1. Einleitung

1.1 Antibiotika

„*Niedermolekulare Sekundärmetabolite, die von Mikroorganismen gebildet werden und in geringer Konzentration das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmen bzw. diese abtöten*.“[1]

Der Terminus Antibiotikum leitet sich im weiteren Sinne aus den altgriechischen Wörtern für „gegen“ (anti) und „Leben“ (bios) oder „zum Leben gehörig“ (biotikos) ab und wurde 1941 von dem Nobelpreisträger Selman A. Waksman in der noch heute gängigen Form zur Bezeichnung dieser Substanzklasse etabliert.[2,3] Waksman bezieht sich dabei auf das bereits im Jahre 1889 von dem Mykologen Paul Vuillemin geprägte Konzept der „Antibiose“, demnach ein Lebewesen das Leben eines anderen stört oder zerstört, um sein eigenes zu bewahren.[4] Aus medizinischer und pharmazeutischer Sicht werden Antibiotika heutzutage im engeren Sinne als Naturstoffe und synthetische Verbindungen verstanden, die zur Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten eingesetzt werden können.[5]

Eine der ersten dokumentierten humanmedizinischen Anwendungen von Antibiotika reicht bis etwa 1000 v.Chr. zurück, als in China verschimmelter Sojabohnenquark zur Heilung von Hautinfektionen eingesetzt wurde.[5] In der Neuzeit beobachtete der französische Naturwissenschaftler Louis Pasteur bereits 1877 für verschiedene Mikroorganismen in einem gemeinsamen Nährmedium eine gegenseitige Inhibition ihrer Entwicklung.[6] In den folgenden Jahrzehnten wurden zwar einige antibiotisch wirksame Substanzen identifiziert, aber auch der phänomenologische Befund von Alexander Fleming aus dem Jahre 1929, dass das Bakterium *Staphylococcus aureus* durch den Schimmelpilz *Penicillium notatum* in seinem Wachstum gehemmt wurde,[7] erregte noch kein größeres Aufsehen. Erst die durch den Zweiten Weltkrieg hervorgerufene gesteigerte Nachfrage nach neuen Heilmitteln gegen Infektionserkrankungen, im speziellen gegen Wundinfektionen, veranlasste Florey, Chain und Mitarbeiter zur Isolierung des als Penicillin bekannt gewordenen Wirkstoffes.[8] Somit war der Grundstein für eine großtechnische fermentative Produktion gelegt. Durch den unbestrittenen Erfolg des Penicillins wurden unzählige Wissenschaftler weltweit inspiriert, was in der Entdeckung zahlreicher neuer antibakteriell aktiver Substanzen resultierte. Grundsätzlich wurden bei der Entwicklung und Erforschung potenter Antibiotika zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Einerseits wurden Techniken und Methoden entwickelt, biologisch aktive Naturstoffe zu isolieren und zu charakterisieren. Diese Strategie fand ihre Blütezeit Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts in der so genannten „Goldenen Ära“ der

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

antibiotischen Wirkstoff-Forschung. Ein Großteil der natürlich vorkommenden Antibiotika weist allerdings hochkomplexe chemische Strukturen auf, weshalb diese zumeist mittels Fermentation produziert werden. Andererseits lieferte die synthetische organische Chemie auch zahlreiche Antibiotika, deren Strukturen der Natur zur Gänze unbekannt sind.[9] Ein dritter Ansatz geht von Naturstoffen aus und versucht durch chemische Modifikationen deren antibiotische Aktivität zu verbessern oder das komplexe Anforderungsprofil zur Zulassung als Medikament zu erfüllen.[10] Diese Strategie wird auch als semi-synthetisch bezeichnet und stellt in gewisser Weise eine Kombination der beiden erstgenannten Konzepte dar.

1.2 Klassifizierung der verschiedenen Antibiotika

Zunächst lassen sich Antibiotika grob nach ihrer jeweiligen Wirkungsweise einteilen. In diesem Kontext werden primär bakteriostatische Substanzen, die das Wachstum von Bakterien und deren Vermehrung inhibieren, von bakterioziden Verbindungen, die zum Absterben der bakteriellen Zellen führen, unterschieden. Die Übergänge lassen sich hierbei allerdings alles andere als scharf definieren. So können zum Beispiel, hervorgerufen durch gravierende Reduktion der Konzentrationen, Bakteriozide in vielen Fällen auch bakteriostatisch wirken. Eine sehr viel eindeutigere Klassifizierung ist über die eigentlichen Wirkorte und -mechanismen der einzelnen Antibiotika möglich. Dabei zeigt sich, dass ein Großteil der Wirkmechanismen der antibiotisch aktiven Substanzen jeweils eines der vier folgenden klassischen Targets adressiert: die bakterielle Zellwand-Biosynthese (Abb. 1.1a), die bakterielle Protein-Biosynthese (Abb. 1.1b), die bakterielle Replikation der DNA oder RNA (Abb. 1.1c) und den bakteriellen Folat-Metabolismus (Abb. 1.1d).[9]

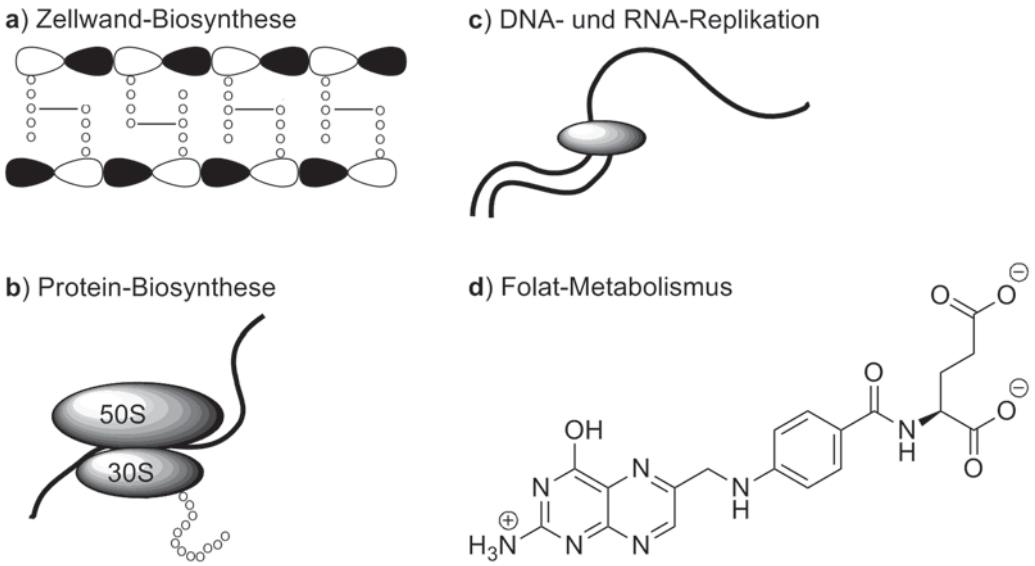


Abb. 1.1 Vier klassische Targes antibiotisch aktiver Substanzen.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Die Biosynthese der bakteriellen Zellwand besitzt keine Entsprechung in eukaryotischen Zellen, da diese im konkreten Sinne keine Zellwand aufweisen.[11] Die aus ribosomaler RNA und Proteinen aufgebauten bakteriellen Ribosomen, an denen die Protein-Biosynthese stattfindet, setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen. Mit Hilfe von Kristallstrukturanalysen konnte nachgewiesen werden, welche spezifischen Antibiotika an welche der beiden Untereinheiten binden.[12-14] Zudem weisen die zwei ribosomalen Untereinheiten von Bakterien (30S und 50S) und Säugetieren (40S und 60S) grundsätzliche strukturelle Unterschiede auf, weshalb die bakteriellen Ribosomen ein hochspezifisches Target für antibiotische Wirkstoffe repräsentieren.[15] Die bakterielle DNA- und RNA-Replikation wird durch Bindung von beispielsweise Ciprofloxacin oder Novobiocin an die DNA-Gyrase oder von Rifampin an die RNA-Polymerase gehemmt.[9] Das entsprechende Anion der Folsäure stellt einen unabdingbares Intermediat der Thymin-Biosynthese dar. Aus diesem Grund geht eine Inhibierung des bakteriellen Folat-Metabolismus mit einem Erliegen der DNA-Synthese einher.[9] Anders als Säugetiere, die Folsäure mit der Nahrung aufnehmen, sind Bakterien auf die Biosynthese dieses essentiellen Metaboliten angewiesen.[17]

Klasse	Jahr der Einführung	Herkunft	Beispiel	Wirkmechanismus
Sulfonamide	1935	synthetisch	Sulfapyridin	Folat-Biosynthese (d)
Penicilline	1941	Naturstoff	Penicillin	Zellwand-Biosynthese (a)
Bakterielle Peptide	1942	Naturstoff	Bacitracin	Zellwand-Biosynthese (a)
Aminoglycoside	1944	Naturstoff	Streptomycin	Protein-Biosynthese (b)
Cephalosporine	1945	Naturstoff	Cephalosporin	Zellwand-Biosynthese (a)
Chloramphenicole	1949	Naturstoff	Chloramphenicol	Protein-Biosynthese (b)
Tetracycline	1950	Naturstoff	Chlortetracyclin	Protein-Biosynthese (b)
Viomycine	1951	Naturstoff	Viomycin	Protein-Biosynthese (b)
Macrolide	1952	Naturstoff	Erythromycin	Protein-Biosynthese (b)
Lincosamide	1952	Naturstoff	Lincomycin	Protein-Biosynthese (b)
Streptogramine	1952	Naturstoff	Virginiamycin	Protein-Biosynthese (b)
Cycloserine	1955	Naturstoff	Cycloserin	Zellwand-Biosynthese (a)
Glycopeptide	1956	Naturstoff	Vancomycin	Zellwand-Biosynthese (a)
Novobiocine	1956	Naturstoff	Novbiocin	DNA-Replikation (c)
Ansamycine	1957	Naturstoff	Rifamycin	RNA-Replikation (c)
Nitroimidazole	1959	synthetisch	Tinidazol	DNA-Replikation (c)
Ethambutole	1962	synthetisch	Ethambutol	Zellwand-Biosynthese (a)
Chinoline	1962	synthetisch	Ciprofloxacin	DNA-Replikation (c)
Fusidane	1963	Naturstoff	Fusidinsäure	Protein-Biosynthese (b)
Diaminopyrimidine	1968	synthetisch	Trimethoprim	Folat-Biosynthese (d)
Phosphonate	1969	Naturstoff	Fosfomycin	Zellwand-Biosynthese (a)
Pseudominsäure	1985	Naturstoff	Mupirocin	Protein-Biosynthese (b)
Oxazolidine	2000	synthetisch	Linezolid	Protein-Biosynthese (b)
Lipopeptide	2003	Naturstoff	Daptomycin	Zellmembran-Biosynthese

Tab. 1.1[16] Bedeutende antibiotische Substanzklassen

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Eine weitere exakte systematische Klassifikation der einzelnen Antibiotika ist zudem mit Hilfe einer Einteilung auf Grund ihrer chemischen Struktur in unterschiedliche Substanzklassen möglich (Tab. 1.1).

1.3 Antibiotika-Resistenzen

„*There are countless antibiotics: more than 50 penicillins, 70 cephalosporins, 12 tetracyclines, 8 aminoglycosides, 1 monobactam, 3 carbapenems, 9 macrolides etc. Despite all these antibiotics, a person could die in a hospital in New York, San Franscisco, Paris etc. as a result of a resistant bacterial infection.*“[18]

Dieses Zitat des amerikanischen Mediziners und Pharmakologen Harold C. Neu hat nach nunmehr fast 20 Jahren nicht im Geringsten an Aktualität eingebüßt; die Situation gewinnt vielmehr von Jahr zu Jahr an Brisanz.

Antibiotika-Resistenz, also die erworbene oder auch bereits natürlich vorhandene Unempfindlichkeit von Mikroorganismen gegenüber antibiotisch aktiven Substanzen[5], stellt einen natürlichen Prozess dar, dem kein Antibiotikum dauerhaft entgehen kann. Ende 2011 konnte erstmals belegt werden, dass die Bildung von Antibiotika-Resistenzen nicht, wie teilweise vermutet, ein Phänomen der modernen Medizin und Landwirtschaft repräsentiert, sondern vielmehr einen bereits seit über 30000 Jahren bekannten Vorgang darstellt.[19] Die Entwicklung von Resistenzen gegen antibiotisch aktive Substanzen resultiert aus dem direkten Kontakt zwischen Bakterium und Antibiotikum und der damit einhergehenden Selektion resistenter Organismen.[20] Zur Begründung des detaillierten Vorganges der Resistenzbildung wurden bereits zahlreiche mechanistische Konzepte erarbeitet: Beispielsweise gehören dazu die Veränderung des Target-Proteins[20], die enzymatische Inaktivierung des Antibiotikums[21], die Erhöhung der Penetrationsbarrieren[22], die Verstärkung des Efflux[23] und die Entwicklung von Ersatzenzymen für die blockierte Stoffwechselreaktion[24]. Ferner sind die für die Antibiotika-Resistenz verantwortlichen Gene zumeist auf Plasmiden lokalisiert, die als mobile genetische Elemente von einem Mikroorganismus durch sogenannte Konjugation auf einen anderen übertragen werden können, wobei der zweite Erreger niemals einen direkten Kontakt zu dem entsprechenden Antibiotikum aufwies.[24] Somit können auch die durch den Antibiotika-Einsatz in der Landwirtschaft gebildeten Resistenzen über die natürlichen Kreisläufe bis zum Menschen gelangen.[25] Eine weitere anthropogene Ursache des gehäuften Auftretens von Antibiotika-Resistenzen findet sich in dem teilweise beinahe inflationären Umgang mit den Ressourcen an antibiotisch aktiven Substanzen in der Humanmedizin.[26]

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Der momentan bekannteste und wohl auch bedeutendste resistente Stamm wird durch den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) repräsentiert[27], wobei der Name historisch begründet ist und die meisten Keime in der Zwischenzeit bereits Resistenzen gegen mehrere Klassen von Antibiotika ausgebildet haben.[10] Diese grundsätzliche Problematik ist allerdings bei Weitem nicht auf *Staphylococcus aureus* beschränkt. Anfang diesen Jahres wurde beispielsweise in Indien das Auftreten eines Tuberculose-Stammes beobachtet, der gegen alle verfügbaren Medikamente resistent war und damit als *totally drug-resistant tuberculosis* bezeichnet wurde.[28]

Diese Fakten bestätigen die Befürchtung zahlreicher Experten, die das reale Risiko einer Pandemie bakterieller Infektionen kommunizieren. Ein solches Szenario wirkt besonders vor dem Hintergrund erschreckend, dass in den letzten Jahren und Jahrzehnten nicht nur die Zahl der neu entdeckten Klassen von Antibiotika (Tab. 1.1), sondern auch die Entwicklung neuer Antibiotika im allgemeinen stark zurückgegangen ist.[29] So betrug die Anzahl der Neuzulassungen antibiotisch aktiver Substanzen als Medikamente durch die FDA von 1983 bis 1987 noch 16, wohingegen in den fünf Jahren zwischen 2004 und 2008 nur noch fünf Antibiotika neu zugelassen worden sind.[30] Diese nahezu desaströse Lage geht zu einem Großteil auf das Verschulden der Pharmaindustrie zurück, die innerhalb der letzten 15 Jahre ihre Forschungsbemühungen auf dem Gebiet der Antibiotika zunehmend reduzierte. Dafür waren allerdings nicht ausschließlich ökonomische Faktoren verantwortlich, auch eine fehlgeleitete Fokussierung auf chemische Modifikation bereits bekannter Antibiotika anstelle einer gezielten Suche nach neuen Leitstrukturen spielte in diesem Kontext eine wichtige Rolle.[31]

Die Brisanz der momentanen Situation führt nunmehr sogar zu einem vermehrten Eingreifen der Politik. So hat die FDA Anfang 2012 den Gebrauch von Antibiotika in der Landwirtschaft nach europäischem Vorbild deutlich eingeschränkt. Des Weiteren hat die EU im November 2011 eine neue Strategie zur Bekämpfung von Antibiotika-Resistenzen veröffentlicht und in diesem Zusammenhang ein 350 Millionen Euro teures Forschungsprojekt initiiert.[32] Eine Kommission international renommierter Experten erarbeitete Ende letzten Jahres Vorschläge, wie dieser wachsenden Bedrohung durch Infektionserkrankungen begegnet werden sollte. Neben einem verantwortungsvolleren Umgang mit den bestehenden Ressourcen und deutlich verbesserten regulatorischen Maßnahmen müssen primär innovative Strategien zur Entwicklung neuer antibiotisch aktiver Substanzen, die im besten Fall neue Wirkmechanismen aufweisen, erarbeitet werden.[33] Einerseits sollte dabei ein verbessertes Verständnis der Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen neue Möglichkeiten erschließen.[34]

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Andererseits bieten auch klassische Targets der antibakteriellen Therapie, wie beispielsweise die Zellwand-Biosynthese, immer noch ein immenses Potential bezüglich der Adressierung bisher nicht genutzter Targets.[35]

1.4 Nucleosid-Antibiotika

Nucleosid-Antibiotika repräsentieren eine Klasse von antibiotisch aktiven Naturstoffen, die alle eine Nucleosid-abgeleitete Kernstruktur aufweisen, wobei sie trotz dieser Gemeinsamkeit eine frappierende strukturelle Vielfalt zeigen (Abb. 1.2).[11,36,37] Tunicamycin[38] beispielsweise besteht aus einem Uridin-Grundkörper, zwei *O*-glycosidisch verknüpften Zuckern und einem Fettsäure-Rest (Abb. 1.2). Neben der antibiotischen Wirkung weist dieser Naturstoff allerdings noch eine signifikante Toxizität auch für Säugetiere auf.[37] Neuere Studien konnten zeigen, dass Tunicamycin auch die Bildung von Biofilmen von *Candida albicans* beeinflusst.[39] Die Mureidomycine[40] basieren dahingegen auf einem

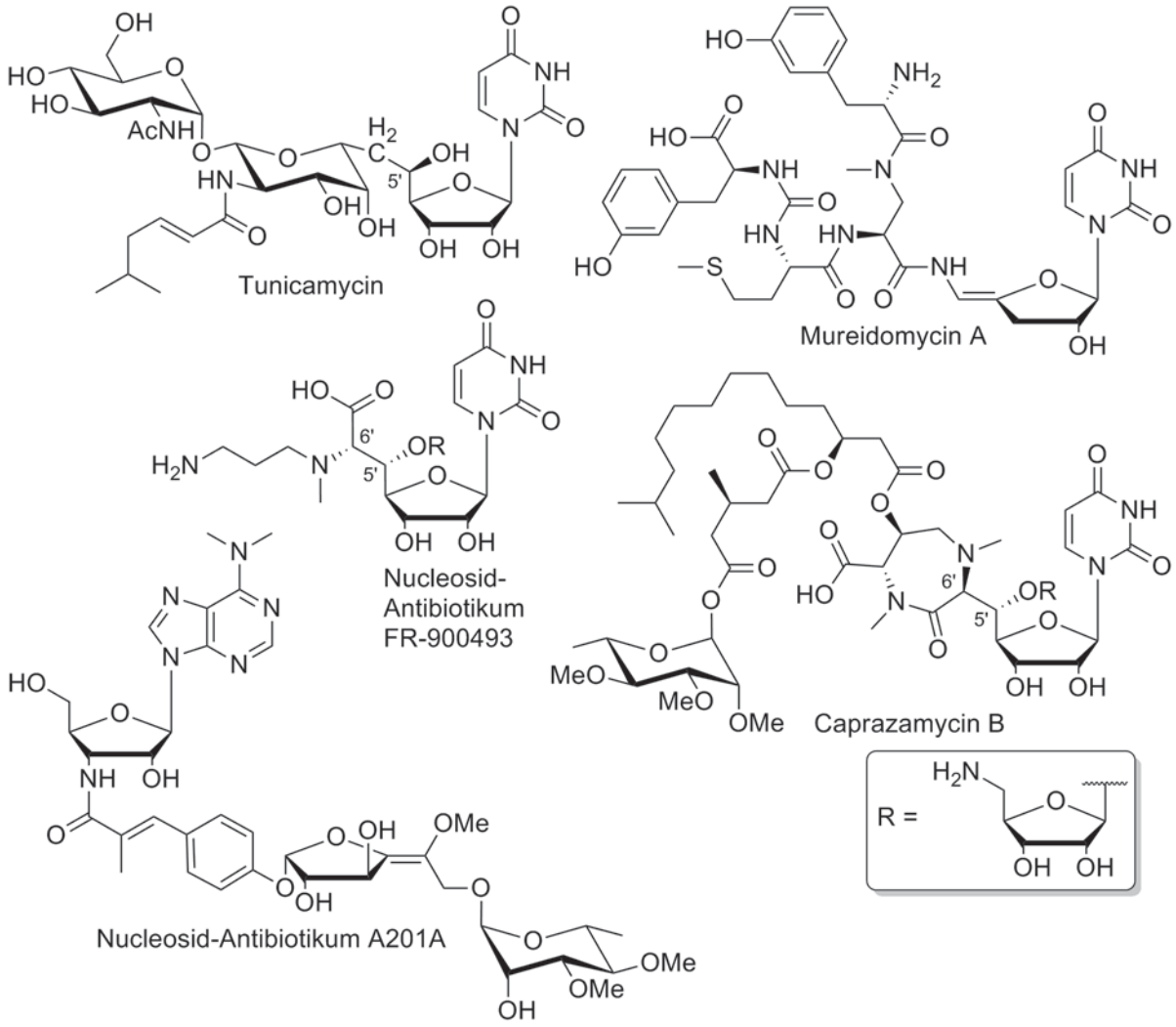


Abb. 1.2 Beispiele für verschiedene Nucleosid-Antibiotika.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

3'-Desoxy-Uridin-Grundkörper, der über eine Amidbindung mit einer Peptidkette verknüpft ist (Abb. 1.2). Die Caprazamycine[41] weisen wiederum eine intakte Uridin-Struktur auf, die über einen Homopiperazin-Ring an eine lipidische Seitenkette gebunden ist (Abb. 1.2). Genau wie in dem entsprechenden, strukturell sehr viel überschaubareren Nucleosid-Antibiotikum FR-900493[42] befindet sich ein an der 5'-Hydroxy-Funktion *O*-glycosidisch-gebundener Aminoribose-Rest (Abb. 1.2). Eine weitere offenkundige Gemeinsamkeit zwischen den Caprazamycinen und FR-900493 wird durch die (5'*S*,6'*S*)-Nucleosyl-Aminosäure-Einheit repräsentiert, ein Struktur-Motiv, das sich beispielsweise auch in den Muraymycinen[43] wiederfindet. Alle bis hierhin vorgestellten Nucleosid-Antibiotika weisen, genau wie die verwandten Liposidomycine[38], Capuramycine[44] und auch der 2008 isolierte ebenfalls Uridin-abgeleitete Phosphorsäurediester A-94964[45,46], den gleichen Wirkmechanismus auf. Dabei handelt es sich um eine Inhibierung des bakteriellen Membranproteins Translocase I,[38,40,42-45,47] einem essentiellen Enzym der Peptidoglycan-Biosynthese, das bis zum heutigen Tage noch von keinem kommerziell erhältlichen Wirkstoff adressiert wird.[11,36,37] Anfang diesen Jahres wurde ein weiterer Naturstoff dieser Klasse beschrieben, wobei das Nucleosid-Antibiotikum A201A[48] eine Adenosin-Grundstruktur beinhaltet (Abb. 1.2). Der konkrete Wirkmechanismus dieser antibakteriellen Substanz wurde allerdings noch nicht aufgeklärt, was vor dem Hintergrund der Tatsache, dass die anderen Vertreter allesamt Uridin-abgeleitete Kernmotive aufweisen, für Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von großem Interesse ist.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

2. Kenntnisstand

2.1 Bakterielle Zellwand-Biosynthese

2.1.1 Die bakterielle Zellwand

Die meisten Bakterien werden von einer widerstandsfähigen äußeren Schicht umgeben, die zum Schutz des empfindlichen Protoplasts vor mechanischer Beschädigung und osmotischer Lyse dient. Ferner zeichnet diese sogenannte Zellwand für die Form der gesamten Bakterienzelle verantwortlich, da der isolierte Protoplast für sich eine sphärische Gestalt annehmen würde.[49] Grundsätzlich werden dem Aufbau ihrer Zellwand nach zwei verschiedene Bakterien-Typen unterschieden, die sich phänomenologisch mit Hilfe der sogenannten Gram-Färbung identifizieren lassen.[50] Der Protoplast Gram-positiver Bakterien ist von einer mit 30-100 nm relativ dicken Polymerschicht umgeben, welche aus linearen Heteropolysaccharidketten aufgebaut ist. Die einzelnen Ketten sind hierbei über Peptid-bindungen quervernetzt und resultieren somit in einer dreidimensionalen Netz-artigen Polymerstruktur, dem Peptidoglycan. Gram-negative Bakterien besitzen ebenfalls eine Peptidoglycan-Schicht, die mit ungefähr 15 nm allerdings sehr viel dünner ist. Zudem werden Zellen dieses Typs noch von einer äußeren Lipid-Doppelschicht umgeben, die als eine effektive Diffusionsbarriere dient, wodurch die Permeabilität beispielsweise von lipophilen Antibiotika-Molekülen stark eingeschränkt wird.[49] Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die eigentliche Zellwand von Vertretern beider Gram-Typen aus Peptidoglycan besteht.[51] Eukaryotische Zellen besitzen im Gegensatz dazu keine Zellwand in diesem Sinne, weshalb die für das bakterielle Zellwachstum essentielle Peptidoglycan-Biosynthese eines der primären Targets für eine selektive antibiotische Therapie darstellt.[11]

2.1.2 Biosynthese von Peptidoglycan

Eine primäre Einteilung der Peptidoglycan-Biosynthese erfolgt sinnvollerweise anhand der jeweiligen Reaktionsorte. Beginnend mit der Darstellung der benötigten Vorstufen und Bausteine im Cytosol folgt die membrangebundene Synthese der Monomereinheiten, die abschließend an der Außenseite der Lipid-Doppelschicht polymerisiert und quervernetzt werden.

Zunächst wird im Cytosol das für die Biosynthese zahlreicher bakterieller Makromoleküle essentielle Substrat Uridindiphosphat-*N*-acetylglycosamin **1** (UDP-Glc*N*Ac) dargestellt (Abb. 2.1). Hierbei wird zunächst D-Fructose-6-Phosphat **2** durch die Transferase GlmS[52] in Glycosamin-6-Phosphat **3** überführt, wobei die Amid-Funktion von L-Glutamin (Gln) als

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

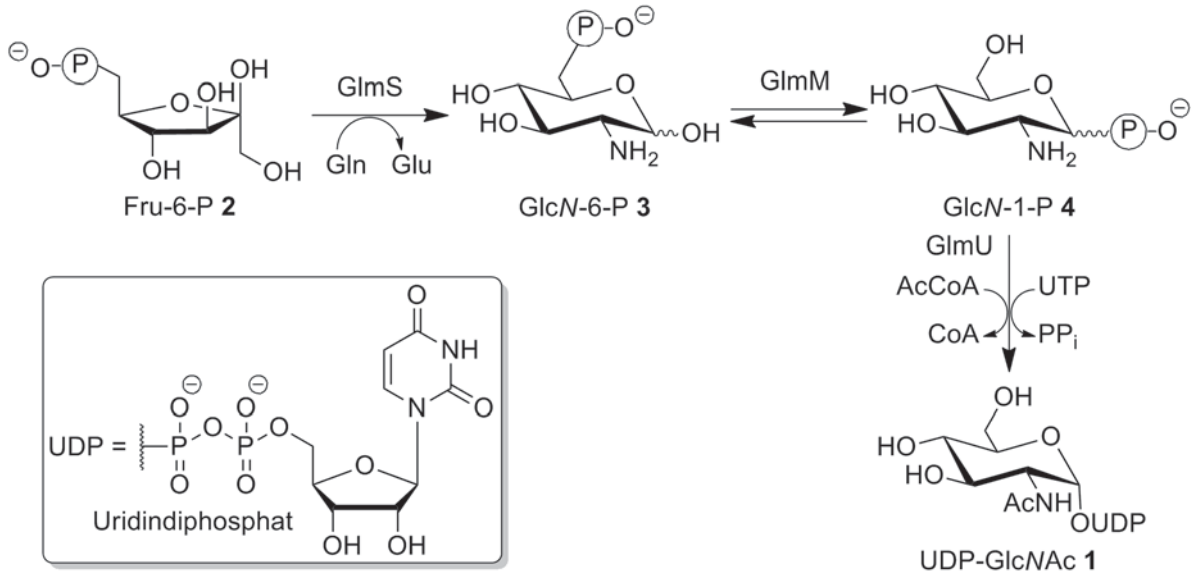


Abb. 2.1 Biosynthese von UDP-Glc*N*Ac **1**.

Stickstoffquelle dient. Die sich anschließende Gleichgewichtseinstellung zwischen Glycosamin-6-Phosphat **3** und Glycosamin-1-Phosphat **4** wird von dem Enzym GlmM[53] katalysiert. In den beiden letzten Schritten der Sequenz wird von dem Coenzym A (CoA) eine Acetyl-Gruppe auf die Amino-Funktion übertragen, und Uridintriphosphat (UTP) wird mit der Phosphat-Funktion in 1-Position unter Freisetzung von Pyrophosphat umgesetzt. Beide finalen Reaktionen zum UDP-Glc*N*Ac **1** werden durch das Enzym GlmU[54] katalysiert.[55]

Im Rahmen der Biogenese von Lipid II **5** erfolgt der Übergang von den rein cytosolischen Reaktionsschritten zu der membrangebundenen Synthesesequenz (Abb. 2.2). Hierbei wird zunächst in einer reversiblen Reaktionsfolge mit Hilfe des Enzyms MurA[56] ein Phosphoenolpyruvat-Rest in 3-Position von UDP-Glc*N*Ac **1** unter Abspaltung eines Phosphatanions eingeführt. Die nachfolgende irreversible Reduktion, die durch die Reduktase MurB[57] katalysierte wird, liefert in Form von Uridindiphosphat-*N*-acetylmuraminsäure **6** (UDP-Mur*N*Ac) einen weiteren essentiellen Baustein der Peptidoglycan-Biosynthese. Des Weiteren wird das Uridindiphosphat-*N*-acetylmuraminsäure-pentapeptid **7** (UDP-Mur*N*Ac-pentapeptid) in vier ATP-abhängigen Stufen generiert. Beginnend mit der Verknüpfung von L-Alanin (Ala) und UDP-Mur*N*Ac **6** durch die Synthetase MurC[58] folgt die Ausbildung der zweiten Peptidbindung zu D-Glutaminsäure (Glu) mit Hilfe der Ligase MurD[59]. Ferner bindet die γ-ständige Carboxyl-Funktion der D-Glutaminsäure durch das Enzym MurE[60] katalysiert an die nachfolgende Aminosäure, wobei es sich je nach Aufbau der Zellwand in den meisten Gram-positiven Organismen um L-Lysin (Lys) und in einem Großteil der Gram-negativen Bakterien um *meso*-2,6-Diaminopimelinsäure (DAP) handelt. Im Falle der Verwendung von *meso*-2,6-Diaminopimelinsäure liegt zwar der Schluss nahe, dass in

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

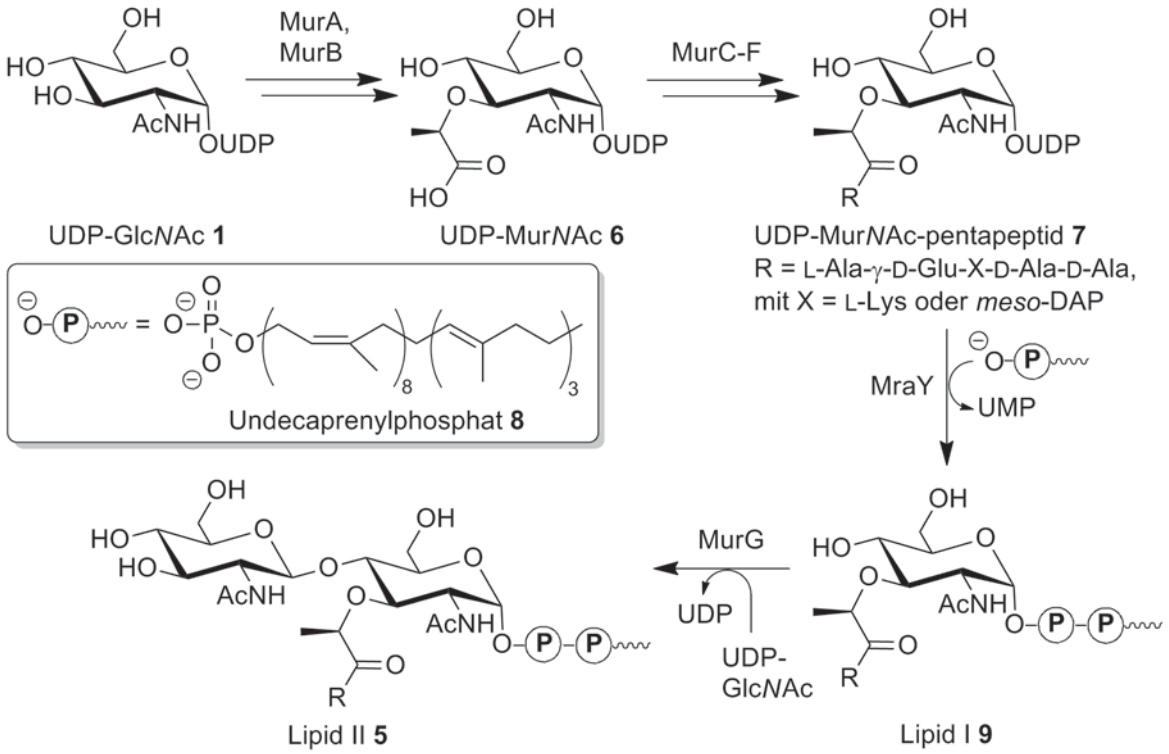


Abb. 2.2 Biosynthese von Lipid II **5**.

Analogie zu L-Lysin die *S*-konfigurierte Aminosäure-Gruppe in die Peptidkette eingebaut wird, was bisher allerdings noch nicht belegt werden konnte. Abschließend werden die beiden verbleibenden D-Alanin-Reste (Ala) als Dipeptid durch die Synthetase MurF[61] eingeführt. In diesem Zusammenhang sollte allerdings nicht unerwähnt bleiben, dass das Pentapeptid **7** in einigen Bakterienstämmen bezüglich der Aminosäuren sowie deren Abfolge gewisse Variationen aufweisen kann.[11,55]

Der Übergang zu der membrangebundenen Synthesesequenz erfolgt mit der Übertragung des UDP-Mur*N*Ac-pentapeptids **7** auf den Lipidcarrier Undecaprenylphosphat **8** durch das Enzym Translocase I (Abb. 2.2). Das resultierende Lipid-Intermediat I **9** (Lipid I) wird mit einem zweiten *N*-Acetylglycosamin-Rest ausgehend von UDP-Glc*N*Ac **1** unter Abspaltung von Uridindiphosphat (UDP) verknüpft. Die β-selektive Bildung des 1,4-Disaccharides Lipid-Intermediat II **5** (Lipid II) wird dabei durch die *N*-Acetylglycosaminyl-Transferase MurG[62] katalysiert.[55,63]

Nachfolgend gelangt das Lipid II **5** einem noch nicht bekannten Mechanismus folgend auf die Außenseite der Lipid-Doppelschicht, wo in Glycosyl-Transfer-Reaktionen Enzym-katalysiert zunächst eine Verknüpfung der vorliegenden Disaccharid-Derivate zu Polysaccharid-Ketten erfolgt. Dies geschieht unter Inversion der Konfiguration am anomeren Zentrum der Mur*N*Ac-Einheiten durch einen Angriff der Hydroxy-Gruppe in 4-Position der Glc*N*Ac-Einheiten, wobei der zunächst aus der Substitution resultierende Diphospho-

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

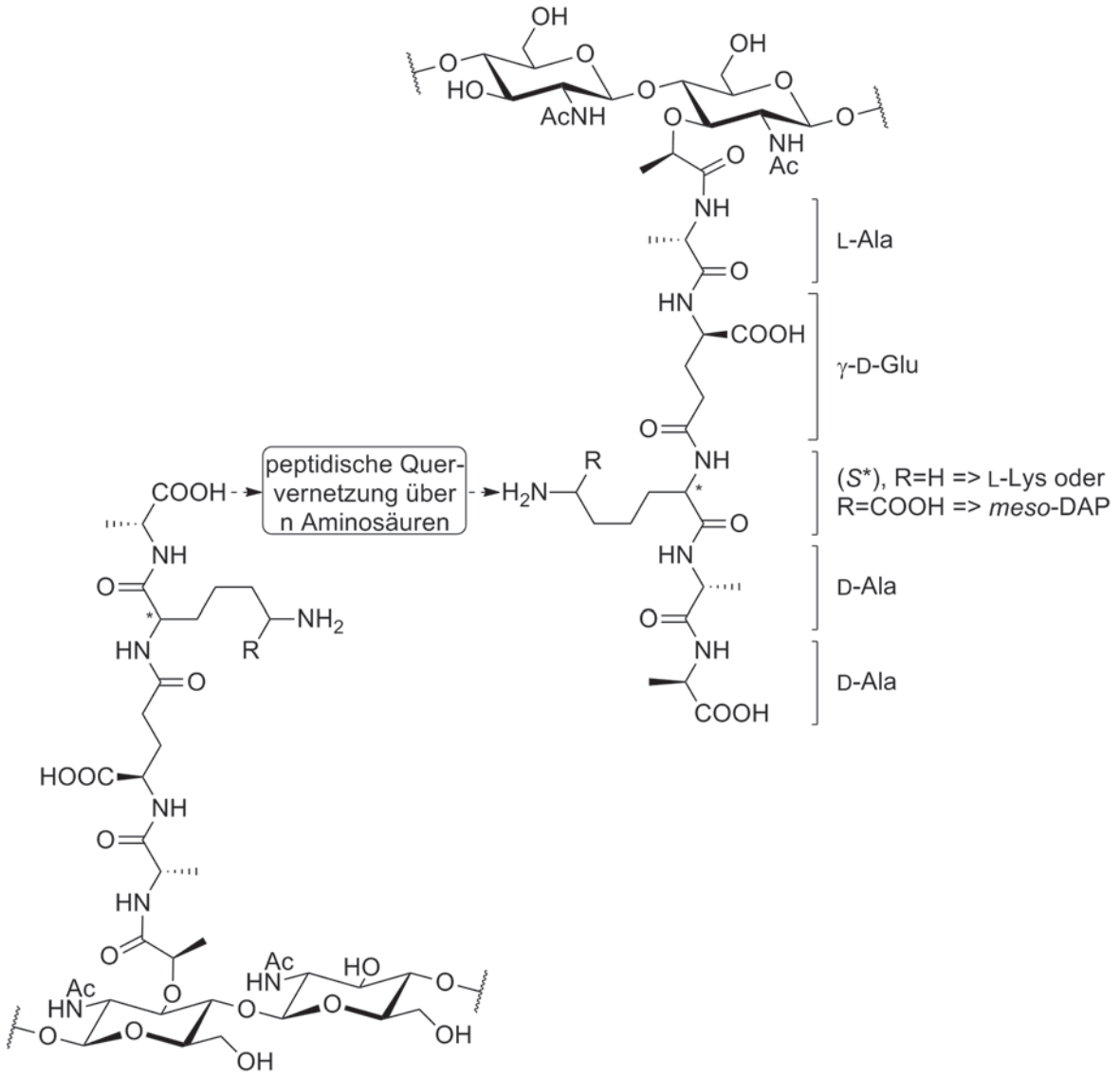


Abb. 2.3 Ausschnitt aus der Peptidoglycan-Struktur
[mit n = Anzahl der zusätzlichen Aminosäuren in der Quervernetzung (n = 0, 1, 2, 3, etc.)].

undecaprenyl-Rest durch Hydrolyse neben einem Phosphat-Anion auch den entsprechenden Lipidcarrier Undecaprenylphosphat **8** wieder freisetzt. Die auf diese Weise gebildeten eindimensionalen β-1,4-verknüpften Polysaccharid-Ketten werden abschließend über die Bildung von Peptidbindungen zu der dreidimensionalen Peptidoglycan-Struktur (Abb. 2.3) quervernetzt. Diese Transpeptidierung erfolgt zwischen der Carboxyl-Funktion von D-Alanin an vierter Stelle des Pentapeptides, die durch die Abspaltung des zuvor endständigen D-Alanin-Restes zugänglich wird, und der Amino-Gruppe von *meso*-2,6-Diamino-pimelinsäure eines anderen Pentapeptides in den meisten Gram-negativen Bakterien direkt, wohingegen die Verknüpfung mit der ε-Amino-Funktion der L-Lysin-Seitenkette für einen Großteil der Gram-positiven Organismen über eine weitere Oligopeptid-Einheit aufgebaut wird.[11]

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

2.1.3 Translocase I (MraY)

Struve und Neuhaus berichteten bereits im Jahr 1965 von der Übertragung von UDP-Mur*N*Ac-pentapeptid **7** auf den membrangebundenen Lipidcarrier Undecaprenyl-phosphat **8** unter Abspaltung von Uridinmonophosphat (UMP).[64] Diese Reaktion zu dem resultierenden Lipid I **9** wird dabei von dem Enzym Uridindiphosphat-*N*-acetylmuramoyl-pentapeptid:Undecaprenylphosphat Phospo-*N*-acetylmuramoyl-pentapeptid Transferase (Translocase I) katalysiert (Abb. 2.4).

Im Jahr 1991 konnten Ikaeda und Mitarbeiter zeigen, dass eine Überexpression des *mraY*-Gens zu einer erhöhten Translocase I-(MraY)-Aktivität in der Membran führt.[65] Der Name des Gens *mraY* leitet sich von dem ihn umgebenden Gencluster *murein region A* (*mra*) ab, der in *Escherichia coli* bei Minute zwei auf der Chromosomenkarte lokalisiert werden konnte. Boyle und Donachie bewirkten durch die Inaktivierung des Gens *mraY* eine Abreicherung von MraY. Als Konsequenz wurde zunächst ein Anschwellen und später eine Lyse der Zellen beobachtet, was den Schluss nahe legt, dass es sich bei *mraY* um ein essentielles Gen der Zellwand-Biosynthese handelt.[66] Bouhss und Mitarbeiter berichteten 2004 schließlich die scheinbar intrinsischen Probleme bezüglich der Überexpression und Reinigung von MraY überwunden zu haben und entwickelten somit eine Methode zur Isolierung des Proteins im Milligramm-Maßstab.[67] Des Weiteren gelang Ende 2011 Wang, Bernhard und Mitarbeitern auch die Etablierung einer Zell-freien Methode zur Expression des Membranproteins Translocase I.[68]

Auf Grundlage der Basensequenz des *mraY*-Gens war es zudem möglich, die einzelnen Aminosäuren und deren Abfolge in dem Enzym MraY vorherzusagen, wobei die hohe Hydrophobizität die Vermutung nahe legte, dass es sich hierbei um ein Membranprotein

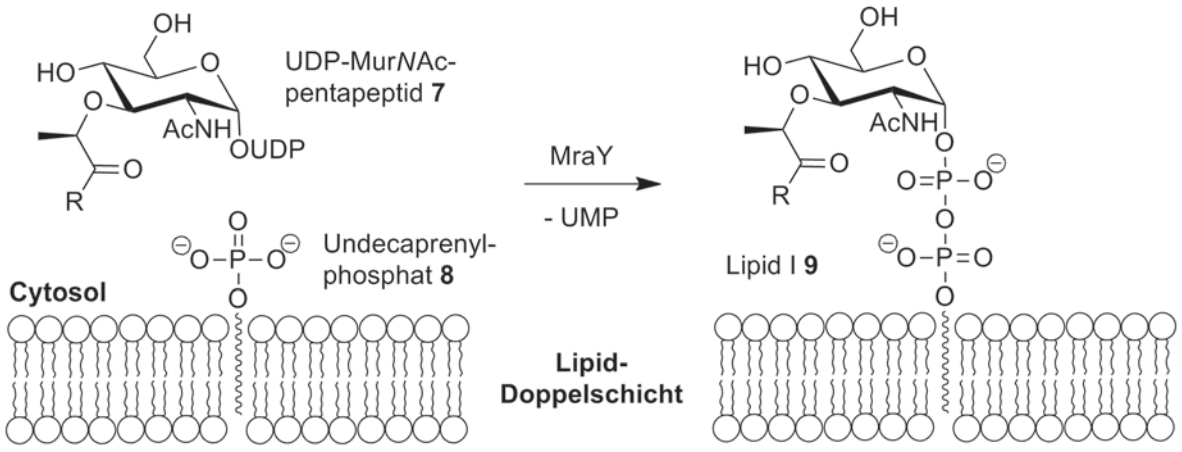


Abb. 2.4 Durch MraY katalysierte Übertragung von Park-Nucleotid **7** auf Undecaprenylphosphat **8** [mit R = L-Ala-γ-D-Glu-X-D-Ala-D-Ala, wobei X = L-Lys oder *meso*-DAP].

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

handeln sollte.[65] Diese These wurde durch die von Neuhaus und Mitarbeitern bereits 1969 beobachtete Abhängigkeit der MraY-Aktivität von der Präsenz einer lipidischen Umgebung unterstützt.[69] Le Beller, van Heijenoort und Mitarbeiter erarbeiteten 1999 ein Topologiemodell des eubakteriellen MraY-Proteins an Hand der Primärstrukturen von 25 orthologen Translocase I-Enzymen. Zunächst wurde der nahezu regelmäßig alternierenden Abfolge von hydrophoben und hydrophilen Domänen folgend ein mehrfaches Überspannen der Membran postuliert. Mit Hilfe von β-Lactamase-Fusions-Experimenten konnte diese Annahme nicht nur bestätigt werden, sondern vielmehr ein konkretes Topologiemodell entwickelt werden. Demnach besteht das MraY-Protein aus 10 transmembranen Segmenten, fünf cytoplasmatischen Domänen und einschließlich des N- bzw. des C-Terminus sechs Domänen auf der Membranaußenseite.[70]

Bereits in den 1960er Jahren führten Neuhaus und Mitarbeiter zahlreiche Experimente zur mechanistischen Aufklärung der durch MraY katalysierten Transfer-Reaktion durch. In diesem Kontext manifestierten sie zunächst den reversiblen Charakter der Umsetzung und bestimmten die Gleichgewichtskonstante auf einen Wert von ungefähr 0.25.[71] Des Weiteren konnten sie in Gegenwart von Tritium-markiertem UMP ([^{3}H]UMP) und in Abwesenheit des Akzeptors Undecaprenylphosphat **8** eine Austauschreaktion von [^{3}H]UMP mit der UMP-Einheit des Substrates UDP-Mur*N*Ac-pentapeptid **7** beobachten. Basierend auf diesem phänomenologischen Befund wurde für die MraY-katalysierte Transfer-Reaktion ein zweistufiger Mechanismus über ein entsprechendes MraY-Phospho-Mur*N*Ac-pentapeptid-

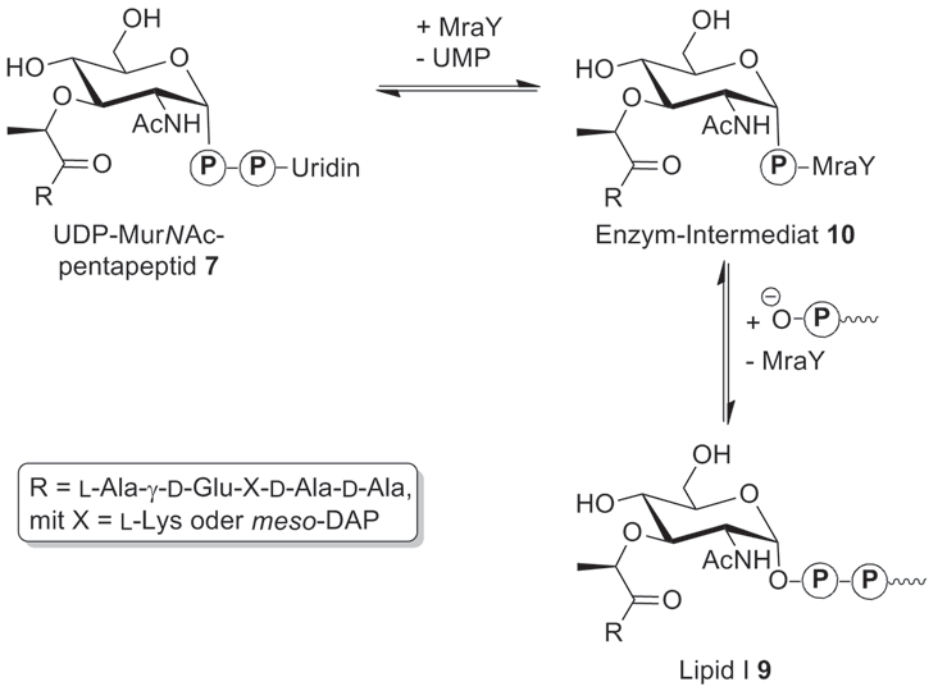


Abb. 2.5 Mechanistische Betrachtung der MraY-katalysierten Biosynthese von Lipid I **9**.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Intermediat **10** als Zwischenstufe postuliert (Abb. 2.5). Zudem ergaben kinetische Untersuchungen, dass die Geschwindigkeitskonstante des ersten Teilschrittes 6 bis 24 mal größer als die der Gesamtreaktion ist. Auf dieser Grundlage stellt die Umsetzung des Enzym-Intermediates **10** mit Undecaprenylphosphat **8** den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Umsetzung hin zu Lipid I **9** dar. Demzufolge sollte eine partielle Inhibierung der ersten Teilreaktion kaum einen Einfluss auf den ungestörten Ablauf der Gesamtreaktion nehmen.[72] Allerdings führten Neuhaus und Mitarbeiter ihre Experimente mit nicht gereinigten MraY-Präparationen durch, da es zu dem damaligen Zeitpunkt noch keine effiziente Methode zur Isolierung des Proteins gab. Auf Grundlage dieser Tatsache können enzymatische Verunreinigungen und damit einhergehend eventuell erhebliche Verfälschungen der Messdaten zumindest nicht kategorisch ausgeschlossen werden. Eine konkrete Validierung der vor nunmehr über 40 Jahren erarbeiteten Ergebnisse mit Hilfe des gereinigten Enzyms[67,68] steht allerdings noch immer aus.[73]

Des Weiteren wurde eine signifikante Stimulation der MraY-Aktivität durch monovalente Metall-Kationen wie Kalium und Natrium nachgewiesen.[40] Hingegen ist die Präsenz eines bivalenten Kations, im Speziellen Mg^{2+}, absolut essentiell für die katalysierte Transfer-Reaktion. Mg^{2+} kann in bedingtem Maße auch durch Mn^{2+} ersetzt werden, was allerdings

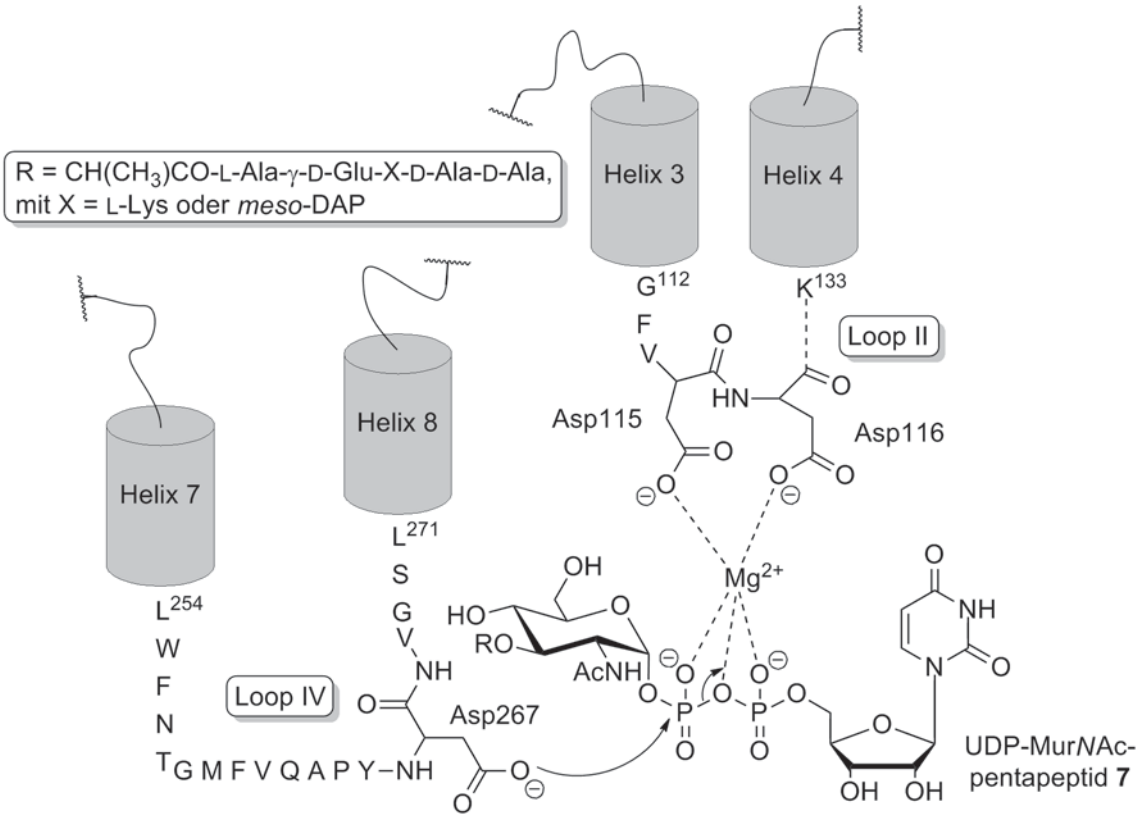


Abb. 2.6[74] Postuliertes Modell des aktiven Zentrums von MraY.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

einen deutlichen Verlust an Aktivität zur Folge hat.[67] Zur Identifikation des aktiven Zentrums des Transmembranproteines MraY wurde auf Basis der Primärstruktur von Vertretern der verwandten Transmembran-Phophozucker-Transferase-Familie nach Analogien gesucht. Vor diesem Hintergrund konnten als einzige Aminosäuren mit geeigneten funktionellen Gruppen in den Seitenketten für den nucleophilen Angriff von MraY an das UDP-Mur*N*Ac-pentapeptid **7** drei Asparaginsäure-Reste Asp-115, Asp-116 und Asp-267 identifiziert werden (Abb. 2.6). Asp-267 befindet sich dabei im cytosolischen Loop IV, wohingegen Asp-115 und Asp-116 im Loop II lokalisiert sind. Asp-115 und Asp-116 bilden ein Motiv, welches sich auch in der Mg^{2+}-abhängigen verwandten Prenyl-Transferase wiederfindet. In Anlehnung an dieses etablierte aktive Zentrum wurde für MraY ein sehr ähnliches Modell postuliert, in dem die beiden benachbarten Asparaginsäure-Reste ein Mg^{2+}-Ion koordinieren. Innerhalb dieses Konzeptes wird das Metall-Kation zudem von drei Sauerstoff-Atomen der Pyrophosphat-Einheit des Substrates UDP-Mur*N*Ac-pentapeptid **7** chelatisiert, was in einer Aktivierung der UMP-Einheit als Abgangsgruppe für einen nucleophilen Angriff des Asp-267-Restes resultiert. Schließlich wurden mittels Mutagenese MraY-Analoga erhalten, in denen die Asparaginsäure-Reste in den Positionen 115, 116 und 267 durch Asparagin (Asn) ersetzt wurden. Diese Mutanten waren allesamt inaktiv, was ein klares Indiz für die Gültigkeit des vorliegenden Modells darstellt.[74]

Bouhss und Mitarbeiter veröffentlichten 2008 eine weitere sehr viel ausführlichere Mutagenese-Studie.[75] In diesem Zusammenhang wurden Mutationen in allen fünf cytoplasmatischen Loops untersucht. Hierbei führte keine einzelne Mutation, auch eine der entsprechenden Asparaginsäure-Reste, zu einem vollständigen Erliegen der katalysierten Umsetzung. Vielmehr resultierten alle Mutationen, nahezu unabhängig von dem adressierten Loop, in einem ungefähr zwei- bis zehnfachen Verlust an enzymatischer Aktivität. Diese Resultate legen eher einen einstufigen Reaktionsmechanismus nahe, wobei kein MraY-Phospho-Mur*N*Ac-pentapeptid-Intermediat **10** als Zwischenstufe generiert wird (vgl. Abb. 2.5) und ein direkter nucleophiler Angriff von Undecaprenylphosphat **8** an das Substrat UDP-Mur*N*Ac-pentapeptid **7** erfolgt. Auf Basis dieser Ergebnisse scheinen zudem alle fünf cytoplasmatischen Loops an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt zu sein. Ferner konnten zwei Histidin-Reste in Loop I und Loop V identifiziert werden, deren Austausch gegen Arginin-Einheiten jeweils zu einer signifikanten Erniedrigung der Bindungsaffinität der Mutanten zu UDP-Mur*N*Ac-pentapeptid **7** führte. Daher könnten diese Histidin-Reste in der Erkennung des Substrates **7** durch MraY eine entscheidende Rolle spielen. Des Weiteren lieferten pH-Wert-abhängige Untersuchungen deutliche Indizien dafür, dass einer der

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Asparaginsäure-Reste im Loop II in eine Deprotonierung des Cosubstrates Undecaprenylphosphat **8** involviert ist und damit die Nucleophilie dieses Phosphorsäuremonoesters signifikant erhöht.[75]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl eine detaillierte Vorstellung des aktiven Zentrums von MraY selbst als auch ein konkreter Mechanismus der entsprechenden Umsetzung bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht erarbeitet werden konnten.

Das Transmembranprotein MraY ist zwar einerseits auf Eubakterien limitiert, hier repräsentiert es aber auf Grund seines ubiquitären Vorkommens ein äußerst interessantes und zugleich attraktives Target für die Entwicklung neuer antibiotisch aktiver Substanzen, da ein solches Antibiotikum bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht kommerziell als zugelassenes Medikament erhältlich ist. Es sind allerdings eine gewisse Anzahl von Inhibitoren dieses Enzyms bekannt,[76,77] die primär durch eine Klasse von nucleosidischen Naturstoffen, die sogenannten Nucleosid-Antibiotika[11,36-38,40-45,47,48], repräsentiert werden. Zur Identifikation von potenziellen Inhibitoren und der Bestimmung ihrer antibiotischen Potenz sind momentan drei verschiedene Methoden bekannt. Diese MraY-Assays bedienen sich alle entweder entsprechender Membranextrakte von transfizierten und induzierten Zellen oder des gereinigten Proteins, basieren dabei aber auf unterschiedlichen Detektionskonzepten. Einerseits erfolgt die Detektion über die Intensität an radioaktiver Strahlung[67] oder an Fluoreszenz[78], wobei ein ^{14}C-markiertes[67] oder eine entsprechendes dansyliertes[78] Analogon von Park-Nucleotid **7** verwendet wurde. Andererseits wurde Anfang 2012 ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-basierter MraY-Assay berichtetet. Hierfür wurde das Substrat **7** wiederum mit einem geeigneten Fluorophor verknüpft. In diesem Kontext wurde zudem ein kommerziell erhältlicher Lipid-gebundener Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff verwendet.[79]

2.2 Muraymycine

2.2.1 Die natürlich auftretenden Muraymycine

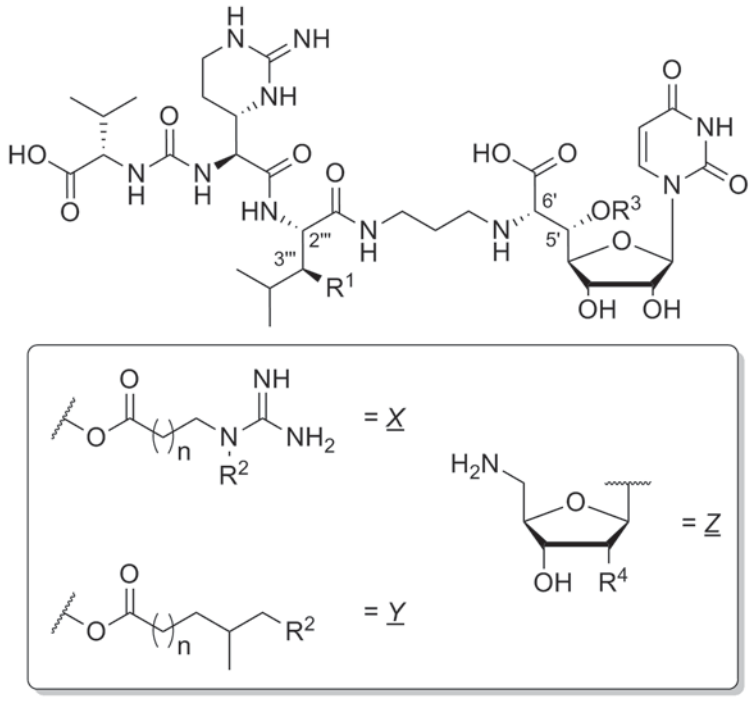
Im Jahr 2002 isolierten McDonald und Mitarbeiter aus einem Stamm einer *Streptomyces sp.* eine neue Klasse von Nucleosid-Lipopeptid-Antibiotika, die sogenannten Muraymycine (Abb. 2.7).[43,80] Es wurden insgesamt 19 Verbindungen durch Trennung und Reinigung erhalten, die auf Basis ihres strukturellen Aufbaus in vier Gruppen A-D unterteilt wurden. Die Strukturaufklärung gelang primär mit Hilfe NMR-spektroskopischer und massenspektrometrischer Untersuchungen. Ferner wurden einige Derivate zur Verifizierung der resultierenden Ergebnisse chemisch ineinander überführt. Die nucleosidische

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Grundstruktur der Muraymycine besteht aus einer Uridin-Einheit, welche *O*-glycosidisch über die 5'-Hydroxy-Gruppe mit einem Amino-Zucker Z verknüpft ist. Die Verbindungen A5 und C4 liegen hingegen als 5'-Alkohole vor. Da diese Vertreter, verglichen mit den 5'-*O*-amininoribosylierten Spezies, gegen die meisten bakteriellen Erreger keine signifikant höhere oder geringere biologische Aktivität aufweisen,[43,80] scheint der Aminoribose-Rest in keinem ausgeprägten Zusammenhang mit der biologischen Aktivität der Naturstoffe zu stehen.

Des Weiteren ist die 6'-Amino-Funktion der Glycin-Einheit über einen Propylamin-Linker mit einer Peptidkette verknüpft, die in den Gruppen A-C mit (3*S*)-3-Hydroxy-L-leucin und in der D-Reihe mit L-Leucin beginnt. Abschließend folgen die nicht-proteinogene Aminosäure L-Epicapreomycidin und die proteinogene Aminosäure L-Valin, welche allerdings über eine Carbonyl-Gruppe verbunden sind, wodurch sich einerseits die effektive Richtung der Peptidkette umkehrt und andererseits ein Harnstoff-Motiv gebildet wird. Ferner ist die Alkohol-Funktion des Hydroxyleucin-Restes in der A-Reihe mit einer guanidinylierten oder *N*-Hydroxy-guanidinylierten Fettsäure und in der B-Reihe mit einer verzweigten Alkyl-Fettsäure verestert.[43,80]

Alle Muraymycine inhibieren die durch das Enzym Translocase I katalysierte Transfer-Reaktion (vgl. Abb. 2.4) überaus effizient, was mit Hilfe der Messung zahlreicher Minimaler Inhibitor-Konzentrationen (MIC, minimum inhibitory concentration) unter Verwendung



	R^1 (n)	R^2	R^3	R^4
A1	X (11)	-OH	Z	-OMe
A2	X (9)	-OH	Z	-OMe
A3	X (11)	-H	Z	-OMe
A4	X (11)	-OH	Z	-OH
A5	X (11)	-OH	-H	-
B1	Y (5)	$-CH_3$	Z	-OMe
B2	Y (5)	-H	Z	-OMe
B3	Y (3)	$-CH_3$	Z	-OMe
B4	Y (4)	-H	Z	-OMe
B5	Y (4)	-H	Z	-OH
B6	Y (3)	-H	Z	-OMe
B7	Y (3)	-H	Z	-OH
C1	-OH	-	Z	-OMe
C2	-OH	-	Z	-OH
C3	-OH	-	Z	-H
C4	-OH	-	-H	-
D1	-H	-	Z	-OMe
D2	-H	-	Z	-OH
D3	-H	-	Z	-H

Abb. 2.7 Die natürlich vorkommenden Muraymycine A1 bis D3.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

verschiedenster Gram-positiver und Gram-negativer Bakterienstämme sowie in Peptidoglycan-Bildungs-Assays ermittelt wurde.[43,80] Matsuda, Ichikawa und Mitarbeiter entwickelten ein erstes Konzept für die Inhibierung von MraY durch Muraymycin-ähnliche Verbindungen, basierend auf vorläufigen Struktur-Aktivitäts-Beziehungs-Studien, rudimentären Computerberechnungen und dem postulierten Modell[74,75] des aktiven Zentrums von MraY.[81] Das Ergebnis dieser Überlegungen sollte wohl mehr als ein gedanklicher Anstoß für weitere Arbeiten verstanden werden, und nicht als ein vollständiges Inhibitionskonzept oder als konkreter Leitfaden für die Entwicklung neuer MraY-Inhibitoren dienen.

Obwohl ein für die Bildung der Muraymycine essentieller Gencluster Anfang 2011 identifiziert werden konnte,[82] repräsentiert die Biosynthese dieser Naturstoffe und verwandter Nucleosid-Antibiotika momentan ein gleichermaßen aktuelles wie brisantes Forschungsfeld, da hierbei zahlreiche Fragestellungen überaus kontrovers diskutiert werden.[82-85] Alle bisher postulierten Konzepte haben allerdings die Bildung der (5'*S*,6'*S*)-Nucleosyl-Aminosäure **11** (Abb. 2.8) ausgehend von dem entsprechenden 5'-Uridin-Aldehyd **12** und Glycin in einer Art Aldolreaktion gemein. Es wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht zweifelsfrei nachgewiesen, ob anschließend zunächst die Einführung einer

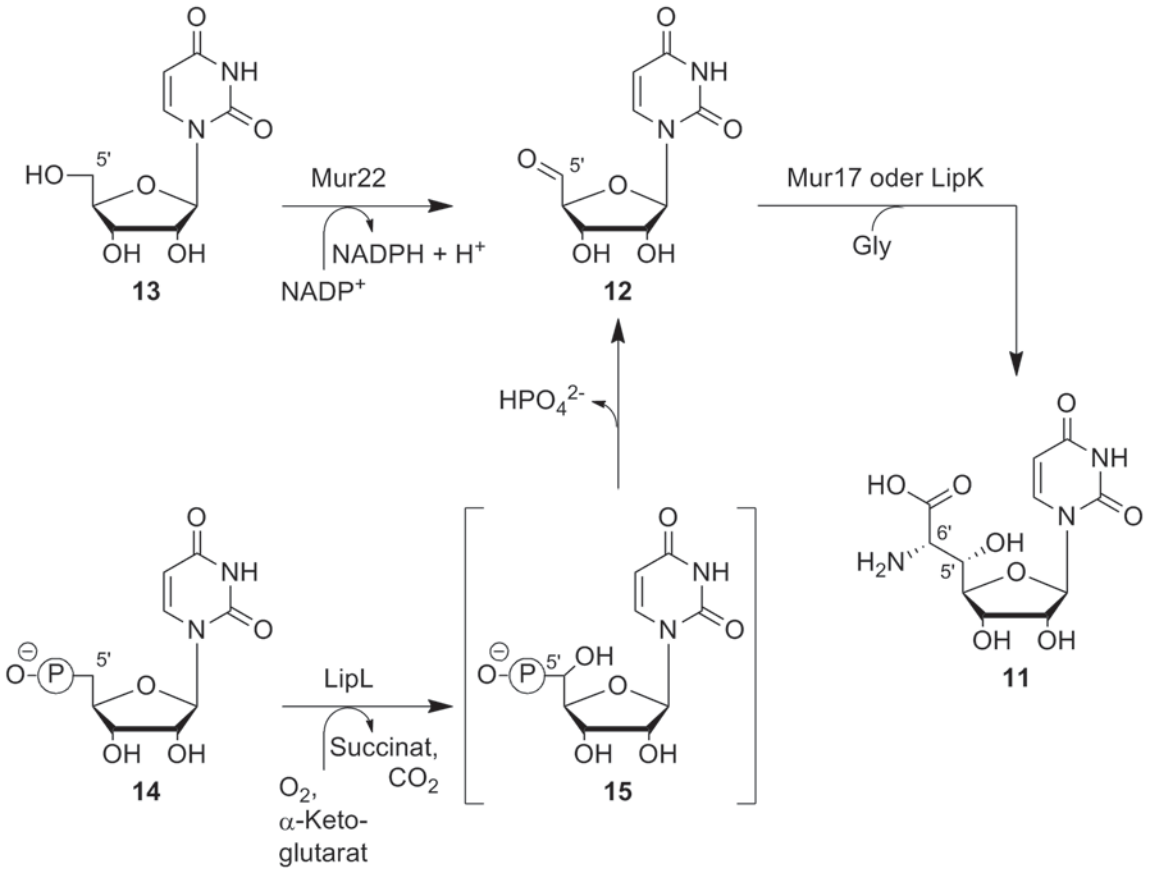


Abb. 2.8 Postulierte Biosynthese-Wege der (5'*S*,6'*S*)-Nucleosyl-Aminosäure **11**.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Aminoribose-Einheit an der 5'-Hydroxy-Funktion[84,85] erfolgt oder ob zuerst ein Aminopropyl-Derivat mit der 6'-Amino-Gruppe[82] verknüpft wird. Selbst für die Biosynthese des Aldehydes **12** wurden zwei verschiedene Routen vorgeschlagen. Deng und Mitarbeiter postulierten eine Dehydrierung durch eine $NADP^+$-abhängige Dehydrogenase Mur22 ausgehend von Uridin **13** (Abb. 2.8).[82] Van Lanen und Mitarbeiter konnten hingegen mit Hilfe einer ^{18}O-Markierung eine Oxidation von Uridinmonophosphat **14** durch eine Eisen-haltige α-Ketoglutarat-abhängige Hydroxylase LipL nachweisen, wobei der resultierende Phosphorsäuremonoester des Aldehyd-Hydrates **15** umgehend zerfällt (Abb. 2.8).[84,85] Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine detaillierte Biosynthese der Muraymycine und verwandter Nucleosid-Antibiotika bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht validiert werden konnte und alle bisherigen Ergebnisse zu einem Großteil auf Analogien zu der Funktion verwandter Enzyme und entsprechenden Postulaten basieren.

2.2.2 Semisynthetische Muraymycine

Lin und Mitarbeiter derivatisierten das natürlich vorkommenden Muraymycin C1, um konkretere Einblicke in Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von Muraymycin-basierten Verbindungen zu erhalten. In diesem Kontext wurden 16 semisynthetisch erhaltene Derivate bezüglich ihrer biologischen Aktivität untersucht. Hierbei wurde sich auf diverse Derivatisierungen des primären Amins des Amino-Zuckers und des sekundären Amins des Glycin-Restes mit Isocyanaten und Aldehyden beschränkt. Im Zuge dieser Arbeiten wurden zwei elementare Erkenntnisse gewonnen. Einerseits führte eine chemische Modifikation des Amino-Zuckers zu einem vollständigen Verlust der antibiotischen Wirkung der entsprechenden Verbindungen. Andererseits konnte eine Korrelation zwischen der Lipophilie der an das sekundäre Amin gebundenen Reste und einem gewissen Erhalt der biologischen Aktivität dargelegt werden. Dabei wurde gezeigt, dass die antibiotische Potenz mit steigender Lipophilie der Derivate weniger stark abnimmt.[86]

2.2.3 Synthetische Arbeiten zu natürlichen Muraymycinen und Analoga

Yamashita und Mitarbeiter stellten eine Vielzahl vollsynthetischer vereinfachter Muraymycin-Analoga dar und untersuchten diese bezüglich ihres inhibitorischen Potentials gegenüber dem Enzym MraY. Der Aufbau des Muraymycin-Grundgerüstes erfolgte hierbei über eine Aldolreaktion zwischen dem 5'-Uridin-Aldehyd **16**[87,88] und dem vorgenerierten Enolat des *N,N*-Dibenzyl-glycin-*tert*-butylesters **17**[89] als Schlüsselschritt (Abb. 2.9). Für diese Reaktion wurde eine intrinsisch kontrollierte Stereoselektivität berichtet, da bevorzugt die 5'-epimere Nucleosyl-Aminosäure **18** und das (5'*S*,6'*S*)-Diastereomer **19** mit der

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

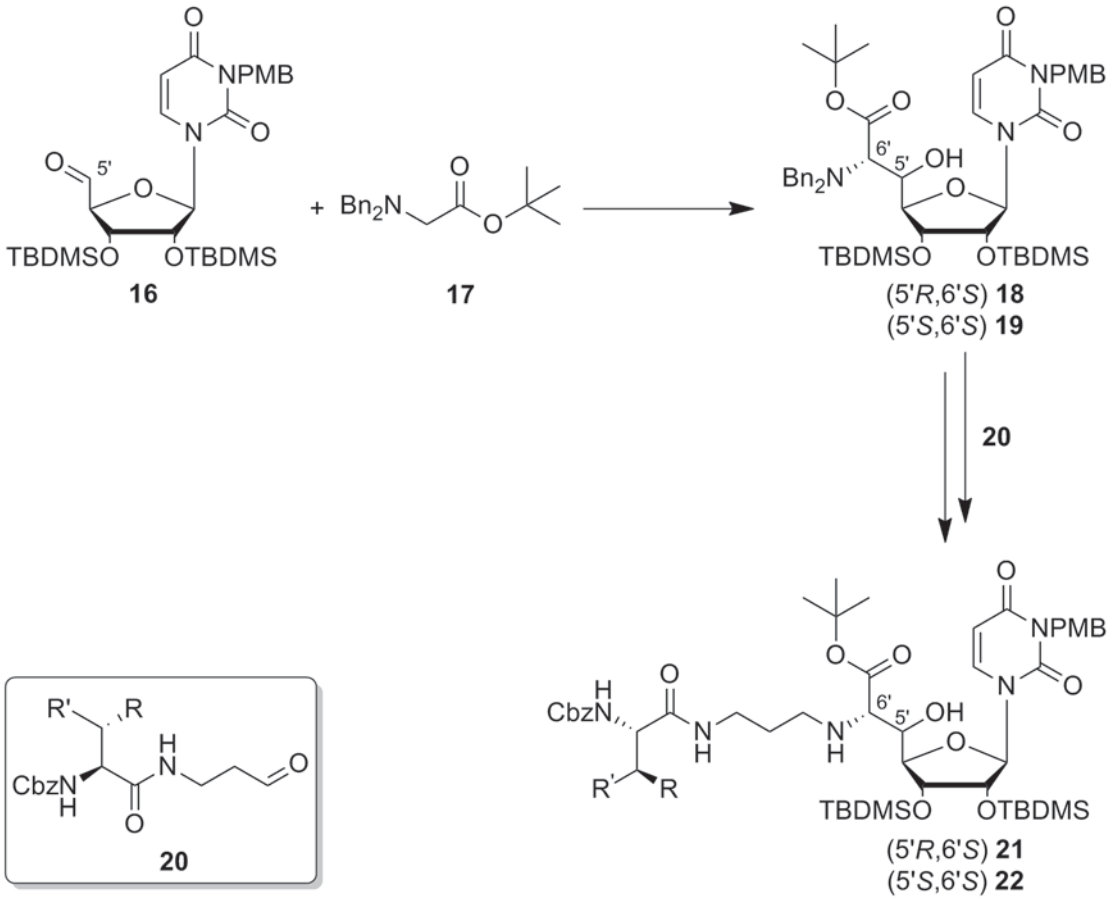


Abb. 2.9 Synthese der vereinfachten Muraymycin-Analoga **21** und **22**.

natürlichen Muraymycin-Konfiguration erhalten wurden. Beide Epimere **18** und **19** wurden nach säulenchromatographischer Trennung hydrogenolytisch Benzyl-entschützt und die resultierenden primären Amine mit verschiedenen Amido-Aldehyden des Types **20** in reduktiven Aminierungen verknüpft. Dieser Strategie folgend wurden jeweils sowohl die entsprechenden 5'-epimeren als auch die analogen natürlich konfigurierten Muraymycin-Derivate dargestellt. Die in diesem Kontext isolierten Analoga **21** und **22** wurden teilweise durch Cbz-Entschützungen in die resultierenden freien Amine überführt und unter Peptidkupplungsbedingungen mit weiteren Aminosäure-Resten verknüpft.[90,91]

Diese synthetischen Muraymycin-Analoga wurden anschließend sowohl in geschützter wie auch teilweise entschützter Form hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität getestet. In diesem Kontext wurden nicht nur einige antibiotisch aktive Substanzen identifiziert, sondern auch zwei erstaunliche Erkenntnisse gewonnen. Einerseits wiesen die 5'-epimeren Analoga in fast allen Fällen deutlich höhere Aktivitäten auf als die entsprechenden Derivate mit der Muraymycin-analogen Konfiguration. Andererseits zeigten die Analoga mit synthetischen Schutzgruppen, wie dem *tert*-Butylester und den Silylethern, eine signifikant größere biologische Potenz verglichen mit den entsprechenden ungeschützten Verbindungen. Auf

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Basis dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass auch stark vereinfachte Muraymycin-Analoga das Potential zur Entwicklung neuer Antibiotika zu besitzen scheinen.[90,91]

Matsuda, Ichikawa und Mitarbeiter veröffentlichten 2005 eine Totalsynthese von Caprazol, der Kernstruktur des Caprazamycins, die eine im Vergleich mit den Muraymycinen analoge Uridinyl-Glycin-Einheit beinhaltet.[92] In diesem Zusammenhang fand eine asymmetrische Sharpless-Aminohydroxylierung[93] als Schlüsselschritt zur diastereoselektiven Darstellung dieses Bausteins Anwendung (Abb. 2.10). Zunächst wurde der Uridin-abgeleitete Alkohol **23** nach Oxidation in einer Wittig-Reaktion[94] mit einem entsprechenden stabilisierten Phosphor-Ylid umgesetzt. Das resultierende *E*-Olefin **24** wurde nachfolgend in einer Sharpless-Aminohydroxylierung mit *tert*-Butyl-hypochlorit als Oxidationsmittel, Kaliumosmat(VI)-

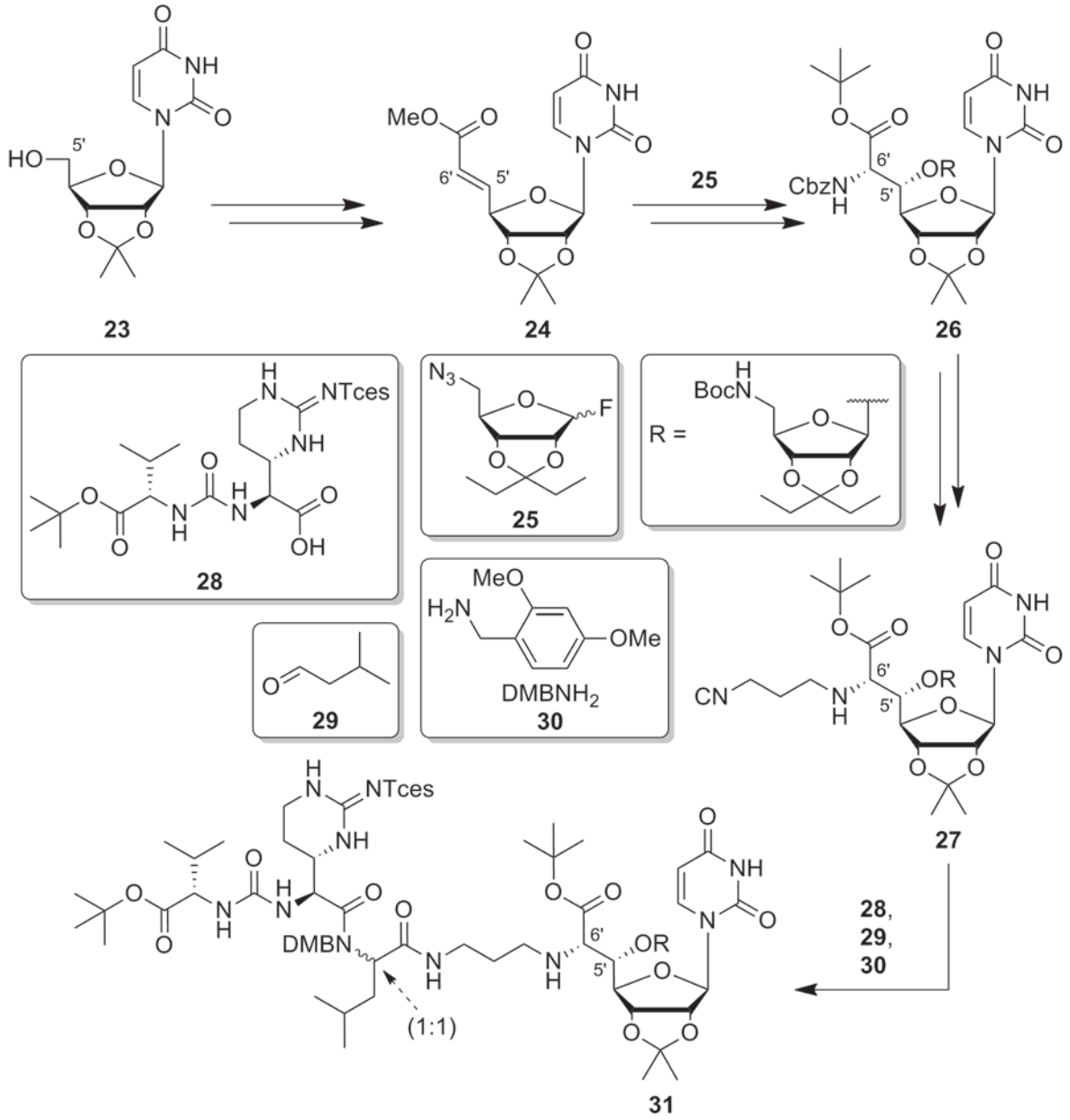


Abb. 2.10 Totalsynthese von Muraymycin D2 nach Matsuda, Ichikawa und Mitarbeitern.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

dihydrat als Katalysatorsalz, Hydrochinidin-(anthrachinon-1,4-diyl)-diether ([DHQD]$_2$AQN) als chiralen Liganden und Benzylcarbamat eingesetzt. Die Glycosylierung des sekundären Alkohols mit dem Fluorid-Donor **25**[95,96] und eine anschließende Umschützung lieferte die (5'*S*,6'*S*)-Nucleosyl-Aminosäure **26**.[97] Auf Basis dieser Ergebnisse gelang Matsuda, Ichikawa und Mitarbeiter 2010 auch die Totalsynthese von Muraymycin D2.[98] Hierzu wurde zunächst das Isonitril **27** generiert, welches mit der Carbonsäure **28**, dem Aldehyd **29** und dem Amin **30** in einer Ugi-Vier-Komponenten-Reaktion umgesetzt wurde. Daraus resultierte allerdings der entscheidende Nachteil, dass ein Diastereomerengemisch (1:1) mit einer L-Leucin- und einer D-Leucin-Einheit **31** gebildet wurde (Abb. 2.10). Daher erscheint es sinnvoller eine Synthesestrategie zu wählen, mit deren Hilfe L-Leucin aus dem *chiral pool* verwendet werden kann. Eine abschließende zweistufige Entschützung und HPLC-Trennung des Gemisches **31** lieferte sowohl Muraymycin D2 als auch das entsprechende Epimer.[98]

Ferner entwickelten Sarabia und Mitarbiter eine Strategie zur stereoselektiven Darstellung von *trans*-Epoxiden ausgehend von Uridin-abgeleiteten Aldehyden und Schwefel-Yliden (Abb. 2.11).[99-105] Dabei wurde aus Sulfonium-Salz **32** *in situ* ein Schwefel-Ylid generiert, welches mit dem Uridin-5'-aldehyd **33** umgesetzt wurde.[99] Das in hervorragender Diastereoselektivität resultierende Epoxy-Indolinamid **34** konnte über die Reaktionssequenz Oxidation, Verseifung, Veresterung[106] in den Epoxy-*tert*-Butylester **35** überführt werden. Eine folgende regioselektive S_N2-artige Epoxid-Öffnung durch primäre Amine oder

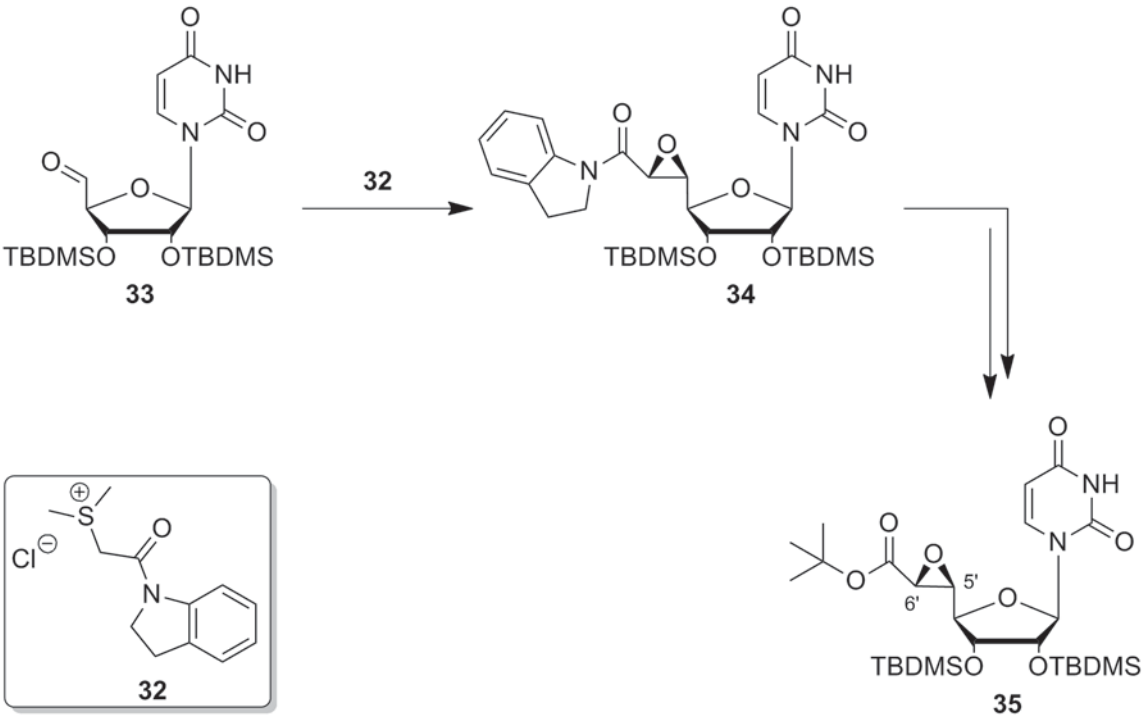


Abb. 2.11 Synthese eines Bausteins des 5'-epimeren nucleosidischen Muraymycin-Grundgerüstes.

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

Natriumazid in 6'-Position konnte nachgewiesen werden.[99] Der Vorteil dieses Konzeptes besteht in der hohen Diastereoselektivität, die hier auch ohne den Einsatz chiraler Hilfsreagenzien erreicht wird. Aggarwal und Mitarbeiter fanden in der Reversibilität des Angriffes des Schwefel-Ylides an den chiralen Aldehyd eine stichhaltige Begründung für die hervorragende intrinsische Stereokontrolle solcher Reaktionen.[107,108] Die absolute Konfiguration wurde von Sarabia und Mitarbeitern zunächst anhand eines Ribose-abgeleiteten Aldehydes, also einer vereinfachten Modellverbindung, bestimmt. In diesem Zusammenhang wurde einerseits mittels theoretischer Berechnungen eine konformationelle Bevorzugung eines *re*-Seiten-Angriffs dieses Aldehydes durch ein Nucleophil vorhergesagt, was zu einer (*S*)-Konfiguration des Kohlenstoff-Atoms in 5'-Position führen würde. Andererseits wurde dieser Aldehyd in einer Schwefel-Ylid-Reaktion verwendet und das gebildete Epoxid mit den beiden möglichen mit Hilfe der etablierten Sharpless-Epoxidierung[109,110] generierten *trans*-Epoxiden verglichen. Die Übereinstimmung der erhaltenen NMR-Spektren des Produktes der Schwefel-Ylid-Reaktion mit denen des (5'*S*,6'*R*)-Diastereomers war somit mit den theoretischen Berechnungen kongruent. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde die absolute (5'*S*,6'*R*)-Konfiguration aller mit Hilfe von Schwefel-Yliden und Uridin-5'-Aldehyden gebildeten Epoxide postuliert.[105] Auf Basis dieser Annahme muss es sich bei den Produkten S_N2-artiger regioselektiver Epoxid-Öffnungen in 6'-Position mit geeigneten Stickstoffnucleophilen zwangsläufig um 5'-epimere Muraymycin-Analoga handeln.[99] Auch wenn die von Sarabia und Mitarbeitern dargelegten Indizien für den postulierten stereochemischen Verlauf der Schwefel-Ylid-Reaktion durchaus schlüssig sind, konnte die absolute Konfiguration der gebildeten *trans*-Epoxide nicht eindeutig bestimmt werden.

In Vorarbeiten konnten die bis dato unbekannten 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **36** und **37** dargestellt werden (Abb. 2.12), die in späteren Struktur-Aktivitäts-Beziehungs-Studien dafür genutzt werden sollen, den Einfluß sowohl der 5'-Hydroxy-Gruppe als auch der absoluten Konfiguration in 6'-Position auf die biologische Potenz der Muraymycine untersuchen zu können. Diese Fragestellung ist vor dem Hintergrund eines besseren Verständnisses des Membranproteins MraY und dessen Inhibierung von signifikanter Relevanz, da einerseits auf Basis der antibiotischen Wirksamkeit verschiedenster Muraymycine, der 5'-*O*-Aminoribose-Rest in keinem ausgeprägten Zusammenhang mit der biologischen Aktivität der Naturstoffe zu stehen scheint.[43,80] Andererseits wiesen die vereinfachten 5'-epimeren Muraymycin-Analoga in fast allen Fällen eine deutlich höhere biologische Potenz auf als die entsprechenden Derivate mit der Muraymycin-analogen Konfiguration.[90,91] Im Rahmen der Synthese dieser neuartigen Analoga **36** und **37** wurde zunächst das *Z*-Olefin **38** mit Hilfe einer

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

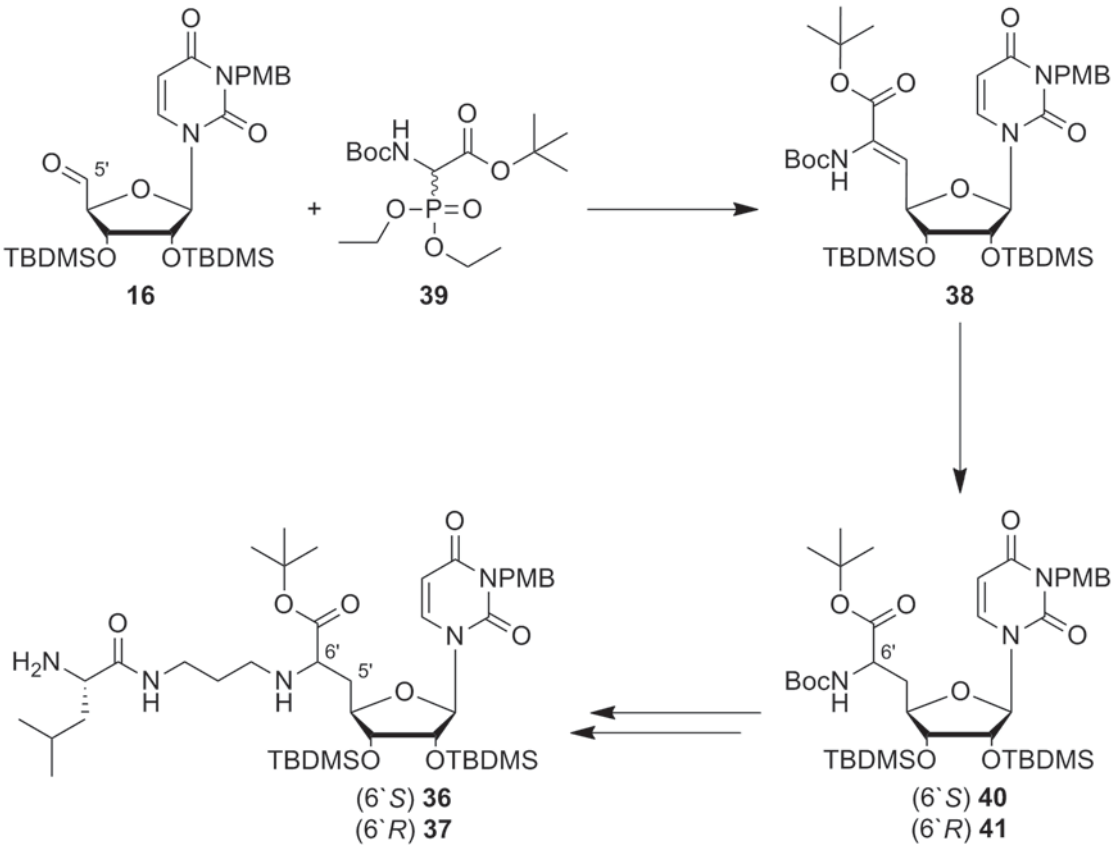


Abb. 2.12 Synthese der 5`-Desoxy-Muraymycin-Analoga **36** und **37**.

Wittig-Horner-Reaktion[111,112] ausgehend von Aldehyd **16** und Phosphonat **39** dargestellt. Nachfolgend wurden die beiden Epimere **40** und **41** jeweils durch stereoselektive Hydrierung der olefinischen Doppelbindung generiert. Das (6'*S*)-Epimer **40** wurde dabei mittels einer homogenen asymmetrische Hydrierung mit einem chiralen Rhodium(I)-Katalysator synthetisiert. Hingegen wurde das (6'*R*)-Epimer **41** durch eine Hydrierung unter heterogenen Bedingungen mit Palladium auf Aktivkohle durch intrinsische Stereokontrolle des eingesetzten chiralen *Z*-Olefins **38** erhalten. Anschließend wurden die Epimere **40** und **41** selektiv unter Erhalt der *tert*-Butylester- und Silylether-Funktionalitäten mit Chlorwasserstoff in Ethylacetat *tert*-Butyloxycarbonyl-entschützt,[113,114] was allerdings nur in sehr moderaten Ausbeuten gelang. Nach der jeweiligen reduktiven Aminierung der resultierenden primären Amine mit einem entsprechenden Aldehyd lieferte die abschließende Benzyloxycarbonyl-Entschützung der erhaltenen sekundären Amine die epimeren 5'-Desoxy-Muraymycin-Analoga **36** und **37** (Abb. 2.12).[115]

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.