Mersacidin-analoge Typ-B-Lantibiotika – Kristallisation, Datensammlung und Strukturaufklärung

---

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jörg Kärcher

aus Höxter

Göttingen 2000

D 7

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

Korreferent: Prof. Dr. J. Magull

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2000

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 allgemeinen kristallographischen Fragen gab. Darüber hinaus danke ich ihm und allen MitarbeiterInnen der Abteilung für die gute Zusammenarbeit und ständige Hilfsbereitschaft.

Für die Durchsicht und Korrektur der Manuskripte danke ich Frau Dr. R. Herbst-Irmer, Herrn Dr. T. R. Schneider, Herrn Dipl.-Chem. P. Müller, Frau S. Kärcher und Herrn T. Pape.

Herrn Dr. L. Vértesy sei für die großzügige Spende der Lantibiotika Mersacidin, Actagardin sowie Ala(0)-Actagardin und insbesondere für die sehr aufschlußreichen Gespräche über biologische und biochemische Aspekte dieser Verbindungen gedankt.

Herrn Prof. Dr. C. Griesinger danke ich für die freundliche Überlassung der Strukturdaten der NMR-Analyse des Mersacidins.

Den Herren Dr. L. Lubini, Dr. E. Pohl und Dr. T. R. Schneider danke ich für die langjährige Zusammenarbeit am Mersacidin-Projekt.

Bei Frau Dr. E. Garman bedanke ich mich für die Anfertigung der *microPIXE*-Analyse des Actagardin-Lyophilisats.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

2 Mersacidin-analoge Typ-B-Lantibiotika 3

2.1 Lanthionine 3

2.2 Lantibiotika 4

2.3 Mersacidin-analoge Typ-B-Lantibiotika 5

3 Röntgenstruktur des Mersacidins 8

3.1 Kristallisation 8

3.2 Datensammlung 9

3.3 Strukturlösung 9

3.4 Strukturverfeinerung 11

3.5 Interpretation der Struktur 15

4 Röntgenstruktur des Actagardins 22

4.1 Kristallisation 22

4.2 Datensammlung 23

4.3 Strukturlösung 24

4.4 Strukturverfeinerung 24

4.5 Interpretation der Struktur 29

5 Röntgenstruktur des Ala(0)-Actagardins 36

5.1 Kristallisation 36

5.2 Datensammlung 37

5.3 Strukturlösung 38

5.4 Strukturverfeinerung 38

5.5 Interpretation der Struktur 41

6 Postulierter Wirkmechanismus Mersacidin-analoger Lantibiotika 51

6.1 Bakterielle Zellwandbiosynthese 51

6.2 Postulierter Wirkmechanismus Mersacidin-analoger Lantibiotika 54

7 Zusammenfassung und Ausblick 56

8 Literaturverzeichnis 59

9 Publikationen 65

10 Lebenslauf 66

Abkürzungsverzeichnis

Aba	*aminobutyric acid*
Ala	Alanin
Ac	Acetat
bzw.	beziehungsweise
CCD	*charge coupled device*
Csx	Cysteinoxid
Cys	Cystein
Dal	D-Alanin
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
d.h.	das heißt
Dha	α,β-Didehydroalanin
Dhb	α,β-Didehydroaminobuttersäure
Dhl	Dehydrolanthionin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	*European Macromolecular Biology Laboratory*
Et	Ethyl
et al.	und andere
GlcNAc	*N*-Acetylglucosamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
Ile	Isoleucin
Kap.	Kapitel
Leu	Leucin
Me	Methyl
MIC	*minimal inhibitory concentration*
MurNAc	*N*-Acetylmuraminsäure
n/a	*not available*
NY	*New York*
Occ	*occupancy*
PEG	Polyethylenglykol
Phe	Phenylalanin

PIXE	*proton-induced X-ray emission*
Pro	Prolin
S.	Seite
SAS	*single-wavelength anomalous scattering*
Ser	Serin
Trp	Tryptophan
u.a.	unter anderem
U.S.A.	*United States of America*
Val	Valin
vgl.	vergleiche
v. u.	*valence units*
z. B.	zum Beispiel

Technisches

Mit Ausnahme der Abbildungen 15 und 16 wurden alle Strukturbilder von Mersacidin, Actagardin und Ala(0)-Actagardin mit den Programmen *BOBSCRIPT*[1,2] und *RASTER3D*[3] berechnet. Die Abbildungen 15 und 16 sind mit *XP*[4] erstellt worden.

Für alle *Least-Squares*-Überlagerungen der Moleküle wurde das Programm *LSQKAB*[5] aus der *CCP4*-Suite[6] verwendet. Die RAMACHANDRAN-Plots basieren auf den Ergebnissen des Programmes *ANGLES*, das ebenfalls in der *CCP4*-Suite enthalten ist.

1 Einleitung[7-9]

Seit der Mensch gelernt hat, antibiotisch wirkende Therapeutika im Kampf gegen bakterielle Infektionen einzusetzen, nimmt er Teil an einem seit Urzeiten andauernden Wettstreit zwischen antibiotikaproduzierenden und gegen Antibiotika resistenzbildenden Organismen. Die Euphorie der siebziger Jahre, als Infektionskrankheiten weitgehend besiegt geglaubt waren, ist längst der Realität multiresistenter Bakterienstämme wie *Staphylococcus aureus*, *Myobacterium tuberculosis* oder *Enterococcus faecalis* gewichen. Der zum Teil unverantwortliche Einsatz der Antibiotika im Ackerbau und in der Viehzucht, aber auch die übermäßige Inanspruchnahme antibiotischer Medikamente in der Humanmedizin haben die Waffen stumpf werden lassen.

Neben teil- oder totalsynthetischen Derivaten der bewährten Antibiotika, die den resistenzverleihenden Mechanismen der Bakterien entgehen, ist die Suche nach neuen Medikamenten mit innovativen Wirkmechanismen, die bislang ungenutzte Schwachstellen der Bakterien angreifen, von großer Bedeutung. Je diversifizierter die Palette der zur Verfügung stehenden Antibiotika ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Kreuzresistenzen einer einzelnen Bakterienspezies und desto größer ist die Chance, eine bakterielle Infektion behandeln zu können.

Zum Verständnis der Wirkungsweise eines Antibiotikums und zum Design neuer oder abgewandelter Antibiotika ist die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur der Moleküle unabdingbar. Die wichtigsten Methoden zur Strukturaufklärung dieser Substanzen sind die NMR-Spektroskopie[10] (kernmagnetische Resonanz) und die Einkristallröntgenstrukturanalyse. Beide Verfahren basieren auf völlig verschiedenen physikalischen Prinzipien und ergänzen sich gegenseitig. So können beispielsweise Unterschiede zwischen den Konformationen einer Verbindung in Lösung (NMR-Analyse) und im Festkörper (Kristallstruktur) aufgedeckt und daraus Rückschlüsse auf variable Bereiche innerhalb des Moleküls gezogen werden. Auf Basis dieser Unterschiede ist dann gegebenenfalls die Eruierung von Wirkungsmechanismen biologisch aktiver Substanzen möglich.

Das Thema der vorliegenden Dissertation ist die Bestimmung und Interpretation der Kristallstrukturen von *Mersacidin*, *Actagardin* und *Ala(0)-Actagardin*. Die drei Wirkstoffe bilden einen Subtyp der *Lantibiotika*, eine Wirkstoffklasse mit einzigartigen Strukturelementen und bislang zum Teil unbekannten Wirkmechanismen. Diese An-

tibiotika werden derzeit nicht in der Humanmedizin eingesetzt und die auf sie ansprechenden Bakterien zeigen bislang keine Kreuzresistenzen zu Vancomycin, einem bei der Behandlung bakterieller Infektionen als Reserve für Notfälle dienenden Glycopeptidantibiotikum.

2 Mersacidin-analoge Typ-B-Lantibiotika

2.1 Lanthionine

1941 veröffentlichten HORN *et al.*[11] ihre Ergebnisse zur sauren Hydrolyse von zuvor eine Stunde in schwach konzentrierter Na_2CO_3-Lösung gekochter Wolle. Sie isolierten eine schwerlösliche schwefelhaltige Substanz, die sich als *Bis-(2-amino-2-carboxyethyl)-sulfid* erwies und der sie den Trivialnamen *Lanthionin* gaben, abgeleitet aus den griechischen Begriffen für Wolle (λανος, lanos) und Schwefel (θειον, theion).

Später konnten als natürlich auftretende Derivate dieses *meso*-Lanthionins u. a. das *β-Methyllanthionin*, *β-Methyllanthioninsulfoxid*, sowie die decarboxylierte Variante cis-*2-Aminovinyl-3-*S*-methyl-*D*-cystein* identifiziert werden.

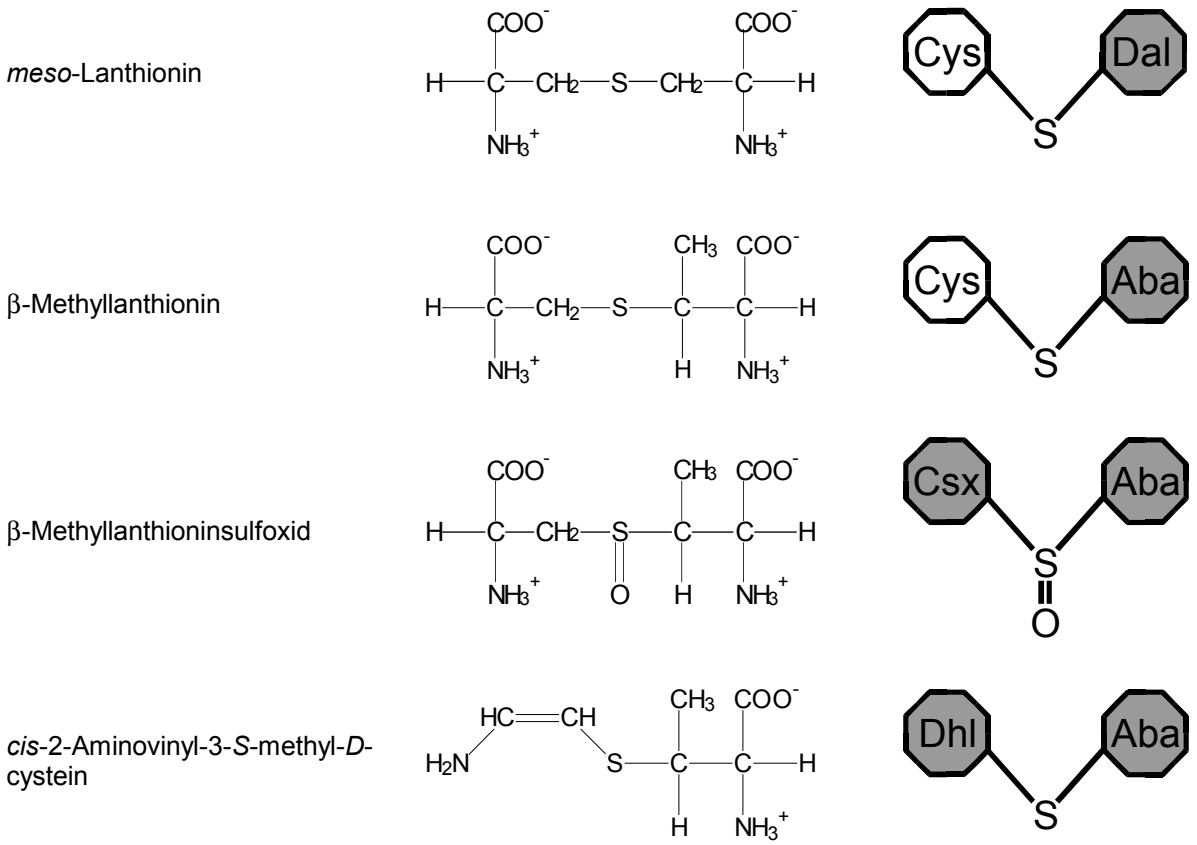


Abbildung 1: FISCHER-Projektionen und schematische Darstellungen einiger Lanthionin-Derivate.

Die Konfiguration der α-Kohlenstoffatome ermittelte ALDERTON[12] 1953 am Beispiel des β-Methyllanthionins durch reduktive Entschwefelung mit RANEY-Nickel und anschließenden Vergleich der Drehwerte der optisch aktiven Komponenten mit ihren synthetisch erzeugten Äquivalenten. Die Konfiguration des stereogenen β-Kohlenstoffatoms konnte 1975 durch KNOX *et al.*[13] anhand einer Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden.

2.2 Lantibiotika[14-16]

Neben Wolle enthalten auch andere Naturstoffe diese ungewöhnlichen Aminosäuren. Zu diesen gehören u.a. Vogelfedern, Haare und eine Klasse von Peptidantibiotika, die *Lan*thionin-haltigen An*tibiotika* oder kurz *Lantibiotika*.

In den letztgenannten sind die Lanthionine mit ihrer Bis-Aminocarbonsäurefunktion an zwei Positionen der Proteinhauptkette gebunden und bilden somit Ringstrukturen aus, die über charakteristische Monosulfidbrücken geknüpft werden.

Lantibiotika werden ausschließlich von GRAM-positiven Bakterienstämmen produziert. Ausgangspunkt ist in allen Fällen ein ribosomal synthetisiertes *Prälantibiotikum*, das aus einer *Leadersequenz* und einem *Prolantibiotikum* besteht, welches posttranslational enzymatisch modifiziert wird.

Der erste Schritt dieser Modifikation ist die Eliminierung von Wasser aus den Hydroxyaminosäuren *Serin* und *Threonin*. Das entstehende α,β-Didehydroalanin (Dha) bzw. die α,β-Didehydroaminobuttersäure (Dhb) wird daraufhin nucleophil in einer stereospezifischen MICHAEL-Addition von einer *Cystein*-Seitenkette intramolekular angegriffen und das entsprechende *meso*-Lanthionin bzw. β-Methyllanthionin gebildet. In Einzelfällen kann anschließend die Oxidation zum Sulfoxid oder durch dehydrierende Decarboxylierung die Bildung eines Enolthioethers erfolgen.

Gegenüber Cystein überzähliges Serin und Threonin, das nach der Eliminierung nicht zum Lanthionin umgesetzt werden kann, verbleibt in seiner ungesättigten Form im finalen Lantibiotikum. Sowohl Serin als auch Threonin können aber auch, vermutlich durch den schützenden Einfluß der Leadersequenz des Prälantibiotikums, unverändert in einigen Lantibiotika auftreten.

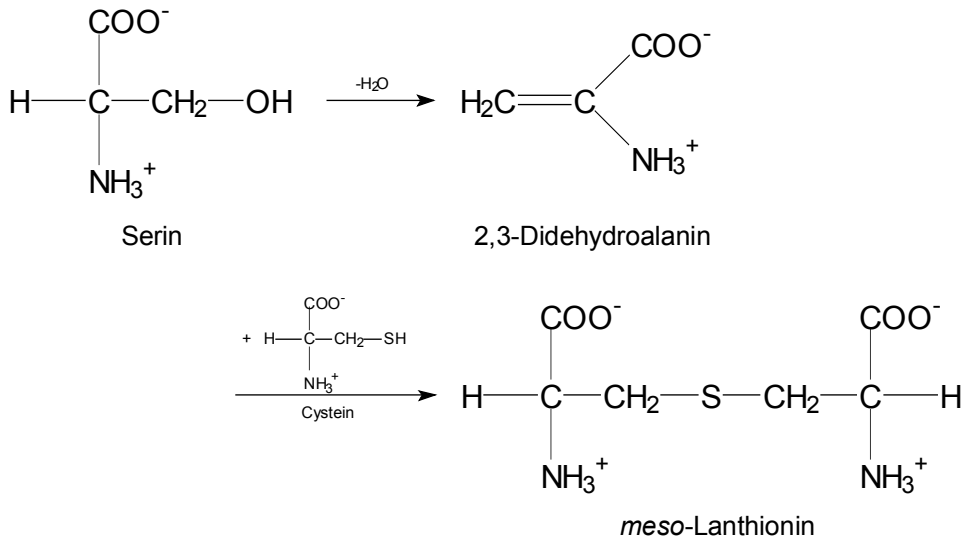


Abbildung 2: Syntheseweg des *meso*-Lanthionins. Alle stereogenen Zentren sind als FISCHER-Projektionen dargestellt.

Der finale Schritt in der Synthese der Lantibiotika besteht in der Abtrennung der Leadersequenz. Die Moleküle besitzen unmittelbar danach ihre antibiotische Aktivität.

2.3 Mersacidin-analoge Typ-B-Lantibiotika

Die Lantibiotika werden gemäß JUNG[14] nach ihrer Wirkungsweise und ihrer räumlichen Struktur in die Typen *A* und *B* unterteilt. Diese, später von SAHL *et al.*[15] korrigierte Kategorisierung, definiert die in der Bakterienzellwand porenbildenden, schraubenförmigen Lantibiotika als Typ A. Dagegen sind die Varianten des Typ B von globularer Gestalt und greifen in die Zellwandbiosynthese der Bakterien ein. Sie werden weiter in die *Cinnamycin*-analogen, enzyminhibierenden und *Mersacidin*-analogen, Lipid-II-komplexierenden (vgl. Kap. 6) Subtypen klassifiziert.

Letztere Gruppe von Lantibiotika enthält neben dem namensgebenden Mersacidin[17] auch das *Actagardin* (früher *Gardimycin*[18] genannt) und als natürlich auftretende Variante desselben das *Ala(0)-Actagardin*[19].

Mersacidin wird vom Bakterienstamm *Bacillus HIL 85,54728* produziert. Der Bakterienstamm *Actinoplanes liguriae ATCC 31048* liefert je nach der Zusammensetzung des Kulturmediums sowohl Actagardin als auch Ala(0)-Actagardin.

Die Peptidsequenzen von Mersacidin und Actagardin weisen eine Abfolge von acht Aminosäuren mit hoher Sequenzhomologie auf. Dieser Bereich ist mit Ausnahme von nur einer Aminosäure in allen Mersacidin-analogen Lantibiotika konserviert und wird daher allgemein als das aktive Zentrum dieser Verbindungen angesehen:

```
 1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15  16  17  18  19  20        <-  Mersacidin
Aba-Cys-Phe-Aba-Leu-Pro-Gly-Gly-Gly-Gly-Val-Cys-Aba-Leu-Aba-Dha-Glu-Cys-Ile-Dhl
                        Dal-Ser-Gly-Trp-Val-Cys-Aba-Leu-Aba-Ile-Glu-Cys-Gly-Aba-Val-Ile-Cys-Ala-Csx
Actagardin  ->           1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15  16  17  18  19
```

Die dem N-Terminus nahestehenden aromatischen Aminosäuren Phe3 im Mersacidin und Trp4 im Actagardin stellen eine weitere Gemeinsamkeit dar.

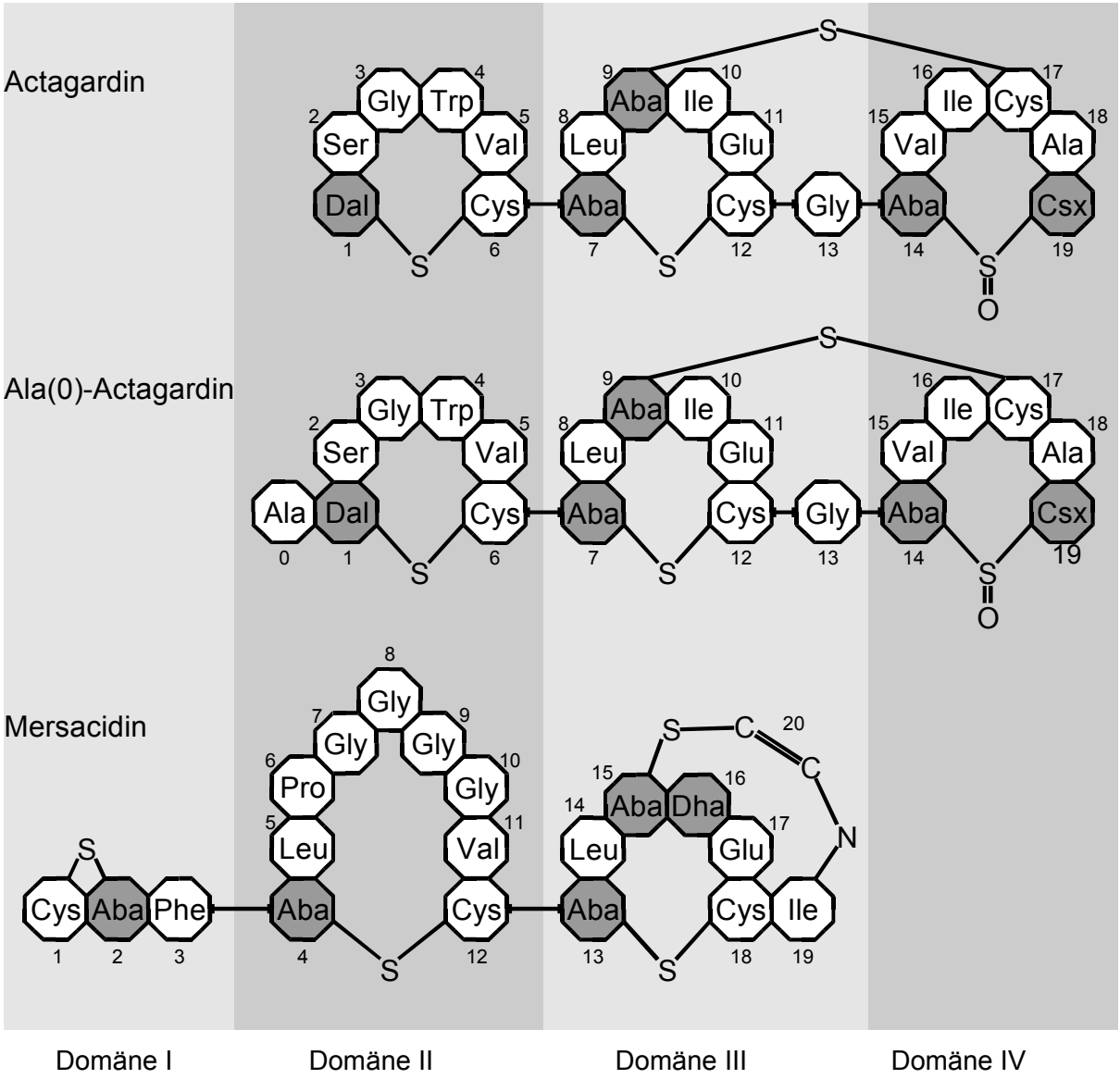


Abbildung 3: Unterteilung von Actagardin, Ala(0)-Actagardin und Mersacidin in relativ zueinander bewegliche Domänen.

PRASCH *et al.*[20] erkannten erstmals die Unterteilung von Mersacidin in drei relativ zueinander bewegliche Domänen. Eine ähnliche Segmentierung ist auch für Actagardin und Ala(0)-Actagardin sinnvoll und soll in den folgenden Kapiteln zur Referenzierung der entsprechenden Bereiche der Lantibiotika herangezogen werden (Abb. 3).

Strukturell sind die Mersacidin-analogen Lantibiotika bislang ausschließlich spektroskopisch durch Kernspinresonanz untersucht worden, und obwohl zumindest für den erwähnten konservierten Bereich der Peptidsequenz dieselbe dreidimensionale Struktur zu erwarten ist, unterscheiden sich die NMR-Modelle des Actagardins von ZIMMERMANN *et al.*[21] und des Mersacidins von PRASCH *et al.*[20] deutlich (Abb. 4).

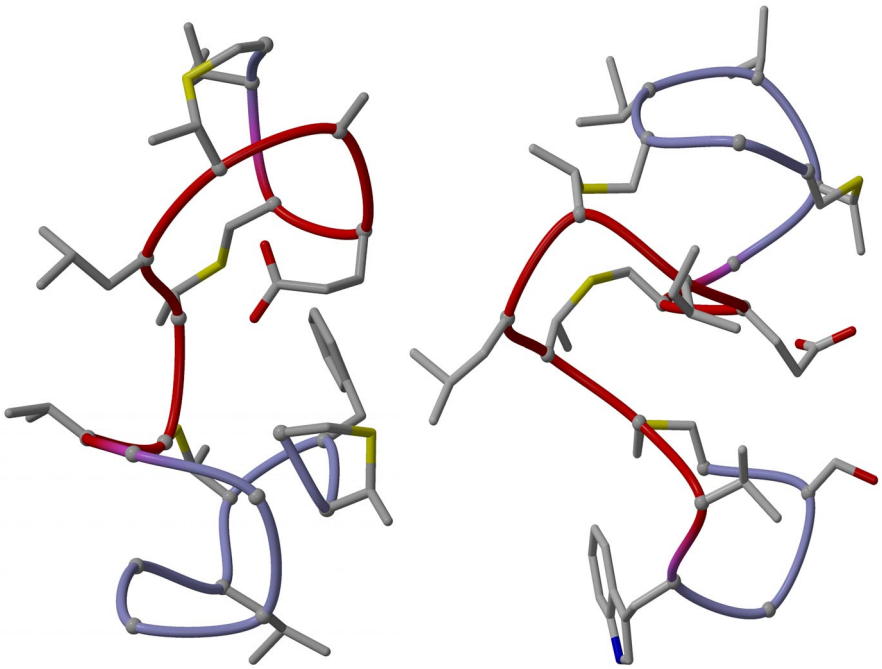


Abbildung 4: NMR-Modelle von Mersacidin (links) und Actagardin (rechts). Der konservierte Bereich der Peptidsequenz ist in rot hervorgehoben. Die mittlere Abweichung der Atomkoordinaten der Cα-Atome des konservierten Bereichs beträgt 1.67 Å.

Die folgenden drei Kapitel werden jedoch zeigen, daß sowohl die NMR- und Kristallstrukturen von Mersacidin, als auch die Röntgenstrukturanalysen von Actagardin und Ala(0)-Actagardin sehr ähnliche Konformationen des konservierten Bereichs besitzen. Daher sind alle *Least-Squares*-Überlagerungen, die in den folgenden Kapiteln gezeigt und beschrieben werden, auf der Überlagerung der Cα-Atome von Cys12 bis Cys18 im Mersacidin bzw. Cys6 bis Cys12 im Actagardin / Ala(0)-Actagardin basiert.

3 Röntgenstruktur des Mersacidins[22]

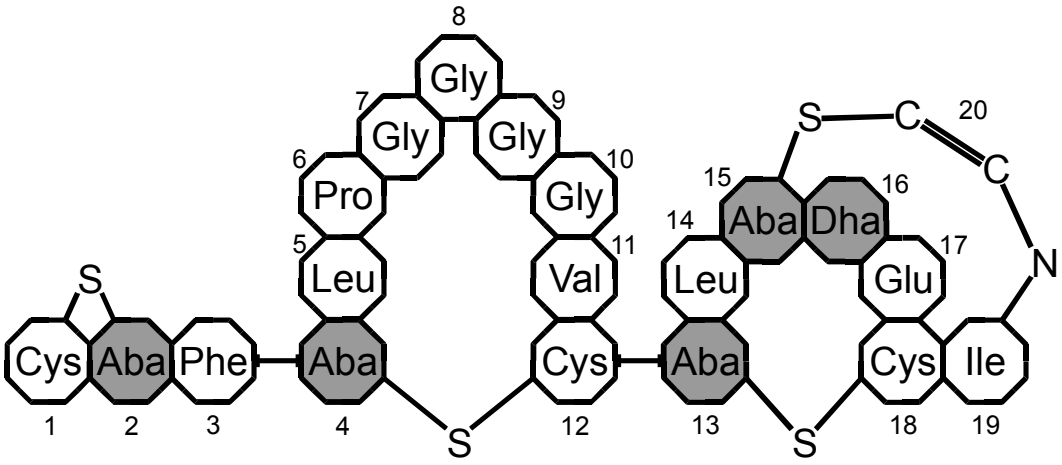


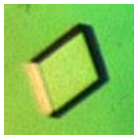
Abbildung 5: Peptidsequenz des Mersacidins.

3.1 Kristallisation

Kristalle von Mersacidin mit Kantenlängen von 300 µm können innerhalb von 10 Tagen bei einer Konzentration von 50 mg/mL aus der Lösung eines 1:1 Gemisches von Methanol und Benzol durch langsame Evaporation des Solvens bei Raumtemperatur erhalten werden[23].

Die dabei auftretenden Kristallhabiti zeigen sämtlich trigonale Symmetrie und werden von trigonalen und rhombischen Prismen nebst weiteren, eher unregelmäßigen Formen dominiert. Bereits diese Variabilität des Erscheinungsbildes der entstehenden Kristalle läßt auf das Vorhandensein einer möglichen Verzwillingung schließen, wie in den folgenden Abschnitten anhand der experimentellen Daten dargelegt werden soll.

Tabelle 1: Kristallisationsbedingungen von Mersacidin.

Ingredienz	rhombische Prismen
Mersacidin	 50 mg/mL in MeOH:C_6H_6=1:1

3.2 Datensammlung

Die Sammlung der Diffraktionsdaten fand an der *EMBL*-Beamline *BW7B* des *DORIS*-Speicherringes am *DESY* in Hamburg statt. Die Wellenlänge betrug 0.865 Å. Als Detektor kam das Imageplate-System der Firma *MAR* mit 180 mm Durchmesser zum Einsatz. Der Kristall wurde, in perfluoriertem Polyetheröl eingebettet, auf einem Glasfaden im Stickstoffstrom eines *Oxford Cryostream* bei 100 K schockgefroren[24].

Bei Kristall-Detektor-Abständen von 79, 135 und 240 mm wurden Daten mit maximalen Auflösungen von 1.06, 1.50 und 3.00 Å aufgenommen. Zur Integration und Skalierung der Daten dienten die Programme *DENZO*[25], *SCALEPACK*[25] und *XPREP*[26].

Die Elementarzelle besitzt hexagonale Metrik mit den Kantenlängen a=b=46.09 Å und c=31.02 Å.

3.3 Strukturlösung

Die Analyse der Röntgendaten mit *XPREP*[26] liefert als mögliche Raumgruppen $P3_1$ und $P3_2$. Die höhersymmetrischen Raumgruppen $P3_121$ und $P3_221$ bzw. $P3_112$ und $P3_212$ besitzen zwar wie erwartet höhere, aber deutlich unterschiedliche R_{int}-Werte*).

Raumgruppen	R_{int} [%]
$P3_1$ / $P3_2$	4.9
$P3_121$ / $P3_221$	19.5
$P3_112$ / $P3_212$	44.3

Der vergleichsweise niedrige R_{int}-Wert für die Raumgruppen $P3_121$ bzw. $P3_221$ ist ein starkes Indiz für eine Verzwillingung und wird unterstützt durch den Wert 0.649 der $|E^2-1|$-Statistik, der gegenüber dem Erwartungswert für azentrische Raumgruppen von 0.736 deutlich zu gering ausfällt[27]. Daraus ergibt sich, daß Mersacidin in $P3_1$ oder $P3_2$ kristallisiert, aber über ein Zwillingsgesetz, das einer zweizähligen Achse entlang der kurzen Diagonale der Elementarzelle entspricht, verzwillingt ist.

---

*) $R_{int} = \sum \left| F_o^2 - \overline{F_o^2} \right| \Big/ \sum F_o^2$

Der Symmetrieoperator der Verzwillingung entspricht folgender Rotationsmatrix:

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

Beim Beugungsexperiment findet eine Überlagerung der reziproken Gitter beider Zwillingsdomänen statt. Die dabei auftretende Mittelung der Reflexintensitäten ist Ursache für den zu kleinen Wert der $|E^2-1|$-Statistik und kann mathematisch für jeden Reflex als Linearkombination zweier Intensitäten angesehen werden.

Aus den beiden Domänen A und B stammen die zwillingsverwandten Reflexe hkl und h'k'l'. Bei einer partiellen Verzwillingung tragen die Domänen unterschiedlich stark zum beobachteten Beugungsbild bei, so daß eine gewichtete Mittelung mit dem Faktor *k* als Gewichtungsfaktor vorliegt:

$$I_{hkl} = (1-k) \times I_{A,hkl} + k \times I_{B,h'k'l'}$$
$$I_{h'k'l'} = k \times I_{A,hkl} + (1-k) \times I_{B,h'k'l'}$$

Dieses lineare Gleichungssystem kann zur Aufspaltung der gemittelten Intensitäten benutzt werden. Voraussetzung ist allerdings ein von 0.5 verschiedener Wert für *k*, da sonst das folgende Gleichungssystem nicht lösbar ist[28]:

$$I_{A,hkl} = [(1-k) \times I_{hkl} - k \times I_{h'k'l'}] / (1-2k)$$
$$I_{B,h'k'l'} = [(1-k) \times I_{h'k'l'} - k \times I_{hkl}] / (1-2k)$$

Auf diese Weise konnten die Röntgendaten des Mersacidins entzwillingt werden. Als Indikator für die Wahl des *k*-Wertes diente der $|E^2-1|$-Wert der entzwillingten Daten. Das Optimum liegt bei $k = 0.2$[29].

Tabelle 2: Entzwillingung der Röntgenstrukturdaten des Mersacidins für verschiedene Verhältnisse der beiden Zwillingsdomänen (Verzwillingungsfaktor *k*)[29].

Verzwillingungsfaktor *k*	$\|E^2-1\|$	R_{int} ($P3_221$)	$\langle I/\sigma \rangle$
0.0	0.643	0.195	14.91
0.1	0.675	0.241	13.11
0.2	**0.736**	**0.318**	**10.76**
0.3	0.838	0.471	7.94

Die Strukturlösung des Mersacidins erfolgte mit dem Programm *SHELXD*[30,31] in der Raumgruppe $P3_1$ auf Basis der entzwillingten Daten. Der 435. Versuch lieferte einen Korrelationskoeffizienten von 24.5% zwischen den beobachteten und berechneten normalisierten Strukturfaktoren*). In der anschließenden Optimierung der *Peaklist*[33] konnte dieser Wert auf 71.0% verbessert werden.

Das Ergebnis zeigte sechs unabhängige Mersacidin-Moleküle in der asymmetrischen Einheit und enthielt 397 der 468 Hauptketten- und 229 der 282 Seitenkettenatome, sowie einige Atome des Lösungsmittels.

3.4 Strukturverfeinerung

Die Atompositionen der Strukturlösung zeigten zum Teil starke Verzerrungen, die auf signifikante Fehler in den Intensitäten des entzwillingten Datensatzes hindeuteten. Die Verfeinerung mit *SHELXL*[34] fand daher gegen die verzwillingten Daten statt. Das Programm bietet die Möglichkeit, über die *TWIN*-Instruktion eine Zwillingsmatrix anzugeben und nach der Methode von PRATT *et al.*[35] und JAMESON *et al.*[36] durch eine gewichtete Mittelung der zwillingsverwandten Reflexe Strukturfaktoren zu berechnen, die dem verzwillingten Datensatz entsprechen. Parallel dazu wird der Verzwillingungsfaktor *k*, der für die gewichtete Mittelung benutzt wird, verfeinert (*BASF*-Instruktion).

Zunächst erfolgte die Umbenennung der aus der Strukturlösung erhaltenen Atome gemäß der Nomenklatur des Mersacidins und damit auch die Zuordnung der korrekten Elemente zu den Atomen. Dabei stellte sich heraus, daß die Moleküle die falsche Chiralität besaßen und sowohl die Koordinaten als auch die Raumgruppe invertiert werden mußten. Die wahre Raumgruppe ist somit $P3_2$.

Neben den *Restraints* für Standardaminosäuren nach ENGH und HUBER[37] stellten für die Lanthioninbrücken intra- und intermolekulare Ähnlichkeitsrestraints, deren Ziel-

---

*) Korrelationskoeffizient nach FUJINAGA *et al.*[34]:

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

werte durch den Einsatz freier Variablen*) nicht vorgegeben waren, ein geeignetes Mittel dar, um die aus der Strukturlösung resultierten Verzerrungen zu korrigieren. Unter Ausnutzung der lokalen nicht-kristallographischen Symmetrie sind so aus den 18 unabhängigen Kopien des β-Methyllanthionins zuverlässige Standardbindungslängen und -winkelabstände für diese Aminosäure bestimmt worden (Tab. 4).

Mit den Programmen *XP*[4] und *XTALVIEW*[38] konnten die sechs Modelle des Mersacidins iterativ bis auf die Tetraglycinketten Gly7–Gly10 der Moleküle C und D vervollständigt werden. Das Programm *SHELXWAT*[34] wurde daraufhin verwendet, um Sauerstoffatome auf, dem Abstand zu anderen Atomen nach geeignete, noch nicht interpretierte Maxima der Differenzelektronendichtekarte zu setzen und somit die restlichen Bereiche der Struktur zu finden. *SHELXWAT* ruft nach der Generierung neuer Atome *SHELXL* auf und entscheidet nach der Verfeinerung anhand des isotropen thermalen Auslenkungsparameters einzeln über den Verbleib oder die Entfernung dieser Atome.

Abschließend erfolgte die anisotrope Verfeinerung aller Nicht-Wasserstoffatome, sowie die ideal-geometrische Generierung von Wasserstoffatomen und deren Verfeinerung nach dem Reitermodell.

Der Verzwillingungsfaktor *k* besaß am Anfang der Verfeinerung den Wert 0.34, verringerte sich dann aber stetig bis auf 0.24. Dies steht in guter Übereinstimmung mit dem in der Strukturlösung verwendeten Wert von 0.20.

---

*) Das Konzept der freien Variablen in *SHELXL* erlaubt die Verfeinerung sonst konstanter Parameter, wie z. B. Zielwerten von Bindungslängen- und Winkelabstands-*Restraints*. Es ermöglicht aber auch die Einführung von *Constraints*, d. h. die Gleichsetzung sonst unabhängiger Parameter, beispielsweise die Verfeinerung nur eines Besetzungsfaktors für alle Atome einer fehlgeordneten Gruppe. Darüberhinaus können freie Variablen mit konstanten Faktoren multipliziert und die Differenz ihrer Wertes zu 1 berechnet werden. Auch die Linearkombination mehrer freier Variablen ist vorgesehen.

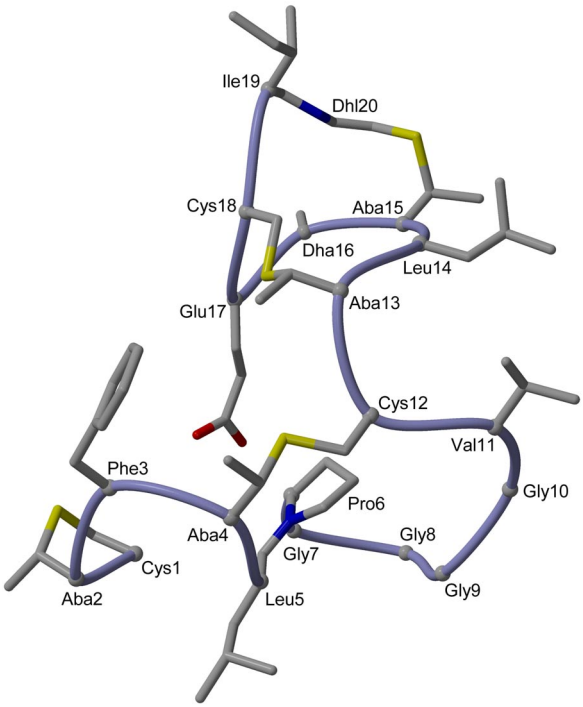


Abbildung 6: Kristallstruktur des Mersacidins (Molekül A).

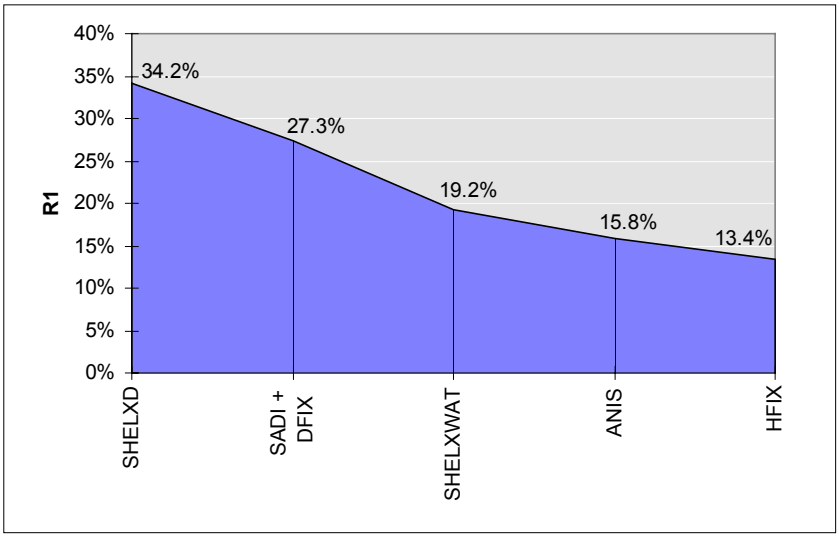


Abbildung 7: Verlauf der Verfeinerung von Mersacidin. Es bedeuten: *SHELXD* - Ausgangskoordinaten nach der Strukturlösung; *SADI + DFIX* - Verfeinerung aller Parameter, Anwendung von ENGH und HUBER[37] Restraints für Standardaminosäuren und Ausnutzung nicht-kristallographischer Symmetrie für die Lanthioninbrücken; *SHELXWAT* - automatische Plazierung von Sauerstoffatomen auf geeignete Maxima der Differenzelektronendichtekarte; *ANIS* - anisotrope Verfeinerung aller Nicht-Wasserstoff-atome; *HFIX* - ideal-geometrische Generierung von Wasserstoffatomen und deren Verfeinerung nach dem Reitermodell.

Tabelle 3: Kristallographische Daten zur Struktur des Mersacidins.

Summenformel	$C_{80}H_{120}N_{20}O_{21}S_4$	Reflexe (Verfeinerung)	33449
Molmasse [g/mol]	1824	Restraints	10784
Kristallsystem	trigonal	Parameter	7438
Raumgruppe	$P3_2$	R1 (F > 4σ(F)) [%]	13.35
a [Å]	46.09	R1 (alle Daten) [%]	14.14
c [Å]	31.02	wR2 [%]	33.38
V [Å^3]	5.707×10^4	Mersacidin (außer H)	750 Atome
Z	18	Mersacidin (nur H)	720 Atome
Meßtemperatur [K]	100	Methanol (kein H)	18 Atome
Wellenlänge [Å]	0.8650	Wasser (kein H)	58 Atome
Gesammelte Reflexe	164063	B (Hauptketten) [Å^2]	16
Unabhängige Reflexe	33469	B (Seitenketten) [Å^2]	20
Max. Auflösung [Å]	1.06	B (Methanol) [Å^2]	21
Vollständigkeit [%]	100.0	B (Wasser) [Å^2]	20
Mittlere Redundanz	4.9	Fehler Bindungen [Å]	1.3×10^{-2}
$\langle\lvert E^2-1\rvert\rangle$	0.643	Fehler Winkel [Å]	3.4×10^{-2}
R_{int} [%]	4.9		
R_σ [%]	3.4		
$\langle I/\sigma\rangle$	14.9		

3.5 Interpretation der Struktur

Die sechs unabhängigen Moleküle bilden in der asymmetrischen Einheit des Mersacidins ein Dimer von Trimeren mit annähernd 32 bzw. D_3 Punktsymmetrie (Abb. 8).

Innerlich werden die Trimere von je drei Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten. Jedes Mersacidinmolekül bindet über Phe3_N an das Carbonylsauerstoffatom Glu17_O seines Nachbarn. Die Reihenfolge, in der die Moleküle A bis F verknüpft sind, lautet A→B, B→C, C→A für das erste und D→E, E→F, F→D für das zweite Trimer (Tab. 5).

Die bei der Dimerisierung der Trimere entstehende Einheit wird durch die Bildung eines hydrophoben Clusters von Phenylalanin-Seitenketten in ihrem Zentrum, der die Aromaten von der hydrophilen Umgebung des Lösungsmittels abschirmt, stabilisiert.

Die zweizählige Achse dieser hexameren Einheit fällt in ihrer Lage und Orientierung mit der zweizähligen Drehachse der Raumgruppe $P3_221$ zusammen. Auf diese Weise findet die zwillingszweizählige Pseudosymmetrie des reziproken Raumes ihre Entsprechung in der nicht-kristallographischen Pseudosymmetrie des reellen Raumes.

Als Ursache der Verzwillingung kann letztlich die 32 Punktsymmetrie des hexameren Clusters angesehen werden: die Kristalle wachsen vermutlich durch Anlagerung dieser Einheiten, die sich zuvor in Lösung gebildet haben. Von Zeit zu Zeit wird dabei einer der Cluster, die im Kristallgitter relativ lose miteinander verbunden sind, um 180° verdreht eingebaut. Dieser Baufehler setzt sich im Kristall fort, und es entstehen große, in sich monokristalline Domänen – ein Zwilling.

In der *Least-Squares*-Überlagerung der sechs Monomere der Kristallstruktur anhand der Cα-Atome der Aminosäuren Cys12 bis Cys18 besitzen diese Cα-Atome eine mittlere Abweichung von 0.24 Å. Während die Domäne III also kaum sterische Flexibilität besitzt, ist eine signifikante Variabilität der Tetraglycinkette von Domäne II (max. Abweichung 4.7 Å) und der gesamten Domäne I zu verzeichnen.

Eine Gemeinsamkeit der unabhängigen Moleküle ist die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Amidstickstoffatomen Cys1_N bzw. Gly7_N und der Seitenkette von Glu17. Diese Wechselwirkung ist aufgrund der Variabilität der Domänen I und II sehr flexibel und in allen sechs Monomeren unterschiedlich. Auch die Wasser-

stoffbrückenbindung zwischen Leu5_N und Aba2_O tritt in allen Molekülen auf (Tab. 6).

Die NMR-Struktur des Mersacidins[20] zeigt für die Cα-Atome von Cys12 bis Cys18 eine mittlere Abweichung von der Kristallstruktur von 0.60 Å. Hier sind dieselben Bereiche des Peptids als variabel anzusehen.

Dem kombinierten RAMACHANDRAN-Plot zufolge liegen die größten Unterschiede beider Strukturen im Bereich der Tetraglycinkette Gly7 bis Gly10, im Ψ-Winkel von Cys12 und im Φ-Winkel von Aba13 (Abb. 11). Die beiden letzten Torsionswinkel kennzeichnen einen *Pepflip* und heben die durch sie verursachten konformellen Änderungen im Molekül gegenseitig auf, so daß die Gesamttopologie der NMR- und Kristallstruktur ähnlich ist.

Nur die Konformation der Domäne II weicht deutlich von derjenigen in der Kristallstruktur ab. Anstatt über eine Wasserstoffbrücke an die Carboxylatgruppe von Glu17 zu binden, geht Gly7 eine Wechselwirkung mit Gly10 ein, indem der Domäne-II-Ring entlang einer gedachten Linie zwischen Aba4_Cα und Gly9_Cα einknickt. Gleichzeitig bewegt sich Domäne I näher an Cys12 heran, ohne dabei die wechselseitigen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Leu5_N und Aba2_O zu verlieren (Tab. 7).

Abbildung 10 stellt die Überlagerung ausgewählter Mersacidinmoleküle der Röntgenstruktur- und NMR-Analyse dar, aus der das Einknicken des Domäne-II-Ringes ersichtlich ist. Es muß jedoch mit Nachdruck darauf hingewiesen werden, daß dies keine zeitaufgelöste Analyse einer Bewegung ist. Dennoch stellt sich die Frage nach Gründen, warum Mersacidin zwischen den Konformationen wechseln können sollte.

Ein triftiges Argument für einen Wechsel ist die Fähigkeit von Mersacidin zur Bildung von Alkali- und Erdalkalisalzen. Das Molekül besitzt in der Kristallstruktur eine für die Koordinierung eines Kations günstigere Geometrie. In Kapitel 5.5 wird das Einknikken des Domäne-II-Ringes im Mersacidin in bezug auf die Bildung des Calciumsalzes von Actagardin und in Kapitel 6 im Kontext eines möglichen Wirkmechanismus der Mersacidin-analogen Typ-B-Lantibiotika näher diskutiert.

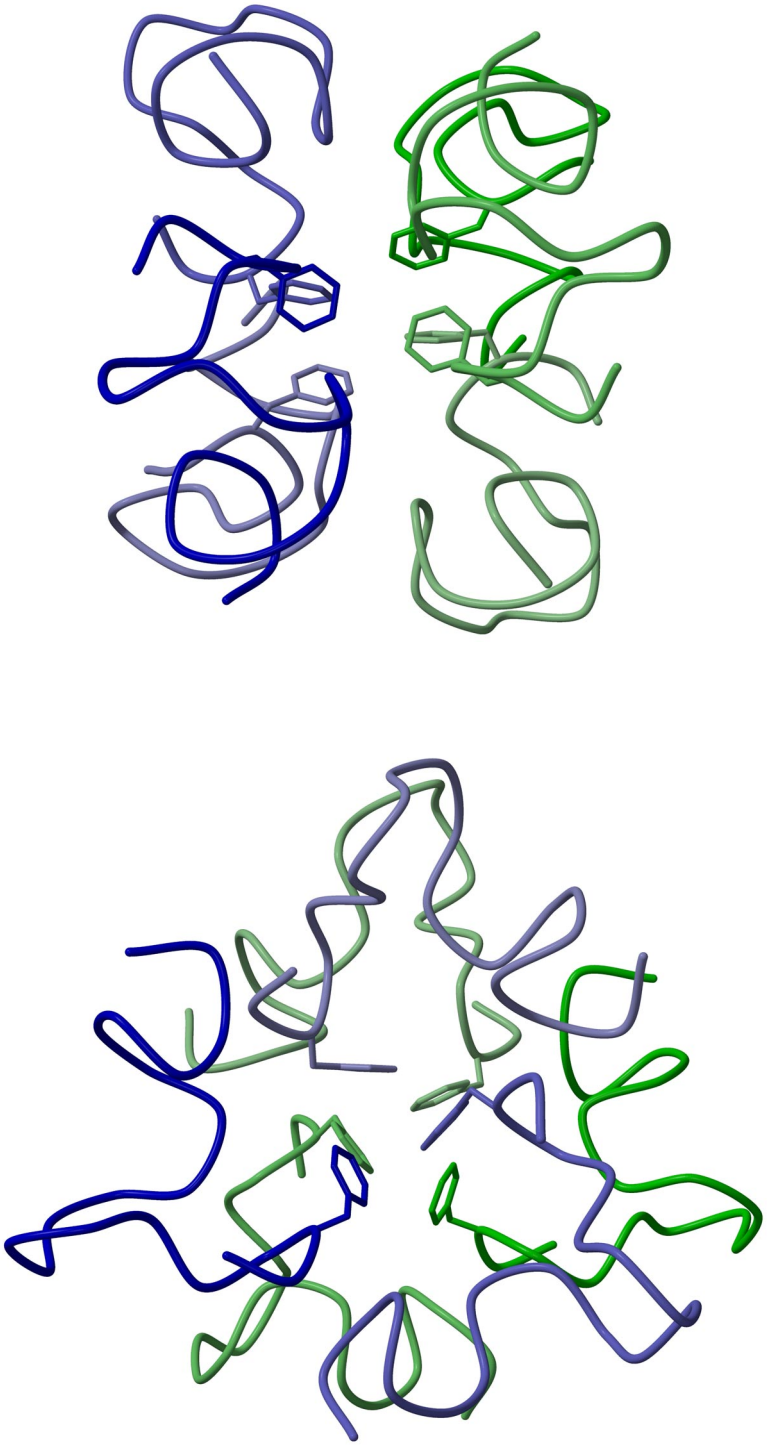


Abbildung 8: Die nicht-kristallographische Symmetrie der Röntgenstruktur des Mersacidins folgt aus der Dimerisierung von zwei Trimeren (grün und blau). Die pseudozweizählige (oben) und die pseudo-dreizählige (unten) Achse entsprechen der 32 Punktsymmetrie des hexameren Clusters.

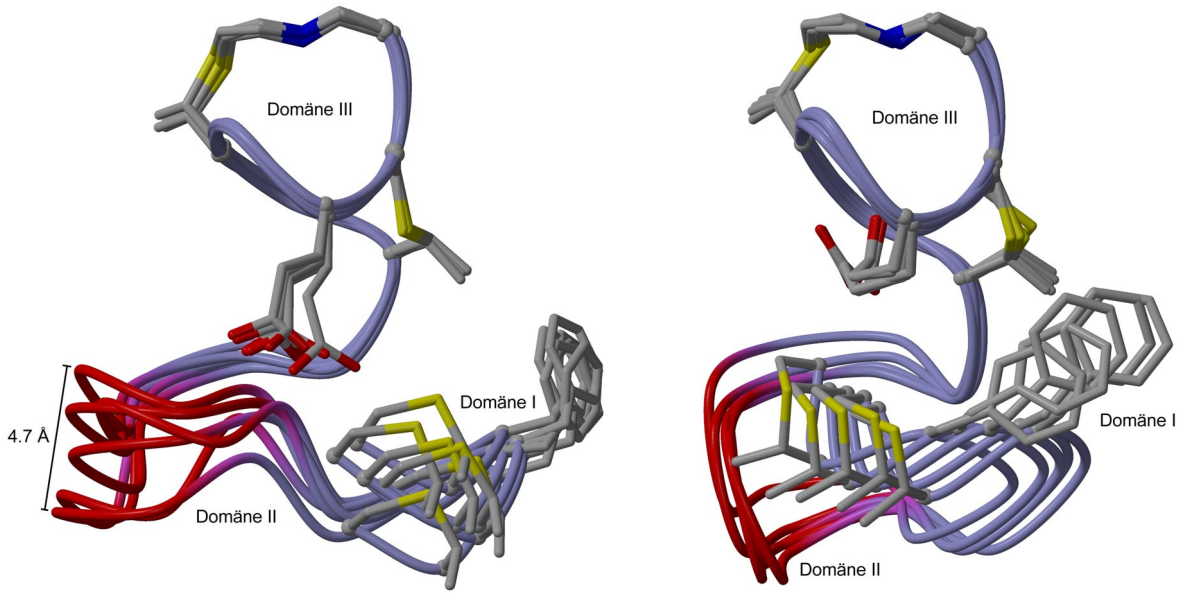


Abbildung 9: *Least-Squares*-Überlagerungen der Mersacidinmoleküle der Röntgenstrukturanalyse (links) und der NMR-Analyse[20] (rechts) anhand der Cα-Atome von Cys12 bis Cys18. Die flexibelsten Bereiche sind in beiden Fällen die Tetraglycinkette Gly7–Gly10 (in rot hervorgehoben) und die Domäne I.

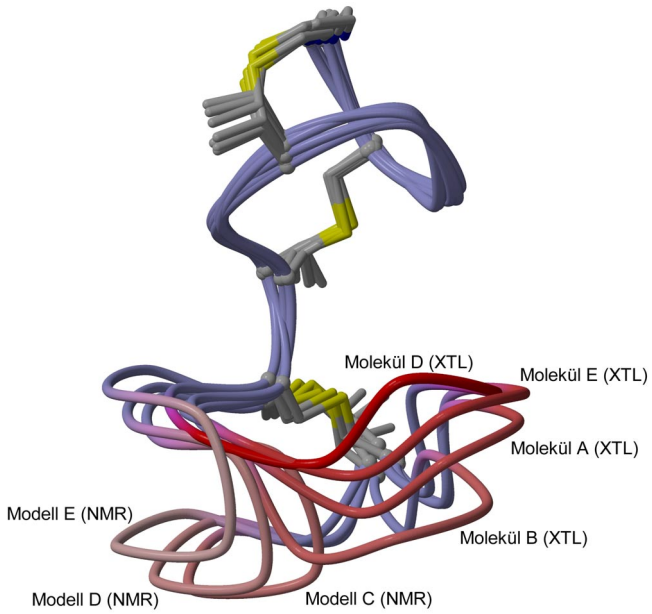


Abbildung 10: Vergleich der unabhängigen Moleküle des Mersacidins mit der NMR-Struktur[20] in Lösung. Die Kristallstrukturen sind mit XTL, die kernresonanzspektroskopischen Modelle dagegen mit NMR gekennzeichnet. Die verschiedenen Konformationen der Tetraglycinkette (rot) legen das Einknicken des Domäne-II-Ringes nahe.

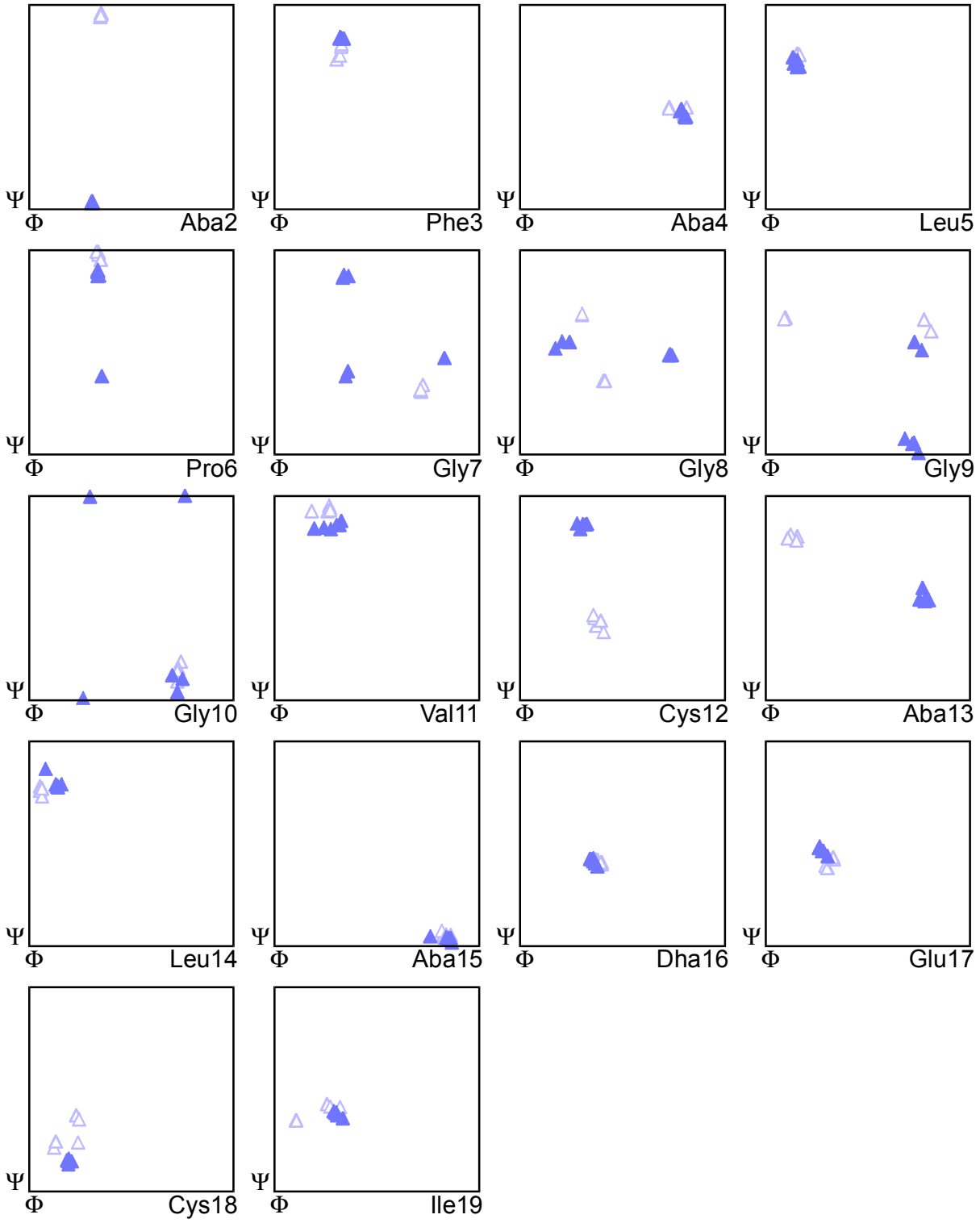


Abbildung 11: RAMACHANDRAN-Plots der Kristallstruktur (▲; sechs Moleküle) und der NMR-Analyse[29] (△; fünf Modelle) von Mersacidin.

Tabelle 4: Gemittelte 1,2- und 1,3-Abstände im β-Methyllanthionin der Kristallstruktur des Mersacidins.

Atompaar	Abstand [Å]	Atompaar	Abstand [Å]
Cys_Cα – Cys_Cβ	1.54(6)	Aba_Cα – Aba_Cβ	1.53(5)
Cys_Cα – Cys_Sγ	2.74(4)	Aba_Cα – Cys_Sγ	2.79(4)
Cys_Cβ – Cys_Sγ	1.80(4)	Aba_Cβ – Cys_Sγ	1.81(4)
Cys_Cβ – Aba_Cβ	2.80(5)	Aba_Cβ – Aba_Cγ	1.53(5)
Aba_Cγ – Aba_Cα	2.52(6)	Aba_Cγ – Cys_Sγ	2.75(4)

Tabelle 5: Intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen in der Kristallstruktur des Mersacidins.

Wasserstoffbrücken-bindung	Abstand Molekül X→Y [Å]					
	A→B	B→C	C→A	D→E	E→F	F→D
Phe3_N – Glu17_O	2.91(2)	2.83(2)	2.84(3)	2.91(3)	2.84(2)	2.86(3)

Tabelle 6: Intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen in der Kristallstruktur des Mersacidins.

Wasserstoffbrücken-bindung	Abstand in Molekül X [Å]					
	X=A	X=B	X=C	X=D	X=E	X=F
Cys1_N – Leu5_O	2.64(5)	2.80(4)	2.73(5)	2.89(8)	2.75(4)	2.77(3)
Cys1_N – Glu17_Oε1	[3.7 (1)]	[4.96(5)]	[4.0 (2)]	2.61(7)	[3.45(5)]	2.83(4)
Cys1_N – Glu17_Oε2	[4.4 (1)]	[5.19(7)]	[5.1 (2)]	[3.6 (1)]	2.87(7)	2.88(4)
Leu5_N – Aba2_O	2.93(4)	2.97(4)	2.92(6)	3.02(7)	2.92(3)	2.88(4)
Gly7_N – Glu17_Oε1	[3.73(9)]	[4.91(7)]	2.8 (1)	[3.4 (1)]	[3.91(6)]	[6.09(4)]
Gly7_N – Glu17_Oε2	2.61(6)	[4.81(9)]	2.5 (2)	2.5 (2)	2.56(9)	[5.47(5)]
Gly9_N – Pro6_O	2.97(4)	2.97(5)	2.88(7)	2.81(9)	2.95(4)	[6.31(5)]
Leu14_N – Val11_O	[3.84(4)]	[3.24(4)]	3.1 (2)	2.9 (1)	[3.29(3)]	[3.28(3)]
Cys18_N – Aba15_O	2.93(3)	2.83(3)	2.88(8)	2.78(4)	2.80(4)	2.89(2)

Tabelle 7: Wasserstoffbrückenbindungen in den NMR-Modellen des Mersacidins[20].

Wasserstoffbrücken-bindung	Abstand in Modell X [Å]				
	X=A	X=B	X=C	X=D	X=E
Cys1_N – Gly9_O	2.69	2.71	2.68	2.68	2.70
Cys1_N – Val11_O	2.67	2.67	2.66	2.67	2.69
Cys1_N – Glu17_Oε2	2.65	2.64	2.61	2.63	2.61
Aba2_N – Leu5_O	2.72	2.76	2.72	2.73	2.79
Aba2_N – Gly8_O	2.95	2.83	[4.88]	[5.24]	[4.80]
Aba4_N – Aba2_O	2.64	2.66	2.84	2.88	2.85
Aba4_N – Cys12_O	[3.90]	[3.39]	3.13	2.95	3.00
Leu5_N – Aba2_O	2.85	2.79	2.82	2.82	2.81
Gly7_N – Gly10_O	2.74	2.77	2.71	2.71	2.69
Gly8_N – Pro6_O	2.85	2.80	2.80	2.82	2.82
Gly9_N – Gly7_O	2.72	2.71	2.86	2.90	2.85
Gly10_N – Gly7_O	[3.73]	[3.35]	2.91	3.02	2.93
Aba13_N – Cys12_O	2.91	2.83	2.87	2.91	2.92
Leu14_N – Glu17_Oε2	2.80	2.79	2.73	2.73	2.71
Glu17_N – Aba15_O	3.07	3.15	3.03	2.95	3.00
Glu17_N – Glu17_Oε1	2.80	2.76	2.70	2.72	2.72
Cys18_N – Glu17_Oε1	2.68	2.69	2.73	[4.35]	[4.27]
Cys18_N – Aba15_O	3.11	3.20	3.05	2.86	2.88
Ile19_N – Aba15_O	2.88	2.88	[3.40]	[3.51]	[3.25]
Dhl20_N – Aba15_O	2.65	2.67	2.71	2.77	2.77

4 Röntgenstruktur des Actagardins

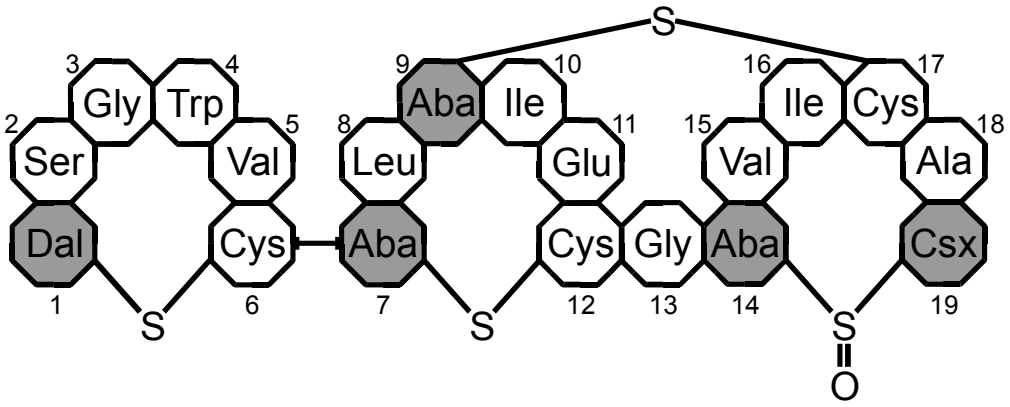


Abbildung 12: Peptidsequenz des Actagardins.

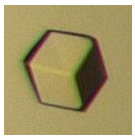
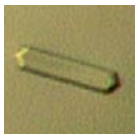
4.1 Kristallisation

Actagardin wurde nach der *Hanging-Drop*-Methode kristallisiert, wobei zunächst säulenförmige Kristalle mit quadratischem Querschnitt erhalten werden konnten. Diese streuten am Synchrotron (*EMBL*-Beamline *BW7B* des *DORIS*-Speicherringes am *DESY* in Hamburg) bis zu einer maximalen Auflösung von 1.9 Å. Trotz intensiver Versuche, die Kristallisationsbedingungen weiter zu verfeinern, waren keine Kristalle besserer Qualität zugänglich, und eine Strukturlösung durch molekularen Ersatz[39-41] mit den Atomkoordinaten des Ala(0)-Actagardins (vgl. Kap. 5) blieb erfolglos.

Durch Co-Kristallisation mit Kaliumiodid wurde daraufhin der Einbau eines Schweratoms in die Kristallstruktur angestrebt, durch dessen anomales Signal eine Strukturlösung nach der SAS-Methode möglich sein sollte[42]. Dieses Verfahren ist zuvor von von STEINRAUF[43] und DAUTER *et al.*[44,45] für Lysozym und weitere Proteine erfolgreich eingesetzt worden.

Die nach der *Hanging-Drop*-Methode erhaltenen Kristalle zeigen kubische Symmetrie mit Kantenlängen von 50–100 μm und wachsen bei Raumtemperatur innerhalb von einer Woche überwiegend direkt auf den silikonisierten Deckgläschen. Daher besitzen die meisten Kristalle die Form eines Würfels, der von einer Ebene, die durch den Mittelpunkt des Kubus verläuft, halbiert wird.

Tabelle 8: Kristallisations- und Cryobedingungen von Actagardin.

Ingredienz	Kuben	tetragonale Säulen
		
Actagardin	20.0 mg/mL in H_2O:EtOH=2:1	
HEPES / NaOH	0.07 M, pH 7.4	
PEG 4000 (50% w/w)	22% v/v	27% v/v
Ethanol	25% v/v	
Kaliumiodid	0.2 M	—
Cryoprotektand	24% v/v PEG 400	24% v/v Glycerol
Kristallisation	4 µL *Hanging-Drop* über 500 µL Reservoir	

4.2 Datensammlung

Die Sammlung der Diffraktionsdaten fand an der *EMBL*-Beamline *X11* des *DORIS*-Speicherringes am *DESY* in Hamburg statt. Die Wellenlänge betrug 0.9094 Å. Als Detektor kam der CCD-Zähler der Firma *MAR* mit 165 mm Durchmesser zum Einsatz. Ein *Oxford Cryostream* temperierte den Kristall während der Messung bei 100 K.

PEG400 erwies sich als geeigneter Cryoprotektand, um während der Messung die Bildung von Eis zu verhindern. Da die Kristalle in der PEG400-haltigen Lösung langsam solvatisierten, mußte das sog. *Soaking* im Cryoprotektand auf etwa 30 Sekunden begrenzt werden. Anschließend wurden die Kristalle nach der Methode von TENG[46] mit einer Schlaufe aus dünnem Nylon der Lösung entnommen und im Kaltgasstrom des *Oxford Cryostream* schockgefroren.

Bei einem Kristall-Detektor-Abstand von 65 mm wurden Daten bis zu einer maximalen Auflösung von 1.26 Å aufgenommen. Zur Integration und Skalierung der Daten dienten die Programme *DENZO*[25], *SCALEPACK*[25] und *XPREP*[26].

Die Elementarzelle besitzt kubische Metrik mit einer Kantenlänge von 47.32 Å.

4.3 Strukturlösung

Die Analyse der Röntgendaten mit *XPREP*[26] liefert $P4_132$ und $P4_332$ als mögliche Raumgruppen. Anhand des anomalen Signals kann zudem der planmäßige Einbau von Iodid bestätigt werden. Somit ist die Lösung der Struktur durch Interpretation einer aus den Intensitätsdifferenzen der anomalen BIJVOET-Paare berechneten PATTERSON-Map möglich.

Das Resultat des mit der *PATT*-Instruktion in Raumgruppe $P4_332$ gestarteten Strukturlösungsprogrammes *SHELXS*[47] ergibt für das Iodidion eine Position auf der Lage *d* nach WYCKOFF[48]. Hierbei handelt es sich um eine zweizählige Achse.

Anschließend erfolgte eine Erweiterung der gewonnenen Phaseninformation mit dem Programm *SHELXD*[30,31]. Dabei verbesserte sich der anfängliche Korrelationskoeffizient von 13.9% innerhalb von 10 Zyklen der Optimierung der *Peaklist*[33] auf 76.1%.

Das Ergebnis enthielt 51 der 77 Hauptketten- und 34 der 52 Seitenkettenatome des Actagardins, sowie einige Atome des Lösungsmittels und zwei weitere etwa gleich starke Elektronendichtemaxima, die denen der vorhandenen Schwefelatome ähnelten.

Da sich einer dieser beiden *Peaks* auf derselben zweizähligen Lage wie das Iodidion befand, konnte es sich ausschließlich um das zum Ladungsausgleich notwendige Kation, in diesem Fall also um ein Kaliumion, handeln.

4.4 Strukturverfeinerung

In der Strukturlösung von *SHELXD* sind die enthaltenen Atome zwar den Maxima der Elektronendichtekarte zugeordnet, jedoch sind ihre Streufaktoren zum Teil nicht korrekt und die isotropen thermalen Auslenkungsparameter sind nicht verfeinert. Ohne die Koordinaten der Atome zu verändern, wurden daher zunächst nur die sog. U-Werte zur Verfeinerung freigegeben.

Lücken zwischen den gefundenen Teilen der Struktur erschwerten die Umbenennung der Atome und damit die korrekte Zuordnung der Elemente zu den Atomen. Um dieses Problem zu umgehen, erfolgte im nächsten Schritt durch das Programm *SHELXWAT*[34] die automatische Plazierung von Sauerstoffatomen auf noch nicht interpretierte Maxima der Differenzelektronendichte. Das Ergebnis dieses zu *ARP*[49]

ähnlichen Ansatzes enthielt 62 der 77 Hauptkettenatome, wodurch die Umbenennung nun eindeutig möglich war.

Der FLACK-Parameter[50] besaß zu diesem Zeitpunkt der Verfeinerung den Wert 1.0(1), so daß sowohl die Struktur als auch die Raumgruppe zu invertieren waren. Actagardin kristallisiert somit in $P4_132$.

Nachdem alle gefundenen Atome entsprechend der Nomenklatur des Actagardins umbenannt waren, zeigte sich, daß das höchste bislang nicht identifizierte Maximum der Differenzelektronendichte an die Carboxyfunktion des Glutamats (Glu11) koordiniert. Es mußte daher ein zweites Kation in der Struktur geben, das aufgrund der gleichen Peakhöhe dieselbe Anzahl von Elektronen wie das zuvor gefundene Kaliumion besitzt. Demzufolge hätte es sich um ein zweites Kaliumion handeln können.

Die Analyse der Wechselwirkungen innerhalb der Koordinationssphäre dieses Kations anhand des *Bond-Valence*-Modells*)[51] zeigte jedoch ein Calciumion an (Tab. 10). Grundlage für die *Bond-Valence*-Berechnungen bildete die Formel nach PAULING ($v = \exp((d_0 - d)/b)$)[52] mit einem einheitlichen Wert von 0.37 Å für b. Die Standardbindungslängen d_0 wurden nach BRESE *et al.*[53] berechnet (Tab. 9). Zur Kontrolle sind auch die *Bond-Valence*-Ergebnisse für das Kaliumion aufgeführt (Tab. 11).

Tabelle 9: Einfachbindungslängen zu den *Bond-Valence*-Berechnungen für Actagardin.

Bindung	d_0 [Å]	Bindung	d_0 [Å]
$K^+\cdots O$	2.150	$K^+\cdots I$	2.892
$Ca^{2+}\cdots O$	1.978	$Ca^{2+}\cdots I$	2.715

*) Das *Bond-Valence*-Modell ist eine zuerst von PAULING[52] aufgestellte semiempirische Korrelation zwischen dem Abstand zweier Atome und der Valenz der sie verknüpfenden Bindung. PAULING erkannte, daß sich die Differenzen der Bindungsradien von C-C-Einfach- und Doppel- bzw. Einfach- und Dreifachbindung zueinander wie log(2) / log(3) verhalten. Daraus läßt sich die allgemeine Formel $v=\exp((d_0 - d) / b)$ ableiten, in der die Valenz *v* der Bindung in Abhängigkeit von ihrer Länge *d* steht. d_0 ist die Länge einer Einfachbindung zwischen dem betrachteten Atompaar. Für die Konstante *b* wird allgemein ein Wert von 0.37 Å angenommen. Die Summe aller Valenzen eines Atoms entspricht seiner Wertigkeit und gibt Aufschluß darüber, um welches Element es sich handelt.

Tabelle 10: *Bond-Valence*-Berechnungen zum Calciumion im Actagardin. Vo ist die beobachtete Wertigkeit des Atomes X ($Vo = \sum Occ \cdot v$), Vc die erwartete Wertigkeit. Occ ist der Besetzungsfaktor der fehlgeordneten Bindungspartner des Calciumions. Ausschlaggebend für die korrekte Zuordnung des Elementes zu Atom X ist die Differenz zwischen Vo und Vc, die im Idealfall Null beträgt.

Bindung	d [Å]	Occ	v(X = K^+)	v(X = Ca^{2+})
X – Ser2_Oa	2.62(2)	0.5 ×	0.28	0.18
X – Ser2_Ob	2.24(2)	0.5 ×	0.78	0.49
X – Val5_O	2.39(1)	1.0 ×	0.52	0.33
X – Leu8_O	2.30(1)	1.0 ×	0.67	0.42
X – Glu11_Oε1	2.53(1)	1.0 ×	0.36	0.22
X – Glu11_Oε2	2.59(1)	1.0 ×	0.30	0.19
X – Eoh400_Oa	2.34(3)	0.5 ×	0.60	0.38
X – Eoh400_Ob	2.37(2)	0.5 ×	0.55	0.35
X – Hoh1015_Oa	2.23(3)	0.5 ×	0.81	0.51
X – Hoh1015_Ob	2.57(3)	0.5 ×	0.32	0.20
		Vo =	3.52	**2.22**
		Vc =	1.00	**2.00**

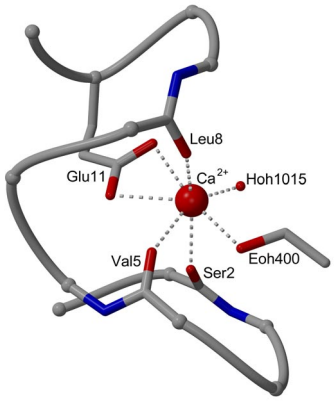
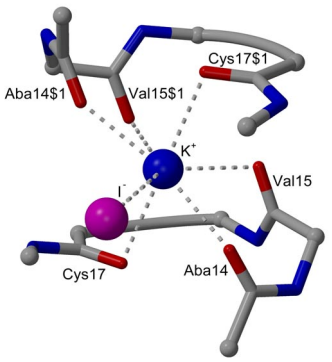


Tabelle 11: *Bond-Valence*-Berechnungen zum Kaliumion im Actagardin. Die mit $1 gekennzeichneten Atome sind Symmetrieäquivalente auf der gegenüberliegenden Seite der durch das Kalium- und das Iodidion verlaufenden zweizähligen kristallographischen Achse. Der zugehörige Symmetrieoperator ist unten angegeben.

Bindung	d [Å]	Occ	v(X = K^+)	v(X = Ca^{2+})
X – Aba14_O	2.62(1)	1.0 ×	0.28	0.18
X – Aba14_O$1	2.62(1)	1.0 ×	0.28	0.18
X – Val15_O	2.99(1)	1.0 ×	0.10	0.06
X – Val15_O$1	2.99(1)	1.0 ×	0.10	0.06
X – Cys17_O	2.80(1)	1.0 ×	0.17	0.11
X – Cys17_O$1	2.80(1)	1.0 ×	0.17	0.11
X – I	4.08(1)	1.0 ×	0.04	0.02
		Vo =	**1.14**	0.72
$1 = -z - 1/4, -y - 5/4, -x - 1/4		**Vc =**	**1.00**	2.00



Im weiteren Verlauf der Verfeinerung konnte eine Fehlordnung der Haupt- und Seitenkettenatome der Aminosäuren Ser2, Gly3 und Trp4 aufgedeckt werden. Das Besetzungsverhältnis der beiden Komponenten verfeinerte als freie Variable auf einen Endwert von 50%.

An diese Fehlordnung koppeln u. a. das Wassermolekül Hoh1015 und das Ethanolmolekül Eoh400, die beide an der Koordination des Calciumions beteiligt sind (vgl. Abb. zu Tab. 10).

Der weitere Gang der Verfeinerung bestand in der Komplettierung des Actagardin- und Lösungsmittelmodells, der geometrisch idealen Positionierung von Wasserstoffatomen und der anisotropen Verfeinerung aller Nicht-Wasserstoffatome.

Während der Verfeinerung kamen die *Restraints* für Standardaminosäuren nach ENGH und HUBER[37], sowie die aus den Modellen der Mersacidin-Kristallstruktur gewonnenen Parameter zur Geometrie des Lanthionins zum Einsatz.

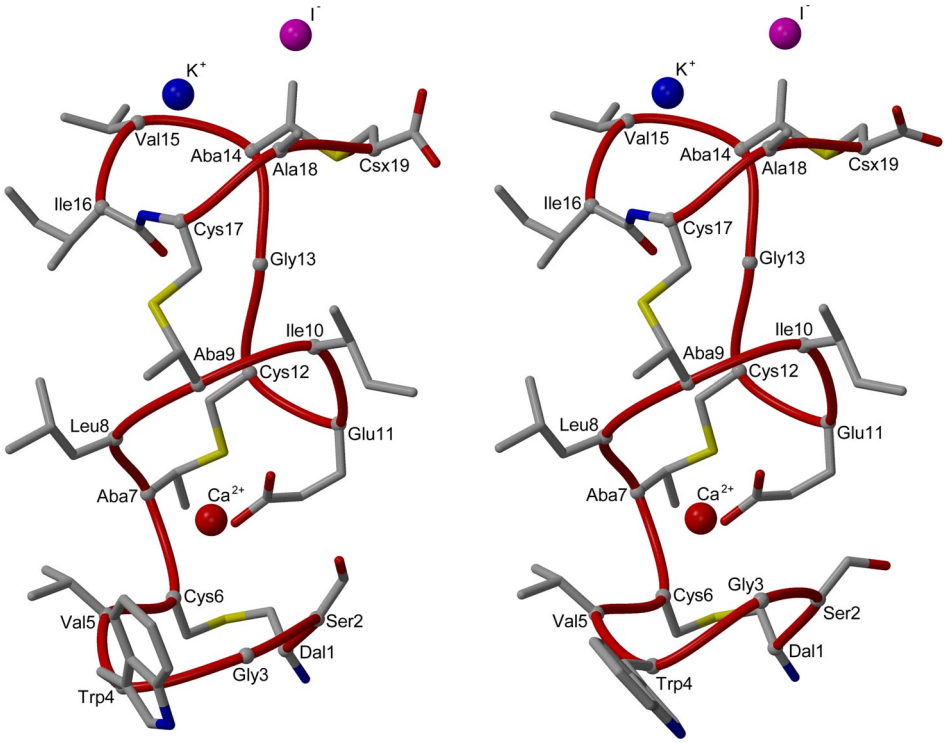


Abbildung 13: Kristallstruktur des Actagardins (links: PART 1; rechts PART 2).

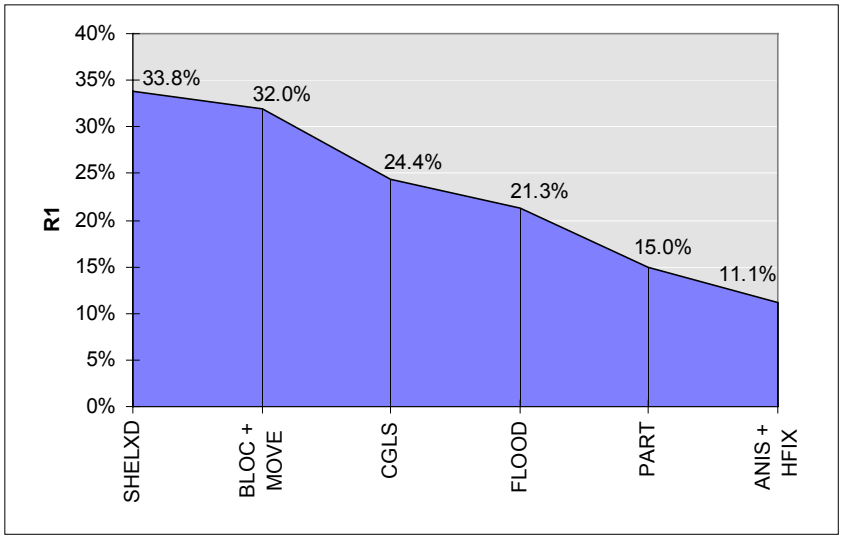


Abbildung 14: Verlauf der Verfeinerung von Actagardin. Es bedeuten: *SHELXD* - Ausgangskoordinaten nach der Strukturlösung; *BLOC + MOVE* - Verfeinerung der isotropen thermalen Auslenkungsparameter und Invertierung der Struktur von $P4_332$ zu $P4_132$; *CGLS* - Verfeinerung aller Parameter; *FLOOD* - Einfügen von Wasser- und Ethanolmolekülen; *PART* - Fehlordnung der Haupt- und Seitenketten von Ser2, Gly3 und Trp4; *ANIS + HFIX* - anisotrope Verfeinerung aller Nicht-Wasserstoffatome, sowie die ideal-geometrische Positionierung von Wasserstoffatomen und deren Verfeinerung nach dem Reitermodell.

Tabelle 12: Kristallographische Daten zur Struktur des Actagardins.

Summenformel	$C_{81}H_{124}N_{20}O_{24}S_4$	Reflexe (Verfeinerung)	8829
Molmasse [g/mol]	1890	Restraints	2787
Kristallsystem	kubisch	Parameter	1815
Raumgruppe	$P4_132$	R1 (F > 4σ(F)) [%]	11.09
a [Å]	47.09	R1 (alle Daten) [%]	11.84
V [Å^3]	1.044×10^5	R_{free} (F > 4σ(F)) [%]	14.26
Z	24	R_{free} (alle Daten) [%]	15.03
Meßtemperatur [K]	100	wR2 [%]	27.65
Wellenlänge [Å]	0.9094	Actagardin (außer H)	129 Atome
Gesammelte Reflexe	90829	Actagardin (nur H)	124 Atome
Unabhängige Reflexe	9315	Ethanol (kein H)	6 Atome
Max. Auflösung [Å]	1.26	Wasser (kein H)	25 Atome
Vollständigkeit [%]	99.6	B (Hauptkette) [Å^2]	17
Mittlere Redundanz	9.8	B (Seitenketten) [Å^2]	15
$\langle\lvert E^2-1\rvert\rangle$	0.762	B (Ethanol) [Å^2]	21
R_{int} [%]	3.6	B (Wasser) [Å^2]	31
R_σ [%]	3.5	Fehler Bindungen [Å]	2.0×10^{-2}
$\langle I/\sigma\rangle$	22.7	Fehler Winkel [Å]	5.4×10^{-2}

4.5 Interpretation der Struktur

Die Ladungsbilanz der Actagardinstruktur weist ein Defizit von einer negativen Ladung auf, denn den vier positiven Ladungen von Ca^{2+}, K^{+} und N-Terminus stehen nur die drei negativen Ladungen der beiden Carboxylatgruppen (Glu11 und Ala19; pH=7.4) und des Iodidions gegenüber.

Die Analyse der anomalen Differenzelektronendichte mit *XTALVIEW*[38] schließt die Präsenz weiterer schwerer Anionen, wie z. B. Chlorid, aus. Aufgrund des schwach basischen Milieus ist daher ein Hydroxidion für den Ladungsausgleich am wahrscheinlichsten.

Bond-Valence-Berechnungen für das Lösungsmittelmodell des Actagardins ergeben im Vergleich zu Ala(0)-Actagardin und Mersacidin die höchsten Valenzen einzelner Wassermoleküle. Besonders eine der Lagen des fehlgeordneten Wassermoleküls Hoh1015 hebt sich deutlich von den anderen ab und kommt daher als Hydroxidion in Frage. Da dieses jedoch nur teilbesetzt ist, muß die Gesamtladung des Hydroxidions durch Fehlordnungen im Lösungsmittelmodell delokalisiert sein.

Tabelle 13: *Bond-Valence*-Berechnung für die Lösungsmittelmodelle in Actagardin, Ala(0)-Actagardin und Mersacidin. Der höhere Wert für Hoh1015_Oa im Actagardin weist auf ein Hydroxidion hin.

Actagardin pH = 7.4		Ala(0)-Actagardin pH = 4.6		Mersacidin pH = n/a	
Wasser	V [v. u.]	Wasser	V [v. u.]	Wasser	V [v. u.]
Hoh1015_Oa	0.62	Hoh1034_O	0.39	Hoh1015_O	0.16
Hoh1015_Ob	0.34	Hoh1009_O	0.31	Hoh1023_O	0.14
Hoh1005_Ob	0.24	Hoh1033_O	0.28	Hoh1050_O	0.14
Hoh1000_O	0.22	Hoh1031_O	0.28	Hoh1035_O	0.13
Hoh1018_O	0.20	Hoh1035_O	0.20	Hoh1054_O	0.11
Hoh1023_O	0.17	Hoh1027_O	0.16	Hoh1003_O	0.11
Hoh1005_Oa	0.16	Hoh1014_O	0.12	Hoh1053_O	0.10
Hoh1030_O	0.12	Hoh1018_O	0.11	Hoh1025_O	0.08
Hoh1016_O	0.12	Hoh1004_O	0.09	Hoh1055_O	0.08
Hoh1025_O	0.11	Hoh1025_O	0.09	Hoh1012_O	0.08

Die Fehlordnung der Haupt- und Seitenkettenatome von Ser2, Gly3 und Trp4 ist auf zwei energetisch gleichwertige Muster von Wasserstoffbrücken zurückzuführen, die zwischen den um eine dreizählige kristallographische Achse gruppierten Symmetrieäquivalenten dieser drei Aminosäuren existieren. In der ersten Komponente der Fehlordnung koordiniert das Glycin über Gly3_N direkt an den Carbonylsauerstoff seines Symmetrieäquivalents, während in der zweiten Komponente eine Bindung an den Carbonylsauerstoff des symmetrieäquivalenten Trp4 erfolgt (Abb. 15). Die beiden unabhängigen Wasserstoffbrücken besitzen eine einheitliche Länge von 2.74(8) Å (Tab. 14) und sind somit innerhalb der Standardabweichung geometrisch und energetisch gleichwertig. Keines der beiden Konformere wird daher favorisiert.

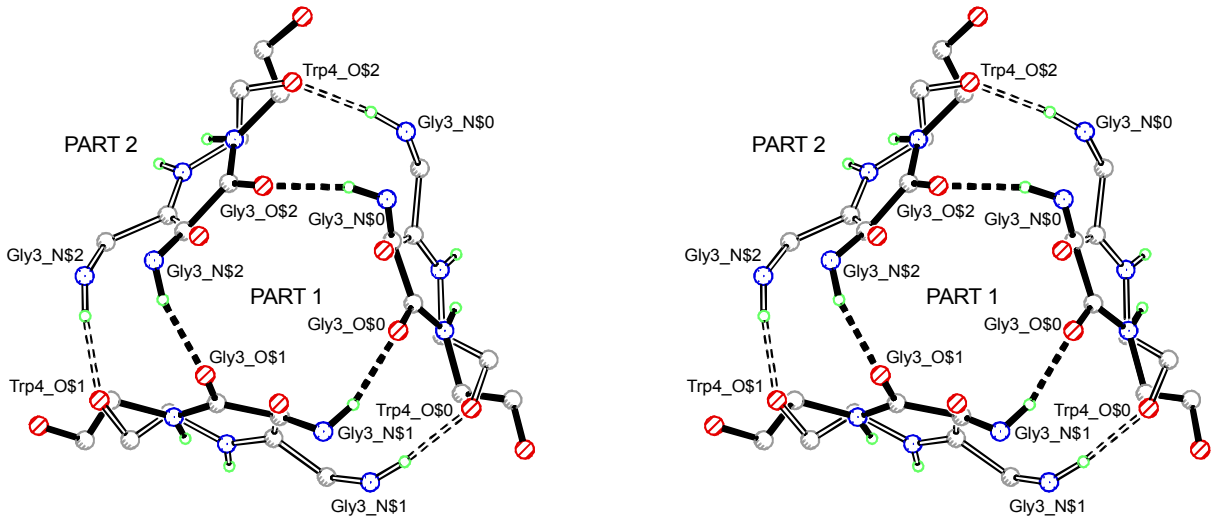


Abbildung 15: Stereobild der Fehlordnung der Hauptkettenatome von Gly3 und Trp4 im Actagardin. Die erste Komponente der Fehlordnung ist als dicke schwarze Linie gezeichnet, Komponente zwei als dünne Doppellinie. Die Suffixe $0, $1 und $2 ordnen die Atome in drei Gruppen ein, die den symmetrieäquivalenten Lagen der durch das Zentrum verlaufenden, senkrecht zur Papierebene stehenden dreizähligen kristallographischen Achse entsprechen.

Um dieselbe dreizählige Achse gruppieren sich auch die symmetrieäquivalenten Seitenketten des Tryptophans Trp4 und sind dabei ebenfalls, über Wasserstoffbrücken zwischen den Trp4_Nε1-Atomen, zyklisch verknüpft (Abb. 16).

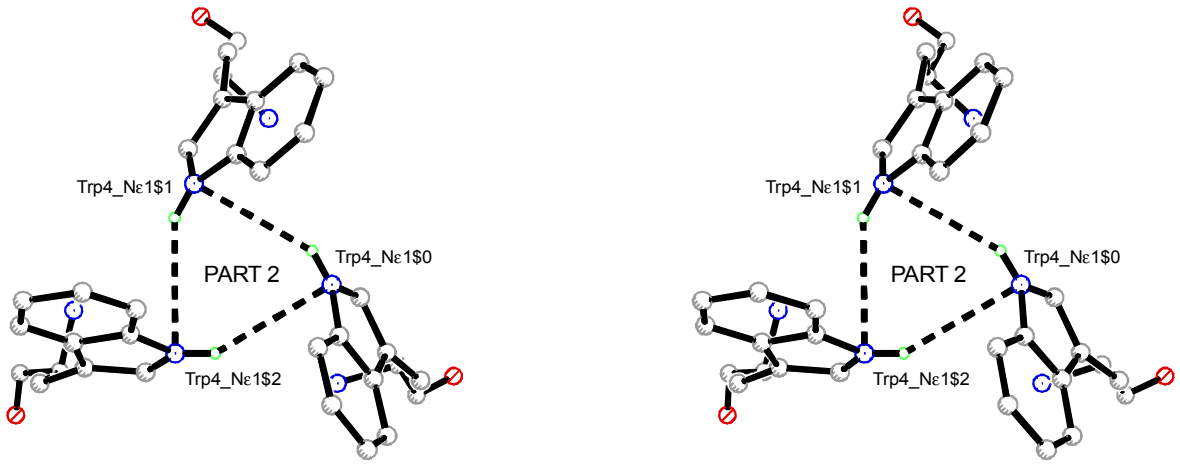


Abbildung 16: Stereobild der Seitenkette von Trp4 im Actagardin mit ihren Symmetrieäquivalenten. Es ist nur die zweite Komponente der Fehlordnung dargestellt. Für die Konvention der Benennung symmetrieäquivalenter Atome vgl. Abb. 15.

Die Quelle der Calciumionen konnte längere Zeit nicht eindeutig bestimmt werden, da sie nicht in der Kristallisationslösung eingesetzt worden waren. Experimentelle Befunde deuten jedoch darauf hin, daß das Calcium bereits im Lyophilisat des Actagardins enthalten ist:

Der *microPIXE*-Analyse*)[54] zufolge, enthält die Actagardin-Ausgangssubstanz neben Spuren von Phosphor ein Calciumion pro 298 Schwefelatome und ein Kaliumion pro 3 Schwefelatome. Bei einer Konzentration von 10 mg/mL Actagardin im 4 µL Kristallisationstropfen entspricht dies 1.7×10^{14} Calciumionen bzw. 7.4×10^{5} μm^3 des kristallisierten Actagardin-Calciumkomplexes pro Tropfen. Da durchschnittlich drei Kristalle in jedem Tropfen wachsen und die allgemein auftretende Kristallform einem halbierten Kubus entspricht, folgt daraus eine maximal mögliche Kristallkantenlänge von etwa 80 µm. Die Kantenlängen der beobachteten Kristalle liegen zwischen 50 und 100 µm. Unter Berücksichtigung der fehlerbehafteten Meßmethoden, ist demnach die im Lyophilisat nachgewiesene Calciummenge ausreichend für die Bildung der erhaltenen Kristalle des Actagardin-Calciumsalzes.

Das Calciumion wird verzerrt pentagonal bipyramidal koordiniert und ist in der äquatorialen Ebene von der bidentalen Seitenkette der Glutaminsäure Glu11, sowie dem

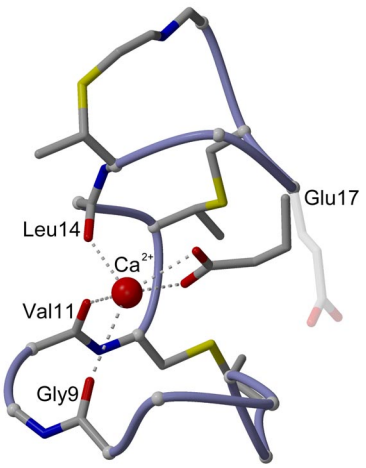
*) Bei der *microPIXE*-Analyse wird eine Probe der zu untersuchenden Substanz mit einem fokussierten Protonenstrahl beschossen und die emittierte charakteristische Röntgenstrahlung zur quantitativen Bestimmung aller Elemente mit einer Ordnungszahl größer 10 herangezogen. Voraussetzung für die quantitative Analyse ist die Kenntnis der Anzahl der Atome eines bestimmten Elementes pro Formeleinheit, im Beispiel des Actagardins also vier Schwefelatome pro Molekül.

Carbonylsauerstoffatom von Val5, dem Wassermolekül Hoh1015 und dem Ethanolmolekül Eoh400 umgeben. Die axialen Positionen sind mit den Carbonylsauerstoffatomen der Aminosäuren Ser2 und Leu8 besetzt (vgl. Abb. zu Tab. 10). Diese Koordination ermöglicht durch Verdrängung der fehlgeordnet gebundenen Lösungsmittelmoleküle den direkten Zugang zum Calciumion, so daß vor allem negativ geladene Bindungspartner direkt andocken könnten.

Bei *Mersacidin* bewirkt die Anreicherung des Mediums mit Calciumionen durchschnittlich eine Verdoppelung der antibiotischen Aktivität[55]. Ähnliche Resultate liefert der Vergleich von Mersacidin mit seinem *Kaliumsalz*[56]. Die Anwesenheit von Kationen wirkt mithin positiv auf die antibakterielle Wirksamkeit dieses Lantibiotikums.

Als Bindungsstelle für das Calciumion im Mersacidin kommt ausschließlich und wie bei Actagardin die Seitenkette der deprotonierten Glutaminsäure in Frage, denn die Carboxylatgruppe des C-Terminus wird während der Biosynthese durch dehydrierende Decarboxylierung entfernt. Somit verbleibt die einzige negative Ladung an Glu17.

Drei der sechs Monomere der Mersacidin-Kristallstruktur zeigen eine dem Actagardin-Calciumkomplex vergleichbare Geometrie (Abb. 17). Daher ist es naheliegend, die aktivitätssteigernde Wirkung der Kalium- und Calciumionen von Mersacidin auf Actagardin zu übertragen.



Ca – Gly9_O	2.20 Å
Ca – Val11_O	2.90 Å
Ca – Leu14_O	3.23 Å
Ca – Glu17_Oε1	2.53 Å
Ca – Glu17_Oε2	2.59 Å

Abbildung 17: Überlagerung der Kristallstruktur von Mersacidin (Molekül D) mit der Position des Calciumions und der Glutaminsäure-Seitenkette der Actagardin-Kristallstruktur. Die ursprüngliche Position der Seitenkette der Glutaminsäure im Mersacidin ist halb durchsichtig dargestellt.

Die Konformation des Mersacidins im NMR-Modell ist in ihrer Fähigkeit Kationen zu binden eingeschränkt, denn der in die Koordinierung involvierte Domäne-II-Ring ist, wie in Kap. 3.5 dargelegt, eingeknickt und kann die Wechselwirkung zum Kation nur abgeschwächt aufbauen. Da aber experimentell bewiesen ist, daß auch Mersacidin Salze bildet, muß Domäne II zurückklappen können und die in der Kristallstruktur beobachtete Konformation annehmen. Dies ist ein Anhaltspunkt der für den in Kap. 3.5 postulierten Konformationswechsel im Mersacidin-Molekül spricht.

ZIMMERMANN und JUNG erkannten in ihrem NMR-Modell des Actagardins[21] neben der hier mit Calcium beladenen Bindungstasche eine zweite Koordinationsstelle in Domäne IV, die in der Kristallstruktur des Actagardins mit einem Kaliumion besetzt ist und die Mersacidin aufgrund des Fehlens der Domäne IV nicht ausbilden kann.

Dieses Alkalikation wird im wesentlichen verzerrt oktaedrisch koordiniert von den Carbonylsauerstoffatomen der Aminosäuren Aba14, Val15 und Cys17, sowie deren Symmetrieäquivalenten auf der gegenüberliegenden Seite der zweizähligen kristallographischen Drehachse (vgl. Abb. zu Tab. 11).

Das Iodidion ist weitgehend isoliert, und es bestehen nur schwache Wechselwirkungen zum Kaliumion, zu Csx19_N, Hoh1019_O und zu den Symmetrieäquivalenten der letzten beiden.

Zwischen den Domänen II und III bestehen, abgesehen von der kovalenten Verknüpfung über Cys6–Aba7 und der über das Calciumion vermittelten elektrostatischen Wechselwirkung, keine weiteren intramolekularen Kontakte. Weder direkte noch indirekte, über Wassermoleküle verlaufende Wasserstoffbrückenbindungen sind zu beobachten (vgl. Tab. 14).

Die *Least-Squares*-Überlagerung der Kristallstrukturen des konservierten Bereiches von Actagardin und Mersacidin (Cα-Atome von Cys6 bis Cys12) liefert eine mittlere Abweichung der Cα-Atome von 0.21 Å (vgl. Abb. 18). Im Gegensatz zum NMR-Modell des Actagardins (1.67 Å) ist hier also eine gute Übereinstimmung mit Mersacidin zu verzeichnen (vgl. Kap. 2.3).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Lantibiotika besteht in der Lage der aromatischen Aminosäuren, Phe3 bei Mersacidin und Trp4 bei Actagardin. Diese befinden sich auf annähernd gegenüberliegenden Positionen des Thioetherringes der

Domäne II. In Kapitel 5.5 wird dieser Umstand im Zusammenhang mit einem bei Ala(0)-Actagardin beobachteten Konformationswechsel eingehender diskutiert.

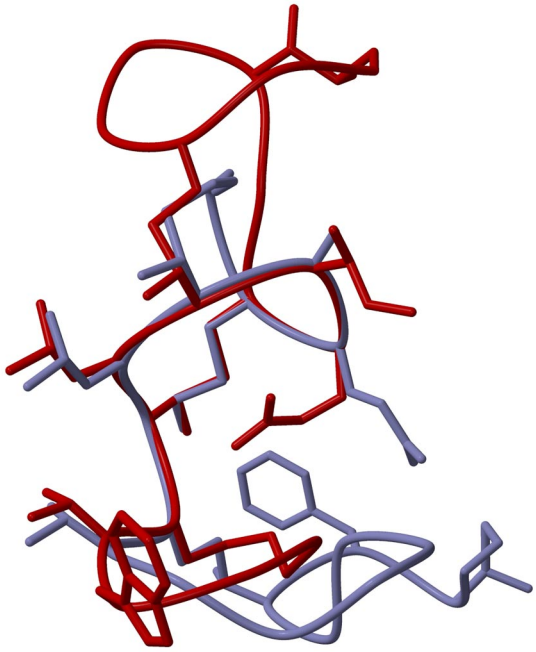


Abbildung 18: *Least-Squares*-Überlagerung der Kristallstrukturen von Actagardin (rot) und Mersacidin (blaugrau). Die mittlere Abweichung der Cα-Atome von Cys6 bis Cys12 beträgt 0.21 Å. Die aromatischen Aminosäuren Phe3 des Mersacidins und Trp4 des Actagardins befinden sich auf gegenüberliegenden Seiten der Moleküle.

Tabelle 14: Wasserstoffbrückenbindungen in der Kristallstruktur des Actagardins.

Wasserstoffbrückenbindung	Abstand [Å]
Dal1_N – Csx19_OT1a$1	2.8 (2)
Dal1_N – Csx19_OT2b$1	2.8 (2)
Gly3_Na – Gly3_Oa$2	2.74(8)
Gly3_Nb – Trp4_Ob$2	2.74(7)
Ser2_Oγa – Trp4_Oa$2	2.91(7)
Val5_N – Eoh400_Oa	2.51(7)
Val5_N – Eoh400_Ob	3.08(7)
Cys6_N – Hoh1004_O	2.82(2)
Hoh1004_O – Dal1_O$3	2.96(3)
Hoh1004_O – Ser2_Oγb$3	2.59(4)
Aba7_N – Leu8_N	2.72(2)
Aba7_N – Glu11_Oε1	2.99(2)
Aba9_N – Hoh1001_O	2.91(2)
Hoh1001_O – Cys12_O	2.95(2)
Hoh1001_O – Ile16_O	2.82(2)
Glu11_N – Glu11_Oε2	2.75(3)
Cys12_N – Aba9_O	2.94(2)
Gly13_N – Hoh1016_O	2.99(4)
Hoh1016_O – Ile10_O	2.66(5)
Aba14_N – Cys17_O	2.93(3)
Ile16_N – Hoh1003_O	2.87(2)
Hoh1003_O – Cys12_O	2.94(2)
Cys17_N – Val15_O$4	2.78(3)
Ala18_N – Hoh1031_Oa	3.15(7)
Ala18_N – Hoh1006_Ob$5	2.75(4)
Hoh1031_Oa – Cys6_O$5	2.30(9)
Hoh1006_Ob – Cys6_O	2.85(3)

$1 = z - 3/4, -y - 3/4, x + 3/4; $2 = z - 1/2, -x - 1/2, -y;
$3 = -y - 1/2, -z, x + 1/2; $4 = -z - 1/4, -y - 5/4, -x - 1/4
$5 = -y - 3/4, x - 1/4, z + 1/4

5 Röntgenstruktur des Ala(0)-Actagardins

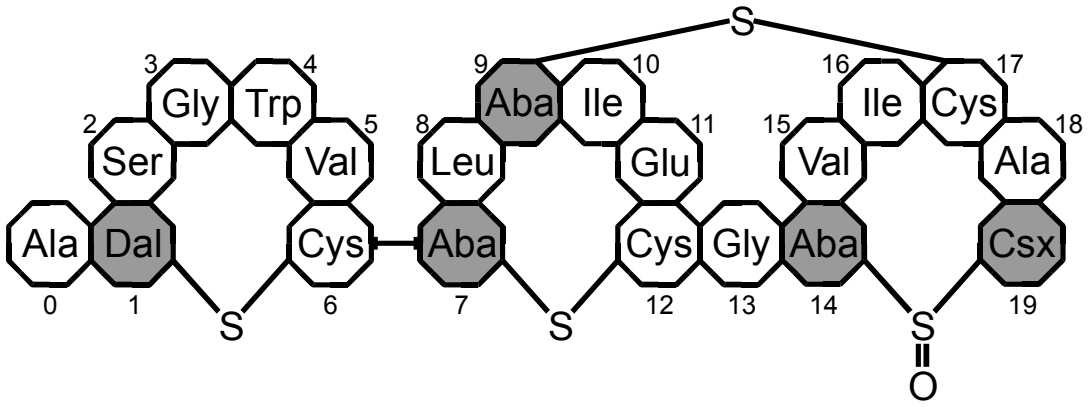


Abbildung 19: Peptidsequenz des Ala(0)-Actagardins.

5.1 Kristallisation

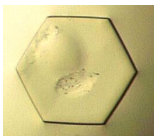
Ala(0)-Actagardin bildet nach der *Hanging-Drop*-Methode unter beinahe identischen Bedingungen zwei morphologisch unterschiedliche Kristallmodifikationen hexagonaler Symmetrie aus, die sich gezielt erzeugen lassen: eine pyramidale und eine prismatische.

Obwohl durch ihre erheblich langsamere Kristallisation von mehreren Monaten die pyramidale Modifikation der prismatischen (plättchenförmigen) vorzuziehen sein sollte, zumal letztere häufig durch Keimbildung am Deckgläschen entsteht und so während des Wachstums entlang einer Ebene durch den Kristallmittelpunkt in ihrer räumlichen Ausdehnung behindert wird, liefert das Beugungsexperiment der prismatischen Form Daten höherer Auflösung.

Da beide Kristallformen dieselbe Raumgruppe und dieselbe Struktur des Ala(0)-Actagardins besitzen, wird im folgenden ausschließlich der hochaufgelöste Datensatz der prismatischen Form zur Diskussion herangezogen.

Die prismatischen Kristalle besitzen Kantenlängen von 150 $\times$ 150 $\times$ 50 μm und wachsen bei Raumtemperatur innerhalb von ca. 2 Wochen.

Tabelle 15: Kristallisations- und Cryobedingungen von Ala(0)-Actagardin.

Ingredienz	hexagonale Plättchen	hexagonale Pyramiden
		
Ala(0)-Actagardin	3.0 mg/mL in H_2O:EtOH=2:1	
HAc / NaAc	0.1 M, pH 4.6	0.1 M, pH 5.0
Isopropanol	30% v/v	25% v/v
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.2 M	
Cryoprotektand	30% v/v Glycerol	
Kristallisation	4 µL *Hanging-Drop* über 500 µL Reservoir	

5.2 Datensammlung

Die Sammlung der Diffraktionsdaten fand an der *EMBL*-Beamline *X31* des *DORIS*-Speicherringes am *DESY* in Hamburg statt. Die Wellenlänge betrug 0.750 Å. Als Detektor kam das Imageplate-System der Firma *MAR* mit 345 mm Durchmesser zum Einsatz. Ein *Oxford Cryostream* temperierte den Kristall bei 100 K.

Glycerol erwies sich als geeigneter Cryoprotektand, um während der Messung die Bildung von Eis zu verhindern. Die Kristalle sind in der glycerolhaltigen Lösung stabil und konnten daher einem etwa zweiminütigen *Soaking* unterzogen werden. Anschließend wurden sie nach der Methode von TENG[46] mit einer Schlaufe aus dünnem Nylon der Lösung entnommen und im Kaltgasstrom des *Oxford Cryostream* schockgefroren.

Bei Kristall-Detektor-Abständen von 90, 250 und 380 mm wurden Daten mit maximalen Auflösungen von 0.90, 1.42 und 2.03 Å aufgenommen. Zur Integration und Skalierung der Daten dienten die Programme *DENZO*[25], *SCALEPACK*[25] und *XPREP*[26].

Die Elementarzelle besitzt hexagonale Metrik mit den Kantenlängen a=b=32.91 Å und c=21.92 Å.

5.3 Strukturlösung

Die Analyse der Röntgendaten mit *XPREP*[26] ergab als höchstsymmetrische Raumgruppe P6. Die Strukturlösung erfolgte mit dem Programm *SHELXD*[30,31], und bereits aus dem ersten Versuch resultierte ein Korrelationskoeffizient von 49.7%, der sich in der anschließenden Optimierung der *Peaklist* [32] bis auf 69.8% verbesserte.

Das Ergebnis enthielt 66 der 80 Hauptketten- und 33 der 54 Seitenkettenatome, sowie einige Atome des Lösungsmittels.

5.4 Strukturverfeinerung

Ähnlich wie bei Actagardin wurden in den ersten Schritten der Verfeinerung zunächst nur die isotropen thermalen Auslenkungsparameter verfeinert und die Atomkoordinaten konstant gehalten. Parallel dazu erfolgte die Umbenennung der aus der Strukturlösung und -verfeinerung gewonnenen Atompositionen gemäß der Nomenklatur des Ala(0)-Actagardins.

Nachdem das Modell des Lantibiotikums auf diese Weise vervollständigt war, konnte anhand der Elektronendichte in *XTALVIEW*[38] ein *Pepflip* der Carbonylgruppe von Ile16 mit einem daran gekoppelten fehlgeordneten Wassermolekül identifiziert werden. Eine zweite Fehlordnung war zu diesem Zeitpunkt auch an der Seitenkette von Ser2 zu erkennen.

Bei der anschließenden anisotropen Verfeinerung gab *SHELXL*[34] eine umfangreiche, etwa zwei Drittel der Gesamtstruktur betreffende Liste von Warnungen über weitere möglicherweise fehlgeordnete Atome aus.

Ausgehend vom *Pepflip* an Ile16 wurden nun zunächst die Aminosäuren zum C-Terminus fehlgeordnet und dann über die Lanthioninbrücke Cys17–Aba9 auch das Zentrum der Struktur von Leu5 bis Aba14. Abschließend mußte auch das N-terminale Ala0 in diese Fehlordnung einbezogen werden.

Somit liegen in der Struktur nebeneinander zwei Konformere des Ala(0)-Actagardins im Verhältnis 54 : 46 als Fehlordnungen vor, die in den Aminosäuren Dal1 bis Trp4 und Val15 übereinstimmen.

Während der Verfeinerung kamen die *Restraints* für Standardaminosäuren nach ENGH und HUBER[37], sowie die aus den Modellen der Mersacidin-Kristallstruktur gewonnenen Parameter zur Geometrie des Lanthionins zum Einsatz.

Um den Verdacht auf Verzwillingung und/oder falsche Wahl der Raumgruppe zu entkräften, wurde die Struktur auch in P3 verfeinert. Das Ergebnis zeigte aber bei den nun zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit dieselbe umfangreiche Fehlordnung wie in der Raumgruppe P6.

Der Vergleich der R_{int}-Werte*) für die Raumgruppen P6 (3.5%) und P622 (40.8%) belegt, daß Ala(0)-Actagardin nicht in der höheren hexagonalen LAUE-Gruppe kristallisiert.

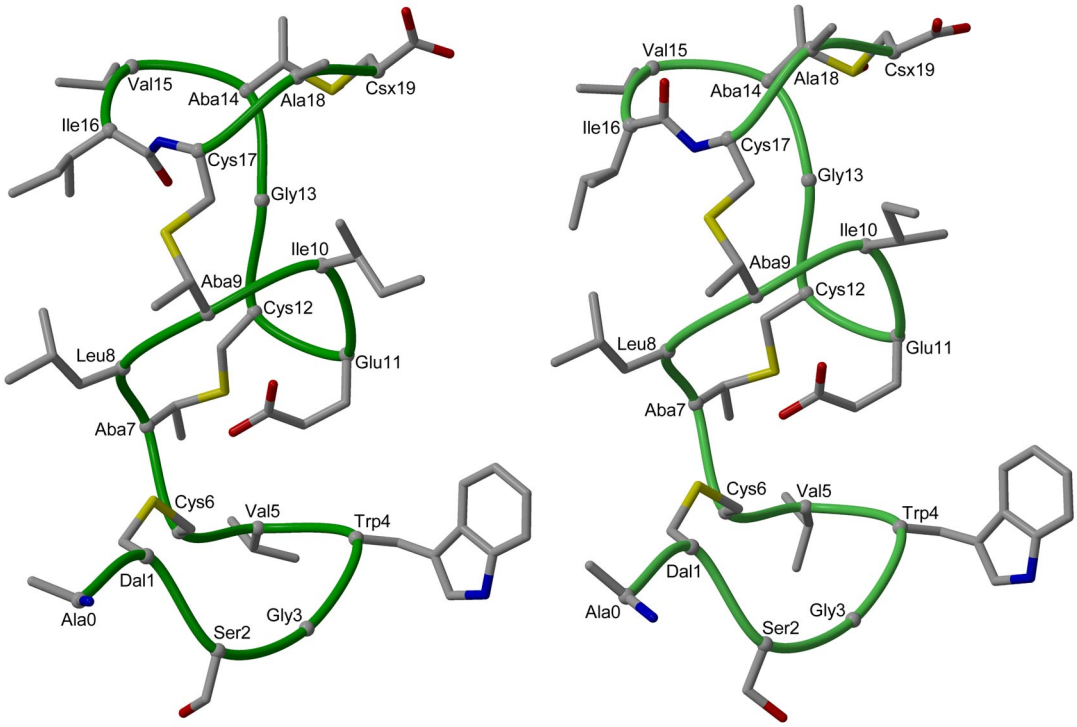


Abbildung 20: Kristallstruktur des Ala(0)-Actagardins (links: PART 1; rechts: PART 2).

*) $R_{int} = \sum \left| F_o^2 - \overline{F_o^2} \right| \Big/ \sum F_o^2$

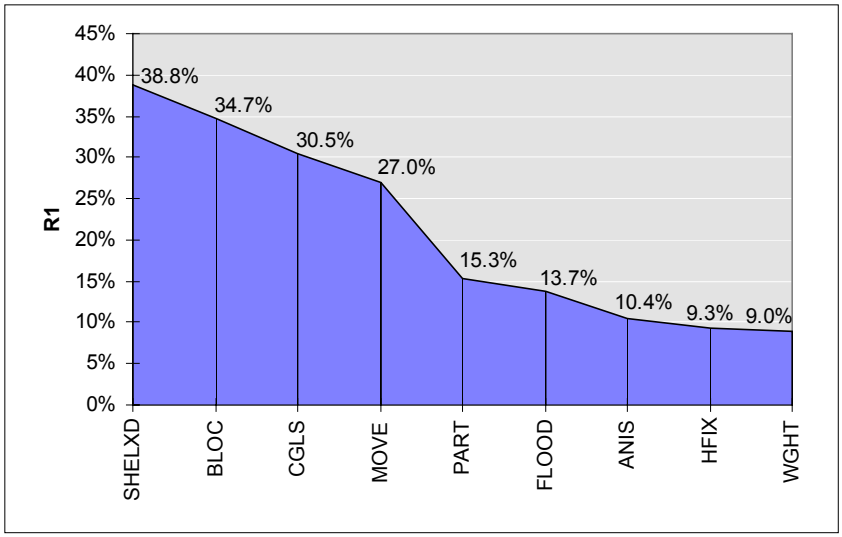


Abbildung 21: Verlauf der Verfeinerung von Ala(0)-Actagardin. Es bedeuten: *SHELXD* - Ausgangskoordinaten nach der Strukturlösung; *BLOC* - Verfeinerung der isotropen thermalen Auslenkungsparameter; *CGLS* - Verfeinerung aller Parameter; *MOVE* - Invertierung der Struktur; *PART* - Fehlordnung der Haupt- und Seitenketten; *FLOOD* - Einfügen von Wassermolekülen; *ANIS* – anisotrope Verfeinerung aller Nicht-Wasserstoffatome; *HFIX* - ideal-geometrische Positionierung von Wasserstoffatomen und deren Verfeinerung nach dem Reitermodell; *WGHT* - Anpassung des Gewichtungsschemas.

Tabelle 16: Kristallographische Daten zur Struktur des Ala(0)-Actagardins.

Summenformel	$C_{84}H_{128}N_{21}O_{25}S_4$	Reflexe (Verfeinerung)	9562
Molmasse [g/mol]	1960	Restraints	6913
Kristallsystem	hexagonal	Parameter	2510
Raumgruppe	P6	R1 (F > 4σ(F)) [%]	9.00
a [Å]	32.91	R1 (alle Daten) [%]	9.26
c [Å]	21.92	R_{free} (F > 4σ(F)) [%]	10.50
V [Å^3]	2.056×10^4	R_{free} (alle Daten) [%]	10.83
Z	6	wR2 [%]	24.38
Meßtemperatur [K]	100	Ala(0)-Actagardin (außer H)	134 Atome
Wellenlänge [Å]	0.7500	Ala(0)-Actagardin (nur H)	128 Atome
Gesammelte Reflexe	61692	Wasser (kein H)	25 Atome
Unabhängige Reflexe	10097	B (Hauptketten) [Å^2]	4
Max. Auflösung [Å]	0.90	B (Seitenketten) [Å^2]	4
Vollständigkeit [%]	99.4	B (Wasser) [Å^2]	13
Mittlere Redundanz	6.1	Fehler Bindungen [Å]	1.9×10^{-2}
$\langle\lvert E^2-1\rvert\rangle$	0.709	Fehler Winkel [Å]	4.0×10^{-2}
R_{int} [%]	3.5		
R_σ [%]	5.5		
$\langle I/\sigma\rangle$	13.7		

5.5 Interpretation der Struktur

Die Existenz zweier Konformere in der Kristallstruktur des Ala(0)-Actagardins ermöglicht, aus ihrem Vergleich auf bewegliche Bereiche der Struktur zu schließen.

Die *Least-Squares*-Überlagerung der beiden Konformere anhand der Cα-Atome der Aminosäuren Cys6 bis Cys12 zeigt eine mittlere Abweichung der Koordinaten dieser Atome von nur 0.12 Å. Aus der Rotationsmatrix und dem Translationsvektor der Überlagerung folgt im wesentlichen eine Parallelverschiebung von Domäne III relativ zu den Domänen II und IV (Abbildung 22; links):

$$\begin{pmatrix} +0.99951 & +0.01583 & -0.02691 \\ -0.01464 & +0.99893 & +0.04377 \\ +0.02758 & -0.04335 & +0.99868 \end{pmatrix} \qquad \left| \begin{pmatrix} -0.34787 \\ +0.89090 \\ -0.90063 \end{pmatrix} \right| = 1.31 \text{ Å}$$

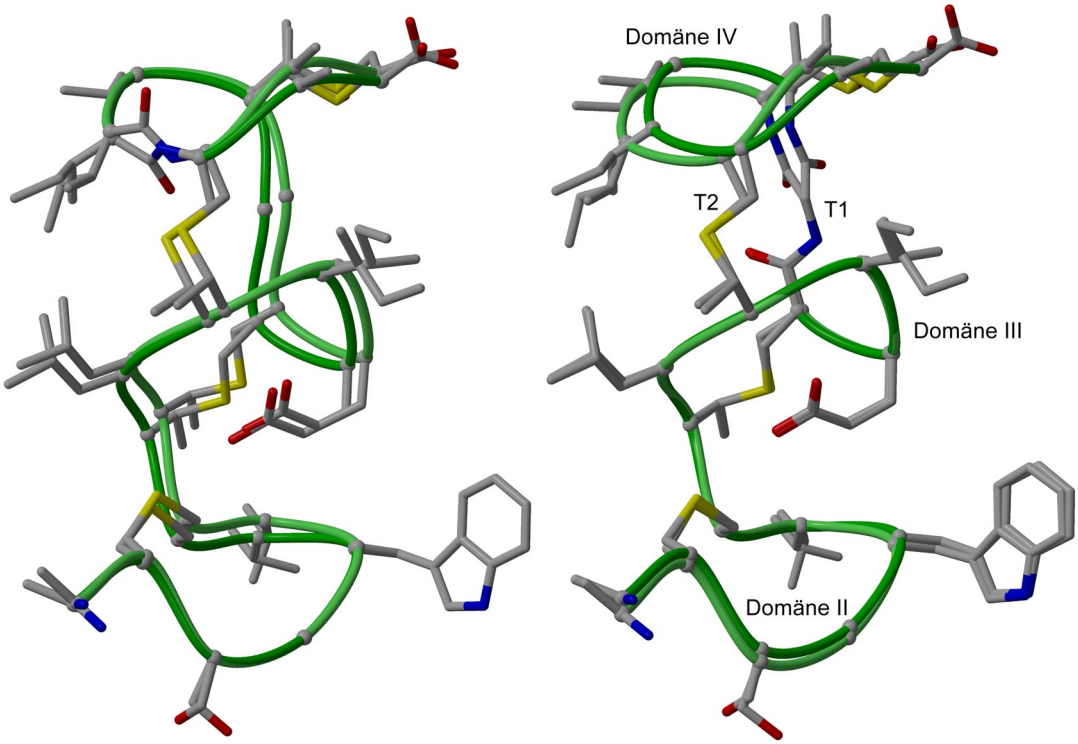


Abbildung 22: Die beiden Fehlordnungskomponenten von Ala(0)-Actagardin im Kristall (links) und nach einem *Least-Squares*-Überlagerung der Cα-Atome von Cys6 bis Cys12 (rechts).

In der Überlagerung beider Fehlordnungskomponenten ist eine Verschiebung der Domäne IV um 1.00 Å ersichtlich (Abbildung 22; rechts), die mit dem *Pepflip* an Ile16 gekoppelt ist. Zusätzlich ändern sich die Torsionswinkel der N-Cα-Bindung von Gly13 (T1) und der Cβ-Sγ-Bindung der Lanthioninbrücke Cys17–Aba9 (T2).

Die Konformation von PART 1 des Ala(0)-Actagardins entspricht, wie nachfolgender Tabelle zu entnehmen ist, dem Actagardin (vgl. Abbildungen 13 und 22):

	T1 [°]	T2 [°]
Ala(0)-Actagardin, PART 1	-92(2)	-154(1)
Ala(0)-Actagardin, PART 2	-66(2)	-173(1)
Actagardin	-92(2)	-157(1)

Die Fehlordnung des zentralen Bereiches der Struktur wird hervorgerufen durch die beiden oben beschriebenen Konformere des Ala(0)-Actagardins in Kombination mit den an zwei-, drei- und sechszähligen kristallographischen Achsen fixierten, über intermolekulare Wasserstoffbrücken verknüpften N- und C-Termini. Als Folge daraus muß der Mittelteil der Struktur ausweichen und ist daher auf zwei Lagen fehlgeordnet.

Die Position des Kaliumions im Actagardin ist im Ala(0)-Actagardin durch das Wassermolekül Hoh1024 besetzt. Werden beide Strukturen mittels eines *Least-Squares*-Überlagerung der Cα-Atome von Cys6 bis Cys12 überlagert, so beträgt der Abstand zwischen K^+ und Hoh1024_O nur 0.38 Å. Es ist anzunehmen, daß von den energetisch gleichwertigen Konformationen des Ala(0)-Actagardins in Anwesenheit eines Metallkations in der Kristallstruktur diejenige des Actagardins bevorzugt wäre.

Die im Actagardin mit einem Calciumion besetzte Bindungstasche ist im Ala(0)-Actagardin leer. Dies ist besonders bemerkenswert, da die Kristallisation in Gegenwart von $CaCl_2$ erfolgte. Statt an ein Kation, bindet Glu11 mit der Seitenkette über eine Wasserstoffbrücke an das Carbonylsauerstoffatom von Leu8 (Glu11_Oε2 – Leu8_O 2.71(6) Å). Bei dem zur Kristallisation gewählten pH-Wert von 4.6 ist die Carboxylatgruppe von Glu11 demzufolge protoniert, obwohl der pKa-Wert der freien Glutaminsäure 4.3 beträgt und für eine Deprotonierung spricht.

Die Untersuchung des Lyophilisats von Ala(0)-Actagardin mittels energiedispersiver Röntgenmikroanalyse*) ergab im Gegensatz zu Actagardin das Fehlen von Calciumionen[57]. In Kapitel 4.5 konnte für Actagardin gezeigt werden, daß der im Kristall ge-

*) Die energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDX) entspricht der in Kap. 4.5 beschriebenen *microPIXE*-Analyse. Der wichtigste Unterschied besteht in der Verwendung eines Elektronen- statt eines Protonenstrahles.

fundene Calciumkomplex bereits in der gefriergetrockneten Ausgangssubstanz vorliegt. Somit ist die Bildung dieser Komplexe bei den Kristallisationsexperimenten bislang nicht beobachtet worden.

CHATTERJEE *et al.*[56] erkannten bei der *in-vitro*-Darstellung des *Mersacidin-Kaliumsalzes* mit KOH die Notwendigkeit, dem Reaktionsgemisch Pyridin zuzusetzen. Dieser Effekt konnte bislang nicht erklärt werden, doch scheint naheliegend, daß Pyridin direkt an der Entstehung des Komplexes beteiligt ist.

Eine mögliche Begründung für die vergleichsweise schwierige Bildung des Kationkomplexes der Lantibiotika ist die kinetische Hemmung, die mit einer konformellen Änderung während der Formierung des Komplexes in Zusammenhang steht und die im folgenden dargelegt werden soll.

Abbildung 23 zeigt ausschnittsweise die Überlagerung der Kristallstrukturen des Actagardin-Calciumsalzes bzw. des Ala(0)-Actagardins mit Mersacidin. Zwischen den Actagardinderivaten ist eine Drehung des N-terminalen Thioetherringes gegenüber dem Rest des Moleküls zu erkennen. Demzufolge kann die Schnittstelle zwischen den Domänen II und III sowohl mit der Ober- als auch mit der Unterseite dieses Ringes gebildet werden, und es stellt sich die Frage, ob ähnlich wie bei Mersacidin (vgl. S. 33) auch für die Actagardine ein Konformationswechsel während der Koordinierung eines Kations postuliert werden kann.

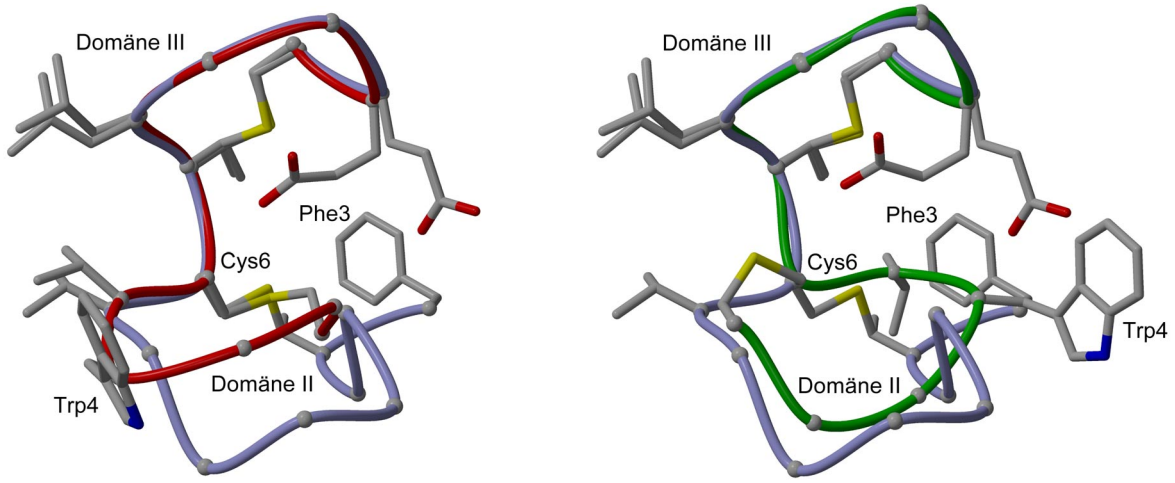


Abbildung 23: *Least-Squares*-Überlagerung von Actagardin (links; rot) bzw. Ala(0)-Actagardin (rechts; grün) mit Mersacidin (blaugrau). Actagardin und Mersacidin zeigen dieselbe Konformation der Peptidkette und der Lanthioninbrücke in Domäne II. Ala(0)-Actagardin und Mersacidin stimmen in der Lage der aromatischen Aminosäuren Trp4 bzw. Phe3 überein. Zwischen Actagardin und Ala(0)-Actagardin findet eine Rotation der Domäne II von 173.2° um die $C\alpha$-C-Bindung von Cys6 statt.

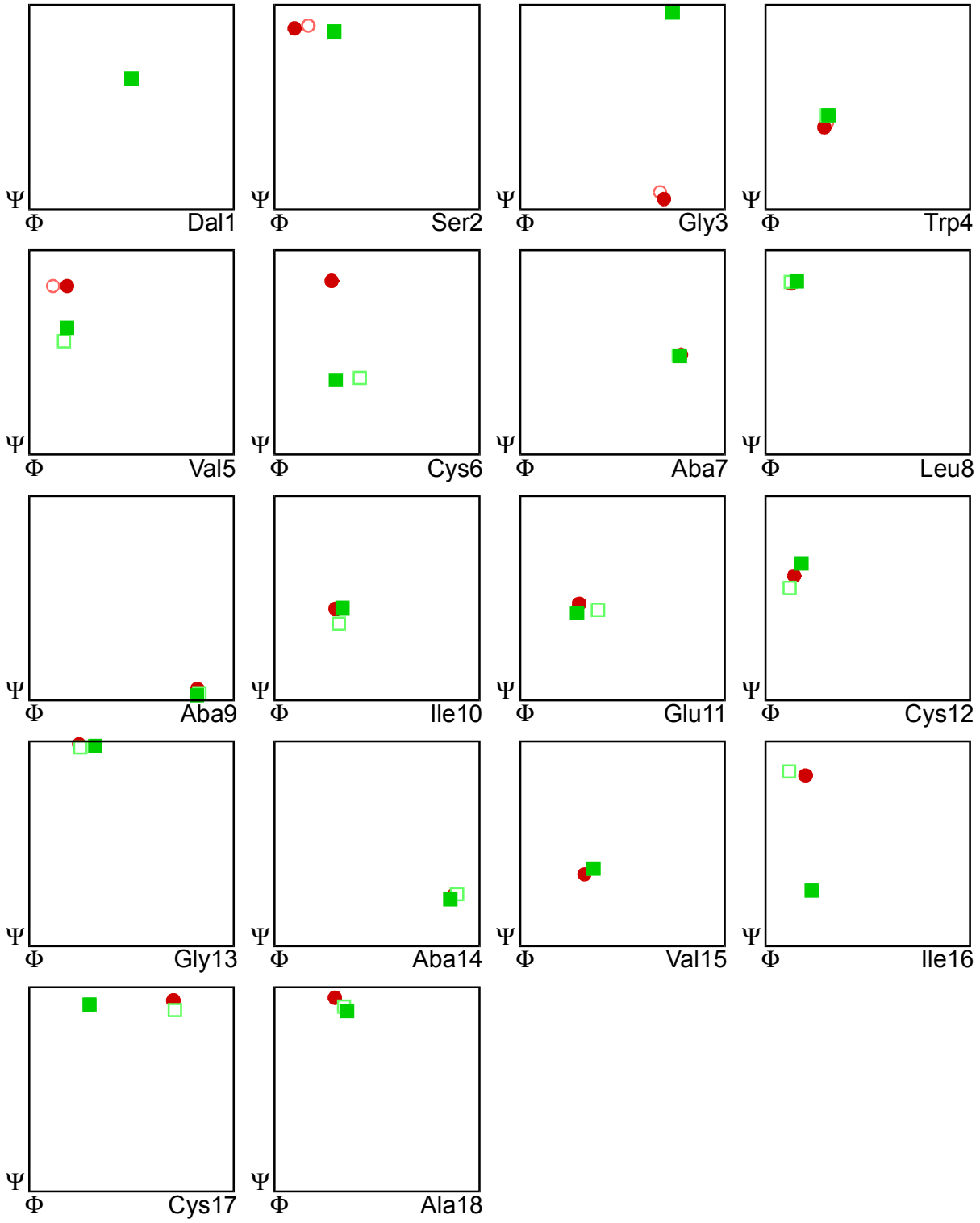


Abbildung 24: RAMACHANDRAN-Plots der Kristallstrukturen von Actagardin (PART 1 = ●; PART 2 = ○) und Ala(0)-Actagardin (PART 1 = ■; PART 2 = □). Die größten Unterschiede befinden sich an Val5/Cys6 (Domäne-II-Rotation) und Ile16/Cys17 (*Pepflip*).

Zunächst ist festzuhalten, daß weder im Actagardin noch im Ala(0)-Actagardin intramolekulare Wasserstoffbrücken zwischen den Domänen II und III existieren, die ein Umklappen behindern könnten (Tab. 14 und 18). Desweiteren ist die Drehung dem kombinierten RAMACHANDRAN-Plot der beiden Lantibiotika zufolge im wesentlichen auf eine Ψ-Rotation in der Aminosäure Cys6 (Cα-C-Bindung) zurückzuführen (Abb. 24).

Wenn die alleinige Drehung um die Cα-C-Bindung von Cys6 ausreichend sein sollte, um die beiden Konformationen ineinander zu überführen, dann dürfen bei der Rotation, abgesehen von der kovalenten Bindung Cys6–Aba7, keine Wechselwirkungen zwischen Atomen der Domänen II und III auftreten. Andernfalls existierten sterische Barrieren und die freie Drehbarkeit wäre eingeschränkt.

Um dies zu überprüfen, wurde die Domäne II in Schritten von 0.1° um die Cα-C-Bindung von Cys6 gedreht und für jede ihrer Orientierungen anhand des *Bond-Valence-Modells* alle Atom-Atom-Abstände zwischen den Domänen II und III in Bindungsvalenzen umgerechnet und aufaddiert. Die sich ergebende Summe ist ein Maß für die sterische Hinderung der Drehung. Im Idealfall, wenn keine Wechselwirkungen zwischen den Domänen auftreten, ergibt sich eine Valenzsumme von Null.

Aus den auf diese Weise abgeschätzten semi-quantitativen Rotationsbarrieren folgt für Actagardin, daß, falls eine Drehung der Domäne II stattfindet, diese im Uhrzeigersinn um die Cα-C-Bindung von Cys6 stattfinden muß (Blickrichtung C→Cα). Bei der umgekehrten Drehbewegung kollidiert die Seitenkette von Val5 mit der Glutaminsäure Glu11. Für Ala(0)-Actagardin gilt entsprechend der gegenläufige Drehsinn, denn die Ausgangslage von Domäne II ist hier gegenüber Actagardin um etwa 180° verdreht (Abb. 25).

Zu beachten ist, daß außer der Ψ-Rotation in Cys6 keine weiteren Torsionswinkel, auch nicht die Stellung der Seitenketten, für die Berechnung verändert wurden. Besonders die Annäherung der N-terminalen Aminosäuren Ala0 und Dal1 an die Seitenkette von Glu11 kann aber durch geringfügige Ausweichbewegungen der Glutaminsäure verhindert werden. Dies ist in Abb. 25 für die beiden Fehlordnungskomponenten des Ala(0)-Actagardins gut zu erkennen. Obwohl sich die beiden Konformationen nur geringfügig unterscheiden, ist der Verlauf der sterischen Hinderung während der Rotation stark unterschiedlich. Dagegen ändert sich die sterische Hinderung

zwischen der Seitenkette von Val5 und der Glutaminsäure kaum. Hier ist neben der Seitenkette auch die Hauptkette von Glu11 involviert.

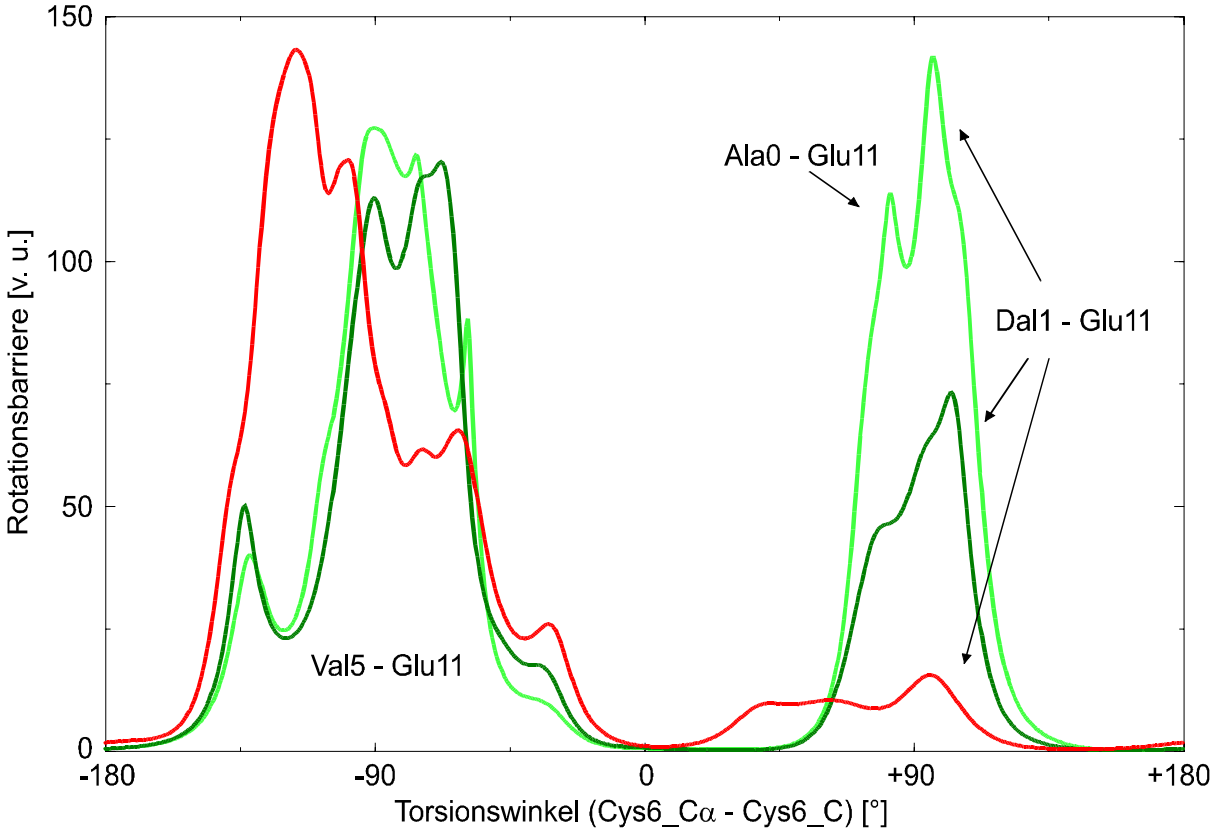


Abbildung 25: Semi-quantitativ berechnete Rotationsbarriere der Drehung von Domäne II in Actagardin (rot) und Ala(0)-Actagardin (hellgrün: PART 1; dunkelgrün: PART 2) um die Cα-C-Bindung von Cys6. Für den Torsionswinkel des Ala(0)-Actagardins gilt eine Phasenverschiebung von 173.2°, die die Graphen beider Lantibiotika zur Deckung bringt. Der Berechnung liegt das *Bond-Valence-Modell* zugrunde, wobei alle Wechselwirkungen zwischen den Domänen II und III als C-C-Wechselwirkungen angenommen sind. Der Wert der Rotationsbarriere ergibt sich aus der Summe der „Valenzen" aller Atom-Atom-Abstände zwischen den Domänen II und III, ausgenommen der kovalenten Bindung zwischen Cys6–Aba7 und (bei Actagardin) Kontakten zum Calciumion.

Durch eine Rotation von 173.2° wird die Domäne II des Actagardins mit einer Abweichung der Ringatome von durchschnittlich 2.11 Å in die Konformation des Ala(0)-Actagardins überführt. Der verbleibende Unterschied ist auf konformelle Änderungen innerhalb des Domäne-II-Ringes an Val5 und an der Lanthioninbrücke Cys6–Dal1 zurückzuführen (Abb. 26; rechts).

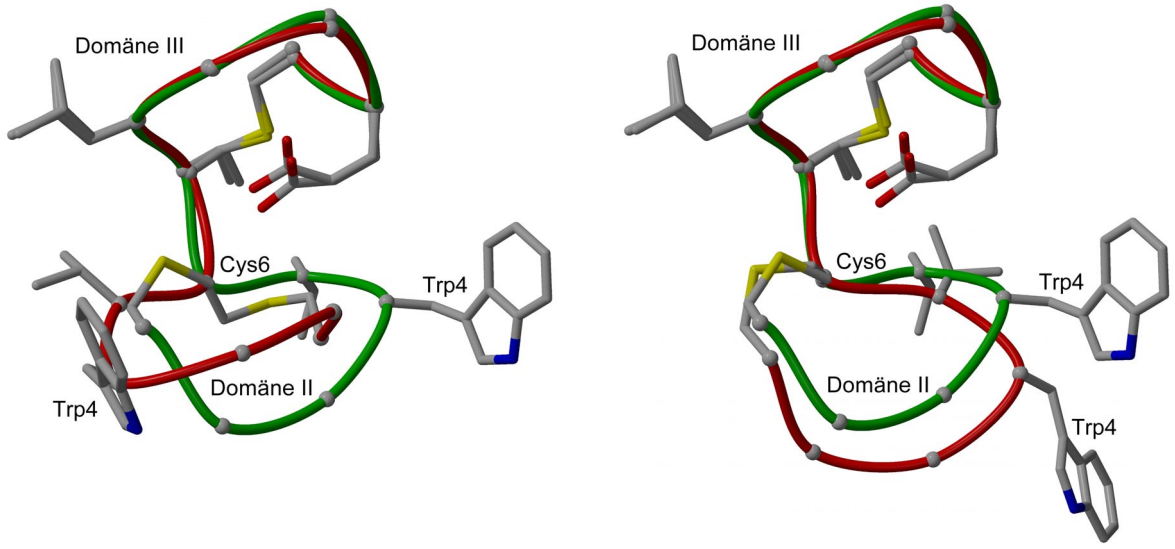


Abbildung 26: Vergleich der Konformationen von Actagardin (rot) und Ala(0)-Actagardin (grün). Die Rotation der Domäne II von Actagardin um 173.2° um die Cα-C-Bindung von Cys6 generiert in erster Näherung, abgesehen von der Orientierung der Seitenkette des Trp4, die Konformation von Ala(0)-Actagardin (links: vor der Rotation; rechts: nach der Rotation).

Bei dem umgekehrten Versuch, Ala(0)-Actagardin an die Konformation des Actagardins anzugleichen, treten sterische Wechselwirkungen zwischen Dal1 und Glu11 auf. Diese gehen auf dieselben konformellen Änderungen innerhalb des Domäne-II-Ringes zurück. Wie der Vergleich zwischen PART 1 und PART 2 des Ala(0)-Actagardins in Abb. 25 belegt, sollte das Molekül jedoch flexibel genug sein, um diese Rotationsbarriere zu überwinden.

Die Aminosäure Ala0 am N-Terminus erzeugt eine zusätzliche sterische Hinderung, die geringfügig die freie Drehbarkeit von Domäne II einschränkt. Darüberhinaus ist, ähnlich wie beim Mersacidin, durch die Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen Ala0 und Glu11 eine Interaktion zwischen den Domänen II und III denkbar, die diese Drehung weiter erschweren könnte.

Als Folge daraus sollte das von VÉRTESY *et al.*[19] *in vitro* synthetisierte Lys(0)-Actagardin aufgrund der größeren Raumbeanspruchung von Lysin gegenüber Alanin und wegen der Fähigkeit, auch mit der Amingruppe der Seitenkette Wasserstoffbrücken bilden zu können, noch stärker in der Drehbarkeit von Domäne II gehindert sein.

Interessanterweise verläuft die biologische Aktivität der Actagardine parallel zum Raumanspruch des N-Terminus und mithin zum Ausmaß der kinetischen Hemmung:

Lys(0)-Actagardin > Ala(0)-Actagardin > Actagardin[19].

Beim Mersacidin wird die Funktion der N-terminalen Aminosäuren durch die Domäne I, d. h. Phe3, Aba2 und Cys1 emuliert. Dieser große Substituent verhindert vollständig die Rotation von Domäne II in der für die Actagardine beschriebenen Weise. Zwar tritt im Vergleich zwischen der Kristallstruktur und dem NMR-Modell[20] die gleiche Rotation um die Cα-C-Bindung von Cys12 auf, sie wird aber durch eine gegenläufige, bei Actagardin und Ala(0)-Actagardin nicht beobachtete Φ-Drehung in Aba13 (N-Cα-Bindung) wieder ausgeglichen (*Pepflip*).

Dies kann also bedingt als Beleg dafür gewertet werden, daß Actagardin und seine Derivate, nicht aber Mersacidin, zwischen beiden Rotationskonformeren wechseln können.

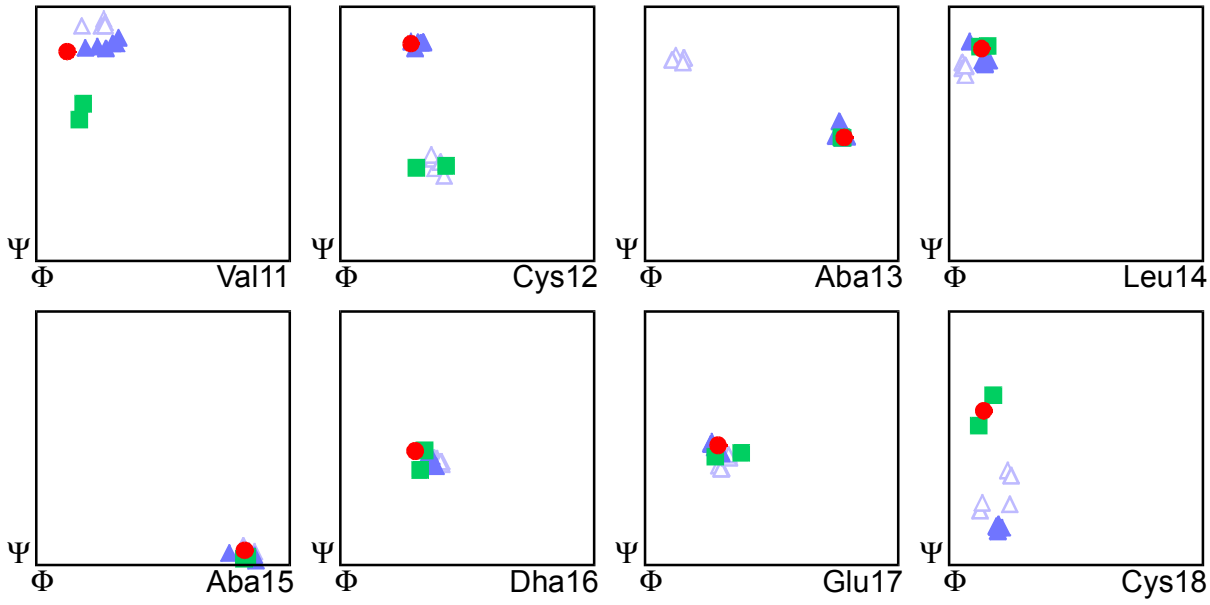


Abbildung 27: RAMACHANDRAN-Plots der konservierten Peptidsequenz Mersacidin-analoger Typ-B-Lantibiotika (Kristallstrukturen von Actagardin (●), Ala(0)-Actagardin (■; zwei Moleküle) und Mersacidin (▲; sechs Moleküle); NMR-Struktur von Mersacidin (△; fünf Modelle)). Die Numerierung und Benennung der Aminosäuren entspricht der Nomenklatur des Mersacidins.

Abschließend soll die Frage geklärt werden, warum Actagardin und Ala(0)-Actagardin zwischen den Rotameren wechseln.

Neben der Fähigkeit Calciumionen zu binden, ist die Lage und Orientierung der aromatischen Seitenkette – Phe3 bei Mersacidin und Trp4 bei Actagardin bzw. Ala(0)-Actagardin – mit hoher Wahrscheinlichkeit von Bedeutung für den Wirkungsmechanismus der Lantibiotika.

Bei allen Konformeren des Mersacidins, sowohl der Kristallstruktur als auch der NMR-Analyse[20], befindet sich das Phenylalanin auf derselben Seite des Moleküls. Zur Koordination eines Calciumions ist zwar eine konformelle Änderung notwendig, das in diesem Zusammenhang in Kapitel 3.5 diskutierte Einknicken des Domäne-II-Ringes beeinflußt die Position von Phe3 jedoch nicht.

Im Gegensatz hierzu können Actagardin und Ala(0)-Actagardin dann ein Kation komplexieren, wenn der Domäne-II-Ring so orientiert ist, daß sich das Tryptophan auf der, im Vergleich zu Mersacidin gegenüberliegenden Seite des Moleküls befindet.

Das andere Rotationskonformer verliert die Fähigkeit zur Komplexbildung mit Sicherheit nicht vollständig, die Koordination sollte jedoch erheblich schwächer sein als in der Kristallstruktur des Actagardins. Dasselbe gilt für die beiden Konformere des Mersacidins.

Wenn also sowohl die Koordination eines Calciumions als auch die Position der Tryptophanseitenkette bedeutenden Einfluß auf die Funktion der Lantibiotika haben sollten, dann müssen Actagardin und seine Derivate durch Rotation der Domäne II zwischen beiden Konformationen wechseln.

Tabelle 17: Vergleich der inhibierenden Aktivität Mersacidin-analoger Typ-B-Lantibiotika gegenüber verschiedenen GRAM-positiven Bakterienstämmen. In 10 der 17 aufgeführten Fälle überwiegt die Aktivität von Mersacidin. In 9 Fällen übertrifft Ala(0)-Actagardin die Aktivität von Actagardin[19].

	MIC [µg / mL] ÷ 0.195		
Bakterienstamm	Mersacidin	Actagardin	Ala(0)-Actagardin
Staph. aureus SG511	**8**	64	32
Staph. aureus 285	**8**	64	32
Staph. aureus 503	**2**	32	16
Staph. aureus FH 1982	**64**	**64**	**64**
Staph. aureus 701 E	**32**	64	64
Staph. aureus 707 E	**64**	128	**64**
Staph. aureus 9 Tüb.	**16**	32	32
Staph. aureus 8236	**8**	32	32
Staph. epidermidis ZH2c	**32**	128	**32**
Staph. epidermidis 6098W	**32**	128	64
Staph. epidermidis 763	**32**	128	**32**
Staph. epidermidis 5747IIW	**16**	**16**	32
Staph. epidermidis 291	**32**	128	64
Staph. epidermidis 799	**32**	128	32
Enteroc. faecum Md8B	128	**16**	32
Streptoc. pyogenes 308A	**16**	32	32
Streptoc. pyogenes 77A	4	**1**	**1**

Tabelle 18: Wasserstoffbrückenbindungen im Ala(0)-Actagardin.

Wasserstoffbrücken-bindung	Abstand [Å] PART 1	Abstand [Å] PART 2
Ala0_N – Ser2_O$1	2.98(2)	2.67(3)
Dal1_N – Csx19_OT2$2	2.63(7)	3.03(9)
Ser2_N – Csx19_OT1$2	2.89(6)	2.87(7)
Trp4_N – Dal1_O$3	2.86(1)	2.86(1)
Val5_N – Ala0_O$3	2.64(6)	3.09(6)
Cys6_N – Gly3_O	3.10(4)	3.16(3)
Aba7_N – Leu8_N	2.74(5)	2.73(4)
Leu8_N – Cys6_Sγ	[3.60(3)]	[3.76(4)]
Glu11_N – Glu11_Oε1	2.67(4)	2.68(4)
Cys12_N – Aba9_O	2.91(3)	2.99(4)
Gly13_N – Ile10_O	3.13(5)	3.16(4)
Aba14_N – Cys17_O	2.76(8)	2.78(9)
Val15_N – Gly13_O$4	2.79(9)	2.95(9)
Ala18_N – Val15_O$5	2.8 (1)	2.9 (1)
Ala0_N – Hoh1010_O	2.79(2)	3.10(4)
Hoh1010_O – Csx19_OT1$6	3.06(5)	2.65(6)
Ile10_N – Hoh1009_O$1	2.93(7)	2.95(8)
Hoh1009_O – Trp4_O	3.03(4)	2.61(4)
Hoh1009_O – Glu11_O	2.83(2)	2.76(2)
Ile16_N – Hoh1000_O	2.89(6)	2.99(6)
Hoh1000_O – Cys12_O	2.91(2)	3.05(3)
Hoh1000_O – Ile16_O	3.08(1)	[5.73(1)]
Hoh1024_O – Aba14_O	2.78(8)	2.68(8)
Hoh1024_O – Val15_O	[4.21(9)]	[4.8 (1)]
Hoh1024_O – Ile16_O	[5.32(4)]	[4.76(3)]
Hoh1024_O – Cys17_O	[3.60(4)]	[4.31(4)]
Glu11_Oε1 – Leu8_O	3.17(4)	3.13(4)
Glu11_Oε2 – Leu8_O	2.70(5)	2.71(6)

$1 = x - y, x - 1, z; $2 = x, y, z - 1; $3 = y + 1, 1 - x + y, z
$4 = 2 - x, 1 - y, z; $5 = 1 - x + y, 1 - x, z; $6 = x - y, x - 1, z - 1

6 Postulierter Wirkmechanismus Mersacidin-analoger Lantibiotika

6.1 Bakterielle Zellwandbiosynthese

Biochemische Untersuchungen von BRÖTZ *et al.*[58-60] belegen, daß den Mersacidin-analogen Typ-B-Lantibiotika das *Lipid-II*-Molekül, der universelle Zellwandbaustein aller Bakterien, als *Target* dient. Bevor anhand der Ergebnisse der strukturellen Untersuchungen (Kapitel 3 bis 5) ein Wirkungsmechanismus postuliert wird, soll daher im folgenden zunächst ein kurzer Überblick zur bakteriellen Zellwandbiosynthese gegeben werden.

Die Zellwand eines Bakteriums besteht aus einem Geflecht von quervernetzten Polysaccharid- und Polypeptidsträngen und wird demzufolge als *Peptidoglycan* bezeichnet (Abb. 28). Das Lipid-II-Molekül ist der Monomerbaustein des Peptidoglycans und seine Synthese findet im Cytoplasma des Bakteriums statt.

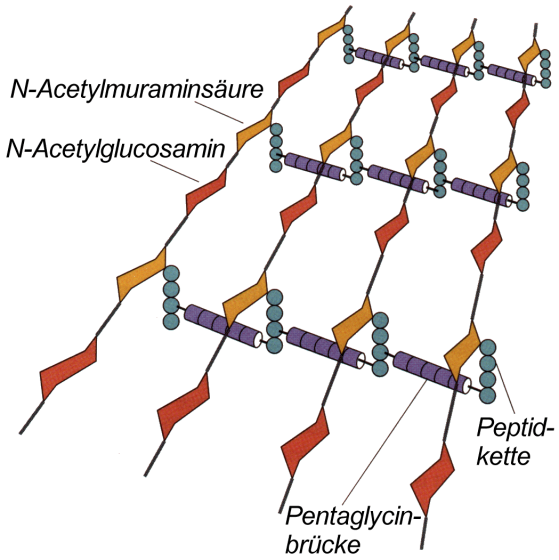


Abbildung 28: Schematische Darstellung des Peptidoglycans in *Staphylococcus aureus*[61].

Das Lipid II enthält die beiden derivatisierten Aldohexosen *N-Acetylglucosamin (GlcNAc)* und *N-Acetylmuraminsäure (MurNAc)*, die β(1,4)-glucosidisch zum Disaccharid verbunden sind. An die Muraminsäure binden außerdem das *Pentapeptid*

L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala und der *Diphosphat*ester des *Undecaprenols*[62] (Abb. 29).

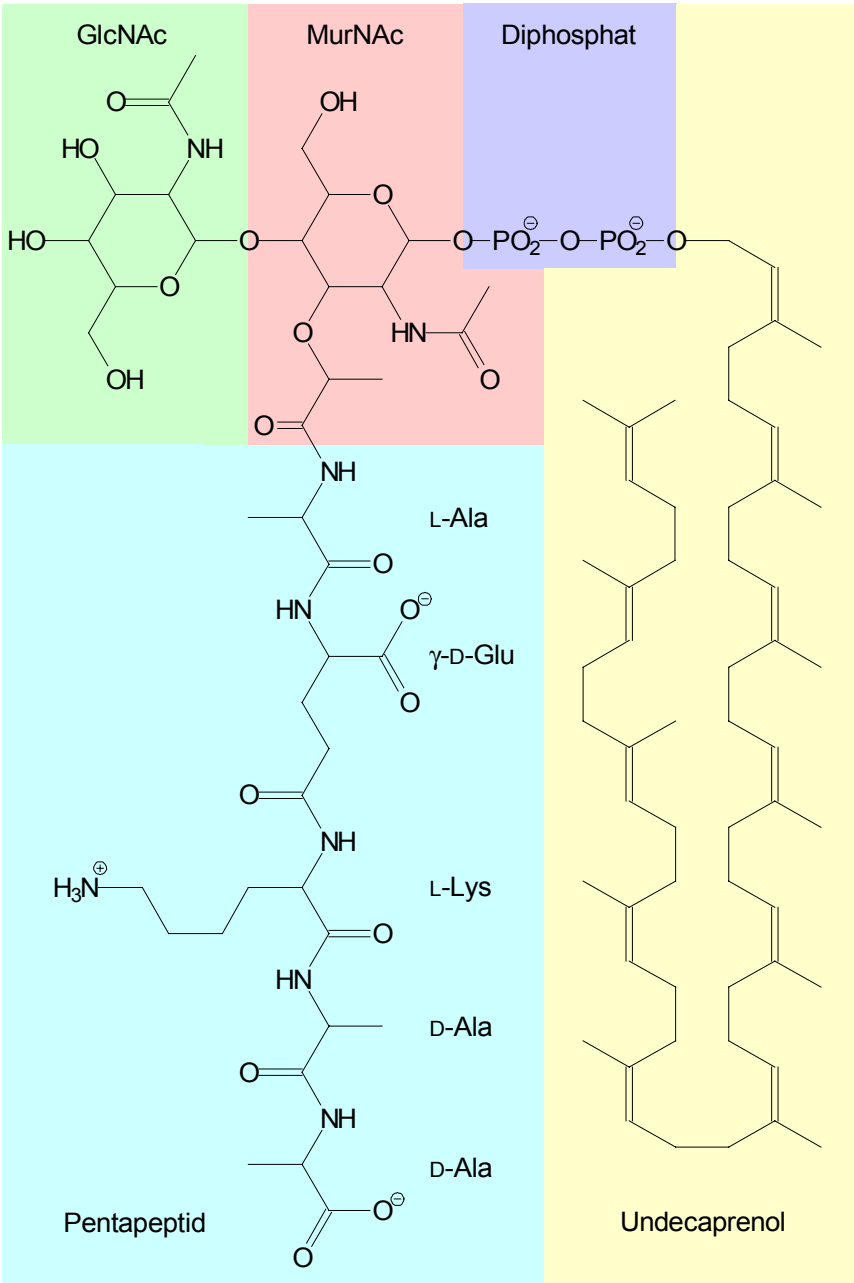


Abbildung 29: Struktur des Lipid II. Das Molekül besitzt einen Überschuß von drei negativen Ladungen, von denen zwei am Diphosphat lokalisiert sind.

Die letzten Schritte der cytoplasmatischen Synthese erfolgen, während der Vorläufer des Lipid II, entsprechend Lipid I genannt, über den isoprenoiden Träger (Undecaprenol) an der Zellmembran befestigt ist. Das Lipid-II-Molekül wird nach seiner Fer-

tigstellung an die Außenseite der Membran transportiert und über *Transglycosylierung* und *Transpeptidierung* zum Peptidoglycan polymerisiert[63] (Abb. 30).

Der Isoprenträger wird nach der Polymerisation wieder in das Innere des Bakteriums überführt und steht dort für einen erneuten Ablauf dieses Kreisprozesses zur Verfügung. Für Bakterien der Art *Micrococcus luteus* konnten 2×10^5 Moleküle des Isoprenträgers pro Zelle nachgewiesen werden[60].

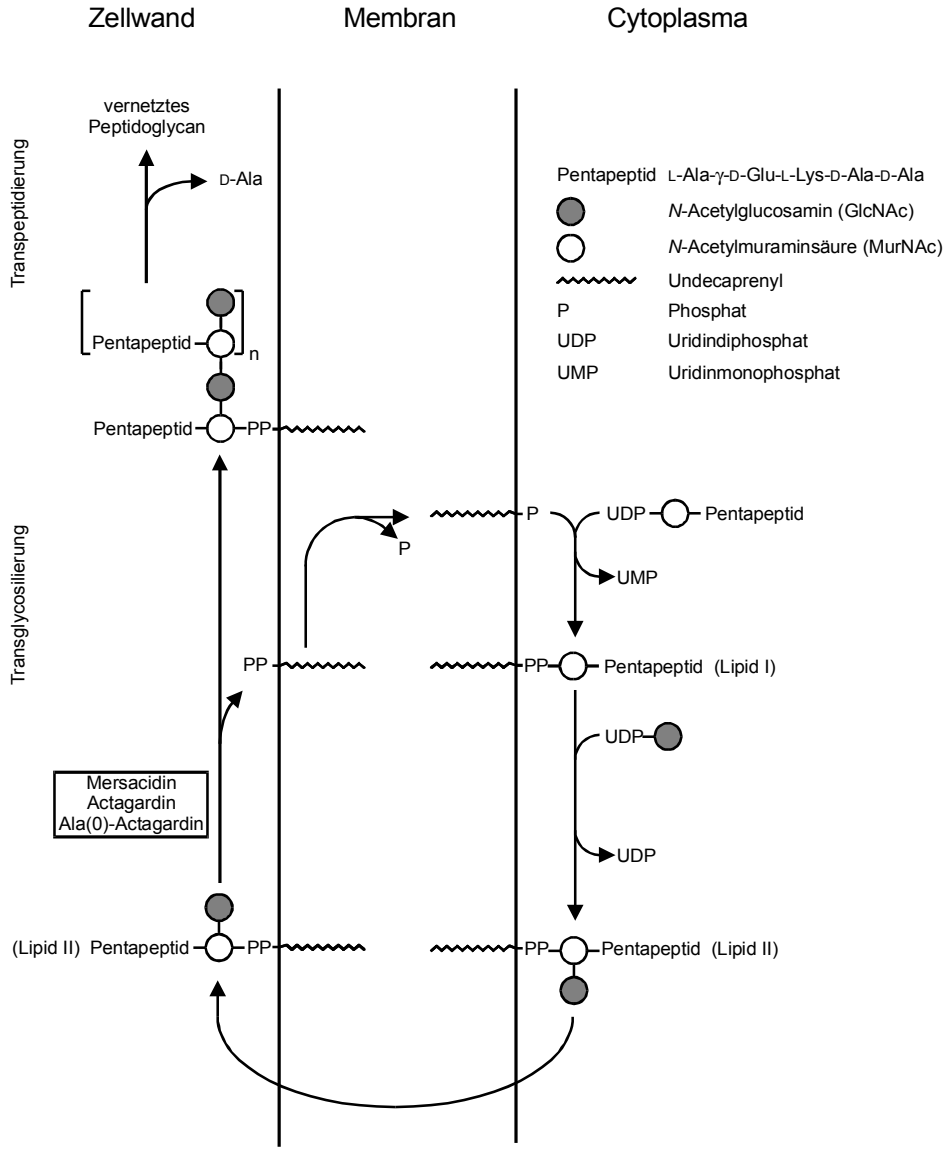


Abbildung 30: Biosynthese des Lipid-II-Moleküls und des Peptidoglycans[63]. Die Typ-B-Lantibiotika Mersacidin, Actagardin und Ala(0)-Actagardin blockieren die Spaltung der Esterbindung zwischen dem Diphosphat (PP) und der *N*-Acetylmuraminsäure (O). Sie verhindern damit die Bildung des Polysaccharid-Stranges des Peptidoglycans (Transglycosilierung).

6.2 Postulierter Wirkmechanismus Mersacidin-analoger Lantibiotika

Die Untersuchungen von BRÖTZ *et al.*[59] belegen in Gegenwart von Mersacidin den Anstieg von zwei Intermediaten der Zellwandbiosynthese: *UDP-MurNAc-Pentapeptid*, dies ist der unmittelbare Vorläufer des Lipid I (vgl. Abb. 30), und das Lipid-II-Molekül selbst. In *M. luteus* (s. o.) existieren für das Lantibiotikum ca. 2×10^5 Bindungsstellen pro Bakterium[60].

Da Mersacidin nachweislich nicht mit der an der Transglycosilierung beteiligten *Glycosyltransferase*, einem extrazellularen membrangebundenen Enzym, reagiert[58], kommt das Lipid II als einziges Zielmolekül des Lantibiotikums in Frage. Mersacidin verhindert offensichtlich die Abspaltung des Isoprenträgers durch die Glycosyltransferase und blockiert damit gleichzeitig die Synthese von Lipid I, denn alle Moleküle des Isoprenträgers (ebenfalls ca. 2×10^5) sind im nicht umgesetzten Lipid II gebunden.

Weitere Unterstützung findet diese Schlußfolgerung dadurch, daß die antibakterielle Aktivität der Mersacidin-analogen Lantibiotika durch einen Überschuß an Lipid II inhibiert wird. Allerdings ist es bislang nicht gelungen, auch durch die Verwendung von Fragmenten des Lipid II eine Inhibierung zu erzielen und damit Rückschlüsse auf die Region des Moleküls zu ziehen, an dem das Lantibiotikum angreift[60].

Da selbst Lipid I keine Inhibierung der antibiotischen Aktivität bewirkt und der einzige Unterschied zu Lipid II in der fehlenden *GlcNAc*-Einheit besteht, scheint zumindest das Disaccharid an dem Komplex beteiligt zu sein. *GlcNAc-MurNAc* allein hebt die Aktivität von Mersacidin jedoch auch nicht auf, so daß zusätzlich auch andere Bereiche des Lipid II eine Rolle spielen müssen.

Die von BARRETT *et al.*[55] gefundene Steigerung der antibiotischen Aktivität von Mersacidin in Gegenwart eines an Calciumionen angereicherten Mediums legen im Zusammenhang mit den in den Lantibiotika gefundenen Calciumbindungstaschen eine Koordination der Lantibiotika an das Diphosphat im Lipid II nahe. Begründen läßt sich dies mit der hohen Affinität von Diphosphat zu Calcium: das Lipid-II-Molekül ist ein Anion mit drei negativen Ladungen, von denen zwei am Diphosphat lokalisiert sind. Obwohl in der Literatur keine Angaben hierzu gemacht werden, bin ich der Auffassung, daß Kationen an das Diphosphat im Lipid II koordinieren und so einen Ladungsausgleich herbeiführen. Calciumionen wären dazu prädestiniert.

An die Bindung zwischen dem Diphosphat und der N-Acetylmuraminsäure dockt die Glycosyltransferase an, protoniert das Sauerstoffatom der Phosphatesterbindung und ermöglicht damit in einer S_N2-Reaktion den nucleophilen Angriff der Hydroxylgruppe von C4 des N-Acetylglucosamins eines zweiten Peptidoglycanbausteins. Das Undecaprenyldiphosphat wird daraufhin abgespalten und eine β(1,4)-Glucosidbindung zwischen den Zuckerringen wird gebildet[64]. Leider sind die an der bakteriellen Zellwandbiosynthese beteiligten Glycosyltransferasen bislang aus struktureller Sicht noch nicht ausreichend charakterisiert, um die dreidimensionale Struktur des Enzym-Substrat-Komplexes vorherzusagen[65,66].

Die antibakterielle Wirkung der Mersacidin-analogen Typ-B-Lantibiotika besteht nach einem Vorschlag von SAHL *et al.*[16] in der Blockierung der Phosphatesterbindung des Lipid II, in deren Folge der Glycosyltransferase der Zugang zum Substrat verwehrt bleibt. Der Komplex aus Mersacidin und Lipid II erweist sich als sehr stabil. So findet z. B. bei der Aufreinigung durch Spülen mit Pufferlösungen oder Methanol keine Spaltung statt. Nur durch das Erhitzen einer Lösung des Komplexes bis zum Sieden ist es BRÖTZ *et al.*[60] gelungen, Mersacidin aus dem Komplex wieder freizusetzen.

Die Bildung des Lantibiotikum-Lipid-II-Komplexes sollte mit der Anlagerung der Diphosphatgruppe des Lipid II über ein dort befindliches Calciumion an das Lantibiotikum eingeleitet werden. Während der Annäherung entstehen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem Calciumion und dem Lantibiotikum, die das für Mersacidin diskutierte Knicken bzw. das für die Actagardine gezeigte Umklappen des Domäne-II-Ringes auslösen könnten. Der dabei entstehende Komplex verbände das Lantibiotikum nicht nur mit dem Calciumion, sondern auch mit dem Lipid II.

Weiterhin könnten die aromatischen Aminosäuren – Phenylalanin im Mersacidin und Tryptophan im Actagardin – eine Wechselwirkung mit den Zuckerringen im Lipid II eingehen. In kohlenhydratbindenden Proteinen wie den *Xylanasen*[67] sind die Bindungstaschen ebenfalls mit aromatischen Aminosäuren ausgekleidet und bewirken über *aromatic stacking* oder *hydrophobic stacking* bezeichnete Interaktionen mit den Zuckerringen deren Koordinierung.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sind die Einkristallröntgenstrukturanalysen von *Mersacidin*, *Actagardin* und *Ala(0)-Actagardin* angefertigt worden. Diese drei Verbindungen bilden die Stoffklasse der Mersacidin-analogen Typ-B-Lantibiotika. Sie besitzen antibiotische Aktivität gegenüber einigen GRAM-positiven Bakterienstämmen, darunter auch multiresistente Spezies der Art *Staphylococcus aureus (MRSA)*.

Die Lantibiotika sind Oligopeptide, deren charakteristisches Merkmal schwefelhaltige Ringstrukturen innerhalb der Peptidkette sind. Hierbei handelt es sich um zyklische Thioether, die eine Klasse von Nicht-Standardaminosäuren, die sogenannten Lanthionine, enthalten. Der hohe Anteil an ungewöhnlichen Aminosäuren mit zum Teil invertierter Konfiguration der stereogenen α-Kohlenstoffatome macht die Lantibiotika zu interessanten neuen Therapeutika im Kampf gegen bakterielle Infektionen.

Durch die Bildung eines Komplexes mit Lipid II, dem universellen Zellwandbaustein aller Bakterien, verhindern die Typ-B-Lantibiotika die Polymerisierung zum Peptidoglycan. Dieser Schritt der bakteriellen Zellwandbiosynthese heißt Transglycosilierung und wird von der Glycosyltransferase, einem extrazellularen membrangebundenen Enzym, katalysiert. Die Beteiligung von Calciumionen an der Entstehung und am Aufbau des Komplexes gilt als wahrscheinlich, denn eine Erhöhung der Calciumionenkonzentration fördert die antibakterielle Wirkung der Typ-B-Lantibiotika[55]. Als Bindungsstelle im Lipid II kommt für die Antibiotika vor allem das Diphosphat aufgrund seines anionischen Charakters und seiner hohen Affinität zu Calcium in Betracht.

In den Kristallstrukturen der beiden Actagardine ist erstmals die Existenz einer anionischen Bindungstasche bewiesen worden, die im Ala(0)-Actagardin leer, beim nativen Actagardin dagegen mit einem Calciumion besetzt ist. Konformelle Unterschiede zwischen den Strukturen belegen die Drehung des N-terminalen Lanthioninringes und lassen dies als einen Teil des biochemischen Wirkmechanismus der Typ-B-Lantibiotika vermuten. Durch Vergleich der Actagardine mit den NMR- und Kristallstrukturen des Mersacidins konnte auch für dieses Antibiotikum eine Bindungsstelle für Calciumionen postuliert und die Existenz zweier Konformere nachgewiesen werden.

Die Bildung der Calciumsalze Mersacidin-analoger Typ-B-Lantibiotika *in vitro* gestaltet sich schwierig. Offensichtlich ist die mit der Koordinierung eines Kations verbundene, im vorherigen Abschnitt erwähnte konformative Änderung kinetisch gehemmt bzw. bedarf der Überwindung einer Energiebarriere. Untersuchungen von CHATTERJEE *et al.*[56] belegen die Notwendigkeit von Pyridin zur Darstellung des Kaliumsalzes von Mersacidin. Die Funktion des Aromaten bei der Bildung des Komplexes ist bislang unbekannt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß das Lipid II *in vivo* auf ähnliche Weise der Koordinierung des Kations dienlich ist.

Für die antibiotische Aktivität der Lantibiotika scheint daher folgender Mechanismus plausibel: das calciumfreie Antibiotikum nähert sich dem Lipid-II-Molekül und koordiniert über ein dort befindliches Calciumion an die Diphosphateinheit seines Substrates. Dabei treten die beschriebenen konformativen Änderungen auf. Das Lantibiotikum umschließt das Calciumion und geht damit auch eine stabile Verbindung mit dem Lipid II ein. Als Folge daraus bleibt der Glycosyltransferase der Zugang zu ihrem Substrat verwehrt, die weitere Biosynthese der bakteriellen Zellwand kommt zum Erliegen, und das Bakterium stirbt bei der nächsten Zellteilung. Es gibt derzeit kein in der Humanmedizin eingesetztes Antibiotikum mit diesem Funktionsprinzip. Kreuzresistenzen mit anderen Antibiotika sind daher unwahrscheinlich und bislang nicht bekannt.

Zur Verifizierung des postulierten Wirkmechanismus ist die Anfertigung zusätzlicher Kristallstrukturen notwendig. Besonderes Augenmerk sollte der Bildung des Calciumkomplexes der Lantibiotika gewidmet werden. Da die Synthese des Lipid II in für die Kristallzucht notwendigen Mengen nur mit sehr hohem Aufwand möglich ist[57], stellt stattdessen die Co-Kristallisation mit Pyridin ein adäquates Mittel hierzu dar. Auch sollte die Spezifität der Lantibiotika für Calcium getestet werden, indem auch andere Kationen (z. B. Co^{2+} oder Cd^{2+}) bei der Kristallisation eingesetzt werden.

Zudem sollte die Kristallisation des calciumfreien Actagardins Aufschluß über den postulierten konformellen Übergang der Rotamere des Calcium-Actagardins und des Ala(0)-Actagardins geben. Die selektive Entfernung der Calciumionen mit einem für zweiwertige Kationen spezifischen Harz, wie es beispielsweise von der Firma Hampton Research®[68] angeboten wird, stellt ein geeignetes Mittel für diesen Zweck dar. Der große Vorteil gegenüber chelatisierenden Reagenzien (z. B. EDTA), ist die

Möglichkeit, das in wässrigen Medien unlösliche Harz nach der Adsorption der Kationen durch Zentrifugation rückstandlos abzutrennen.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Dissertation betrifft den konservierten Bereich der Peptidsequenz von Cys12 bis Cys18 im Mersacidin und Cys6 bis Cys12 im Actagardin bzw. Ala(0)-Actagardin. Die NMR-Analyse des Mersacidins in Lösung von PRASCH *et al.*[20] und die hier vorgestellten Kristallstrukturen der Lantibiotika, insgesamt zehn Strukturen, besitzen für diese sieben Aminosäuren dieselbe Faltung. Grundlegend verschieden sind dagegen die NMR-Modelle des Actagardins in Lösung von ZIMMERMANN *et al.*[21] (Tab. 19). Vor diesem Hintergrund sollten die spektroskopischen Daten der Actagardin-NMR-Analyse einer neuen Bewertung unterzogen werden.

Tabelle 19: Mittlere Abweichung der Cα-Atome in den *Least-Squares*-Überlagerungen der genannten Moleküle mit Molekül A der Mersacidin-Kristallstruktur. Für die Überlagerungen und die Bestimmung der Abweichung wurden die Cα-Atome von Cys12 bis Cys18 im Mersacidin und Cys6 bis Cys12 im Actagardin bzw. Ala(0)-Actagardin benutzt. Die Kristallstrukturen sind mit XTL und die kernresonanzspektroskopischen Modelle mit NMR gekennzeichnet

Molekül	Abweichung [Å]	Molekül	Abweichung [Å]
Mersacidin (Molekül B; XTL)	0.23	Mersacidin (Modell A; NMR)	0.61
Mersacidin (Molekül C; XTL)	0.25	Mersacidin (Modell B; NMR)	0.69
Mersacidin (Molekül D; XTL)	0.30	Mersacidin (Modell C; NMR)	0.55
Mersacidin (Molekül E; XTL)	0.20	Mersacidin (Modell D; NMR)	0.62
Mersacidin (Molekül F; XTL)	0.23	Mersacidin (Modell E; NMR)	0.56
Actagardin (XTL)	0.21	Actagardin (NMR)	1.67
Ala(0)-Actagardin (PART 1; XTL)	0.19	Ala(0)-Actagardin (PART 2; XTL)	0.24

Trotz dieser Abweichung sind, wie einleitend erwähnt wurde, die NMR-Analyse und die Röntgenstrukturbestimmung durch ihre Komplementarität in der Lage, sich gegenseitig zu ergänzen. Gerade durch die Unterschiede zwischen den Ergebnissen sind Rückschlüsse auf die dynamischen Eigenschaften und die konformative Variabilität der untersuchten Verbindungen möglich.

8 Literaturverzeichnis

[1] R. M. Esnouf, „An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities“, *J. Mol. Graph. Model*, **1997**, *15*, 132-134.

[2] P. J. Kraulis, „*MOLSCRIPT:* a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures“, *J. Appl. Cryst.*, **1991**, *24*, 946-950.

[3] E. A. Merritt, D. J. Bacon, „Raster3D: Photorealistic Molecular Graphics“, *Methods Enzymol.*, **1997**, *276*, 505-524.

[4] XP, *Programm zur interaktiven graphischen Darstellung von Molekülen*, v6.03, © Bruker Advanced X-ray Solutions, Inc., **1999**.

[5] W. Kabsch, „A solution for the best rotation to relate two sets of vectors“, *Acta Cryst.*, *A32*, 922-923.

[6] Collaborative Computational Project, Number 4, „The *CCP4* Suite: Programs for Protein Crystallography“, *Acta Cryst.*, **1994**, *D50*, 760-763.

[7] P. M. Hawkey, „Action against antibiotic resistance: no time to lose“, *Lancet*, **1998**, *351*, 1298-1299.

[8] F. A. Waldvogel, „New Resistance in *staphylococcus aureus*“, *N. Engl. J. Med.*, **1999**, *340*, 556-557.

[9] M. Schäfer, „Glycopeptid Antibiotika - Kristallisation, Datensammlung und Strukturaufklärung“, Dissertation, Universität Göttingen, **1997**.

[10] K. Wüthrich, „NMR – This Other Method for Protein and Nucleic Acid Structure Determination“, *Acta Cryst.*, **1995**, *D51*, 249-270.

[11] M. J. Horn, D. B. Jones, S. J. Ringel, „Isolation of a new sulfur-containing amino acid (lanthionine) from sodium carbonate-treated wool“, *J. Biol. Chem.*, **1941**, *138*, 141-149.

[12] G. Alderton, „A New Sulfur-containing Amino Acid from Subtilin“, *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, *75*, 2391-2392.

[13] J. R. Knox, P. C. Keck, „β-Methyllanthionine: a Sulfur Amino Acid in Subtilin and Nisin Antibtiotics“, *Acta Cryst.*, **1975**, *B31*, 2698-2700.

[14] G. Jung, „Lantibiotics - ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α,β-didehydroamino acids“, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1991**, 30, 1051-1068, *Angew. Chem.*, **1991**, 103, 1067-1084.

[15] H.-G. Sahl, R. W. Jack, G. Bierbaum, „Review: Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications“, *Eur. J. Biochem.*, **1995**, 230, 827-853.

[16] H.-G. Sahl, G. Bierbaum, „LANTIBIOTICS: Biosynthesis and Biological Activities of Uniquely Modified Peptides from Gram-Positive Bacteria“, *Annu. Rev. Microbiol.*, **1998**, 52, 41-79.

[17] S. Chatterjee, S. Chatterjee, S. J. Lad, M. S. Phansalkar, R. H. Rupp, B. N. Ganguli, H.-W. Fehlhaber, H. Kogler, „Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus* – fermentation, isolation, purification and chemical characterization“, *J. Antibiot.*, **1992**, 45, 832-838.

[18] F. Parenti, H. Pagani, G. Beretta, „Gardimycin, a new antibiotic from *Actinoplanes*. I. Description of the producer strain and fermentation studies“, *J. Antibiot.*, **1976**, 29, 501-506.

[19] L. Vértesy, W. Aretz, A. Bonnefoy, E. Ehlers, M. Kurz, A. Markus, M. Schiell, M. Vogel, J. Wink, H. Kogler, „Ala(0)-Actagardine, a New Lantibiotic from Cultures of *Actinoplanes liguriae* ATCC 31048“, *J. Antibiotics*, **1999**, 52, 730-741.

[20] T. Prasch, T. Naumann, R. L. M. Markert, M. Sattler, W. Schubert, S. Schaal, M. Bauch, H. Kogler, C. Griesinger, „Constitution and solution conformation of the lantibiotic mersacidin determined by NMR and molecular dynamics“, *Eur. J. Biochem.*, **1997**, 244, 501-512.

[21] N. Zimmermann, G. Jung, „The three-dimensional solution structure of the lantibiotic murein-biosynthesis-inhibitor actagardine determined by NMR“, *Eur. J. Biochem.*, **1997**, 246, 809-819.

[22] T. R. Schneider, J. Kärcher, E. Pohl, P. Lubini, G. M. Sheldrick, „*Ab initio* structure determination of the lantibiotic mersacidin“, *Acta Cryst.*, **2000**, D56, 705-713.

[23] E. Pohl, persönliche Mitteilung.

[24] T. Kottke, D. Stalke, „Crystal handling at low temperatures“, *J. Appl. Cryst.*, **1993**, *26*, 615-619.

[25] Z. Otwinowski, W. Minor, „Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode“, *Methods Enzymol.*, **1997**, *276*, 307-326.

[26] XPREP, *Programm zur Bearbeitung von Beugungsdaten und zur Untersuchung reziproker Gitter*, v6.03, © Bruker Advanced X-ray Solutions, Inc., **1999**.

[27] R. Herbst-Irmer, G. M. Sheldrick, „Refinement of Twinned Structures with *SHELXL97*“, *Acta Cryst.*, **1998**, *B54*, 443-449.

[28] T. O. Yeates, „Detecting and Overcoming Crystal Twinning“, *Methods Enzymol.*, **1997**, *276*, 344-358.

[29] G. M. Sheldrick, UNTWIN*, Programm zur Entzwillingung der Diffraktionsdaten des Mersacidins*, **1997**, nicht veröffentlicht.

[30] G. M. Sheldrick, „SHELX applications to macromolecules“ in „Direct Methods for Solving Macromolecular Structures“, S. Fortier (Herausgeberin), Kluwer Academic Publishers, **1998**, 401-411.

[31] I. Usón, G. M. Sheldrick, „Advances in direct methods for protein crystallography“, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1999**, *9*, 643-648.

[32] M. Fujinaga, R. Read, „Experiences with a New Translation-Function Program“, *J. Appl. Cryst.*, **1987**, *20*, 517-521.

[33] G. M. Sheldrick, R. O. Gould, „Structure Solution by Iterative Peaklist Optimization and Tangent Expansion in Space Group P1“, *Acta Cryst.*, **1995**, *B51*, 423-431.

[34] G. M. Sheldrick, T. R. Schneider, „SHELXL: High-Resolution Refinement“, *Methods Enzymol.*, **1997**, *277*, 319-343.

[35] C. S. Pratt, B. A. Coyle, J. A. Ibers, „Redetermination of the Structure of Nitrosyl-penta-amminecobalt(III) Dichloride“, *J. Chem. Soc. (A)*, **1971**, 2146-2151.

[36] G. B. Jameson, R. Schneider, E. Dubler, H. R. Oswald, „Tris(ethylenediamine)-nickel(II) Sulphate at 110 K. Structure Determination in the Presence of Twinning“, *Acta Cryst.*, **1982**, *B38*, 3016-3020.

[37] R. A. Engh, R. Huber, „Accurate Bond and Angle Parameters for X-ray Protein Structure Refinement“, *Acta Cryst.*, **1991**, *A47*, 392-400.

[38] D. E. McRee, „XtalView/Xfit—A Versatile Program for Manipulating Atomic Coordinates and Electron Density“, *J. Struct. Biol.*, **1999**, *125*, 156-165.

[39] J. Navaza, „*AMoRe*: an Automated Package for Molecular Replacement“, *Acta Cryst.*, **1994**, *A50*, 157-163.

[40] C. R. Kissinger, D. K. Gehlhaar, D. B. Fogel, „Rapid automated molecular replacement by evolutionary search“, *Acta Cryst.*, **1999**, *D55*, 484-491.

[41] N. M. Glykos, M. Kokkinidis, „A stochastic approach to molecular replacement“, *Acta Cryst.*, **2000**, *D56*, 169-174.

[42] D. E. Brodersen, E. de La Fortelle, C. Vonrhein, G. Bricogne, J. Nyborg, M. Kjeldgaard, „Applications of single-wavelength anomalous dispersion at high and atomic resolution“, *Acta Cryst.*, **2000**, *D56*, 431-441.

[43] L. K. Steinrauf, „Structures of monoclinic lysozyme iodide at 1.68 Å and triclinic lysozyme nitrate at 1.1 Å“, *Acta Cryst.*, **1998**, *D54*, 767-779.

[44] Z. Dauter, M.Dauter, „Anomalous Signal of Solvent Bromides used for Phasing of Lysozyme“, *J. Mol. Biol.*, **1999**, *289*, 93-101.

[45] Z. Dauter, M. Dauter, K. R. Rajashankar, „Novel approach to phasing proteins: derivatization by short cryo-soaking with halides“, *Acta Cryst.*, **2000**, *D56*, 232-237.

[46] T.-Y. Teng, „Mounting of Crystals for Macromolecular Crystallography in a Free-Standing Thin Film“, *J. Appl. Cryst.*, **1990**, *23*, 387-391.

[47] G. M. Sheldrick, „Phase Annealing in SHELX-90: Direct Methods for Larger Structures, *Acta Cryst.*, **1990**, *A46*, 467-473.

[48] International Tables for Crystallography, Volume A (Space-Group Symmetry), D. Reidel Publishing Company, **1987**.

[49] V. L. Lamzin, K. S. Wilson, „Automated Refinement for Protein Crystallography“, *Methods Enzymol.*, **1997**, *277*, 269-305.

[50] H. D. Flack, „On Enantiomorph-Polarity Estimation“, *Acta Cryst.*, **1983**, *A39*, 876-881.

[51] J. Kärcher, „Das *bond valence*-Modell als strukturchemische Verifizierungs-Methode“, Diplomarbeit, Universität Göttingen, **1996**.

[52] L. Pauling, „Atom Radii and Interatomic Distances in Metals“, *J. Am. Chem. Soc.*, **1947**, *69*, 542-553.

[53] N. E. Brese, M. O´Keefe, „Bond-Valence Parameters in Solids“, *Acta Cryst.*, **1991**, *B47*, 192-197.

[54] E. Garman, „Leaving no element of doubt: analysis of proteins using microPIXE“, *Structure*, **1999**, *7*, R291-R299.

[55] M. S. Barrett, R. P. Wenzel, R. N. Jones, „*In vitro* activity of mersacidin (M87-1551), an investigational peptide antibiotic tested against gram-positive bloodstream isolates“, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **1992**, *15*, 641-644.

[56] S. Chatterjee, D. K. Chatterjee, R. H. Jani, J. Blumbach, B. N. Ganguli, N. Klesel, M. Limbert, G. Seibert, „Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*, *in vitro* and *in vivo* antibacterial activity“, *J. Antibiot.*, **1992**, *45*, 839-845.

[57] L. Vértesy, persönliche Mitteilung.

[58] H. Brötz, G. Bierbaum, A. Markus, E. Molitor, H.-G. Sahl, „Mode of Action of the Lantibiotic Mersacidin: Inhibition of Peptidoglycan Biosynthesis via a Novel Mechanism?“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1995**, *39*, 714-719.

[59] H. Brötz, G. Bierbaum, P. E. Reynolds, H.-G. Sahl, „The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation“, *Eur. J. Biochem.*, **1997**, *246*, 193-199.

[60] H. Brötz, G. Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds, H.-G. Sahl, „The Lantibiotic Mersacidin Inhibits Peptidoglycan Synthesis by Targeting Lipid II“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1998**, *42*, 154-160.

[61] D. Voet, J. G. Voet, „Biochemistry“, *John Wiley & Sons, Inc.*, **1995**, 269.

[62] T. D. H. Bugg, C. T. Walsh, „Intracellular Steps of Bacterial Cell Wall Peptidoglycan Biosynthesis: Enzymology, Antibiotics, and Antibiotic Resistance“, *Nat. Prod. Rep.*, **1992**, 199-215.

[63] M. Baptista, F. Depardieu, P. Courvalin, M. Arthur, „Specificity of Induction of Glycopeptide Resistance Genes in *Enterococcus faecalis*“, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, *40*, 2291-2295.

[64] M. Terrak, T. K. Ghosh, J. van Heijenoort, J. Van Beeumen, M. Lampilas, J. Aszodi, J. A. Ayala, J.-M. Ghuysen, M. Nguyen-Distèche, „The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*“, *Mol. Microbiol.*, **1999**, *34*, 350-364.

[65] A. M. di Guilmi, N. Mouz, J.-P. Andrieu, J. Hoskins, S. R. Jaskunas, J. Gagnon, O. Dideberg, T. Vernet, „Identification, Purification, and Characterization of Transpeptidase and Glycosyltransferase Domains of *Streptococcus pneumoniae* Penicillin-Binding Protein 1a“, *J. Bacteriol.*, **1998**, *180*, 5652-5659.

[66] A. M. di Guilmi, N. Mouz, L. Martin, J. Hoskins, S. R. Jaskunas, O. Dideberg, T. Vernet, „Glycosyltransferase Domain of Penicillin-Binding Protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* Is Membrane Associated“, *J. Bacteriol.*, **1999**, *181*, 2773-2781.

[67] T. Ponyi, L. Szabó, T. Nagy, L. Orosz, P. J. Simpson, M. P. Williamson, H. J. Gilbert, „Trp22, Trp24, and Tyr8 Play a Pivotal Role in the Binding of the Family 10 Cellulose-Binding Module from *Pseudomonas* Xylanase A to Insoluble Ligands“, *Biochemistry*, **2000**, *39*, 985-991.

[68] <http://www.hamptonresearch.com>.

9 Publikationen

a) Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

[1] R. E. Allan, H. Gornitzka, J. Kärcher, M. A. Paver, M.-A. Rennie, C. Russel, P. R. Raithby, D. Stalke, A. Steiner, D. S. Wright, „Structure and reactivity of [{Te(NMe_2)$_2$}$_\infty$]; application to the preparation of metalloorganic tellurium(II) compounds“, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1996**, 1727-1730.

[2] H. Sitzmann, T. Dezember, W. Kaim, F. Baumann, D. Stalke, J. Kärcher, E. Dormann, H. Winter, C. Wachter, M. Kelemen, „Synthesis and Characterization of the Stable Dicarbonyl(cyclopentadienyl)iron Radical [(C_5R_5)Fe(CO)$_2$] (R=$CHMe_2$)“, *Angew. Chem.*, **1996**, *108*, 3013-3016, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1996**, *35*, 2872-2875.

[3] C. Rennekamp, A. Gouzyr, A. Klemp, H. W. Roesky, C. Brönneke, J. Kärcher, R. Herbst-Irmer, „Synthesis and structure of the first Si-Al-NH cage compound from a stable triaminosilane and trimethylaluminium“, *Angew. Chem,* **1997**, *109*, 413-415, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1997**, *36*, 404-406.

[4] T. R. Schneider, J. Kärcher, E. Pohl, P. Lubini, G. M. Sheldrick, „*Ab initio* structure determination of the lantibiotic mersacidin“, *Acta Cryst.*, **2000**, *D56*, 705-713.

b) Vorträge und Posterpräsentationen

[1] J. Kärcher, P. Lubini, E. Pohl, T. R. Schneider, G. M. Sheldrick, „*Ab initio* Strukturlösung von Mersacidin, einem Lantibiotikum mit 850 unabhängigen Atomen“, 6. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kristallographie (DGK), Karlsruhe, 02. - 05. März 1998.

[2] J. Kärcher, „COSMO - An Automated Strategy Organizer for Data Collections on Area Detectors“, Annual Meeting of the American Crystallographic Association, Buffalo (NY, U.S.A.), 22. - 27. Mai 1999.

[3] J. Kärcher, P. Lubini, E. Pohl, T. R. Schneider, G. M. Sheldrick, „*Ab initio* Solution and Refinement of the Lantibiotic Mersacidin, a Twinned Structure with 850+ Atoms“, Annual Meeting of the American Crystallographic Association, Buffalo (NY, U.S.A.), 22. - 27. Mai 1999.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jörg Kärcher
Geburtsdatum	23.12.1970
Geburtsort	Höxter
Familienstand	unverheiratet
Eltern	Heribert Kärcher
	Heide Kärcher, geb. Klein

Schulbildung

08/1977 - 07/1981	Gemeinschaftgrundschule Höxter
09/1981 - 05/1990	König-Wilhelm-Gymnasium Höxter mit Abschluß Abitur

Hochschulstudium

10/1990 - 05/1996	Diplomstudiengang Chemie an der Georg-August-Universität zu Göttingen
22.04.1994	Diplomvorprüfung
05/1995 - 05/1996	Diplomarbeit am Institut für Anorganische Chemie der Georg-August-Universität zu Göttingen im Arbeitskreis von Herrn Prof. G. M. Sheldrick:
	„Das *bond valence*-Modell als strukturchemische Verifizierungs-Methode“
03.05.1996	Diplomhauptprüfung

Promotion

05/1996 - 05/2000	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Strukturchemie der Georg-August-Universität zu Göttingen unter Anleitung von Herrn Prof. G. M. Sheldrick.