden. Diese teilweise definierten Citratmoleküle sahen dem ebenfalls eingesetzten MPD sehr ähnlich. Zu Beginn der Verfeinerung wurde die Citratfehlordnung als MPD fehlinterpretiert. Das Aufdecken dieses Fehlers war mit einem größeren Zeitaufwand verbunden.

d) Verfeinerung

Durch die gute Qualität der Daten bei gleichzeitig hoher Auflösung werden besonders in dem vorliegenden Fall einer niedersymmetrischen Raumgruppe weitreichend strukturelle Details sichtbar.

Ausgehend von zwei Citratfehlordnungen schließt sich in dieser Struktur die Fehlordnung eines großen Teils der definierten Wassermoleküle an. Es läßt sich detailliert verfolgen, wie diese Fehlordnung über Wasserstoffbrückenbindungen kausal auf andere Citratanionen und auf die umgebenden Wassermoleküle übertragen wird. Je weiter die Wassermoleküle von der zentralen Fehlordnung entfernt sind, desto näher rücken die fehlgeordneten Lagen zusammen. Diese Fehlordnung überträgt sich glücklicherweise an keiner Stelle der Struktur auf die beiden Antibiotikadimere und ihre Substratmoleküle.

Eine anfängliche Verfeinerung der sehr gut definierten Citratfehlordnungen ergab Besetzungsfaktoren von 50 bzw. 60 % für die beiden Lagen. Für alle sich von diesen Fehlordnungen kausal ableitenden Unordnungen wurde ein Besetzungsfaktor von 50 % festgesetzt. Darüber hinaus konnten zwei schlecht lokalisierte MPD-Moleküle ausgemacht werden.

Es kamen verschiedene Restraints zur Anwendung. Für 1,2- und 1,3-Abstände wurden aus der bekannten Vancomycinstruktur^[90] erstellt. Aromaten und sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome

wurden mit FLAT und CHIV Restraints versehen. Der vierfachen NCS, die sich durch das Vorliegen von zwei Dimeren des Komplexes ergibt, wurde mittels einer SAME Anweisung Rechnung getragen. Die 1,4-Abstände der Moleküle wurden nicht mit einer NCSY-Anweisung einander angeglichen. SIMU und DELU wurden wie bei Proteinstrukturen üblich auf alle Kohlenstoff-, Sauerstoff- und Stickstoffatome angewendet.

In einem vorletzten Verfeinerungsschritt wurde bis zur Konstanz der Atompositionen gegen alle Daten inklusive der R_{free} -Reflexe verfeinert. Um diese Vorgehensweise zu rechtfertigen, kam es anschließend zu keinen weiteren Interpretationen der Elektronendichte und es wurde auf plötzliche starke Veränderungen verschiedener FOMs oder Atompositionen geachtet. Unten angegebene Werte für R_{work} und R_{free} beziehen sich auf den letzten Verfeinerungszyklus unter Separation von R_{free} -Reflexen. In einem finalen Verfeinerungszyklus wurden alle Restraints entfernt und *eine full-matrix-least-square*-Verfeinerung gegen alle Daten durchgeführt um *esds* zu erhalten, die nicht durch Restraints verfälscht sind. Am Ende der Verfeinerung wies R_{work} einen Wert von 8.22 % und R_{free} einen von 10.04 % auf.

e) Strukturbeschreibung

In der asymmetrischen Einheit befinden sich zwei Homodimere des Balhimycins. Ihre Bindungstaschen sind mit jeweils einem Molekül des Dipeptids besetzt. Wie im Falle des Deglucobalhimycins ist den Dipeptiden ein Besetzungsfaktor von eins zuzuschreiben. Die Bindungsmodalitäten sind denen des Deglucobalhimycins equivalent.

Des weiteren konnten fünf Citratanionen aufgefunden werden. Das Citratanion weist drei Carboxylatgruppen auf, die in ihrem chemischen Verhalten sehr ähnlich sind. Nur zwei dieser drei anionischen Gruppen sind stereochemisch equivalent.

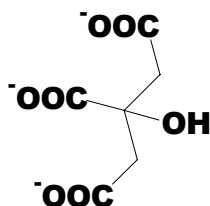


Abb. 14: Molekülformel des Citratianions

Dies führt dazu, daß Citrat auf verschiedene Arten Wasserstoffbrücken mittels seiner Carboxylatsauerstoffatome ausbilden kann. Liegt kein Peptidligand vor, so können die Carboxylatgrup-

pen des Citrats die Funktion des C-Terminus des Peptids übernehmen und so die Bindungsstelle des Antibiotikums besetzen. Da es unter diesen Umständen lediglich zur Ausbildung der drei Wasserstoffbrücken zu den Amidprotonendonatoren N10, N24 und N32 kommen kann und gleichzeitig die o.g. Fehlorderungen im Verhältnis 2:1 zu erwarten sind, ist das Citratanion in diesen Fällen nur schlecht definiert. Der hier beschriebene Sachverhalt tritt ebenfalls bei der Struktur des Tripeptidkomplexes (siehe 3.1.3.) in Erscheinung.

3.1.3. Balhimycin im Komplex mit D-Ala-D-Ala-Lys

a) Kristallisation

Eine nach oben genanntem Verfahren hergestellte Lösung des Dipeptidkomplexes wurde nach der *sitting-drop*-Methode unter ähnlichen Bedingungen wie im Falle des Dipeptidkomplexes von Balhimycin zur Kristallisation gebracht. Hierbei enthielt die Stammlösung 0.3 M NaCit-Puffer (pH = 4.0) und 25 % MPD. Es konnten isometrische, monokline Kristalle erhalten werden, die Kantenlängen bis 0.5 mm aufweisen.

b) Datensammlung und Strukturlösung

Die Struktur konnte auf Grund ihrer großen Zahl an Atomen in der asymmetrischen Einheit (ca. 900 Atome Nicht-Wasserstoffatome) über mehrere Jahre nicht gelöst werden. Schließlich wurde ein SAS-Experiment an einer rotierenden Anode mit Kupferstrahlung (1.5418 Å) vorgenommen, um die Positionen der zwei Chloratome pro Molekül anhand von anomaler Dispersion zu bestimmen.

i) SAS-Daten

Die in der Kristallisationslösung enthaltene Konzentration an MPD reichte als Kryopuffer aus, um einen Kristall (0.1 mm x 0.1 mm x 0.2 mm) im Stickstoffstrom bei 100 K zu frieren.

Da diese Struktur mit anomalen Daten, die auf einem SAS-Experiment basieren, gelöst wurde sollen die Datensammlung und die Strukturlösung zusammen besprochen werden.

An einer rotierenden Anode mit Kupferstrahlung wurden zwei vollständige Datensätze aufgenommen. Bei jedem einzelnen Datensatz wurde um volle 360 ° in φ gedreht. Der Startwinkel der zweiten Messung war gegenüber dem der ersten um 0.25 ° versetzt, um eine statistische Minimierung von Meßfehlern zu erreichen. Es wurde ein Mar345 IP im 345 mm Modus verwendet. Während der gesamten Messung warf die Düse der Tieftemperaturanlage einen Schatten auf den Zähler. Dieser Zählerbereich wurde mit einer Maske gekennzeichnet und bei der Datenreduktion nicht berücksichtigt. Da ein Teil der Reflexe bei niedriger Auflösung den Zähler sättigten wurden weitere 90 ° mit geringerer Belichtungszeit nachgesammelt.

Tabelle 6: Datensammlung Tripeptid, SAS

Detektordurchmesser [mm]	345
Detektorabstand [cm]	150
Scanwinkel [°]	1
Gesamtwinkel [°]	2 x 360

Aus den anomalen Differenzen konnte mit dem Programm SHELXD die Substruktur der Chloratome gefunden werden. Hierzu wurden folgende Befehle verwendet:

SHEL 99 2.5	Es wurden lediglich Daten bis zu einer Auflösung von 2.5 Å in die Strukturlösung einbezogen.
PATS 17	Mit einer Pattersonsuperposition sollten bis zu 17 Chlorpositionen gefunden werden (es war zu diesem Zeitpunkt unklar, wie viele Chloratome zu erwarten waren).
MIND 3.0	Gibt einen Mindestabstand von 3.0 Å für die Chloratome vor.
PLOP 15 20 25	<i>peak-list-optimization</i> der mit PATS gefundenen Atome über drei Zyklen.

Nach wenigen (ein bis zehn) Zyklen wurden von SHELXD Lösungen erzeugt. Nach dem 16. Atom weisen alle darauffolgenden negative Peakhöhen auf. Es konnte also von diesem Zeitpunkt an mit sehr großer Sicherheit davon ausgegangen werden, daß sechzehn Chloratome in der asymmetrischen Einheit vorhanden sind.

Tabelle 7: Kristallographische Daten Tripeptid, SAS

Zellmetrik / Raumgruppe	Orthorhombisch / P2 ₁ 2 ₁ 2
Zelldimensionen	a = 28.63 (0.03), b 88.95 = (0.09), c = 50.71 (0.05)
Auflösung [Å]	50.71 / 1.90
Wellenlänge [Å]	1.5418
R _{merge} [%]	3.24
Vollständigkeit [%]	99.9
< I/σ > / < I/σ > (2.00 Å - 1.90 Å)	75.6 / 21.3
Daten	19343

Die Richtigkeit der gefundenen Koordinaten für die Chloratome konnte auch aufgrund der aus anderen Balhimycinstrukturen bekannten inter- und intramolekularen Chlor-Chlor-Abstände be-

stätigt werden. Dabei zeigte sich, daß anders als in allen anderen Peptidkomplexen jeweils zwei Homodimere über eine bis zu diesem Zeitpunkt nicht aufgetretene Wechselwirkung Tetramere bilden mußten. Eine Interpretation der Gesamtstruktur war unter diesen Umständen unter zu Hilfenahme von Modellen aus der Struktur von Deglucobalhimycin im Komplex mit dem gesamten Pentapeptid 3.1.4. möglich.

ii) Native Daten

Es wurde ein Kristall (0.15 mm x 0.15 mm x 0.25 mm) im Stickstoffstrom eines Oxford Cryostreams^[92] bei 100 K schockgefroren. An der Beamline X11 des EMBL c/o DESY^[93] wurde ein kompletter Datensatz bis zu atomarer Auflösung gesammelt. Hierbei wurde die Datensammlung in drei Auflösungsbereiche unterteilt. Bei der Sammlung der innersten Daten wurde der Strahl mittels handelsüblicher Aluminiumfolie abgeschwächt, um einer Sättigung des Zählers durch die intensivsten Reflexe vorzubeugen. Es wurde ein Mar345 Flächenzähler in verschiedenen Betriebsmodi verwendet.

Tabelle 8: Datensammlung Tripeptid, nativ

	hohe Aufl.	mittlere Aufl.	niedrige Aufl.
Auflösung [Å]	10 – 0.98	10 – 1.44	88.92 – 2.65
Detektordurchmesser [mm]	345	300	180
Detektorabstand [cm]	120	200	250
Scanwinkel [°]	0.5	1	2.5
Frames / Gesamtwinkel [°]	187 / 93.5	107 / 107	44 / 110

Die einzelnen Datensätze wurden mit dem Programmen DENZO und SCALEPACK^[94] in der monoklinen Raumgruppe $P2_1$ integriert und skaliert. Reflexe, die den Zähler sättigten, wurden, um komplette Daten bei niedriger Auflösung zu erhalten, bei der Messung mit größtem Zählerabstand in die Skalierung einbezogen. Die drei einzelnen Datensätze wurden mit dem Programm SALEPACK skaliert und anschließend in XPREP^[96] gemerged.

Mit den nativen Daten war es unkomplizierter, eine Erweiterung der Struktur zu erreichen, als "von Hand". Dies geschah unter Verwendung der in SHELXD implementierten *peak-list-optimization* (PLOP), wobei die zu atomarer Auflösung gesammelten Daten Verwendung fanden. Hierbei wird die Substruktur in jedem Zyklus um etwa 50 % erweitert. Die gesamte verwendete PLOP-Anweisung hat das folgende Aussehen:

PLOP 60 100 170 300 500 850 1200 1800.

Auf diese Weise konnten 900 Atome gefunden werden. Im Falle Direkter Methoden ist der Korrelationskoeffizient der Lösung ein wichtiges Gütekriterium. Er betrug in diesem Fall 76.13 %. Die Lösung wies acht Moleküle des Balhimycins auf. Diese bilden untereinander zwei Tetramere. Es konnte nur in den Bindungstaschen der Hälfte der Antibiotikamoleküle das Tripeptid eindeutig lokalisiert werden.

c) Verfeinerung

Das oben genannte SAS-Experiment fiel zeitlich mit dem Beginn der Erstellung dieser Dissertationsarbeit zusammen. Aus diesem Grund und wegen der Größe der Struktur von über 900 definierten Nicht-Wasserstoffatomen in der asymmetrischen Einheit, kann an dieser Stelle keine finale Verfeinerung vorgestellt werden. Stand der Dinge ist ein R_{work} von 20.26 % und ein R_{free} von 22.50 %. Diese Werte sind für eine qualitative Diskussion der Struktur ausreichend.

Es wurden acht Moleküle verfeinert. Bei vier der acht Moleküle sind in den Bindungstaschen vollbesetzte Tripeptidmoleküle zu erkennen. Im Falle der anderen vier zeichnen sich fehlgeordnete Citratmoleküle ab, deren Carboxylatgruppen mit der Bindungstasche des Antibiotikums Wasserstoffbrücken ausbilden. Es konnten mühelos 140 Wassermoleküle sowie zwei gut definierte, fehlgeordnete Moleküle MPD gefunden werden, die die beiden Tetramere zu einem Oktamer verbinden.

d) Strukturbeschreibung

Die Tripeptidmoleküle sind in einer β -Faltblatt ähnlichen Anordnung (siehe Abb. 15) miteinander verbunden. Unterstützt wird dieses Strukturelement durch zwei weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem phenolischen Sauerstoff O78 und einem Carboxylatsauerstoff des C-Terminus des Peptids. Dies ist aufgrund des bei dieser Kristallisation eingesetzten Puffers (pH 4) möglich.

Es muß an dieser Stelle die Frage gestellt werden, ob ein solcher Komplex auch *in vivo* auftritt. Die große Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen läßt vermuten, dass ein solches Aggregat eine hohe Stabilität besitzt. Es sollte mit biologischen und chemischen Arbeitsmethoden gezeigt werden, ob ein solcher Komplex z.B. bei den in einem Entzündungsherd bzw. in der natürlichen Umgebung eines Bakteriums herrschenden pH-Werten stabil ist. Des weiteren kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß bei den oben genannten Kristallisationsbedingungen

kein äquimolares Verhältnis von Antibiotikum und Peptid eingesetzt wurde. Dies kann mit einem Fehler bei der Einwaage der Substanzen oder der besonderen Stabilität des vorliegenden Strukturmotivs bei niedrigem pH-Wert erklärt werden. Auch diesbezüglich sind weitere Untersuchungen wünschenswert.

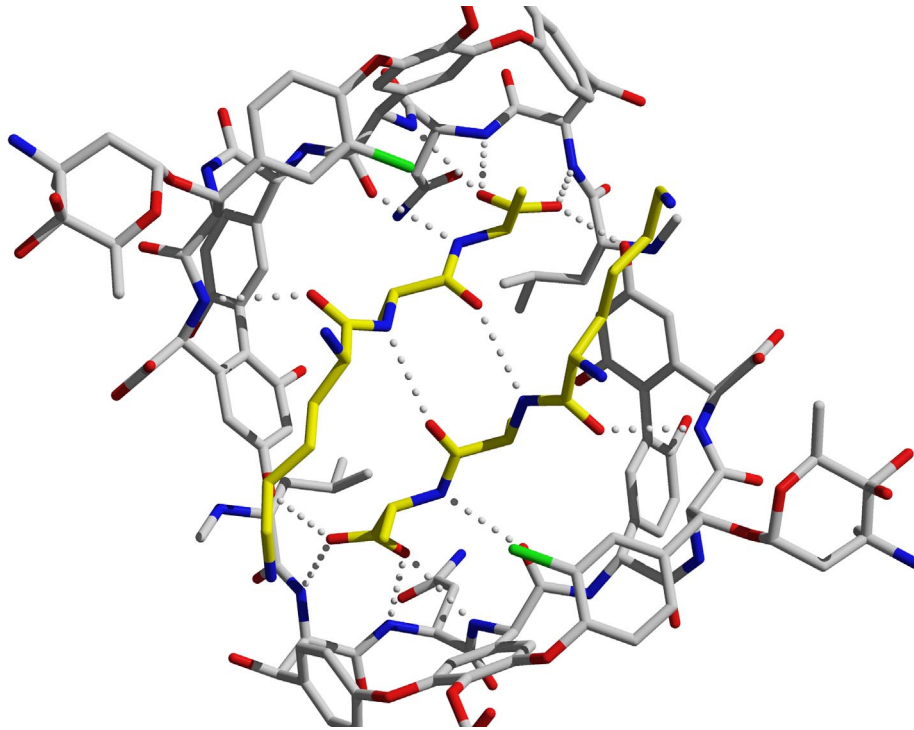


Abb. 15: Verknüpfung zweier Dimerkomplexe im Tripeptidkomplex

Es läßt sich aber vermuten, daß ein solcher Komplex die postulierte Wirkungsweise von Vancomycin unterstützen würde. Es ist auf diese Weise eine Besetzung von zwei Zellwandpeptiden mittels zweier Antibiotikadimere möglich (2:2-Verknüpfung). Bei dem bisher postuliertem Wirkungsmechanismus handelt es sich um eine Verknüpfung von zwei Zellwandpeptidsträngen mit einem Dimer des Antibiotikums (1:2-Verknüpfung). Dieser zweite Verknüpfungsmechanismus könnte die antibiotische Wirkung in Fällen einer lokal erhöhten Konzentration von Vancomycin verstärken. Je nach örtlichen Gegebenheiten der nascenten Zellwand sind auch die anderen Formen, die 2:3-, 2:4-Verknüpfung und allgemein eine n:m-Verknüpfung möglich. Gerade die so erreichbare Verstärkung der Inhibition der Zellwandsynthese lassen den hier postulierten zusätzlichen Wirkungsmechanismus sinnvoll erscheinen.

Es soll an dieser Stelle auf die in der Vergangenheit fruchtbare, wechselseitige Beziehung von Kernresonanzspektroskopie und Röntgenstrukturanalyse verwiesen werden. Gerade die Aufnahme von Kernresonanzspektren bei verschiedenen pH-Werten und Konzentrationen des Anti-

biotikums und des Peptids könnten Erkenntnisse über die Bildung dieses biologisch und medizinisch interessanten Sachverhaltes erbringen. Es ist natürlich in diesem Fall von Interesse, Erkenntnisse über mögliche Aggregate in Lösung oder sogar an der Zellwand lebender Bakterien zu gewinnen. Eine n:m-Verknüpfung größerer Bereiche des Peptidoglycans könnten mit Elektronen-mikroskopie aufgeklärt werden.

Anhand einer systematischen Darstellung sollen die Verknüpfungsmöglichkeiten zwischen Antibiotikum und nascenter Zellwand noch einmal verdeutlicht werden. Dabei sind die Homodimere des Antibiotikums durch blaue, das Zellwandpentapeptid durch rote Linien symbolisiert dargestellt.

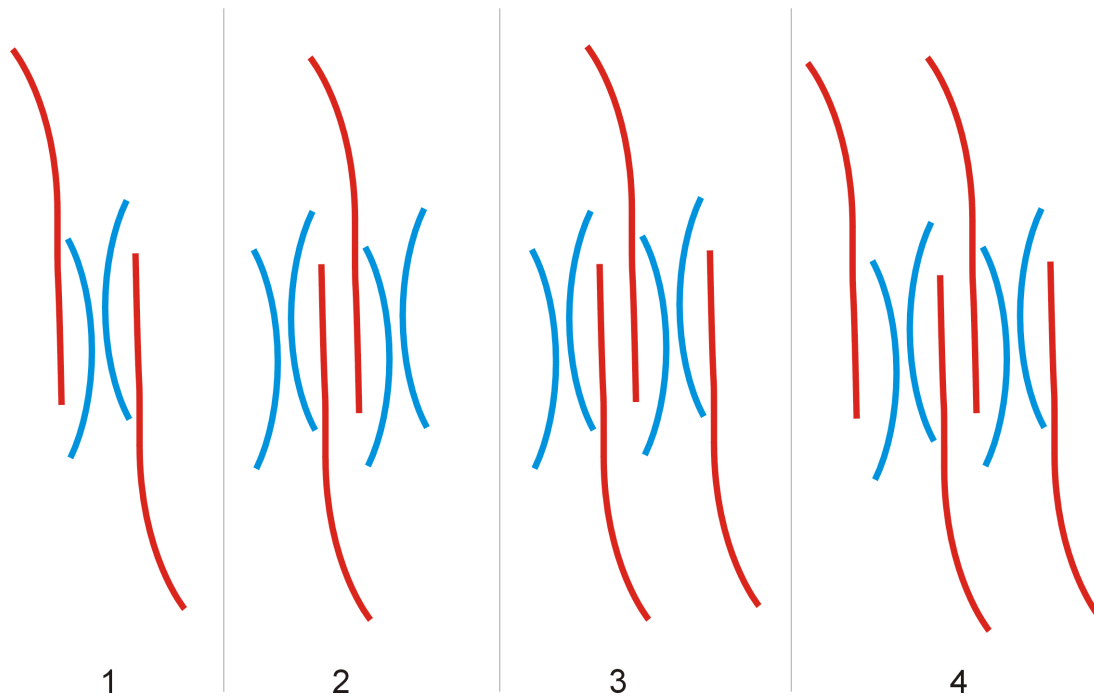


Abb. 16 mögliche Verknüpfungen von Peptidoglycan (rot) und Vancomycin (blau)

Es gibt mehrere Möglichkeiten der Verknüpfung:

- 1) Ein Vancomycindimer verknüpft zwei Peptide. (2:1-Verknüpfung).
- 2) Zwei Vancomycindimere verknüpfen zwei Peptide. (2:2-Verknüpfung).
- 3) Zwei Vancomycindimere verknüpfen drei Peptide. (2:3-Verknüpfung).
- 4) Zwei Vancomycindimere verknüpfen vier Peptide. (2:4-Verknüpfung).

3.1.4. Deglucobalhimycin im Komplex mit D-Ala-D-Ala-Lys-D- γ Glu-Ala

a) Kristallisation

Eine nach dem eingangs vorgestellten Verfahren hergestellte Lösung des Komplexes zwischen Deglucobalhimycin und einem Pentapeptid der Sequenz D-Ala-D-Ala-Lys-D- γ Glu-Ala wurde nach der *sitting-drop*-Methode aus 0.1 M NaCit-Puffer (pH 4.0), 0.2 M NaCit und 30 % 1,2-Propandiol hergestellt. Die Kristalle wiesen eine hexagonal-prismatischen Habitus auf. Anders als im Falle des Komplexes zwischen Deglucobalhimycin und D-Ala-D-Ala konnten diese Kristalle nur über einen relativ kleinen Bereich der Konzentrationen an Citrat, pH-Wert und der 1,2-Propandiolkonzentration erhalten werden.

b) Datensammlung

Die in der Mutterlösung enthaltene Konzentration an 1,2-Propandiol reichte aus, um einen Kristall der Kantenlängen 0,10 mm x 0,10 mm x 0.25 mm im Stickstoffstrom eines Oxford Cryostreams^[92] bei 100 K zu frieren.

Es wurde auf der Beamline X11 am EMBL c/o DESY^[93] ein vollständiger Datensatz bis zu atomarer Auflösung aufgenommen. Hierbei wurde die Datensammlung in drei Auflösungsbereiche unterteilt. Bei der Sammlung der innersten Daten wurde der Strahl mittels handelsüblicher Aluminiumfolie abgeschwächt, um einer Sättigung des Zählers durch die intensivsten Reflexe vorzubeugen. Es wurde ein Mar345 Flächenzähler in verschiedenen Betriebsmodi verwendet.

Tabelle 9: Datensammlung Pentapeptidkomplex

	hohe Aufl.	mittlere Aufl.	niedrige Aufl.
Auflösung [Å]	10.0 - 0.97	10 – 1.44	Inf. – 3.36
Detektordurchmesser [mm]	300	180	180
Detektorabstand [cm]	100	120	320
Scanwinkel [°]	1.0	1.5	3.5
Frames / Gesamtwinkel [°]	101 / 101	67 / 100.5	20 / 70

Die einzelnen Datensätze wurden mit dem Programmen DENZO und SCALEPACK^[94] trigonal integriert und skaliert. Reflexe, die den Zähler sättigten, wurden, um komplette Daten zu erhalten, bei den inneren Daten mit in die Skalierung einbezogen.

Tabelle 10: Kristallgraphische Daten des Pentapeptidkomplexes

Zellmetrik / Raumgruppe	Trigonal / P ₃ 2 ₁
Zelldimensionen	a = 48.29 (0.05), c = 39.30 (0.04)
Auflösung [Å]	41.78 - 0.97
Wellenlänge [Å]	0.9114
R _{merge} [%]	1.92
Vollständigkeit [%]	99.8
< I/σ > / I/σ (1.10 - 0.97 Å)	15.50 / 6.45
Daten / Daten für R _{free}	33267 / 1481
R _{work} [%]	9.92
R _{free} [%]	13.53

c) Strukturlösung

Die Strukturlösung wurde von Prof. G. M. Sheldrick mit Direkten Methoden in der Raumgruppe P₃2₁ mit einer nicht distribuierten Version des Programms SHELXD vorgenommen. In der asymmetrischen Einheit der Lösung befinden sich drei Moleküle Deglucobalhimycin. Die Bindungstaschen sind mit zum Teil lokalisierten Atomen des Pentapeptids besetzt. Dabei sind in allen drei Fällen die ersten beiden Aminosäuren vollständig und das Lysin zum Teil lokalisiert. Weiterhin konnte der am besten definierte Teil der Wasserstruktur gefunden werden.

d) Verfeinerung

Zwei Moleküle bilden das aus, den anderen Strukturen bekannte Homodimer mittels NCS über eine zweizählige Achse aus. Auch das dritte Molekül ligt als Dimer vor, allerdings ist in diesem Fall die zweizählige Achse die kristallographische der Raumgruppe P₃2₁.

Alle Bindungstaschen waren mit Pentapeptidmolekülen besetzt. Lediglich eines der Peptidmoleküle war vollständig definiert. Die anderen beiden "verlieren sich" ab dem γ -Glutamat bzw. dem Lysin in einer Region von fehlgeordneten Wassermolekülen.

Solche Kanäle von flüssigem Wasser sind aus sehr vielen Proteinstrukturen bekannt und können z.B. genutzt werden, um Substratmoleküle im intakten Kristall einzulagern (*soaking*). Die Tatsache, daß eines der Peptidmoleküle vollständig lokalisiert ist, läßt sich anhand einer weite-

ren intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem terminalen Lysinstickstoff und einem Phenolatsauerstoff eines symmetrieäquivalenten Deglucobalhimycin erklären. Bezüglich der verwendeten Restraints wurde wie bei den anderen hochaufgelösten Strukturen verfahren. Die Struktur konnten bis auf einen R_{work} von 9.92 % verfeinert werden. R_{free} ist mit 13.53 % nicht auffällig.

e) Strukturbeschreibung

Die Struktur des Pentapeptidkomplexes ist denen aus Kernresonanzuntersuchungen^[97] äquivalent. Allerdings können leider keine Aussagen bezüglich der in diesem Fall fehlenden Saccharide gemacht werden.

Es bilden sich zwischen jedem Pentapeptid und der Bindungstasche eines jeden Balhimycins fünf Wasserstoffbrückenbindungen aus.

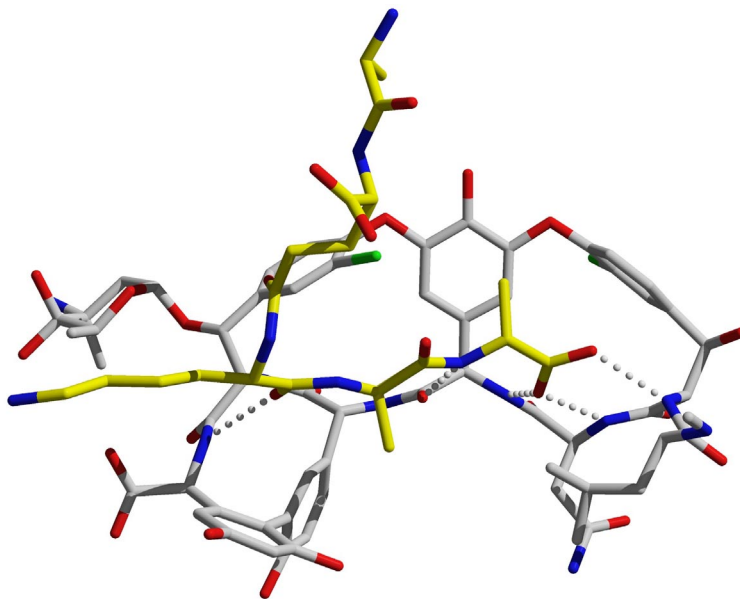


Abb. 17: Deglucobalhimycin im Komplex mit D-Ala-D-Ala-Lys-D-γGlu-Ala

Neben den vier vom C-Terminus des Peptids ausgehenden H-Brücken tritt eine fünfte zwischen dem Carboxylatsauerstoff des Lysins und dem Amidproton von N68 auf.

3.1.5. Zusammenfassung der Peptidkomplexe

Anhand der vorliegenden Röntgenstrukturanalysen der beiden Balhimycine im Komplex mit verschiedenen Zellwandpeptiden können detaillierte strukturelle Aussagen gewonnen werden. Die vorliegenden Sachverhalte geben Hinweise auf mögliche, neue Mechanismen der antibiotischen Wirkung von Vancomycin. Alle Koordinaten der Peptidkomplexe sind wegen der atomaren Auflösung und der hohen Güte der Daten mit sehr kleinen *esds* behaftet und können für Modellrechnungen verwendet werden.

Besonders interessant sind die im Falle des Tripeptidkomplexes auftretenden Bindungen zwischen Zellwandpeptid und Antibiotikum. Diese lassen weitere Untersuchungen an diesem System notwendig und vielversprechend erscheinen.

Aber auch die Dipeptidkomplexe zeigen neue strukturelle Aspekte, die vertiefende Untersuchungen wünschenswert machen. Besonders die Tatsache, daß D-Ala-D-Ala auf der einen Seite Abgangsgruppe der Peptidoglycansynthese ist, auf der anderen aber eine vermutlich sehr große Affinität zu Vancomycin besitzt, läßt vermuten, daß der Wirkungsmechanismus des Vancomycin noch nicht vollständig verstanden ist.

Die strukturellen Ergebnisse der Untersuchungen am System Pentapeptid-Deglucobalhimycin bestätigen im Wesentlichen die Ergebnisse früherer Strukturuntersuchungen^[80-88]. Anhand einer Superposition nach der eingangs genannten Methode können Abweichungen zwischen der vorliegenden Kristallstruktur und der mit Methoden der Kernresonanz erstellten verglichen werden (siehe Abb. 18). Die großen Abweichungen im Bereich der beiden N-terminalen Aminosäuren des Pentapeptid (Ala- γ -Glu) können zwanglos mit dem Fehlen der Zuckermoleküle im Falle des Deglucobalhimycins erklärt werden.

Interessant ist die abweichende Orientierung der Carboxylatgruppe des C-Terminus des Pentapeptids. Dieser Sachverhalt ist nur schwer unter Berufung auf Lösungsmiteleinfluß zu begründen. Da aber die gesamte, schon oben (3.1.1.) erwähnte Domäne, auf der rechten Seite in Abb. 18, in den beiden Strukturen abweichende Koordinaten aufweist, sind Lösungsmittelleffekte nicht auszuschließen. Für den Wirkungsmechanismus von Vancomycin sind diese Abweichungen von untergeordneter Bedeutung.

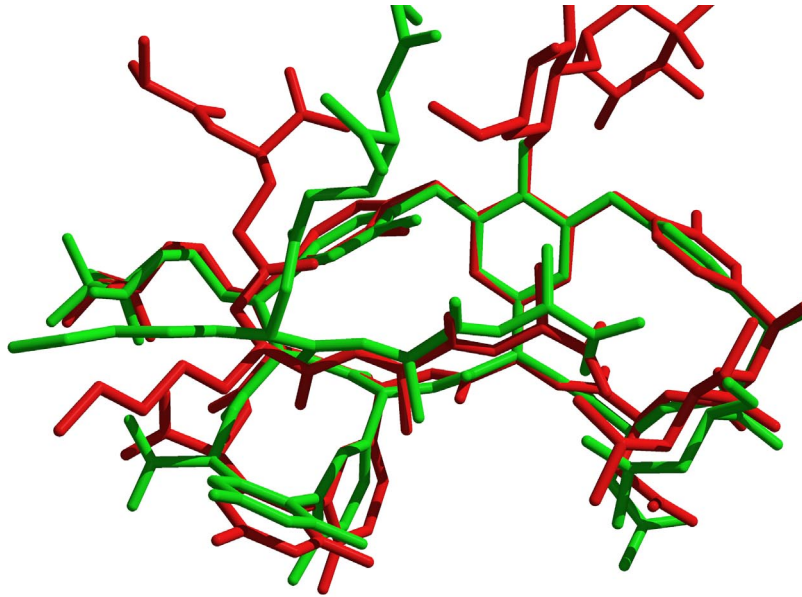


Abb. 18: Superposition von Pentapeptidkomplexen; NMR (rot), Röntgenstruktur (grün)

Bei allen Hochaufgelösten Strukturen fiel gegen Ende der Verfeinerungen negative Restelektronendichte in der Nähe der kovalent gebundenen Chloratome Cl1 und Cl6 auf. Diese wies Größen um $-0.7 \text{ e}/\text{\AA}^3$ auf. Die Anzahl an Strukturen, die dieses Verhalten zeigten, ist zu groß, als daß Fehler in Verfeinerung oder Datensammlung verantwortlich gemacht werden könnten.

Eine mögliche Erklärung ist, daß die Schwingung der Phenylringe und die dazu senkrechte Bewegung der Chloratome sich so überlagern, daß die resultierende Aufenthaltswahrscheinlichkeit schlecht durch die sonst üblichen Ellipsoide beschrieben werden kann. Die Richtigkeit dieser Annahme müßte anhand einer Analyse der Restelektronendichte bei Strukturen, die bei verschiedenen Temperaturen zu messen sind, bestätigt werden können.

Gerade an den Systemen der Dipeptidkomplexe könnten, bei Zutreffen dieser Vermutung, Datensätze zu extrem hohen Auflösungen gesammelt werden, welche einer Multipolverfeinerung unter der Annahme von Auslenkungstoroiden unterzogen werden könnten.

3.2. Decaplanin

Im Rahmen der industriellen Forschung an Glycopeptidantibiotika wurden viele erfolgversprechende modifizierte Antibiotika isoliert. So ist das Decaplanin^[101] durch das Fehlen des Chlortoms Cl6 (siehe Abb. 9) charakterisiert.

Es konnten vier verschiedene Modifikationen des Decaplanins unter unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen erhalten werden. Zwei dieser Decaplaninformen hatten für eine Verbindung dieser Größe große Zellkanten und zeigten ein schlechtes Streuverhalten. Es stellte sich heraus, daß diese einen hohen Wasseranteil und hohe B-Werte aufwiesen. Wegen der geringen Auflösung der Daten von weniger als 1.4 Å konnten beide Modifikationen nicht mit Direkten Methoden gelöst werden. Zur Strukturlösung wurden Makromolekülmethoden herangezogen.

3.2.1. Decaplanin (P₂₁ / erste Form)

Da zwei sehr ähnliche P₂₁-Formen des Decaplanins erhalten werden konnten, sollen diese, zur Unterscheidung als erste Form (Tabelle 11) und zweite Form (Tabelle 12) angesprochen werden.

a) Kristallisation

Die Kristallisationsbedingungen wurden von Dr. M. Dauter am National Laboratory in Brookhaven, U.S.A. gefunden. Die Kristallisationslösung enthielt 33 % Li₂SO₄, 0.2 M Tris-Puffer bei einem pH-Wert von pH= 8.5 und 20 % Glycerol.

b) Datensammlung

Die Daten wurden von Dr. Z. Dauter am National Laboratory in Brookhaven U.S.A. gesammelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Tabelle 11: Kristallographische Daten von Decaplanin ($P2_1$ / erste Form)

Zellmetrik / Raumgruppe	Monoklin / $P2_1$
Zelldimensionen	$a = 25.60 (0.05)$, $b = 38.60 (0.08)$, $c = 31.71 (0.06)$, $\beta = 105.88^\circ (0.03)$
Auflösung [\AA]	30.58 - 1.00
Wellenlänge [\AA]	0.98000
R_{merge} [%]	4.90
Vollständigkeit [%]	98.5
$\langle I/\sigma \rangle / \langle I/\sigma \rangle$ (1.10 \AA – 1.00 \AA)	12.22 / 4.45
Daten _{gesamt} / Daten für R_{free}	31754 / 1535

c) Strukturlösung

Die Strukturlösung wurde von Prof. G. M. Sheldrick mit Direkten Methoden in der Raumgruppe $P2_1$ mit einer nicht distribuierten Version des Programms SHELXD vorgenommen.

In der Lösung sind zwei Homodimere des Decaplanins zu erkennen. Bis auf die stark fehlgeordneten Isobutylgruppen C6 - C9 sind diese vollständig definiert.

d) Verfeinerung

Bezüglich der bei der Verfeinerung verwendeten Restraints gilt das gleiche wie bei den anderen hochaufgelösten Strukturen (3.1.). Es wurden SIMU, FLAT, CHIV, SAME, DFIX, DANG und DELU verwendet. In einer alternativen Verfeinerungsstrategie wurde auf die 1,2- und 1,3-Restraints, DANG und DFIX verzichtet und unter Ausnutzung der NCS mit SAME verfeinert. Es konnte ein Modell mit einem R_{work} von 10.54 % und einen R_{free} von 13.81 % erhalten werden. Anschließend wurden die für den freien R-Wert separierten Reflexe in eine Verfeinerung einbezogen und bis zur Konvergenz gegen alle Daten gerechnet. Dies lieferte einen R_{work} von 10.64 %.

In einem finalen Verfeinerungszyklus wurde ohne Restraints mit der gesamten Parametermatrix gegen alle Daten gerechnet um *esds* zu erhalten. Hierbei wurden mit dem Befehl DUMP 0 0 jegliche Veränderungen der Koordinaten verhindert.

Die vier Moleküle des Decaplanins bilden zwei der in Abb. 13 gezeigten Homodimere aus. Die bewegliche Gruppe C1-C9 ist in drei der vier Molekülen fehlgeordnet und konnte nicht immer vollständig lokalisiert werden.

3.2.2. Decaplanin (P2₁ / zweite Form)

a) Kristallisation

5 ml einer gesättigten Lösung von Decaplanin in 1M Natriumcitrat bei pH 7 wurden in einer Zentrifuge bei 10000 U/min vom festen Bodenkörper sowie unlöslichen Verunreinigungen getrennt. Anschließend wurde die Lösung in einen 10 ml Einhalskolben überführt und für einige Wochen bei 0 °C gelagert. Es konnten farblose Kristalle mit bis zu 3 mm Kantenlänge erhalten werden. Diese zeigten bei Durchsicht unter Verwendung von Polarisationsfiltern deutliche Anzeichen einer hohen Mosaizität (Risse, „regenbogenfarbiges Schillern“).

b) Datensammlung

Ein isometrischer Kristall der Kantenlänge 0.8 mm wurde in PFE bei 133 K gefroren und auf einem Stoe-Siemens-Huber Vier-Kreis-Diffraktometer mit Siemens-1K-CCD-Detector an Molybdän-Strahlung ($\lambda = 0.71073$) mit Graphitmonochromator bei einem Kristall-Detektorabstand von 8 cm gemessen. Um eine möglichst hohe Auflösung zu erzielen wurde sich dafür entschieden, φ -scans mit lediglich $\Delta\varphi = 0.3^\circ$ bei einer Belichtungszeit von 90 s zu arbeiten. Die Messung und Datenreduktion gestaltete sich wegen der relativ großen Zellkanten und einer sehr geringen Kristallqualität äußerst schwierig. Die Daten wurden mit der Datenreduktionssoftware SAINT^[103] integriert. Anschließend wurde mit dem Programm SADABS^[104] eine semiempirische Absorptionskorrektur durchgeführt.

Die Mosaizität konnte durch ein modifiziertes *crystal annealing*, mehrfaches Einfrieren des Kristalls im Kaltgasstrom, auftauen in PFE und erneutes Einfrieren, unter Verlust an Auflösung merklich verringert werden.

Ein vergleichbarer Kristall lieferte an einer Cu-Drehanode stark gespaltene Reflexprofile und wurde nicht weiter untersucht.

Tabelle 12: Kristallographische Daten von Decaplanin (P2₁ / zweite Form)

Zellmetrik / Raumgruppe	Monoklin / P2 ₁
Zelldimensionen	a = 28.95 (0.03), b = 31.91 (0.03), c = 34.73 (0.04), β = 109.87° (0.05)
Auflösung [Å]	18.08 - 1.15
Wellenlänge [Å]	0.71073
R _{merge} [%]	9.84
Vollständigkeit [%]	99.3
< I/σ > / < I/σ > (1.20 Å – 1.15 Å)	12.1 / 4.23
Daten _{gesamt} / Daten für R _{free}	38893 / 1901
R _{work} [%]	20.36
R _{free} [%]	22.68

c) Strukturlösung

Es wurde mit dem Dimer bestehend aus den Molekülen drei und vier der ersten P2₁-Form (3.2.1.) des Decaplanins ein isotropes Suchmodell erstellt. Hierbei wurden die verfeinerten B-Werte übernommen und nicht durch Standardgrößen ersetzt. Mit dem auf genetischen Algorithmen basierenden MR-Programm EPMR^[49] wurden unter Verwendung der Daten bis 2.5 Å zwei Dimere gesucht. Es wurde eine Suche in sechs Dimensionen durchgeführt. Die Populationsgröße betrug 300 und es wurde 50 Generationen lang jeweils 10 Zyklen gerechnet, wobei keine besonderen Grenzwerte für R-Wert oder Korrelationskoeffizient vorgegeben wurden.

Die beste Lösung des ersten Dimers wies einen Korrelationskoeffizienten von 22.3 % und einen R-Wert von 59.7 % auf. Nach einem weiteren Zyklus überschritt der Korrelationskoeffizient mit 42.4 % den vom Programm vorgegebenen Grenzwert des anderthalbfachen des ersten Korrelationskoeffizienten. Der R-Wert für beide Fragmente veränderte sich mit 52.7 % nur wenig.

d) Verfeinerung

Die vier Moleküle wurden mit dem Befehl AFIX 6 in jeweils zwei starre Gruppen unterteilt, wobei zwischen dem Disaccharid (siehe Tabelle 1) und dem Rest des Moleküls unterschieden wurde. Diese acht starren Gruppen wurden gegen die Daten bis zu einer Auflösung von 2.5 Å verfeinert. Anschließend wurde direkt gegen alle Daten verfeinert ohne zuerst die B-Werte aus der Lösung zu verfeinern. Die erhaltenen Elektronendichten waren problemlos interpretierbar. Allerdings war die Differenzelektronendichte „verrauscht“ und die resultierenden R-Werte schlecht.

Unter Verwendung kleiner Standardabweichungen für SIMU (0.01) und DELU (0.001) für alle Atome außer den Chloratomen konnte ein anisotropes Modell verfeinert werden. Nach geometrisch idealer Positionierung der Wasserstoffatome und einer Verfeinerung ihrer Positionen nach dem Reitermodell lieferte einen R_{work} von 20.36 % und einen R_{free} von 22.68 %. Obwohl diese Werte für eine Struktur dieser Größe bei atomarer Auflösung sehr groß sind, ist davon auszugehen, daß die Koordinaten für qualitative Aussagen herangezogen werden können. Die oben angegebenen Fehler der Zellgeometrie sind, wenn man die Probleme bei der Messung und der Datenreduktion berücksichtigt, viel zu klein veranschlagt.

Auf Aussagen quantitativer Art ist bei diesem Modell sicherlich zu verzichten. Es muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß eine erneute Kristallisation unter Verwendung von Makromolekülmethode (*hanging drop*, *seeding*) sicherlich wesentlich bessere Kristalle liefern würde, mit denen genauere Koordinaten erhalten werden können.

3.2.3. Decaplanin (P6₁22-Modifikation / erste Form)

a) Kristallisation

Kristalle dieser Decaplaninmodifikation wurden von Dr. M. Dauter am National Laboratory in Brookhaven U.S.A aus 0.1 M TRIS, pH = 8,5 und 44 % MgSO₄ erhalten.

b) Datensammlung und Strukturlösung

Da diese Struktur mit einem auf der anomalen Dispersion von Bromid basierenden MAD-Experiment gelöst wurde, sollen Datensammlung und Strukturlösung in einem Kapitel abgehandelt werden. Die Daten wurden von Dr. Z. Dauter am National Laboratory in Brookhaven U.S.A. gesammelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Selbstrotations Patterson zeigt in der Kappa-Sektion von 180°, in der zweizählige Achsen aufgefunden werden können, 24 Signale am Äquator. Dieser Befund ist dahingehend zu interpretieren, daß neben den sechs, raumgruppenimmanenten Kopien in der Elementarzelle, pro asymmetrischer Einheit vier weitere durch zweizählige nicht-kristallographische Symmetrie erzeugt werden. Da in den Kappa-Sektionen für höhere Symmetrie keine bzw. nur die 6₁-Achse der Raumgruppe gefunden werden konnten, mußte davon ausgegangen werden, daß sich vier Decaplaninmoleküle in der asymmetrischen Einheit befinden.

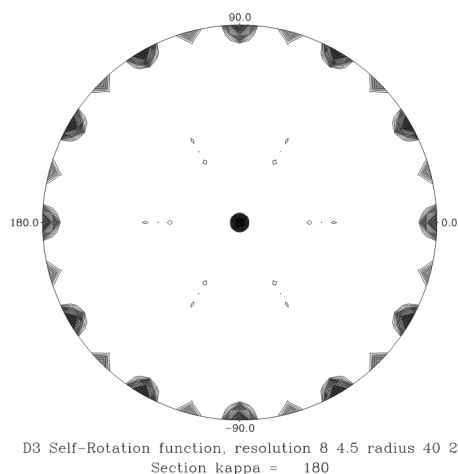


Abb. 19: Rotationspatterson von Decaplanin
(erste hexagonale Form)

Da die in dieser Modifikation vorliegenden Kristalle nicht bis zu atomarer Auflösung streuten, wurde entschieden, ein auf der anomalen Dispersion von Bromidionen basierendes MAD-Experiment zur Strukturlösung heranzuziehen. Zu diesem Zweck wurden die Kristalle in einer Bromidlösung gelagert (soaking), um zu erreichen, daß Bromidanionen in den Kristallverband diffundieren und sich an definierten Positionen einlagern. Diese können dann mit Hilfe ihrer anomalen Dispersion bei verschiedenen Wellenlängen lokalisiert werden. Die so erhaltene Phaseninformation kann daraufhin zur Gesamtstruktur erweitert werden.

Tabelle 13: Kristallographische Daten von Decaplanin (P6₁22 / erste Form)

Zellmetrik / Raumgruppe	Hexagonal / P6 ₁ 22
Zelldimensionen	a = 64.36 (0.06), c = 84.13 (0.08)
Auflösung min / max [Å]	23.23 / 1.90
Wellenlängen [Å]	0.98000, 0.98500*
R _{merge} [%]	8.00*
Vollständigkeit [%]	99.5*
< I/σ > / I/σ (1.90 Å –2.00 Å)	26.20 / 15.30*
Daten / Daten für R _{free}	15316 / 807*
R _{work} [%]	20.24*
R _{free} [%]	24.69*

Es wurde ein Modell gegen die Daten bei einer Wellenlänge von 0.985 Å (*) verfeinert, da diese bessere Werte für R_{merge} und I / σ aufweisen

Die Messstrategie beschränkte sich in diesem Fall auf eine Datensammlung bei zwei verschiedenen Wellenlängen. Die benötigten F_a -Werte (F_h in Abb. 3) wurden mit dem mit dem Programm XPREP^[96] unter der Annahme der in Tabelle 14 folgenden Werte für f' bzw. f'' erstellt. Eine anschließende Verfeinerung von f'' gegen die MAD-Daten lieferte folgendes Ergebnis:

Tabelle 14: Verfeinerung von f' und f'' mit XPREP

Wellenlänge [Å]	f'	f'' (start)	f'' (verfeinert)
0.980	-1.000	3.000	10.093
0.985	-8.000	7.000	2.670

Zur Beurteilung der Güte des anomalen Signals kann eine Auftragung des anomalen Korrelationskoeffizienten gegen die Auflösung herangezogen werden. Diese zeigte folgendes Aussehen:

Tabelle 15: Anomaler Korrelationskoeffizient vs. Auflösung [Å]

Auflösungs- Bereich [Å]	Inf	8.0	6.0	5.0	4.0	3.5	3.1	2.9	2.7	2.5	2.3	2.1
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8.0	6.0	5.0	4.0	3.5	3.1	2.9	2.7	2.5	2.3	2.1	1.9
anomaler Korrelations- koeffizient [%]	97.1	95.0	90.2	89.4	81.2	70.1	62.5	52.3	50.4	36.4	23.9	15.7

Es lässt sich sagen, daß bei Daten, die einen kleineren anomalen Korrelationskoeffizienten als 30 %, aufweisen das anomale Signal zu schwach für eine MAD-Phasierung ist. Aus diesem Grund wurden nur Daten mit einer Auflösung bis 2.3 Å für die Strukturlösung berücksichtigt. Mit dem Programm SHELXD wurde eine Pattersonsuche nach vier Bromidionen in den so erhaltenen Strukturfaktoren erfolgreich durchgeführt. Hierbei konnte von einem Mindestabstand für die Bromatome von 4 Å ausgegangen werden.

Dies lieferte die Positionen von vier unterschiedlich besetzten Bromidionen mit den folgenden Koordinaten:

Tabelle 16: Koordinaten der mit SHELXD aufgefundenen anomalen Streuer

Atom	X	Y	Z
BR1	0.6880	0.5697	0.0169
BR2	0.2284	0.6630	0.0138
BR3	0.2251	0.4993	0.0783
BR4	0.3890	0.4846	0.0608

Unter der Annahme, daß die Strukturfaktoren des MAD-Experimentes sich aus der Summe von Protein- und Schweratomphasen zusammensetzen, wurden mit den aus den Bromkoordinaten berechenbaren Phasen auf die Proteinphasen zurückgeschlossen (siehe Abb. 3 in 2.7.2.).

Anschließend wurde mit dem Programm $dm^{[51]}$ eine Phasenerweiterung durchgeführt. Hierbei wurden *histogram matching* sowie *solvent flattening* unter Annahme von 50 % Wasser verwendet. Mit den so erhaltenen, mit Wahrscheinlichkeiten gewichteten Phasen wurde eine erste Elektronendichte erstellt. Diese konnte vor allem wegen der leicht zu identifizierenden kovalent gebundenen Chloratome sowie der charakteristischen Phenylringe interpretiert werden. Eine Superposition der mit SHELXD erhaltenen Bromidpositionen gegen verfeinerte Koordinaten zeigte, daß die Bromidionen Br1 und Br4 in der Nähe kovalent gebundener Chloratome des Decaplanis lagen. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Werte von f' und f'' für Brom und Chlor bei diesen Wellenlängen (siehe Tabelle 13), so ist dieser Befund unerwartet. Eine Verfeinerung aller Halogenidionen als Chlorid lieferte geringfügig höhere Werte für R_{work} und R_{free} .

Da kein nativer Datensatz dieser Verbindung zur Verfügung steht, wurde einer der beiden Datensätze für die Verfeinerung verwendet. Eine Mischung kommt wegen der unterschiedlichen Wellenlängen nicht in Frage.

c) Verfeinerung

Es wurden vier Decaplaninmoleküle sowie zwei Bromidionen in der Elektronendichte platziert. Die Moleküle wurden mit dem Befehl AFIX 6 in drei starre Gruppen aufgeteilt: die beiden Zucker und das restliche Molekülgerüst.

Restraints für 1,2- und 1,3-Abstände wurden aus der ersten bis zu atomarer Auflösung gemessenen P2₁-Form (Tabelle 11) erstellt. Die zu aromatischen Ringsystemen gehörenden Atome wurden mit dem FLAT-Befehl versehen. Den sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen wurde mit

CHIV ein chirales Volumen von null zugewiesen. Die NCS fand in einer SAME-Anweisung ihre Entsprechung.

Es konnten insgesamt fünf anomale Streuer gefunden werden, die als Chlorid, Bromid oder ein Gemisch beider Ionen zu interpretieren waren. Diese wurden als Fehlordnung zwischen Chlorid und Bromid verfeinert, wobei das Verhältnis zwischen den Ionen mit einer freien Variable ermittelt wurde. Sowohl die Koordinaten als auch die Auslenkung der beiden Ionen wurde mit den Constraints EADP und EXYZ gleichgesetzt. Die einen relativ großen Teil der Elektronendichte pro Volumen ausmachenden Halogenatome bzw. -anionen wurden anisotrop verfeinert. Die freien Variablen verfeinerten auf Werte von 0.54, 0.97, 0.97, 1.00 und 0.76. Hieraus kann geschlossen werden, daß nur zwei der drei Positionen zum Teil (ca. 1/2 bzw. 1/3) mit Bromid besetzt sind.

Des weiteren konnten zwei Moleküle Glycerol, von denen eines als Fehlordnung verfeinert wurde, sowie 76 Wassermoleküle gefunden werden. Für die Glycerolmoleküle wurden idealisierte Restraints für 1,2- und 1,3-Abstände verwendet.

Da die Atome sich durch große isotrope Auslenkungsparameter auszeichneten, wurden Wassermoleküle bis zu U-Werten kleiner als 1.0 \AA^2 , deren Umgebung mit der von Wassermolekülen konsistent war, in die Verfeinerung einbezogen. Bei dem Versuch weitere Wassermoleküle in die Verfeinerung einzubeziehen, sank zwar R_{work} , R_{free} stieg aber gleichzeitig an. Es ist üblich Proteine, bis unter 20 % in R_{work} zu verfeinern, um sicher zu gehen ein richtiges Modell zu erhalten. Bei oben genanntem Verhalten der beiden R-Werte darf aber keine weitere Elektronendichte interpretiert werden. Es wurden aus diesem Grund bei einem R_{work} von 20.24 % keine weiteren Interpretationen mehr vorgenommen. Die Wasserstoffatome wurden ideal positioniert und ihre Positionen nach dem Reitermodell verfeinert.

Trotz der mit 2189 relativ geringen Anzahl an zu verfeinernden Parametern führte eine *full-matrix-least-squares*-Verfeinerung mit dem SHELXL-Befehl L.S. über mehrere Zyklen zu inakzeptablen Ergebnissen bezüglich der Restelektronendichte. Es wurden lediglich Restelektronendichtepeaks mit einer Höhe von 0 e/\AA^3 gefunden. Dies kann auf eine starke Korrelation zwischen den beiden Parametern der SWAT-Anweisung und den B-Werten zurückgeführt werden. Im letzten Verfeinerungszyklus wurden alle Restraints entfernt und mit dem Befehl DAMP 0 0 ein Zyklus *full-matrix-least-squares*-Verfeinerung gegen alle Daten inklusive der R_{free} -Reflexe durchgeführt.

3.2.4. Decaplanin (P6₁22-Modifikation / zweite Form)

a) Kristallisation

Eine gesättigte wässrige Lösung von Decaplanin wurde in einer Zentrifuge bei 10000 U/min von ihrem Bodenkörper und unlöslichen Anteilen getrennt. Als Kristallisationslösung wurde die Lösung Nr. 48 des Crystal Screens™ Nr. 1 der Firma Hampton Research^[105] oder eine Lösung gleicher Zusammensetzung verwendet. Diese enthält einen 0.1 M Tris/HCl-Puffer, pH 8.5 und 2 M Lösung von Ammoniumdihydrogenphosphat. Nach ein bis drei Monaten bilden sich nach der *hanging-drop*-Methode Decaplaninkristalle in Form hexagonaler Bipyramiden. Diese Zeitspanne wurde durch erneute Kristallisation verifiziert. Um eine Kristallisation in praktikablen Zeiträumen zu bewerkstelligen, wurde es nötig, Kristalle durch *micro-seeding* zu vermehren. Diese Vorgehensweise ist zweckmäßig, da ein großer Teil der gesamten Kristallisationszeit für die Kristallkeimbildung zu veranschlagen ist. Unter diesen Umständen waren immer noch einige Wochen für das Kristallwachstum nötig.

Da es im Laufe dieser Projekte nötig schien, Kristalle am Synchrotron des National Laboratory in Brookhaven, U.S.A. zu vermessen, wurde eine Möglichkeit gesucht diese für einen Transport per Post zu präparieren. Es stellte sich wegen der hohen Konzentration an Ammoniumhydrogenphosphat als unpraktikabel heraus, Kristalle auf die sonst übliche Art in Kapillaren zu transportieren, da sich an der Luft sofort Phosphatkristalle bildeten. Leider konnten keine Kristalle aus anderen Hydrogenphosphaten erhalten werden. Es wurde eine Probe des Antibiotikums in Pulverform versandt und am Synchrotron erneut kristallisiert. Aus dieser Vorgehensweise resultierte ein erneuter Zeitaufwand von mehreren Monaten.

b) Datensammlung und Strukturlösung

Es wurden mehrere Datensätze des Decaplanins aufgenommen. Da die Struktur unter Verwendung der anomalen Dispersion von Chlor gelöst wurde, sollen Datensammlung und Strukturlösung zusammen besprochen werden.

i) Kryobedingungen

Zum Aufsuchen von Kryobedingungen und zur Bestimmung der Elementarzelle und der Raumgruppe wurde an einer rotierenden Kupferanode mit einem MWPC ein hochredundanter Datensatz bis 3 Å bei 133 K aufgenommen. Es zeigte sich, daß sowohl aus Paratone N^[106] der Firma Exxon, als auch aus oben genannter Lösung, die zusätzlich 30% Glycerol oder 25% 1,2-Propandiol enthielt, bei 120 K Kristalle schockgefroren werden konnte. Die Daten wiesen eine zur Bestimmung von Zellmetrik und Raumgruppe ausreichende Qualität auf.

ii) native Daten

Es wurde auf der Beamline BW7B am EMBL c/o DESY^[93] ein Datensatz gesammelt.

Bei einer Temperatur von 100 K stellte sich Paratone N als ungeeignet heraus, die vorliegenden Kristalle zu frieren. Der Grund hierfür liegt vermutlich in einem unterschiedlichen Ausdehnungskoeffizienten von Paratone N und der den Kristall umgebenden Lösung.

Aus diesem Grund wurde der o.g., 1,2-Propandiol enthaltende Kryopuffer verwendet. Hierbei wurde die Datensammlung in drei Auflösungsbereiche unterteilt. Bei der Sammlung der innersten Daten wurde der Strahl mittels handelsüblicher Aluminiumfolie abgeschwächt, um eine Sättigung des Zählers durch die intensivsten Reflexe zu verhindern. Es wurde ein Mar345 Flächenzähler in verschiedenen Betriebsmodi verwendet.

Tabelle 17: Kristallographische Daten von Decaplanin (P6₁22 / zweite Form)

Zellmetrik / Raumgruppe	Hexagonal / P6 ₁ 22
Zelldimensionen	a = 60.10 (0.06), c = 131.4 (0.2)
Auflösung [Å]	1.47
Wellenlänge [Å]	0.83450
R _{merge} [%]	5.10
Vollständigkeit [%]	99.1
< I/σ > / < I/σ > (1.60 Å – 1.47 Å)	2.3
Daten _{gesamt} / Daten für R _{free}	24558 / 1244
R _{work} [%]	17.40
R _{free} [%]	20.59

iii) SAS-Daten

Die hier erhaltene Auflösung war nicht ausreichend, um das Phasenproblem mit Direkten Methoden zu lösen, MR mit verschiedenen Glycopeptiden als Suchmodell scheiterte und die verwendete Wellenlänge war für die Ausnutzung anomaler Dispersion ungeeignet.

Da Decaplanin ein kovalent gebundenes Chloratom pro Molekül aufweist und die Raumgruppe P6₁22 die Möglichkeit in Aussicht stellte, relativ schnell einen hochredundanten Datensatz zu erhalten, schien ein SAS-Experiment Erfolg zu versprechen. Da das Absorptionsmaximum von Chlor bei einer für Röntgenstrukturuntersuchungen nicht praktikablen Wellenlänge liegt, wurde am National Laboratory in Brookhaven ein Kristall bei möglichst großer Wellenlänge vermessen ($\lambda = 1.542 \text{ \AA}$). In diesem Fall wurde auf den glycerolhaltigen Kryopuffer zurückgegriffen.

Tabelle 18: Kristallographische Daten von Decaplanin, zweite P6₁22-Form, SAS

Auflösung [Å]	1.60
Wellenlänge [Å]	1.542
R _{merge} [%]	5.40
Vollständigkeit [%]	100
< I/σ > / I/σ (letzte Auflösungsschale)	43.09 / 10.29
Daten	35996

Die Selbstrotationspatterson lieferte den gleichen Befund wie in der anderen P6₁22-Form des Decaplanins. Allerdings ist das Zellvolumen in diesem Fall mit rund 411000 \AA^3 um nahezu 40 % größer. Eine Abschätzung des Zellinhalts, basierend auf einem mittleren Atomvolumen von

18 Å³ für Nicht-Wasserstoffatome und unter der Annahme von vier Molekülen Decaplanin in der asymmetrischen Einheit, ergab einen Wassergehalt von über 75 %. Aus diesem Grund wurde zunächst von acht bis zwölf Kopien und einem resultierenden Wassergehalt zwischen 35 und 60 % ausgegangen.

Die Rotationspatterson gibt lediglich Hinweise auf vorhandene NCS. Es kann z.B. bei einem hohen Translationsanteil der NCS vorkommen, daß die Signale für die verschiedenen Kopien zusammenfallen und so NCS übersehen wird. Dies ist dann häufig an der normalen Pattersonmap zu erkennen, indem man Signale in der Ebene findet, in denen sich die Pseudotranslation manifestiert. Es ist auch möglich, daß die NCS den gleichen Rotationsanteil wie die Raumgruppensymmetrie oder eine weitere vorliegende NCS hat.

Mit dem Programm XPREP^[96] läßt sich das anomale Signal von Datensätzen in verschiedenen Auflösungsschalen abschätzen. Es wird das Verhältnis von Signal zu Rauschen als Funktion der Auflösung betrachtet. Ein Verhältnis von eins ist als reines Rauschen zu werten. Die Berechnung dieses Verhältnisses basiert auf der Varianz von F^+/F^- . Ein Wert von 1.10 und größer wird hierbei als signifikantes anomales Signal gewertet.

Tabelle 18: Anomales Signal der SAS-Daten Daten von Decaplanin (P6₁22 / zweite Form)

Auflösungs- Bereich [Å]	Inf	8.0	6.0	5.0	4.0	3.5	3.0	2.6	2.4	2.2	2.0	1.8	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	8.0	6.0	5.0	4.0	3.5	3.0	2.6	2.4	2.2	2.0	1.8	1.6	
Signal/Rauschen (Varianz von F^+/F^-)		2.14	1.95	1.66	1.77	1.36	1.72	1.87	1.81	1.60	1.46	1.40	1.20

Anhand dieser Auftragung können mehrere, für die weitere Verwendung der Daten nützliche Informationen gewonnen werden. Das anomale Signal nimmt mit höherer Auflösung ab. In dem vorliegenden Fall bedeutet dies, daß die Information über die Koordinaten der anomalen Streuer in allen Auflösungsbereichen gering, aber bis zur vollen Auflösung als signifikant anzusehen ist. Die Korrelation bricht im Bereich zwischen 3.5 und 4.0 Å ein. Dies ist auf die in diesem Bereich immer vorhandene, diffuse Streuung von flüssigem Wasser zurückzuführen, die sich bei einem Effekt, wie der anomalen Dispersion von Chlorid bei einer Wellenlänge von 1.542 Å deutlich, störend bemerkbar macht. Es sei an dieser Stelle darauf verwiesen, daß die diffuse Streuung auch durch eine Verbesserung der Messtechnik nicht zu vermeiden ist.

Es wurde nun analog dem SAS-Experiment in 3.1.3. verfahren. Mit dem Programm SHELXD^[102] konnten acht anomale Streuer gefunden werden.

Es fiel auf, daß die ersten vier Chlorpositionen ungewöhnlich kurze Abstände von 3.93 bzw. 3.81 Å untereinander aufwiesen. Da jedes Decaplaninmolekül nur ein Chloratom trägt, konnte es sich hier nicht um den aus anderen Glycopeptidstrukturen bekannten kurzen Chlor-Chlor-Abstand über die zweizählige Dimerachse (siehe Abb. 12) handeln, die in etwa diese Länge aufweisen.

Die erste Lösung der Chloratome wurden mit dem Programm SHARP^[50] gegen die anomalen Daten verfeinert. Ausgehend von den oben erwähnten, acht erwarteten Kopien wurden die Besetzungsfaktoren der gefundenen Atome auf 1.00 festgesetzt und nicht verfeinert. Weiter konnte davon ausgegangen werden, daß die mit SHELXD^[102] erhaltenen Koordinaten sehr genau sind und keiner weiteren Verfeinerung bedürften. Diese Annahme konnte dadurch betätigt werden, daß bei einer Verfeinerung zu Testzwecken die Chlorpositionen sich nicht signifikant von ihrer ursprünglich bestimmten Position entfernten. Eine weitere Verbesserung der Phasen kann mit SHARP dadurch erreicht werden, daß die anisotrope Auslenkung der anomalen Streuer verfeinert wird.

Mit den so gewonnenen, verfeinerten Phasen und den Positionen der Chloratome, konnte in dm^[51] eine Phasenerweiterung unter Dichtemodifikation vorgenommen werden. Hierbei kamen *histogram matching* und *solvent flattening* zum Einsatz. In Erwartung, acht Moleküle in der asymmetrischen Einheit zu finden, wurde zunächst mit einem Wassergehalt von 50 % gerechnet. Die aus dm resultierende Elektronendichte war sehr gut interpretierbar. Bei späteren Berechnungen wurde der korrekte Wassergehalt von 75 % angenommen. Dieses Vorgehen grenzte die zum Molekül gehörende Elektronendichte noch weiter gegen die sie umgebenden diffusen Wassermoleküle ab. Eine Verbesserung der Elektronendichte im Bereich der Moleküle selbst konnte durch diese Vorgehensweise nicht mehr erreicht werden.

Es zeigte sich, daß lediglich vier Kopien des Moleküls in der asymmetrischen Einheit präsent waren. Die restlichen vier Chlorkoordinaten gehörten zu nicht an das Molekül gebundenen anomalen Streuern. Da in der vorhandenen Decaplaninprobe als Gegenion und Puffer Citrat enthalten war, und kein Chlorid erwartet wurde, mussten einige Überlegungen und Verfeinerungsversuche angestellt werden.

Letztendlich waren die gefundenen Tatsachen kaum unter der Annahme zu erklären, daß es sich bei den gefundenen Chlorpositionen um eine [Cl-H-Cl]⁻-Spezies handelt. Eine CSD^[98]-Recherche ergab, daß die bekannten Hydrogenschloridanionen einen Cl-Cl-Abstand von weniger als 3.2 Å aufwiesen und Winkel ausbildeten, die Beträge um 180 ° aufweisen. Eine Bestimmung des Bindungswinkels von Verbindungen, an denen Wasserstoff beteiligt ist, ist unter Berücksichtigung der Auflösung von ca. 1.5 Å und der Größe der Verbindung mit röntgenstrukturanalytischen Methoden nicht möglich. Der in [Cl-H-Cl]⁻-Spezies gefundene Bindungsab-

stand, sowie der pH-Wert der eingestzten Puffrlösung von über acht lassen die annahme, es handele sich um dieses Anion nicht zu.

Jedes der beiden Chloratome ist an fünf Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt. Es treten hierbei die Amid- und Aminprotonen von N2, N10, N24 und N32 als Protonendonatoren auf. N2 ist sogar mit beiden Protonen beteiligt. Diese Tatsache macht eine Beschreibung des Sachverhaltes auch ohne die Annahme eines zwischen den Chloridionen positionierten Protons möglich. Die vier Wasserstoffe von den N2-Aminprotonen könnten die negative Ladung der Chloridanionen voneinander soweit abschirmen, daß der hier resultierende Abstand möglich wird, welcher nicht so weit von den in Salzen die das Cl^- -Anion enthalten entfernt ist.

Es soll an dieser Stelle auf die Möglichkeit einer Neutronenbeugungsstruktur hingewiesen werden, mit deren Hilfe quantitative Aussagen über die Positionen von Wasserstoffatomen möglich sind. Allerdings müßten für diesen Zweck erheblich größere Kristalle erzeugt werden.

Der im Vergleich zu den CSD-Strukturen erheblich größere Abstand zwischen den Chloratomen kann auch dadurch erklärt werden, daß jedes Chloratom weitere Wasserstoffbrückenbindungen eingeht. Es liegen also keine reinen $[\text{Cl-H-Cl}]^-$ -Anionen vor. Weitere Bindungspartner sollten nach einer qualitativen Bond-Valenz-Überlegung^[107] die Bindungsordnung der Cl-H-Bindung erniedrigen und so zu ihrer Verlängerung führen. Bei anschließenden Verfeinerungen wurde der Wasserstoff zwischen den beiden Chloratomen nicht in die Verfeinerung einbezogen.

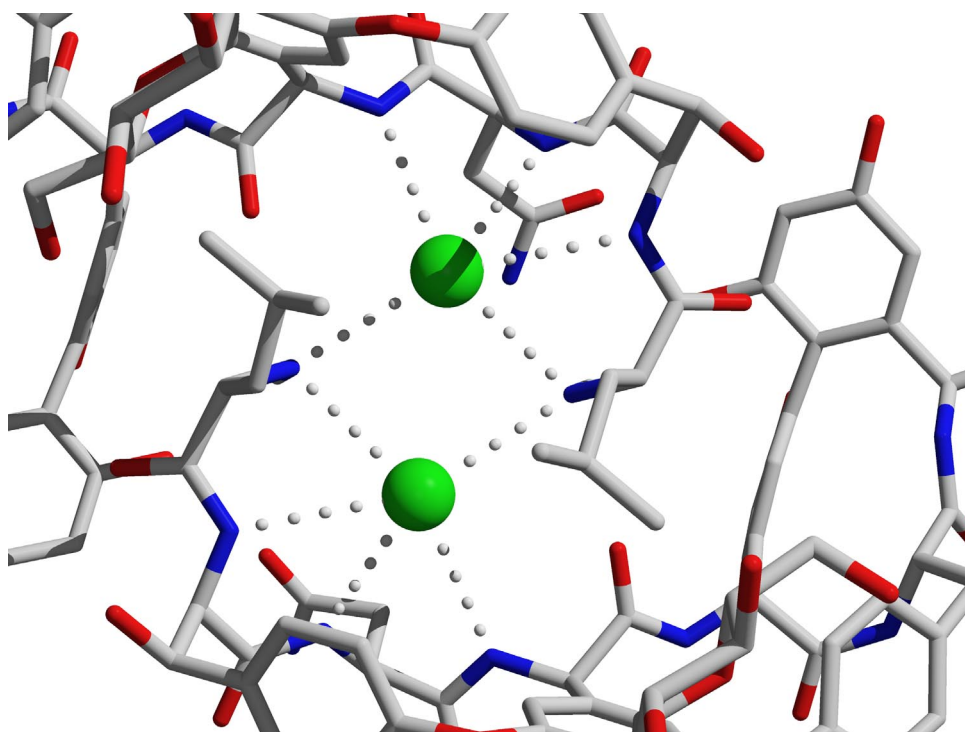


Abb. 20: Chloridanionen in der Bindungstasche von Decaplanin

Das oben Gesagte gilt auch für die erste P6₁22-Form mit dem geringeren Zellvolumen, die zu einem späteren Zeitpunkt gelöst wurde. Bei ihr wurde aufgrund dieses Befundes die Möglichkeit, daß auch Chlorid in der Struktur zu finden ist, frühzeitig berücksichtigt.

c) Verfeinerung

Es wurde gegen den nativen Synchrotrondatensatz (siehe Tabelle 17) verfeinert, da dieser mit ca. 1.5 Å die höchste Auflösung aufwies.

Die Kristalle enthalten mit 75 % eine sehr große Menge an glasartig erstarrtem Wasser, welches nur in den beiden Parametern einer SWAT-Anweisung Berücksichtigung fand. Aus diesem Grund war das Daten-Parameter-Verhältnis mit einem Wert von über fünf (nach anisotroper Verfeinerung) ausreichend, um eine anisotrope Verfeinerung der thermalen Atomauslenkung zu rechtfertigen.

Es sei darauf hingewiesen, daß diese Art, das Daten-Parameter-Verhältnis zu berechnen eine etwas naive Vorgehensweise darstellt. Da der größte Teil der Struktur nicht zu den gewonnenen Meßergebnissen beiträgt, spiegelt sich in der scheinbar großen Datenmenge nur die Information über den definierten Teil der Struktur wieder. Definiert heißt an dieser Stelle, daß die ungeordneten Wassermoleküle zwar jedes für sich genommen Röntgenbeugung zeigt, da aber die Bragg-Gleichung nicht erfüllt ist, es zur Auslöschung durch Interferenz der einzelnen gebeugten Röntgenquanten kommt. Diese Information ist aber durch ihre häufige Messung, die Messung des lokalisierten Teils der Struktur in immer anderen Netzebene, sehr fehlerarm. So läßt sich das Vorgehen der anisotropen Verfeinerung auch mit der hohen Güte der Daten begründen.

Auf der anderen Seite zeigte es sich, daß durch eine anisotrope Behandlung der Atomauslenkung die R-Werte nicht wie in anderen Fällen üblich, sehr stark sinken. So gab der R_{work} mit 4 % relativ wenig nach.

Zu Beginn konnten vier Moleküle des Dekaplanis, deren Koordinaten der mit Direkten Methoden gelösten P2₁-Form entnommen wurden, in die Elektronendichte platziert werden. Es wurde mit den aus der P2₁-Form erstellten Restraints direkt gegen die volle Auflösung der nativen Daten verfeinert. Später wurden die Chloridanionen in die Verfeinerung einbezogen.

Die erste aus dem anomalen Datensatz berechnete Elektronendichte konnte mittels der Decaplaninmoleküle aus der *ab initio* gelösten P2₁-Form interpretiert werden. Zusätzlich zu vier Molekülen konnten die zwei [Cl-H-Cl]⁻Anionen in der SAS-Dichte gefunden werden. Die Decaplaninmoleküle wurden mit AFIX 6 Anweisungen in drei starre Gruppen, die zwei Zucker und den Rest des Moleküls, unterteilt. Als erstes wurde nun eine Verfeinerung dieser starren Gruppen gegen die Daten bis 2.5 Å vorgenommen. Mit den aus dieser Verfeinerung resultierenden Koor-

dinaten wurden auf gleiche Weise gegen die nativen Daten verfeinert. Anschließend konnte mit Restraints aus der hochaufgelösten P2₁-Form gegen die gesamten Daten verfeinert werden. Es wurden zusätzlich zwei teilbesetzte Phosphatanionen gefunden. Die Auslenkungsparametern der Phosphatsauerstoffe wurden mit dem Constraint EADP auf gleiche Werte verfeinert. Alle Atome außer Wasserstoff wurden anisotrop verfeinert.

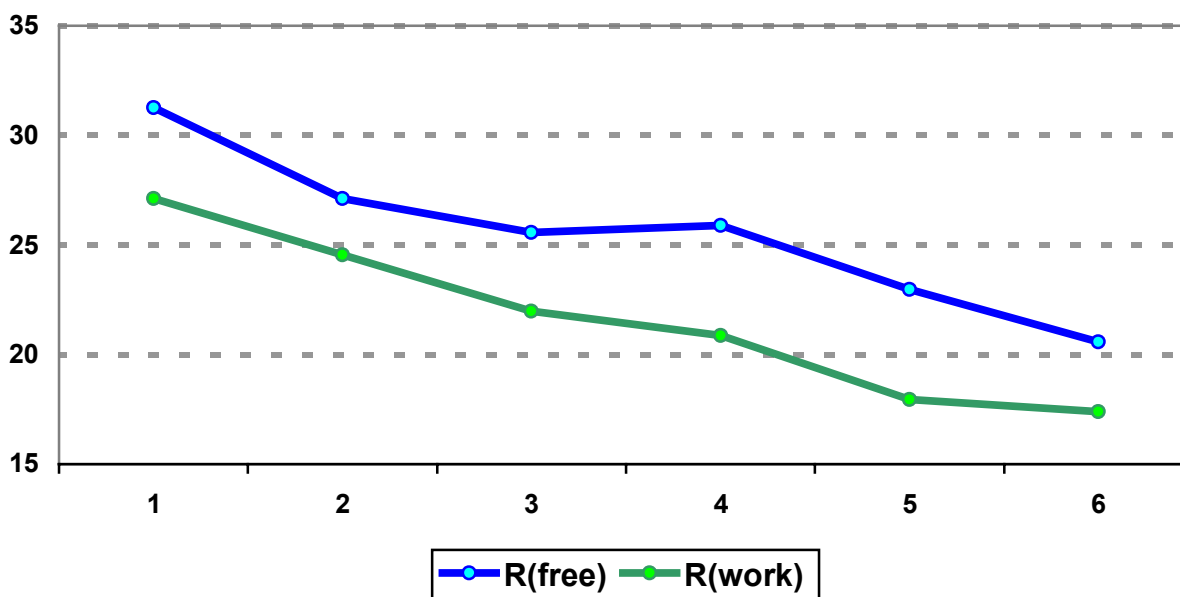


Abb. 21: Verfeinerungsfortschritt von Decaplanin zweite hexagonale Form

Die Verfeinerung kann in sechs Schritte unterteilt werden:

1. rigid body
2. alle Daten, Chloridionen, Phosphat
3. Wasser
4. 2. Phosphat
5. ANIS
6. Wasserstoffatome.

d) Strukturbeschreibung

Das Auffälligste an dieser Struktur ist ihr sehr großer Wassergehalt von ca. 75 %. Um den Aufbau des Decaplanis in dieser Modifikation besser verdeutlichen zu können, wurde eine schematische Abbildung^[108] vieler asymmetrischer Einheiten erstellt. Jedes Molekül Decaplanin wird hierbei durch das Kohlenstoffatom C33 und das kovalent gebundene Chloratom symbolisiert.

Des Weiteren sind die beiden Chloridanionen dargestellt. Allen Atomen wurden extrem große Radien zugewiesen, um ein verknüpftes Molekülbild zu erhalten. Die Blickrichtung ist die kristallographische z-Achse.

Anhand dieser Darstellung wird ersichtlich, daß sich die Decaplaninmoleküle in zwei, ineinander verwundenen Spiralen entlang der kristallographischen z-Achse anordnen. Dieser Aufbau wird auf der einen Seite durch die Homodimere, auf der anderen über die Chloridanionen ermöglicht. Wie schon anhand der sehr großen B-Werte für diese Struktur zu ersehen ist, ist dieser Aufbau sehr flexibel.

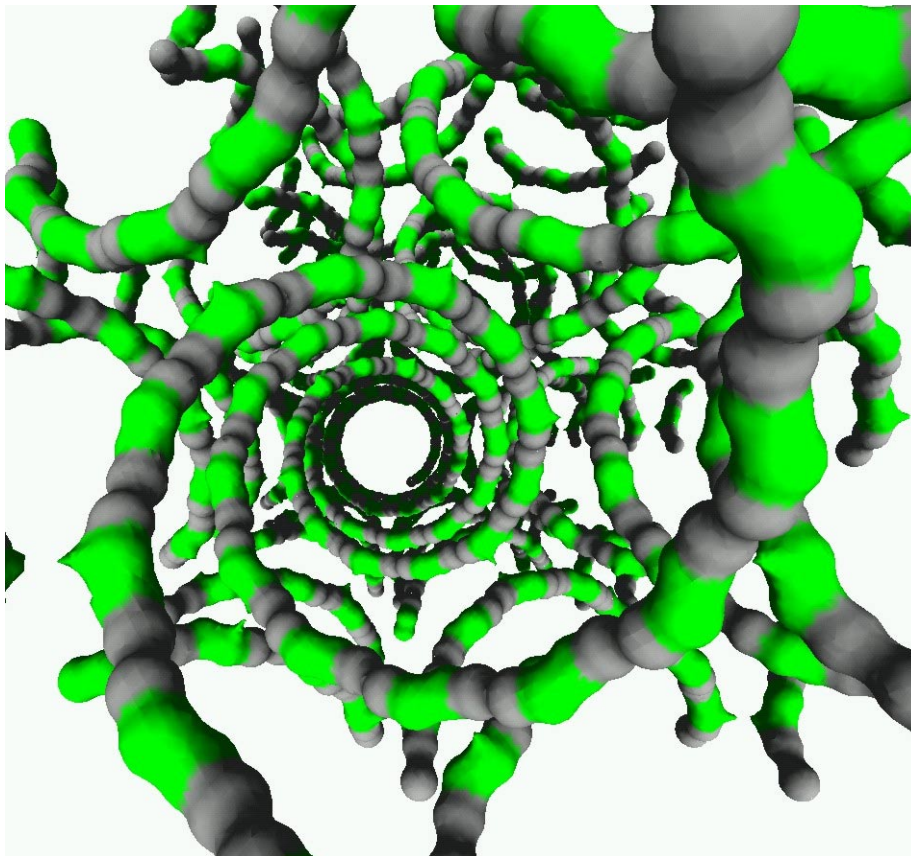


Abb. 22: Decaplanin in der zweiten hexagonalen Form

3.2.5. Vergleich der Strukturlösungsmethoden

Die Struktur von Decaplanin wurde in der vorliegenden Arbeit in vier verschiedenen Modifikationen mit vier verschiedenen Methoden gelöst. Ein Vergleich der Güte der verwendeten Methoden kann dadurch erhalten werden, daß die Phasen der Lösung mit denen der verfeinerten Struktur verglichen werden und ein mittlerer Phasenfehler berechnet wird.

Bezüglich der mit Direkten Methoden gelösten P2₁-Modifikation 3.2.1. zeigt sich, dass der mittlere Phasenfehler über alle Auflösungsbereiche bei lediglich 21.8° liegt. Dies ist von allen hier

behandelten Methoden das beste Ergebnis. Ein derart niedriger Phasenfehler läßt bei der Verfeinerung kaum Fehlinterpretationen erwarten.

Im Falle der mit SAS gelösten hexagonalen Form 3.2.4. des Decaplanins weist der mittlere gewichtete Phasenfehler nach der Anwendung von SHARP^[50] einen Betrag von 59° auf. Die anschließende Verwendung von dm^[51] konnte diesen auf 52.4° verringern. Diese Werte korrespondieren mit gut interpretierbarer Elektronendichte und lassen kaum Spielraum für Fehlinterpretationen.

Im Falle der hexagonalen Decaplaninform, die mit einem auf der anomalen Dispersion von Brom basierenden MAD-Experiment gelöst wurde (3.2.3.), wiesen die mittleren Phasenfehler überraschende Beträge auf. So waren vor der Verwendung von dm 78° zu verzeichnen. Mit dm stieg dieser schon vorher enorme Wert auf 83.8° an. Man erinnere sich an die im Zusammenhang mit den Positionen vermeindlicher Bromidanionen zusammenhängenden falschen Koordinaten. Eine Interpretation von Elektronendichte, die mit derartigen Fehlern behaftet ist, ist nur in diesem Fall eines starren Grundkörpers der aufzufindenden Moleküle möglich. Kein Protein mit unbekannter Sekundärstruktur hätte mit vergleichbaren Daten gelöst werden können.

Für den Fall des mit MR gelösten Decaplanins, können keine Phasenfehler angegeben werden, da die Lösung naturgemäß Koordinaten liefert. Es zeigt sich aber, daß MR-Lösungen bezüglich einer Phasenerweiterung mit dm nicht sehr zweckmäßig sind. Trotzdem muß natürlich der Tatsache Rechnung getragen werden, daß die größte Zahl der Makromolekülstrukturen mit dieser Methode gelöst wurden.

Die Decaplanistrukturen sind bezüglich ihrer biologischen Relevanz nicht mit den in 3.1. beschriebenen Peptidkomplexen zu vergleichen. Die strukturelle Ergiebigkeit ist eher gering. Eine Ausnahme bildet die zweite hexagonale Form in 3.2.4.. Deren spiralartiger Aufbau und ihr hoher Wassergehalt geben Anlaß zur Verwunderung. Aus Sicht der Ausbildung auf dem Gebiet der Proteinkristallographie waren aber gerade diese Strukturen besonders hilfreich. Es konnten alle, modernen Methoden zur Lösung des Phasenproblems bei Makromolekülen an unbekanntem Strukturen angewendet werden. Die so gewonnenen Erfahrungen führten letztendlich zur Strukturlösung des Tripeptidkomplexes in 3.1.3. mittels eines SAS-Experimentes.

Im Falle des MAD-Experimentes in 3.2.3. konnten die enormen Phasenfehler auf einen fehlerhaften Algorithmus aufmerksam machen, und so indirekt zur Methodenentwicklung beitragen. Neuere Berechnungen mit den vorliegenden Daten liefern adäquate Phasenfehler.

5. Literatur

- [1] Streyer, L., 1990, *Biochemie*, 4. Aufl.: Heidelberg, Spektrum der Wissenschaften, 205-207
- [2] < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> >
- [3] H. J. Behrens, (02.06.1997), Neue Killer-Salmonellen aufgetaucht , BILD-Zeitung
- [4] < <http://www.tagesschau.de> > (31.05.2000)
- [5] McPherson, A., 1985, *Methods in Enzymology* 114, 112-127.
- [6] Ducruix, A. & Giegé, R., 1992, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins*, 1. Aufl.: Oxford University Press, New York.
- [7] Mikol, V, Rodeau, J.-L. & Giegé, R., 1989, *J. Appl. Crystallogr.* 22, 155-161.
- [8] Arakali, S.V., Luft, J.R. & DeTitta, G., 1995, *Acta Cryst.* D51, 772-779.
- [9] Luft, J.R. & DeTitta, G., 1995, *Acta Cryst.* D51, 780-785.
- [10] Chayen, N.E., Shaw Stewart, P.D. & Blow, D.M., 1992, *J. Crystal Growth* 122, 176-180.
- [11] Shaw Stewart, P.D. & Khimasia, M., 1994, *Acta Cryst.* D50, 441-442.
- [12] Luft J.R., Wolfley J., Collins R., Bianca M., Weeks D., Juruca I., Rogers P., Glasgow J., Fortier S., DeTitta G.T., 2000, *Methods in macromolecular Crystallography*, 30th Course
- [13] Ducruix, A. & Giegé, R. in [6], 73-98.
- [14] Stura, E., Nemerow, G.R. & Wilson, I.A., 1992, *J. Crystal Growth* 122, 273-285.
- [15] Stura, E.A. & Wilson, I.A., 1990, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 1, 38-49.
- [16] Stura, E.A. & Wilson, in Ducruix, A. & Giegé, R., 1992, *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins*, 1. Aufl.: Oxford University Press, New York. 99-126.
- [17] Teng, T.-Y., 1990, *J. Appl. Crystallogr.* 23, 387-391.
- [18] Rodgers, D.W., 1994, *Structure* 2, 1135-1140.
- [19] Garman, E.F. & Mitchell, E.P., 1996, *J. Appl. Crystallogr.* 29, 584-587.
- [20] Mitchell, E.P & Garman, E.F., 1994, *J. Appl. Crystallogr.* 27, 1070-1074.
- [21] Weik M., Ravelli R.B.G., Kryger G., McSweeney S., Raves M.L., Harel M., Gros P., Silman I., Kroon J., Sussman J.L., 1999, *PNAS* 623- 628
- [22] Glusker, J.P., 1994, *Crystal Structure Analysis for Chemist and Biologists*, 1. Aufl.: VCH, New York, 39.
- [23] Giacovazzo, C., 1992, *Fundamentals of Crystallography*, 1. Aufl.: IUCr, Oxford University Press, 229-286.

- [24] Helliwell, J.R., 1992, *Macromolecular Crystallography with Synchrotron Radiation*, Cambridge University Press.
- [25] Gruner, S.M. & Ealick, S.E., 1995, *Structure* 3, 13-15.
- [26] Lewis, R., 1994, *J. Synchrotron Rad.* 1, 43-53.
- [27] Amemiya, Y., Satow, Y., Matsushita, T., Chikawa, J., Wakabayashi, K. & Miyahara, J., 1988, *Topics in Current Chemistry* 147, 121-144.
- [28] Hauptman, H., 1986, *Angew. Chem.* 98, 600-610.
- [29] Karle, J., 1986, *Angew. Chem.* 98, 611-626.
- [30] Schenk, H., 1991, *An Elementary Introduction to Direct Methods*, 1. Aufl.: Plenum Press, New York, 1-8.
- [31] Woolfsen, M.M., 1987, *Acta Cryst.* A43, 593-612.
- [32] Sayre, D., 1950, *Acta Cryst.* 5, 60-65.
- [33] Cochran, W., 1952, *Acta Cryst.* 5, 65-67.
- [34] Zachariasen, W.H., 1952, *Acta Cryst.* 5, 68-73.
- [35] Hauptman, H. & Karle, J., 1956, *Acta Cryst.* 9, 635-651.
- [36] Karle, J. & Karle, I., 1966, *Acta Cryst.* 21, 849-859.
- [37] Hauptman, H., 1974, *Acta Cryst.* A30, 472-476.
- [38] Schenk, H., 1974, *Acta Cryst.* A30, 477-481.
- [39] Schenk, H., 1981, *Acta Cryst.* A37, 573-578.
- [40] Sheldrick, G.M., 1990, *Acta Cryst.* A46, 467-473.
- [41] Z. Dauter, M.Dauter, 1999, *J. Mol. Biol.*, 289, 93-101.
- [42] Giacovazzo, C., 1992, *Fundamentals of Crystallography*, 1. Aufl.: IUCr, Oxford University Press, 141-226.
- [43] Sheldrick, G.M., 1999, *Vorlesugsscriptum: "Strukturchemie Teil II", VII:1*
- [44] Drenth, J., 1994, *Principles of Protein X-ray Crystallography*, 1. Auflage: Springer Verlag, New York.
- [45] Rossmann. M.G., 1972, *The Molecular Replacement Method*, Gordon and Breach, Science Publishers, Inc., New York.
- [46] Lattman, E., 1985, *Methods in Enzymology* 115, 55-77.
- [47] Rossmann, M.G., 1990, *Acta Cryst.* A46, 73-82.
- [48] M. Fujinaga, R. Read, „Experiences with a New Translation-Function Program“, 1987, *J. Appl. Cryst.*, 20, 517-521.
- [49] Kissinger C.R., Gelhaar D.K., Fogel D.B., 1999, *Acta. Cryst.* D55, 484-491.
- [50] De La Fortelle E., Bricogne G., 1997, *Methods in Enzymology* 276, 472-494.
- [51] Cowtan K. ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallographie, 1994, 31, 34-38.

- [52] D. E. McRee, „XtalView/Xfit—A Versatile Program for Manipulating Atomic Coordinates and Electron Density“, *J. Struct. Biol.*, 1999, 125, 156-165.
- [53] Sheldrick, G.M. & Schneider, T.R., 1997, *Methods in Enzymology*.
- [54] Sheldrick, G.M., 1996, SHELXL, Programm zur Strukturverfeinerung, Universität Göttingen.
- [55] Hendrickson, W.A. & Konnert, J.H., 1980, *Computing in Crystallography*, Hrsg.: R. Diamond, S. Ramaseshan & K. Venkatesan, IUCr & Indian Acad. Sci., Bangalore, Indien, 13.01-13.25.
- [56] Hirshfeld, F.L., 1976, *Acta Cryst.* A32, 239-244
- [57] Trueblood, K.N. & Dunitz, J.P., 1983, *Acta Cryst.* B39, 130-144
- [58] Rollet, J.S., 1980, *Crystallographic Computing*, Hrsg.: F. Ahmed, S.R. Hall & C.P. Huber, Munksgaard, Copenhagen, 167-181
- [59] Bernadinelli, G. & Flack, H.D., 1985, *Acta Cryst.* 41, 500-511.
- [60] Flack H.D. , 1983, *Acta Cryst.* A39, 876-881.
- [61] Gale, E.F., Cundliffe, E., Reynold, P.E., Richmond, M.H. & Waring, M.J., 1981, *The Molecular Basis of Antibiotic Action*, 2. Aufl.: Viley, London.
- [62] Reynolds, P.E., 1985, *Scientific basis of Antimicrobial Chemotherapy*, Hrsg.: D. Green and F.O.' Grady, Cambridge University Press, 18-22.
- [63] Neu, H.C., 1992, *Science* 257, 1064-1073.
- [64] Brant, M., Wingert, P. & Hager, P., 1994, *Newsweek* 123, 38-43.
- [65] McCormick, M.H., Stack, W.M., Pittenger, G.E., Pittenger, R.C. & McGuire, J.M., 1956, *Antibiot. Ann.* 1955-1956, 606-611.
- [66] Cunha, B.A., 1995, *Antimicrob. Therapy* 79, 817-831.
- [67] Levine, J.F., 1987, *Med. Clin. North. Am.* 71, 1135-1145.
- [68] McHenry, M.C. & Gavan, T.L., 1983, *Pediatric. Clinics of North America* 30, 31-47
- [69] Geraci, J.E., Hermans, P.E., 1983, *Mayo Clin. Proc.* 58, 88-91.
- [70] Alexander, M.R., 1974, *Drug. Intell. Clin. Pharm.* 8, 520-525.
- [71] Polk, R.E., Israel, D., Wang, J., Lenitz, J., Miller, J. & Stotka, J., 1993, *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 2139-2143.
- [72] Centers for Disease Control, 1993, *Nosocomial enterococci resistant to vancomycin - United States 1989-1993f. MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 42, 597-600.
- [73] Monthon, L. & Mainardi, J.L., 1996, *Current Opinion Infection Diseases* 9, 256-260.
- [74] Bauer, J., 1996, *New Scientist* 2065, 24-27.
- [75] Arthur, M. & Courvalin, P., 1993, *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 1563-1571.
- [76] Walsh, C.T., 1993, *Science* 261, 308-309.

- [77] Walsh, C.T., Fisher, S.I., Park, I-S., Prahalad, M. & Wu, Z., 1996, *Chemistry & Biology* 3, 21-28.
- [78] Wright, G.D. & Walsh, C.T., 1992, *Acc. Chem. Res.* 25, 468-473.
- [79] Bugg, T.D.H., Dutka-Malen, S., Arthur M., Courvalin, P. & Walsh, C., 1991, *Biochemistry* 30, 2017-2021.
- [80] Waltho, J.P. & Williams, D.H., 1989, *J. Am. Chem. Soc.* 111, 2475-2480.
- [81] Groves, P., Searle, M.S., Mackay, J.P. & Williams, D.H., 1994, *Structure* 2, 747-754.
- [82] Groves, P., Searle, M.S., Chicarelli-Robinson, J. & Williams, D.H., 1994, *J. Chem. Soc. Perkins Trans. I*, 659-665.
- [83] Molinari, H., Pastore, A., Lian, L., Hawkes, G.E. & Sales, K., 1990, *Biochemistry* 29, 2271-2277.
- [84] Williams, D.H., Williamson, M.P., Butcher, D.W. & Hammond, S.J., 1983, *J. Am. Chem. Soc.* 105, 1332-1339.
- [85] Williams, D.H. & Butcher, D.W., 1981, *J. Am. Chem. Soc.* 103, 5697-5700.
- [86] MacKay, J.P., Gerhard, U., Beauregard, D.A., Westwell, M.S., Searle, M.S. & Williams, D.H., 1994, *J. Am. Chem. Soc.* 116, 4581-4590.
- [87] Beauregard, D.A., Williams, D.H., Gwynn, M.N. & Knowles, D.J.C., 1995, *Antimicrob. Agents Chemotherapy* 39, 781-785.
- [88] Prowse, W.G., Kline, A.D., Skelton, M.A. & Loncharich, J., 1995, *Biochemistry* 34, 9632-9644.
- [89] Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissing H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. *Nucleic Acid Research*, 28 235-242, 2000
- [90] Schäfer, M., Sheldrick, G.M., Schneider, T.R. & Vértesy, L., 1997, *Acta Cryst. D*
- [91] Evans D.A., Wood M.R., Trotter B.W., Richardson T.I., Barrow J.C., Katz J.L., *Angew. Chem* 1998, 110, Nr. 19
- [93] Silfhout, R. G. & Hermes C., 1995, *Rev. Sci. Instrum.* 66, 11818-1820.
- [94] Z. Otwinowski, W. Minor, *Methods Enzymol.*, 1997, 276, 307-326.
- [95] Schäfer, M., Schneider, T.R. & Sheldrick, G.M. 1996 *Structure* 4, 1509-1515
- [96] Sheldrick, G.M. 1997 XPREP, Programm zur Datenanalyse, Universität Göttingen.
- [97] Prowse, W.G., Kline, A.D., Skelton, M.A. & Loncharich, J., 1995 *Biochemistry* 34, 9632-9644.
- [98] Allen F.H., Bellard S. Brice M.D., Cartwright B. A., Doubleday A., Higgs H., Hummelink T., Hummelink-Peters B.G., Kennard O., Motherwell W.D.S., Rodgers J.R., Watson D.G. *Acta. Cryst. B*35, 2331-2339, 1979
- [99] Schneider T.R. *Acta. Cryst. D*56, 714-721, 2000
- [100] Vértesy, L., Fehlhäber, H.-W., Kogler, H. & Limbert, M. *J. Antibiot.* 49, 115-118, 1996

-
- [101] Europäische Patentschrift: 89 115 519.4
- [103] SAINT Programm zur Datenintegration, Siemens analytical X-ray systems Inc. Madison, Version 4.05, 1995
- [104] Sheldrick, G.M. SADABS Programm zur Absorptionskorrektur von Flächenzählerdaten, Universität Göttingen, 1996
- [105] <<http://www.hamptonresearch.com>>.
- [106] Hope H. ACS Symposium No. 357, pp 257-262, 1987
- [107] J. Kärcher, „Das *bond valence*-Modell als strukturchemische Verifizierungs-Methode“, Diplomarbeit, Universität Göttingen, 1996.
- [108] Hewitt M. *Diplomarbeit*, Universität Göttingen, (unveröffentlicht)
- [109] R. M. Esnouf, *J. Mol. Graph. Model*, 1997, 15, 132-134.
- [110] P. J. Kraulis, „*MOLSCRIPT*: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures“, *J. Appl. Cryst.*, 1991, 24, 946-950.

6 Publikationen

a) Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Helmut Werner Wolfram Stür, Matthias Laubender, Christopher Lehmann, and Regine Herbst-Irmer; **Stable Osmium Hydrido-Carbene Complexes with CH₂ and Secondary Carbenes CHR as Ligands**, *Organometallics*; **1997**; 16, 2236-2238.

Olexandr I. Guzyr, Mark Schormann, Jürgen Schimkowiak, Herbert W. Roesky, Christopher Lehmann, Mrinalini G. Walawalkar, Ramaswamy Murugavel, Hans-Georg Schmidt, and Mathias Noltemeyer; **Conversion of Alkyltantalum Chlorides to Fluorides Using Trimethyltin Fluoride as a Fluorinating Agent of (p-MeC₆H₄CH₂)₃TaF₂, (Me₃SnCl*Me₃SnF*TaF₅)_n, (Me₃Si)₂CHTaCl₄, {(Me₃Si)₂CHTaCl₄*[(Me₃Si)₂CH]₂Ta₂Cl₆(μ₂-O)}**, and (Me₃Si)₂CHTaF₄, *Organometallics*; **1999**; 18, 832-836.

Helmut Werner, Wolfram Stür, Justin Wolf, Matthias Laubender, Birgit Werberdörfer, Regine Herbst-Irmer, and Christopher Lehmann; **Hydrido(carbene), Hydrido(diazoalkane), Aqua(Carbene), and Vinyl(carbene) Complexes of Osmium(II)**, *Eur. J. Inorg. Chem.*; **1999**; 1889-1897.

Olexandr I. Guzyr, Jörg Prust, Herbert W. Roesky, Christopher Lehmann, Markus Teichert, and Fanica Cimpoesu; **Hydrolysis of (5-C₅Me₅O)MMe₄ (M=Mo,W) and the Formation of Organometallic Oxides with 3-Ch Methylidyne and -CH₂ Methylidene Groups: Model Compounds for Catalysis on Metal Oxide Surfaces**, *Organometallics* **2000**; 19(8); 1549-1555.

b) Vorträge und Posterpräsentationen

C. Lehmann, G. M. Sheldrick; **Vancomycin derivatives and their complexes with cell-wall models**, International School of Crystallography 31st Course (Erice), **2000**.

Technisches

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Programm Word 2000 erstellt.

Die Abbildungen 1-3 wurden mit dem Programm CorelDRAW 9 erstellt.

Alle Abbildungen von kristallographischen Molekülstrukturen mit Ausnahme von Abbildung 20 wurden mit den Programmen BOBSCRIPT^[109] und RASTER3D^[110] berechnet.

Für die Abbildung 14 wurde das Programm ChemWindow verwendet.

Die Abbildung 20 wurde mit einem Programm erstellt, das Gegenstand der Diplomarbeit von Herrn M. Hewitt war.