

## 1.1 Penicillin – ein Wundermittel gegen Infektionen?

Die Entdeckung des Penicillins gilt als größter Meilenstein in der Geschichte der Entwicklung von Antibiotika. Als Entdecker des Penicillins wird der Schotte Alexander Fleming angesehen, der 1929 nach einer zufälligen Verunreinigung einer pathogenen *Staphylococcus aureus*-Kultur mit Pilzsporen von *Penicillium notatum* einen Hemmhof feststellte und so auf die bakterizide Wirkung von Stoffwechselprodukten des Pilzes schloss [1]. Tatsächlich war er jedoch nicht der Erste, dem dieser Effekt auffiel. Bereits 1872 hat der Arzt Joseph Lister in einem Brief geschrieben: „Sollte sich ein geeigneter Fall einstellen, werde ich *Penicillium glaucum* [-Extrakt] einzusetzen versuchen und beobachten, ob das Wachstum der Organismen [Bakterien] in menschlichem Gewebe gehemmt wird.“ 1892 war es der französische Medizinstudent Ernest Duchesne, der eine Arbeit über die Wirkung von *Penicillium*-Pilzen auf Bakterienwachstum anfertigte, die allerdings nicht die entsprechende Aufmerksamkeit fand, andernfalls hätte die Erfolgsgeschichte des Penicillins unter Umständen schon 50 Jahre früher beginnen können.



Abbildung 1.1 Die *Staphylococcus aureus*-Petrischale Flemings mit durch *Penicillium notatum*-Sporen verursachten Hemmhöfen

Fleming hatte wohl die Bedeutung seiner Entdeckung erkannt, es gelang ihm jedoch nicht, die verantwortliche Substanz aufgrund ihrer Instabilität zu isolieren, so dass er seine Bemühungen einstellte und seine letzte Publikation über das Penicillin 1931 veröffentlichte.

Um 1940 gelangen dem Australier (Lord) Howard Walter Florey und (Sir) Ernst Boris Chain, einem jüdischen Flüchtling deutsch-russischer Abstammung, in Oxford nicht nur die Isolierung der bakteriziden Verbindungen, sondern auch die Durchführung einer ersten erfolgreichen klinischen Testreihe, so dass das

Penicillin und dessen Derivate von da an ihren Siegeszug durch Therapie und Pharmaentwicklung antreten konnten [2]. Sowohl Fleming als auch Florey und Chain erhielten 1945 für ihre Forschungen den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Bereits während ihrer Untersuchungen fiel Florey und Chain auf, dass einige Stämme von *Escherichia Coli* Bakterien in der Lage waren Penicillin zu spalten. Die damals sogenannten „Penicillinase“-Enzyme wurden schnell in  $\beta$ -Lactamasen umbenannt. Sie verbreiteten sich unaufhaltsam über die meisten Bakterienarten. 1941 waren noch alle *Staphylococcus aureus* Stämme Benzylpenicillin-sensibel, 1944 wurde jedoch schon von Problemen in der Therapie berichtet. Die große Influenza-Pandemie 1957/58 wurde begleitet von der Verbreitung eines Penicillin-resistenten Stamms von *Staphylococcus aureus*. Die Entwicklung von „Super- $\beta$ -Lactamen“, den sogenannten „ $\beta$ -Lactamase-stabilen“ Penicillinen, brachte nur kurzen Aufschub. Die nun als „Superbugs“ bezeichneten Mikroorganismen, allen voran die MRSA-Keime (MRSA – *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*) entwickelten erneut Resistenzen. Die verschiedenen MRSA-Stämme stellen bei den Infektionen durch Hospitalkeime die größte Gruppe dar und ihre Verbreitung scheint unaufhaltsam. Allein im deutschsprachigen Raum ist von 1998 bis 2001 der MRSA-Anteil aller isolierten *Staphylococcus aureus* Stämme von 15 auf 20 % angestiegen [3].

Gegenwärtig sind *Pseudomonas aeruginosa*-, *Serratia spp.*-, *Enterobacter cloacae*- und vor allem MRSA-Kulturen bekannt, die gegen fast<sup>1</sup> jedes  $\beta$ -Lactam<sup>2</sup> (und viele andere Antibiotika) resistent geworden sind.

Die Kenntnis des molekularen Wirkungsmechanismus von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika könnte die Möglichkeit zu einer zielorientierten Modifikation dieser Verbindungen eröffnen und damit einen entscheidenden Fortschritt bei der Bekämpfung von Bakterien ermöglichen. Allerdings konnte bisher weder der Reaktionsmechanismus der Enzyme, die als Zielstruktur der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika dienen, noch der der defensiven  $\beta$ -Lactamasen aufgeklärt werden.

---

<sup>1</sup> Für neue in die Therapie eingeführte  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wie z.B. Ertapenem gelten MRSA-Stämme noch als sensibel.

<sup>2</sup> Im pharmazeutischen Sprachgebrauch versteht man unter der eigentlich nicht ausreichenden Bezeichnung „ $\beta$ -Lactam“ die Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika.

Die vorliegende Arbeit soll durch Anwendung aktuellster *Molecular Modelling* Methoden einen Beitrag zur Aufklärung des Reaktionsmechanismus von  $\beta$ -Lactamasen leisten.

Im Folgenden werden die Wirkungsweise und die Zielstrukturen von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sowie Abwehrmechanismen der Bakterien dargestellt werden.

## 1.2 Die Bakterienzellwand

Für die Entwicklung nebenwirkungsarmer Chemotherapeutika<sup>1</sup> ist es wichtig, Zielstrukturen in der prokaryotischen Bakterienzelle zu adressieren, die sich von denen der eukaryotischen Säugetierzelle weitgehend unterscheiden oder im Idealfall erst gar nicht vorhanden sind.

Die Zellwand von Bakterien ist ein derartiges „ideales“ *Target*<sup>2</sup>, da sie in Form des Mureins eine essenzielle Struktur besitzt, die in der Säugetierzelle nicht vorhanden ist. Sowohl die Zellwände gramnegativer als auch die der grampositiven Bakterien besitzen als unverzichtbaren Bestandteil das Murein, auch wenn sich der restliche Aufbau der Zellwände stark unterscheidet [4].

Zum besseren Verständnis der Wirkungsweise von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und der Notwendigkeit für ein Bakterium Abwehrmechanismen, wie die Enzymklasse der  $\beta$ -Lactamasen zu entwickeln, soll der grundsätzliche Aufbau und die Synthese des Mureins kurz erläutert werden.

### 1.2.1 Aufbau des Mureins

Die Grundstruktur des Mureins ist in grampositiven und in gramnegativen Bakterienstämmen identisch. Im Murein sind Polysaccharidketten über Peptidbrücken, die mehr oder weniger stark verzweigt sein können, miteinander verknüpft, daher wird das Murein auch als Peptidoglykan bezeichnet (s. Abbildung 1.2). Eine einzelne Polysaccharidkette setzt sich aus einer sich wiederholenden Disaccharideinheit zusammen, die aus mit  $\beta$ -D-N-Acetyl-Glucosamin 1-4 glykosidisch verknüpfter  $\beta$ -D-N-Acetyl-Muraminsäure besteht. Die N-Acetyl-Muraminsäuren sind über ihre Carbonsäurefunktion mit einem L-Alanin verbunden, das alternierend mit weiteren L- und D-Aminosäuren peptidisch verknüpft ist. Das Ende der Seitenkette besteht jedoch immer aus einem D-Alanyl-D-alanin-Rest. Zur Stabilisierung des Mureins sind benachbarte Proteoglykan-Ketten über ihre Peptidseitenketten kovalent miteinander verbunden. Gramnegative Bakterien sind über die Aminosäuren an Position 3 und 4 (jeweils eine Diaminosäure und ein D-Alanin) zweier verschiedener

---

<sup>1</sup>  $\beta$ -Lactame sind aufgrund ihrer Herkunft aus einem Organismus als Antibiotika zu bezeichnen. Der Begriff Chemotherapeutika, der sich ursprünglich nur auf rein synthetisch gewonnene Substanzen bezog, hat sich jedoch als Oberbegriff weitgehend durchgesetzt.

<sup>2</sup> Ein „*Target*“ ist die Struktur, mit der ein Wirkstoff interagiert und dadurch eine Wirkung hervorruft.

Proteoglykan-Seitenketten direkt miteinander verbunden. Grampositive Bakterien dagegen verknüpfen in der Regel diese Aminosäuren über ein Interpeptid, dessen Zusammensetzung je nach Bakterienstamm stark variieren kann. Der Hauptunterschied neben der Quervernetzungsart besteht jedoch in der Dicke der Mureinschicht. Bei gramnegativen Bakterien ist diese nur ca. 25 Å dünn, bei grampositiven Bakterien kann sie bis zu 100 Å dick werden.

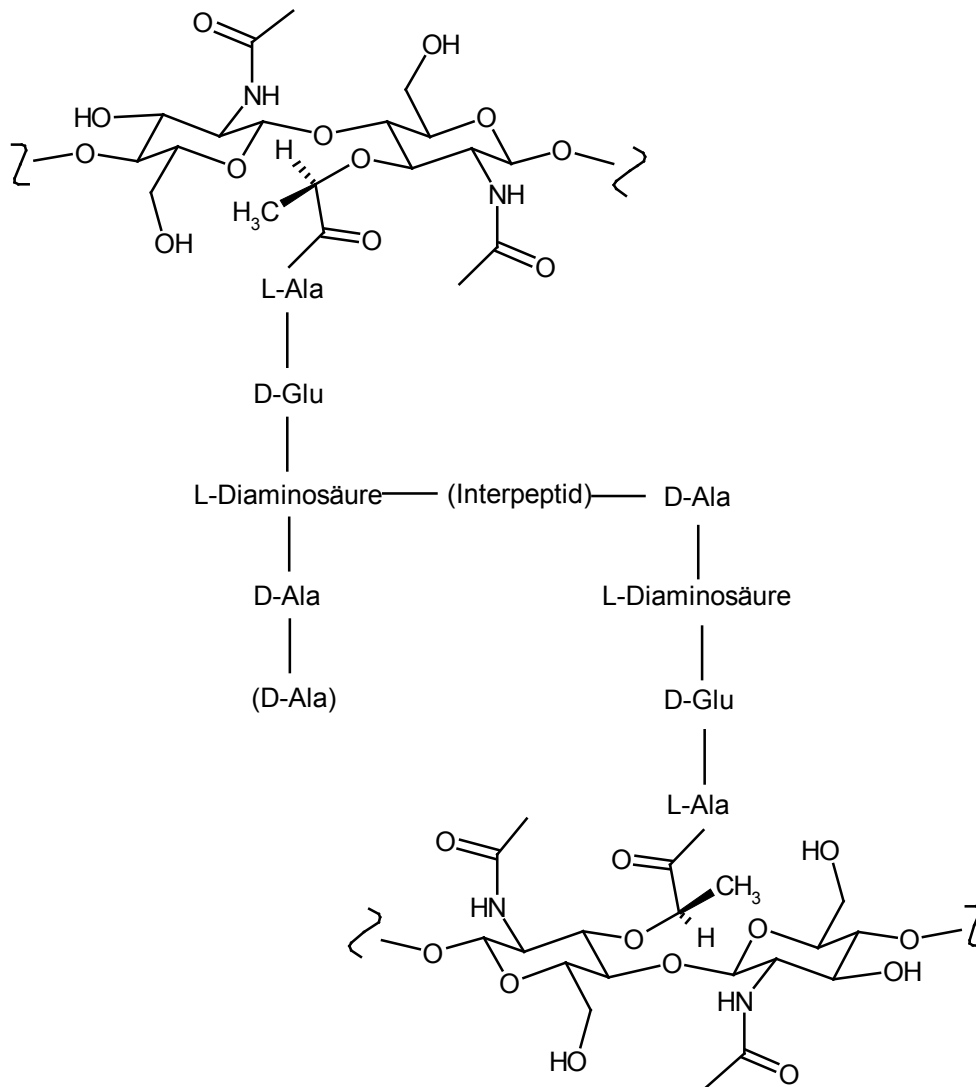


Abbildung 1.2 Aufbau der Mureinschicht in der bakteriellen Zellwand.  
 G = N-Acetyl-Glucosamin  
 M = N-Acetyl-Muraminsäure

Im Gegensatz zu dem in Funktion und Struktur ähnlichen Chitin<sup>1</sup> ist die Struktur des Mureins nicht kristallin [5], sondern gleicht eher der eines viskosen Gels [6], das sich bis zu dem Vierfachen seiner Breite dehnen lässt [7]. Das Murein ist dennoch der stabilitätsgebende Bestandteil der Zellwand [8][9]. Bei einer nicht intakten Mureinschicht kann die Plasmamembran allein dem intrazellulären osmotischen Druck nicht standhalten und es kommt zur Zellyse.

### 1.2.2 Murein-Biosynthese

Die Biosynthese des Mureins ist ein komplexer Prozess und gliedert sich in einen intrazellulären und einen extrazellulären Teil [10][11]. Intrazellulär werden die Bestandteile synthetisiert, die später nach Transport in den extrazellulären Raum (grampositiv) oder in den periplasmatischen Raum (gramnegativ) polymerisiert werden.

An der Innenseite der Plasmamembran befinden sich die Enzyme, die ausgehend von Fructose-6-Phosphat über einen mehrstufigen Prozess ein C<sub>55</sub>-Disaccharid-pentapeptid, das Undecaprenol, synthetisieren. Diese kleinste Untereinheit des Mureins wird nach Transport aus der Zelle während der extrazellulären Syntheseschritte an die Murein-Glykankette durch eine Transglycosylierungsreaktion geknüpft und über eine Transpeptidation im peptidischen Teil quervernetzt. Sowohl die Transglycosylierung als auch die Quervernetzung werden von der gleichen Klasse von Enzymen, den Penicillin-bindenden Proteinen (PBPs siehe Kapitel 1.3.1.1), katalysiert. Den entscheidenden, durch  $\beta$ -Lactam-Antibiotika hemmbaren Schritt, stellt hierbei die Quervernetzung des Peptidteils dar. Das PBP reagiert im ersten Schritt mit dem endständigen D-Alanyl-D-alanin-Rest der Peptidseitenkette. Dabei kommt es zur Acylierung des PBPs an seiner aktiven Aminosäure, einem Serin, und zur Abspaltung eines D-Alanins an der Peptidbindung. Drei Reaktionen können nun konkurrierend ablaufen:

1. Das Acylenzym akzeptiert als Nucleophil die terminale Aminogruppe des Interpeptids (grampositiv) bzw. der L-Diaminosäure (gramnegativ) einer anderen Peptidseitenkette. Es kommt zur Quervernetzung des Mureins und zur Aminolyse des Serinesters, wobei das Enzym regeneriert wird [12][13].

---

<sup>1</sup> Chitin ist ein 1-4 glykosidisch verknüpftes  $\beta$ -D-N-Acetyl-Glucosamin-Polysaccharid.

2. Das Acylenzym wird durch Wasser hydrolysiert. Das Enzym regeneriert sich, aber die Untereinheit kann nicht mehr über den eigenen D-Alanyl-D-alanin-Rest quervernetzt werden, da ein Alanin abgespalten wurde [14]. Das ist eine wichtige Reaktion zur Steuerung des Ausmaßes der Quervernetzung.
3. Das Acylenzym wird durch das bereits abgespaltene Alanin wieder regeneriert. Es ist dabei zwar zu keiner Quervernetzung gekommen, aber diese ist noch möglich, da das Substrat des PBPs, der D-Alanyl-D-alanin-Rest wiederhergestellt wurde [15].

### **1.3 Penicillin Recognizing Enzymes**

*Penicillin Recognizing Enzymes* (PREs) bilden die Gesamtheit aller Enzyme, die mit Penicillin bzw. anderen  $\beta$ -Lactam-Strukturen interagieren können, diese also aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften „erkennen“ können. Sie lassen sich weiter unterteilen und werden im Folgenden vorgestellt.

#### **1.3.1 Einteilung der PREs**

##### **1.3.1.1 Penicillin Binding Proteins (PBPs)**

Die penicillinbindenden Proteine, die PBPs, sind die eigentlichen *Targets* von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und wurden erst wegen ihrer Eigenschaft, Penicillin zu binden, entdeckt und 1972 das erste Mal isoliert. Zu dieser Zeit konnte man sich jedoch noch nicht ihre Funktion oder den Grund ihrer Bindungseigenschaft für Penicilline erklären [16]. 1974 gelang die Aufklärung ihrer Funktion und 1975 konnten durch Gel-Elektrophorese die PBPs weiter voneinander getrennt werden, so dass ein System zu ihrer Einteilung etabliert werden konnte, das bis heute Gültigkeit besitzt [17]-[19].

Nahezu alle PBPs sind membrangebundene Enzyme, die durch einen „Membran-*linker*“ mit der Zellmembran verbunden, im periplasmatischen Spalt bzw. im Extrazellulärraum lokalisiert sind. Die physiologische Funktion von PBPs ist der Auf- bzw. Abbau sowie die Instandhaltung der Mureinschicht in der bakteriellen Zellwand. Mit Ausnahme eines zinkabhängigen Proteins enthalten alle Enzyme dieser Klasse in ihrem aktiven Zentrum ein katalytisch essenzielles Serin, haben aber keinerlei strukturelle oder sequenzielle Ähnlichkeit mit der großen Familie der Serin-Proteasen. Dies kann als Beispiel dafür angesehen werden, wie sich in der Evolution das gleiche mechanistische Grundprinzip,