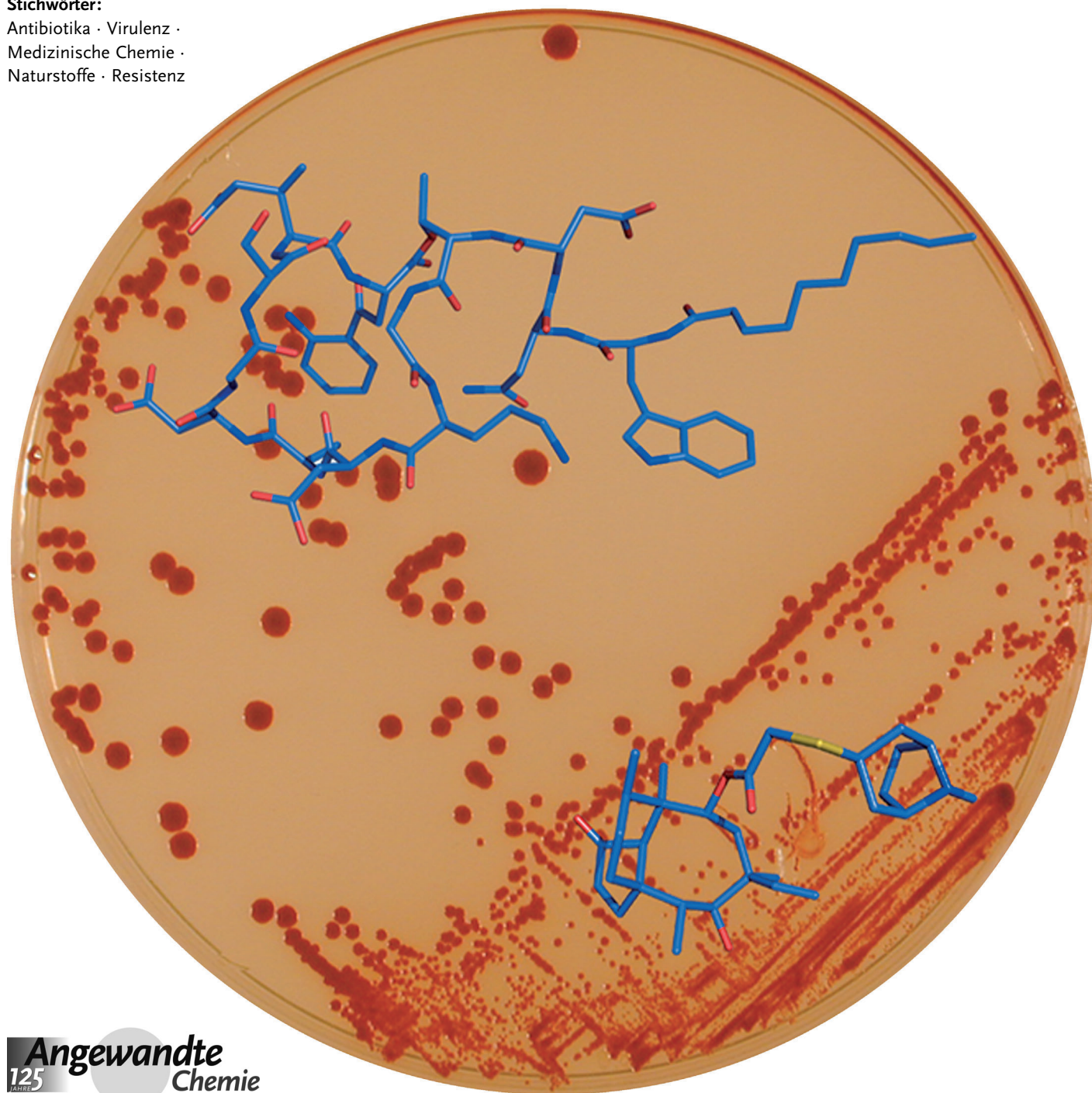


# Die Bekämpfung multiresistenter Bakterien: aktuelle Strategien zur Entdeckung neuer Antibiotika

*Kieron M. G. O'Connell, James T. Hodgkinson, Hannah F. Sore, Martin Welch, George P. C. Salmond und David R. Spring\**

**Stichwörter:**

Antibiotika · Virulenz ·  
Medizinische Chemie ·  
Naturstoffe · Resistenz



**Die** Einführung effizienter antibakterieller Therapien für Infektionskrankheiten in der Mitte des 20. Jahrhunderts revolutionierte die klinische Praxis und erleichterte die Entwicklung der modernen Medizin. Viele potenziell lebensbedrohliche Erkrankungen wurden leicht heilbar, die Zahl der Toten oder Verheerten aufgrund von Bakterieninfektionen nahm drastisch ab. Dieser überwältigende historische Erfolg macht es schwer, sich ein Leben ohne effiziente Antibiotika vorzustellen. Dennoch wird dies durch die unaufhaltsame Zunahme resistenter Bakterien für einige Infektionen zu einer sehr realen und verstörenden Möglichkeit. Die rücksichtslose Selektion auf resistente Bakterien, gekoppelt mit ungenügenden Investitionen für Infektionsforschung, hat zu einer stetigen Abnahme der Wirksamkeit vorhandener Therapien und zu einem Mangel an neuen Strukturklassen geführt, um die bekannten Verbindungen zu ersetzen oder zu ergänzen. Daraus hat sich ein dringender Bedarf für neue Antibiotika und Behandlungsstrategien ergeben, den zu befriedigen eine der Schlüsselaufgaben für die Medizinalchemie des 21. Jahrhunderts sein wird.

## 1. Einleitung und Überblick

Leitstrukturen für die antibakterielle Chemotherapie stammen wie alle Chemotherapeutika aus zwei Quellen: aus chemischer De-novo-Synthese und aus Naturstoffen. Bei den Antibiotika spielen die Naturstoffe historisch eine wesentlich größere Rolle, nur drei klinisch eingesetzte Verbindungsklassen haben einen rein präparativen Ursprung. Die übrigen Antibiotikaklassen gehen alle auf Naturstoffe aus mikrobiellen Quellen zurück. Ein Aspekt ist, dass die Produktion dieser Verbindungen sich über die Jahrtausende entwickelt hat, um ihren mikrobiellen Produzenten einen Selektionsvorteil gegenüber weniger konkurrenzfähigen Organismen zu verschaffen. Ihre Wirksamkeit bei der Hemmung von Bakterien ist daher offensichtlich. Es überrascht auch nicht, dass die Isolierung und Prüfung dieser bioaktiven Verbindungen sich als eine sehr fruchtbare Forschungslinie für die Medizinalchemie bestätigt hat.

Die Entwicklung der Antibiotikatherapie geht auf das späte 19. Jahrhundert zurück, als zeitgenössische Mikrobiologen, darunter so bedeutende Wissenschaftler wie Robert Koch und Louis Pasteur, die antagonistische Aktivität zwischen mikrobiellen Populationen beobachteten und Paul Ehrlich nach seiner „magischen Kugel“ suchte, die gegenüber den Bakterienzellen selektiv toxisch war.<sup>[1]</sup> Es dauerte allerdings bis zur Mitte des 20. Jahrhunderts, dass mit der Einführung der Sulfonamide (als chemischer Therapeutika) 1935 und der  $\beta$ -Lactame (als Naturstoff-Therapeutika) 1940 Antibiotika breit eingesetzt wurden und das moderne Zeitalter antibakterieller Behandlungen begann.<sup>[1]</sup> Die Einführung dieser Verbindungen kündigte auch den Beginn eines Zeitalters intensiver Forschungsaktivitäten an, sodass manchmal vom „goldenen Zeitalter“ antibakterieller Entdeckungen<sup>[2]</sup> gesprochen wird. Während dieser Zeit zwischen den 1940er und den 1960er Jahren wurden die meisten der gegenwärtig eingesetzten Antibiotika entdeckt.

Es folgte eine lange „Innovationslücke“ von fast 40 Jahren zwischen den Chinolonen 1962 und dem Oxazolidinon Linozolid (Zyvox) im Jahr 2000, während der keine neuen antibakteriellen Verbindungsklassen in den Klinikalltag eingeführt wurden.<sup>[3]</sup> Die meisten Wirkstoffe, die während des „goldenen Zeitalters“ eingeführt worden waren, stammen aus der Durchmusterung von Naturstoffen aus Mikroorganismen-Fermentationen. Wesentlich zu der Innovationslücke hat dem Anschein nach beigetragen, dass die meisten „niedrig hängenden Früchte“ dieses Ansatzes schnell gepflückt wurden und in Nachfolgeprogrammen nur bekannte Substanzen wiederentdeckt wurden.<sup>[4]</sup> Außerdem ließ die bemerkenswerte Verbesserung der antibakteriellen Chemotherapie zwischen etwa 1930 und 1960 eine gewisse Nachlässigkeit bei Infektionserkrankungen aufkommen. Die Verfügbarkeit vieler effizienter Wirkstoffe machte das Forschungsfeld aus industrieller Sicht für Investitionen zunehmend weniger interessant.<sup>[5]</sup>

Infektionsforschung blieb ein aktives Feld in den Jahrzehnten zwischen dem goldenen Zeitalter und der Einführung von Linozolid, doch die Verbindungen, die während dieser Zeit in die Klinik eingeführt wurden, waren eher Derivate bekannter Verbindungsklassen als neue, bisher noch unbekannte Substanzen.

Bis heute ist die Entwicklung neuer Antibiotika eine wenig interessante Investition für Pharma-Großunternehmen.

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung und Überblick</b>	10905
<b>2. Bakterielle Zielstrukturen und Resistenzmechanismen</b>	10906
<b>3. Neue Antibiotika aus Naturstoffen</b>	10908
<b>4. Die Modifizierung bestehender Verbindungsklassen</b>	10911
<b>5. Hybridantibiotika</b>	10915
<b>6. Antimikrobielle Peptide</b>	10918
<b>7. Antivirulenz-Strategien durch Hemmung des Quorum Sensing</b>	10921
<b>8. Zusammenfassung und Ausblick</b>	10928

[\*] Dr. K. M. G. O'Connell, Dr. J. T. Hodgkinson, Dr. H. F. Sore, Dr. M. Welch, Prof. G. P. C. Salmond, Dr. D. R. Spring  
Departments of Chemistry and Biochemistry  
University of Cambridge  
Lensfield Road, Cambridge, CB2 1EW (Großbritannien)  
E-Mail: spring@ch.ac.uk  
Homepage: <http://www-spring.ch.cam.ac.uk>



men.<sup>[6]</sup> Hauptgrund dafür ist, dass sich die Antibiotika selbst überflüssig machen: Wenn die Verbindung wirksam ist, heilt sie die Erkrankung, gegen die sie eingesetzt wird, schnell, und macht eine weitere Behandlung unnötig. Im Unterschied dazu müssen Therapeutika bei chronischen Krankheiten wie Bluthochdruck oft über Jahrzehnte ständig eingenommen werden. Die Reife der antibakteriellen Forschung, der ungewisse Lebenszyklus neuer Verbindungen und das allgemeine regulatorische Umfeld, das die Geschwindigkeit der Verwertung beeinflusst, verringern den kommerziellen Schwung für ein Investment in Antibiotika in einem sehr schwierigen Marktsegment.<sup>[7]</sup> Daher kann es sein, dass die schnellsten Fortschritte in der Antibiotikaforschung gegenwärtig aus akademischen Labors sowie den Labors kleiner und mittlerer Biotechnologiefirmen kommen.<sup>[8]</sup>

In diesem Aufsatz beschreiben wir kurz die verschiedenen bakteriellen Prozesse, die mit Antibiotika angegriffen werden, und die Entwicklung von Resistenzmechanismen gegen diese Verbindungen. Schwerpunkt dieses Aufsatzes ist es, einen Überblick über die aktuelleren und wichtigen Felder der „zeitgenössischen“ Antibiotikaforschung zu geben. Die ausgewählten Aspekte sollen einen möglichst breiten Ausschnitt der Wissenschaft zeigen, die für die Antiinfektivaentwicklung angewendet wird. Dennoch ist der Aufsatz nicht notwendigerweise vollständig, denn einen umfassenden Überblick über ein so riesiges Feld zu geben, wäre eine schlicht aussichtslose Aufgabe.

Neue Entwicklungen bei den „klassischen“ Suchverfahren werden diskutiert, darunter die Anwendung moderner

genetischer Techniken bei der Durchmusterung bakterieller Naturstoffe und Beispiele für Synthesekampagnen der Medizinalchemie, die den bekannten Verbindungsklassen immer wieder neues Leben einhauchen. Wir werden anschließend mehr forschungsorientierte Ansätze vorstellen, darunter die Entwicklung von Hybridantibiotika und die mögliche Nutzung von Verteidigungspeptiden für therapeutische Eingriffe. Schließlich geben wir einen Überblick über das Potenzial von Quorum-Sensing-Hemmstoffen als virulenzverhindernde Substanzen und als alternativer Ansatz für die Entwicklung neuer Antibiotika. Insbesondere konzentrieren wir uns auf die Hemmung der Chinolon-Signalgebung bei *Pseudomonas aeruginosa* und die autoinduzierte Peptidsignalgebung in *Staphylococcus aureus*, also auf zwei klinisch relevante Pathogene, die oft in nosocomialen Infektionen auftreten.

## 2. Bakterielle Zielstrukturen und Resistenzmechanismen

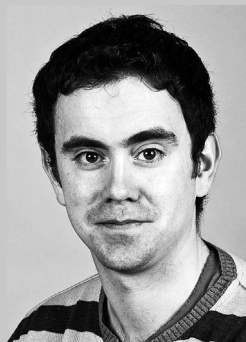
Antibiotika wirken gegen Bakterien, weil sie gegen lebensnotwendige Vorgänge gerichtet sind; sie hemmen die Zellwandsynthese, stören Struktur und Funktion der Zellmembran, verhindern die Synthese lebensnotwendiger Proteine oder beeinträchtigen die Synthese von RNA oder DNA (Tabelle 1).<sup>[9]</sup> Einige dieser Wirkstoffe, wie die Hemmstoffe der Zellwandsynthese, töten Bakterienzellen ab und heißen daher bakterizid. Andere Antibiotika dagegen, wie die Tetracycline, die die Proteinbiosynthese hemmen, werden bak-



Kieron O'Connell erhielt 2007 seinen M.Chem. in Chemie (mit einem Jahr Industrieaufenthalt) von der University of Reading. Er promovierte anschließend an der University of Cambridge unter Anleitung von Dr. David Spring. Dabei befasste er sich mit der Synthese diversitätsorientierter Bibliotheken für antibakterielles Screening und mit der Entwicklung von Methoden zum Aufbau neuer Gerüste. Seinen Dokortitel erhielt er 2011 und wechselte nach einem kurzen Postdoktorat in der Gruppe von Spring als Synthesechemiker zu Peakdale Molecular.



Hannah Sore arbeitete als Medizinalchemikerin bei Millenium Pharmaceuticals und Astex Therapeutics, wo sie niedermolekulare Hemmstoffe gegen Entzündung und onkologisch relevante biologische Zielstrukturen entwickelte. 2006 begann sie an der University of Cambridge unter Anleitung von Dr. David Spring mit ihrer Dissertation. Sie befasste sich insbesondere mit der Entwicklung neuer siliciumbasierter Vernetzungsverfahren. Nach Abschluss der Arbeit übernahm sie eine Position als Beraterin für Gesundheitswesen bei Frost & Sullivan. Gegenwärtig arbeitet sie als Postdoktorandin bei Spring an der Entwicklung von Antibiotika.



James Hodgkinson erhielt 2007 seinen B.Sc. mit Auszeichnung in Chemie von der Queens University Belfast. Für die Doktorarbeit wechselte er zur University of Cambridge; in dieser Zeit befasste er sich an der Schnittstelle zwischen Chemie und Biologie auf dem Feld des Quorum Sensing unter Anleitung von Dr. David Spring und Dr. Martin Welch. Nach Abschluss der Arbeit 2011 erhielt er ein Junior Research Fellowship am Trinity College Cambridge.



Martin Welch studierte Biochemie an der Oxford University. 1989 begann er mit seiner Dissertation am Weizmann Institute of Science. 1994 erhielt er ein Langzeitstipendium der EMBO und ging nach Toulouse, wo er die Struktur eines der bakteriellen Chemotaxisproteine aufklärte. 1997 kehrte er nach Großbritannien zurück, wo er sich mit Virulenz von Bakterien und dem Quorum Sensing befasste. Nach einem kurzen Aufenthalt als Forschungsstipendiat der RSC ging er als Dozent nach Cambridge. Sein Ziel ist es, den Einfluss der Lebensweise von Bakterien und ihrer Wechselwirkung mit der Umgebung auf die mikrobielle Physiologie zu verstehen.

terioistisch genannt, weil sie nur das Wachstum der Bakterien hemmen. Einige Antibiotika sind nur gegen ein enges Spektrum von Bakterien gerichtet; so wirken die Glycopeptide nur gegen Gram-positive Organismen, während andere Antibiotika wie die  $\beta$ -Lactame gegen Prozesse gerichtet sind, die den Mikroorganismen gemeinsam sind, und deshalb Breitbandantibiotika genannt werden.<sup>[9]</sup>

Bakterien haben eine Reihe von Schutzmechanismen entwickelt, um antibakterielle Verbindungen zu deaktivieren, zu entfernen oder um auf andere Weise die Toxizität von Antibiotika zu umgehen; so sind die aktuellen multiresistenten Erreger entstanden.<sup>[9b]</sup> Dieses Phänomen wird als erworbene Resistenz bezeichnet, d. h., die Bakterien haben eine Resistenz gegen ein antibakterielles Mittel entwickelt, gegen das sie vorher empfindlich waren. Bakterielle Resistenz kann grundsätzlich als fortgesetztes Wachstum in Gegenwart cytotoxischer Konzentrationen von Antibiotika definiert werden.<sup>[10]</sup> In der Klinik spricht man von einem resistenten Organismus, wenn eine Behandlung mit dem entsprechenden Wirkstoff bei der in vivo verabreichten Konzentration scheitert.<sup>[10]</sup> Begrenzender Faktor ist daher oft die Bioverfügbarkeit des Therapeutikums. In Abbildung 1 ist die ungefähre zeitliche Abfolge der Einführung einiger bedeutender Antibiotika und des nachfolgenden Auftauchens klinisch relevanter Resistenzen zusammengestellt.

Die genetische Resistenz kann auf zwei mögliche Arten entstehen, entweder als Folge einer chromosomalen Mutation oder, häufiger, durch die Übertragung eines Resistenzgens von einem anderen Bakterium durch mobile Plasmide oder



George Salmond studierte Mikrobiologie in Strathclyde und Warwick. Seine Doktorarbeit fasste er über Wechselwirkungen zwischen Bakteriophagen und Bakterien ab. Er ist gegenwärtig Professor für Molekulare Mikrobiologie und Leiter des Departments of Biochemistry, University of Cambridge und Angehöriger des Wolfson College, Cambridge. Vor seinem Wechsel nach Cambridge 1996 war er Professor für Mikrobiologie an der University of Warwick. Er interessiert sich für verschiedene Gebiete der molekularen Mikrobiologie, darunter Quorum Sensing,

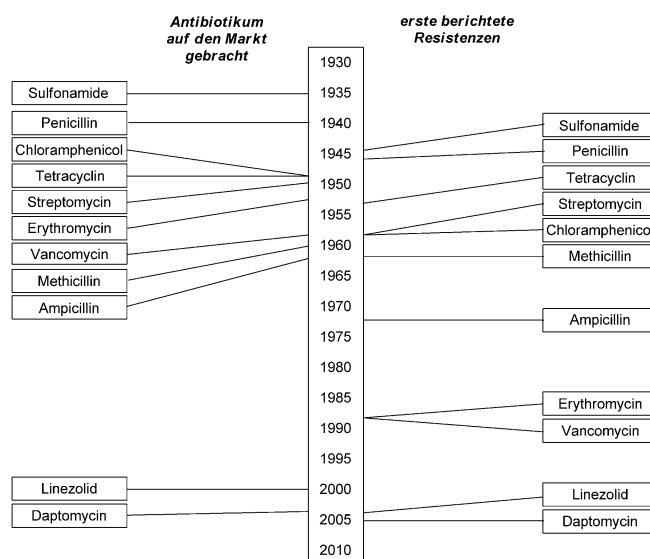
Pathogenese, Proteinsekretion sowie Antibiotika und andere bioaktive Sekundärmetaboliten.



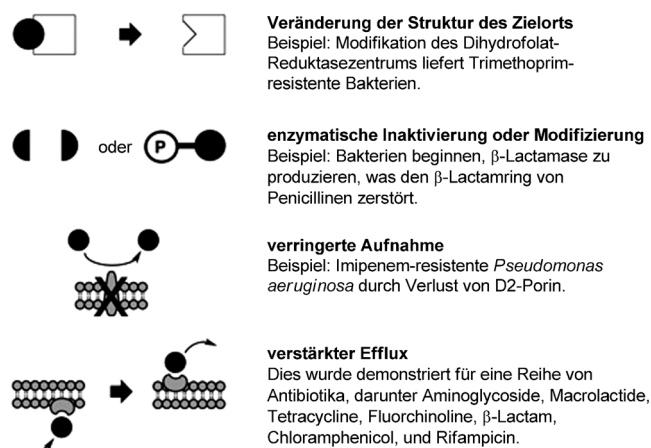
David Spring ist gegenwärtig EPSRC Established Career Fellow am University of Cambridge Chemistry Department. Vorher war er zweieinhalb Jahre als Wellcome Trust Postdoctoral Fellow und Fulbright Scholar an der Harvard University bei Prof. Stuart L. Schreiber. Für seine Arbeit über die postulierte Biosynthese der Manzaminalkaloide an der Oxford University unter Anleitung von Prof. Sir Jack E. Baldwin FRS erhielt er den D.Phil. Die aktuellen Forschungsarbeiten drehen sich um diversitätsorientierte Synthese und den Einsatz niedermolekularer Verbindungen, um biologische Prozesse zu untersuchen.

**Tabelle 1:** Antibiotikaklassen und ihre Wirkmechanismen.

Antibiotikaklassen	Wirkmechanismus
Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme, Monobactame, Glycopeptide, Polypeptide	<b>Zellwandaufbau</b> Hemmung der Peptidoglycansynthese oder der Bildung der Vernetzungen; Folge ist osmotische Lyse
Lipopeptide, Polypeptide	<b>Zellmembranzerstörung</b> Änderungen von Struktur und Funktion der Zellmembran verursachen Undichtigkeiten der Membran
Aminoglycoside, Tetracycline	<b>Hemmung der Proteinsynthese</b> Bindung an die ribosomale 30S-Untereinheit verhindert die Initiation der Translation und Bindung der tRNA
Macrolide, Oxazolidinone, Streptogramine, Phenicol	<b>Hemmung der Proteinsynthese</b> Bindung an die ribosomale 50S-Untereinheit stört die Translokations- und Peptidyltransferaseaktivität
Rifampin	<b>Hemmung der RNA-Synthese</b> verhindert die Synthese von mRNA durch Bindung an die DNA-gerichtete RNA-Polymerase
Chinolone	<b>Hemmung der DNA-Synthese</b> verhindert die DNA-Replikation durch Bindung an Topoisomerase IV oder DNA-Gyrase
Trimethoprim	<b>Hemmung des Folsäurestoffwechsels</b> verhindert die Synthese der Nucleotidbasen durch Blockierung der Tetrahydrofolatsynthese
Sulfonamide	<b>Hemmung des Folsäurestoffwechsels</b> verhindert die Synthese der Nucleinsäuren durch Blockierung der Folatsynthese



**Abbildung 1.** Zeiten zwischen der Einführung eines Antibiotikums und dem Auftauchen klinisch relevanter Resistenz.



**Abbildung 2.** Genetische Resistenzmechanismen, die von Bakterien entwickelt werden.

Transposonen.<sup>[9b,11]</sup> Dieser horizontale Gentransfer zwischen Bakterienpopulationen ist der wichtigste Grund für die Ausbreitung von Resistenzen. Die genetischen Resistenzmechanismen umfassen (Abbildung 2): die Modifikation oder Überexpression der Zielstruktur,<sup>[12]</sup> die Kontrolle der intrazellulären Antibiotikakonzentrationen (entweder durch Expression von Effluxpumpen oder durch Mechanismen, die den Einstrom reduzieren)<sup>[13]</sup> und die Expression von Enzymen, die die Antibiotika inaktivieren.<sup>[14]</sup> Diese beeindruckende Auswahl von Schutzmechanismen, zusammen mit unzureichenden Investitionen in Antiinfektiva-Forschung wurde als „perfekter Sturm“ bakterieller Resistenzen bezeichnet.<sup>[15]</sup>

Wir neigen dazu, Resistenzen für eine relativ moderne Entwicklung zu halten, entstanden durch den Selektionsdruck, der durch den klinischen Einsatz von Antibiotika während der letzten 70 Jahre ausgeübt wurde. Dies ist jedoch ein falscher Eindruck, denn es gibt Hinweise darauf, dass es Resistenzmechanismen in Bakterien schon viele Jahre vor der klinischen Anwendung von Antibiotika als Therapeutika gab.<sup>[10]</sup>

Eine aktuelle Untersuchung wies in einer Metagenomanalyse 30000 Jahre alter DNA aus Permafrostsedimenten der Beringsee Gene nach, die für Resistenzen gegen  $\beta$ -Lactame, Tetracycline und Glycopeptidantibiotika kodierten.<sup>[16]</sup> Dies belegt zweifelsfrei, dass diese Resistenzmechanismen mindestens 30000 Jahre alt sind, höchstwahrscheinlich aber noch deutlich älter. Man schätzt das Alter von Bakterien auf über 3,8 Milliarden Jahre, und anhand der genetischen Divergenz von Antibiotika-Genclustern hält man Antibiotika-Produzenten für mindestens mehrere hundert Millionen Jahre alt.<sup>[17]</sup> Da Antibiotika-Produzenten gleichzeitig als Selbstschutz Resistenzmechanismen entwickeln mussten, wenn sie selbst die Zielstruktur für das gebildete Antibiotikum besaßen, ist die Annahme vernünftig, dass Resistenzmechanismen bereits ebenso lange existieren. Die Fähigkeit von Bakterien, die Resistenzgene horizontal innerhalb von Populationen zu übertragen, gekoppelt mit dem Selektionsdruck durch klinischen Antibiotikaeinsatz, führte in den letzten Jahren zum Auftauchen multiresistenter Pathogene.

Es ist daher ein unglücklicher Rückschlag beim Einsatz von Naturstoffen als Antibiotika, dass sich nicht nur die Produktion dieser bioaktiven Verbindungen über die Jahrtausende entwickelt hat, wobei die Aktivität kontinuierlich optimiert wurde, sondern dass auch die gleiche Zeit zur Verfügung stand, die entsprechenden Resistenzen zu entwickeln. Auf den ersten Blick sollte man meinen, dass zukünftige Antibiotikasuche sich auf nichtnatürliche Verbindungen konzentrieren sollte. Bakterien haben sich aber als ebenso lernfähig erwiesen, Resistenzen gegen rein synthetische Verbindungen wie Sulfonamide oder Linezolid zu entwickeln. Tatsächlich sind klinisch signifikante Resistenzen gegen jedes Antibiotikum aufgetaucht, das je eingeführt wurde, manchmal schon wenige Jahre nach dem ersten Einsatz.<sup>[18]</sup>

Die Herstellung neuer Antibiotika allein reicht nicht aus, um die Multiresistenzen zu bekämpfen. Es muss mehr geschehen, um das Verhalten und den Einsatz von Antibiotika zu verändern, um Resistenzen gegen existierende Mittel zu kontrollieren oder gar zu reduzieren. Der Resistenzgrad Gram-negativer Pathogene nahm 2011 in ganz Europa nach dem jährlichen Überwachungsreport des European Centre for Disease Prevention and Control zu.<sup>[19]</sup> Demgegenüber blieb die Resistenz Gram-positiver Pathogene stabil oder nahm in einigen europäischen Ländern sogar ab. Bei den überwachten Pathogenen gibt es typischerweise ein Nord-Süd-Gefälle mit niedrigerem Resistenzgrad in nordeuropäischen als in südeuropäischen Ländern.<sup>[19]</sup> Die Unterschiede sind ein Ergebnis der Politik, die im Norden entwickelt und angewendet wurde, wie kluger Einsatz von Antibiotika in der Klinik (beispielsweise nicht immer bei Virusinfektionen Antibiotika zu verschreiben) und in der Landwirtschaft und umfassende Maßnahmen der Infektionskontrolle.<sup>[19]</sup>

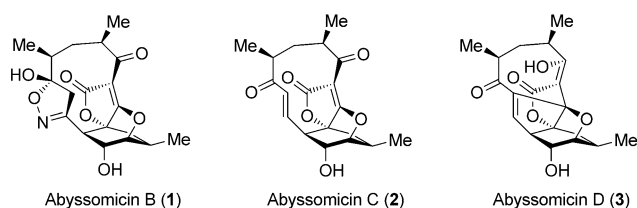
Es ist klar, dass es keine einzelne Maßnahme geben kann, um der Antibiotikaresistenzen Herr zu werden, und dass kein Antibiotikum für immer wirksam bleiben wird. Allerdings wird sich alle Forschung, die zur Entdeckung neuer Antibiotika oder zur Aufklärung von Resistenzmechanismen führt (und wie man sie überwindet), in einer Zukunft als entscheidend erweisen, in der ein ganzes Spektrum weitverbreiteter, multiresistenter Bakterien droht, die nicht effizient bekämpft werden können. Daher sind neue Bemühungen in der Infektionsforschung dringend geboten.

### 3. Neue Antibiotika aus Naturstoffen

Historisch gesehen war das erfolgreichste Mittel auf der Suche nach neuen Antibiotika das Durchmustern von Naturstoffen aus mikrobiellen Quellen. Zwar wurden viele der am einfachsten zugänglichen Verbindungen entdeckt, allerdings hat dieser Ansatz noch immer seinen Wert, wie man an den fortdauernden Forschungen auf diesem Gebiet sehen kann.<sup>[20]</sup> Die gegenwärtige Auffassung ist, dass bislang nur ein kleiner Bruchteil des möglicherweise relevanten chemischen Raums für Naturstoffe erforscht wurde.

### 3.1. Eintauchen in neue Tiefen, um die nächste Generation von Naturstoffen hervorzubringen

Der größte Teil der klinisch verwendeten Antibiotika aus Naturstoffen wurde von Actinomyceten aus dem Erdboden gewonnen. Dies zeigt eine historische Hinwendung zu dieser Klasse leicht isolierbarer und kultivierbarer Bakterien. Folge dieser Konzentration ist, dass ein nennenswerter Anteil der mikrobiellen Flora, wie den, den man in „unkonventionellen“ ökologischen Nischen findet, noch nicht systematisch auf die Produktion potenziell nutzbarer antibakterieller Verbindungen untersucht wurde. Eine Untergruppe ist besonders aussichtsreich für die Produktion bioaktiver Substanzen, nämlich die der marinen Bakterien. 2004 isolierten Süssmuth und Mitarbeiter die Abyssomicine (Abbildung 3), eine interes-



**Abbildung 3.** Die Abyssomicine, eine neue Klasse antibiotisch wirksamer Naturstoffe aus Tiefseesedimenten. Wissenschaftler erforschen gegenwärtig weniger zugängliche Regionen des Globus auf der Suche nach der nächsten Generation von antibiotischen Naturstoffen.

sante neue Antibiotikaklasse aus einem Actinomyceten, der in Sedimentproben aus der Tiefsee gefunden wurde.<sup>[21]</sup> Abyssomicin C (**2**) zeigt vielversprechende Aktivität gegen Gram-positive Bakterien wie methicillin- und Vancomycin-resistente Stämme von *Staphylococcus aureus* mit einer MIC<sub>50</sub> (MIC = minimale Hemmkonzentration) von 4 µg mL<sup>-1</sup> bzw. 13 µg mL<sup>-1</sup>.<sup>[21]</sup> Es hat auch einen bisher unbekannten Wirkmechanismus. Abyssomicin C verhindert die Umwandlung von Chorisminsäure in *p*-Aminobenzoessäure (*p*ABA), eine Vorstufe in der Tetrahydrofolat-Biosynthese. Die Hemmung der *p*ABA-Biosynthese ist ein vielversprechendes Ziel für Antibiotika, weil es sich in vielen Mikroorganismen, nicht aber im Menschen findet.<sup>[22]</sup>

### 3.2. Die „Unkultivierten“ kultivieren

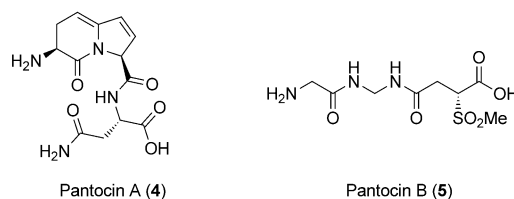
Selbst, wenn die Bemühungen auf die leicht zugänglichen Bodenbakterien beschränkt bleiben, schätzt man, dass die Zahl der erfolgreich kultivierten und überprüften Arten weniger als ein Prozent der Gesamtpopulation ausmacht.<sup>[23]</sup> Dies liegt daran, dass viele Mikroorganismen unter Standard-Laborbedingungen nicht kultivierbar sind und daher historisch gesehen für eine Untersuchung unzugänglich waren.<sup>[24]</sup> Die Existenz dieser „unkultivierten“ Bakterien ist in der Wissenschaftsgemeinde seit über einem Jahrhundert anerkannt. Die erhebliche Diskrepanz zwischen der mikroskopisch bestimmten Gesamtzellzahl und der in der Petrischale gezählten Lebendkeimzahl ist als „Great Plate Count Anomaly“ bekanntgeworden.<sup>[25]</sup> Offensichtlich hat diese An-

omalie die Auswertung der Bakterienpopulation bezüglich ihrer Antibiotikaproduktion stark eingeschränkt. Mit modernen biologischen und genetischen Techniken lässt sich diese Schwierigkeit umgehen, sodass es letztlich vielleicht möglich sein wird, das gesamte mikrobielle Genom zu durchmustern.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, dieses Problem anzugehen. Eine davon ist, die Kulturbedingungen für noch nicht kultivierte Bakterien mit unkonventionellen Techniken weiterzuentwickeln. Im einfachsten Falle kann dies Änderungen bei Inkubationszeit, Wachstumstemperatur oder Medienzusammensetzung bedeuten. Aber auch ausgefeiltere Verfahren, mit denen die natürliche Umgebung der Bakterien nachgebildet werden soll, werden untersucht.<sup>[26]</sup> Mit einem solchen Verfahren, den Diffusionskammern für die Inkubation, wurden von Novobiotic Pharmaceuticals verschiedene neue Antibiotika entdeckt.<sup>[27]</sup> Diese Diffusionskammern sind hilfreich, weil das Wachstum vieler Bakterienstämme von Wachstumsfaktoren abhängt, die von anderen Mikroorganismen der Umgebung gebildet werden. Ermöglicht man die Diffusion dieser Wachstumsfaktoren in die Kammern, können sie die molekulare Umgebung einer Population aus vielen Arten nachahmen, während ein einzelner Stamm isoliert in der Kammer wächst.

Ein anderer Ansatz mit enormem Potenzial ist die heterologe Expression der Synthesegene von Antibiotika in einfach kultivierbaren Wirtorganismen.<sup>[28]</sup> Für den Erfolg dieser Strategie kann es notwendig sein, dass die Biosynthesegene und die intrinsischen Resistenzgene auf benachbarten DNA-Bereichen liegen. Glücklicherweise kommt diese Anordnung von Biosynthese- und Resistenzgenen bei antibiotischen Naturstoffen oft vor. Weitere Schwierigkeiten können durch Unterschiede im Codongebrauch zwischen Wirt und Donororganismus entstehen (was Probleme bei der Genexpression nach sich zieht)<sup>[29]</sup> oder wenn Biosyntheseproteine zur Aktivierung posttranslational modifiziert werden müssen, wie man dies bei einigen Polyketid- und nichtribosomalen Peptidsynthesen findet.<sup>[30]</sup>

Trotz dieser Schwierigkeiten gibt es Beispiele für die erfolgreiche Expression von Wirkstoffkandidaten in einem genetisch veränderten Wirt, so die Expression und nachfolgende Identifizierung der Pantocin-Antibiotika (Abbildung 4).



**Abbildung 4.** Pantocin A und B; eine neue Klasse antibakterieller Naturstoffe aus einem genetisch veränderten Wirt.

Pantocin A und Pantocin B hemmen die Histidin- bzw. Argininbiosynthese. Sie werden ursprünglich von *Pantoea agglomerans* gebildet. Es ist seit den 1980er Jahren bekannt, dass diese Art Antibiotika produziert, allerdings konnten die Verbindungen erst eindeutig identifiziert werden, nachdem



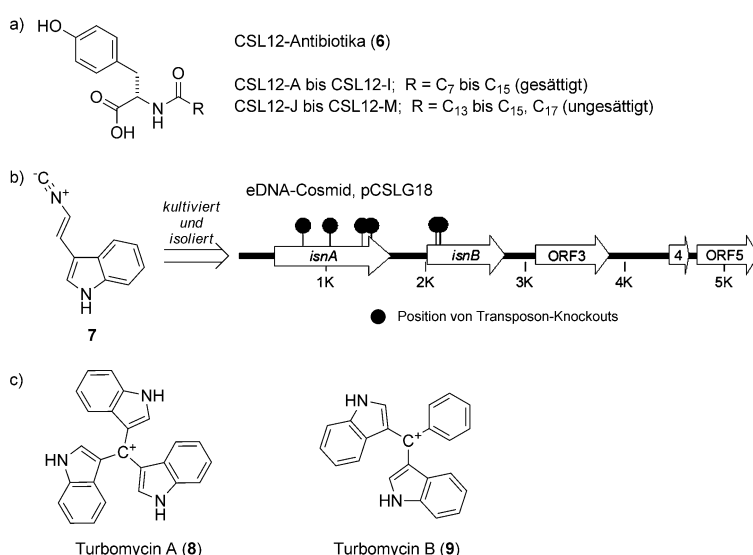
die Biosynthesegene in *Escherichia coli* kloniert und exprimiert worden waren.<sup>[31]</sup>

### 3.3. Metagenomik

Heterologe Techniken sind nicht auf die Expression der DNA aus Einzelkolonien spezifischer Bakterien beschränkt; man kann mit ihrer Hilfe auch DNA aus Umweltproben (manchmal auch eDNA für „environmental DNA“ genannt) auf die Produktion von Naturstoffen untersuchen.<sup>[32]</sup> Die direkte Extraktion und Analyse von DNA aus der gesamten mikrobiellen Population einer Umweltprobe wird Metagenomik genannt.<sup>[33]</sup> Der wichtigste Vorteil des metagenomischen Ansatzes ist, dass man damit die Kultivierung von Bakterienstämmen im Labor zum Test auf Antibiotikaproduktion vermeidet.

Metagenomik umfasst die Extraktion der DNA aus allen Mikroorganismen einer Umweltprobe, deren nachfolgende Reinigung und Insertion in Vektoren wie Plasmide, Cosmide oder BACs (bacterial artificial chromosomes) und anschließend die Vermehrung der DNA in Wirten wie *E. coli*.<sup>[33,34]</sup> Die so erhaltene komplexe DNA-Bibliothek kann funktionell auf die Produktion neuer Antibiotika oder anderer biologisch interessanter Sekundärmetabolite durchmustert werden.<sup>[33,34]</sup> Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die Entdeckung neuer Antibiotika untrennbar mit der Entdeckung der jeweiligen Biosynthesegene gekoppelt ist.

Es wurden bereits mehrere Beispiele für die Entdeckung neuer Antibiotika mit Metagenomik veröffentlicht, und wahrscheinlich werden weitere folgen, denn das Gebiet reift, und die Verfahren werden immer ausgefeilter. Das erste neu gefundene Antibiotikum aus einer heterolog exprimierten Umwelt-DNA wurde im Jahr 2000 publiziert, als Brady und Clardy von der Entdeckung der langkettigen gesättigten und ungesättigten *N*-Acyl-L-Tyrosine CSL12-A bis -M berichteten (**6**; Abbildung 5a).<sup>[35]</sup> Diese 13 Verbindungen wurden bei der Durchmusterung von etwa 700 000 Klonen aus einer Bodenprobe gefunden; sie erwiesen sich als aktiv gegen einen antibiotikaresistenten Stamm des Gram-positiven Bakteriums *Bacillus subtilis*. Das Ausmaß der antibakteriellen Aktivität hängt von der Kettenlänge ab, wobei die 13–16 C-Atome langen, gesättigten und ungesättigten Acetylderivate am aktivsten sind. Fünf Jahre später entdeckten die gleichen Autoren die Isocyanid-Indolverbindung **7**, die ebenfalls gegen *B. subtilis* aktiv ist (Abbildung 5b).<sup>[36]</sup> **7** stammte von dem eDNA-Cosmid pCSLG18, das die Biosynthesegene *isnA/B* trägt.<sup>[36]</sup> Ein anderes Beispiel ist die Entdeckung der Antibiotika Turbomycin A und B (**8** und **9**; Abbildung 5c) durch Handelsman und Mitarbeiter.<sup>[37]</sup> Diese kationischen Naturstoffe sind gegen eine Reihe Gram-positiver und -negativer Bakterien, darunter *Erwinia herbicola*, *Streptococcus pyogenes* und *Staphylococcus aureus*, aktiv. Auffällig ist, dass Turbomycin A zuvor schon aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert wurde, nie jedoch als bakterieller Metabolit.



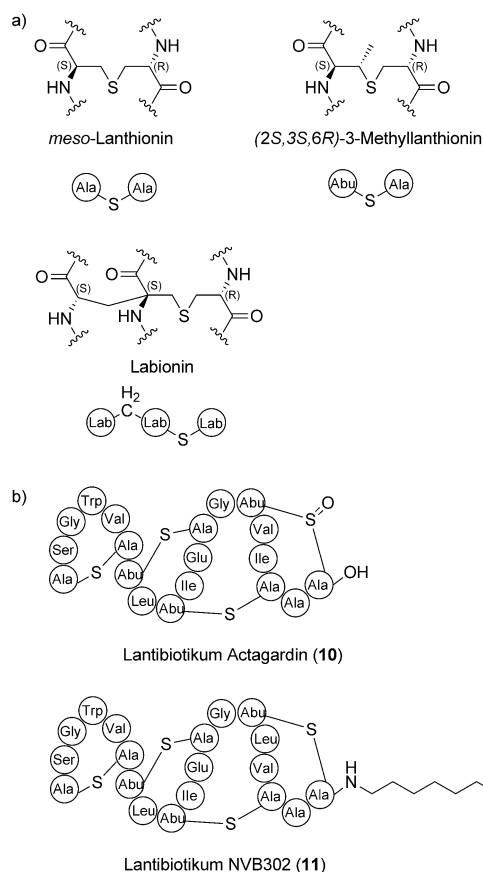
**Abbildung 5.** Antibiotika, die mit metagenomischen Suchverfahren entdeckt wurden. a) CSL12-G bis CSL12-I und CSL12-J bis CSL12-L zeigen starke Wirksamkeit gegen *B. subtilis*. b) **7** ist gegen *B. subtilis* wirksam. c) Der MIC<sub>50</sub>-Wert von Turbomycin A beträgt 6.2 µg mL<sup>-1</sup> gegen *E. herbicola*, *B. subtilis*, *S. aureus* und *S. pyogenes* und 12.5 µg mL<sup>-1</sup> gegen *S. enterica* ssp. 1 Serovar Typhimurium.

Turbomycin B ist ein neuer Naturstoff.<sup>[38]</sup> Diese frühen Befunde zeigen, dass Metagenomik ein vielversprechendes Feld für die Entdeckung neuer Antibiotika sein kann.

Es ist wahrscheinlich, dass bei kultivierungsabhängigen und -unabhängigen Verfahren zur Entdeckung neuer Antibiotika noch wichtige Fortschritte gemacht werden können und dass viele biologisch interessante Metaboliten noch unentdeckt sind. Außer zur Entdeckung neuer Antibiotika kann man mithilfe der Metagenomik auch Informationen über bakterielle Resistenzmechanismen erhalten.<sup>[39]</sup> Aus diesen Gründen wird die Suche nach Antibiotika aus Naturstoffen auf absehbare Zeit ein wichtiges Forschungsgebiet bleiben.

### 3.4. Das Aufkommen der Lantibiotika

Lantibiotika als Unterklasse der Bacteriocine sind peptidische Toxine, die von Bakterien synthetisiert werden, um das Wachstum nahe verwandter Bakterien zu hemmen.<sup>[40]</sup> Sie sind ribosomal synthetisierte Antibiotika mit einem hohen Grad an posttranslationaler Modifikation, durch die es zur Bildung mehrfacher makrocyclischer Ringe innerhalb der dreidimensionalen Struktur kommt. Die Makrocyclen werden aus der linearen Peptidsequenz durch die Bildung von Lanthionin-, Methyllanthionin- und/oder Labioninbrücken geschlossen. Dies geschieht typischerweise über Dehydratisierung und Cyclisierung an Cystein- und Serin-/Threoninresten (Abbildung 6a).<sup>[40c,41]</sup> Jung et al. berichteten als erste über die genetischen Grundlagen der Biosynthese von Epidermin.<sup>[42]</sup> Sie wiesen nach, dass das Strukturgen *epiA* für das antibiotisch wirkende Epidermin kodiert, ein ribosomal synthetisiertes Lantibiotikum mit vier über Sulfidbrücken geschlossenen makrocyclischen Ringen. Seitdem wurde eine



**Abbildung 6.** Strukturen von Lantibiotika. a) Gemeinsame Brückenstrukturen, die in den Lantibiotika posttranslational eingeführt werden, um die globuläre dreidimensionale Struktur zu bilden. b) Die strukturell ähnlichen Lantibiotika Actagardin (**10**) und NVB302 (**11**) zeigen deutliche antibakterielle Wirkung; NVB302 wird gegenwärtig klinisch in der Erstbehandlung von *C. difficile* erprobt.

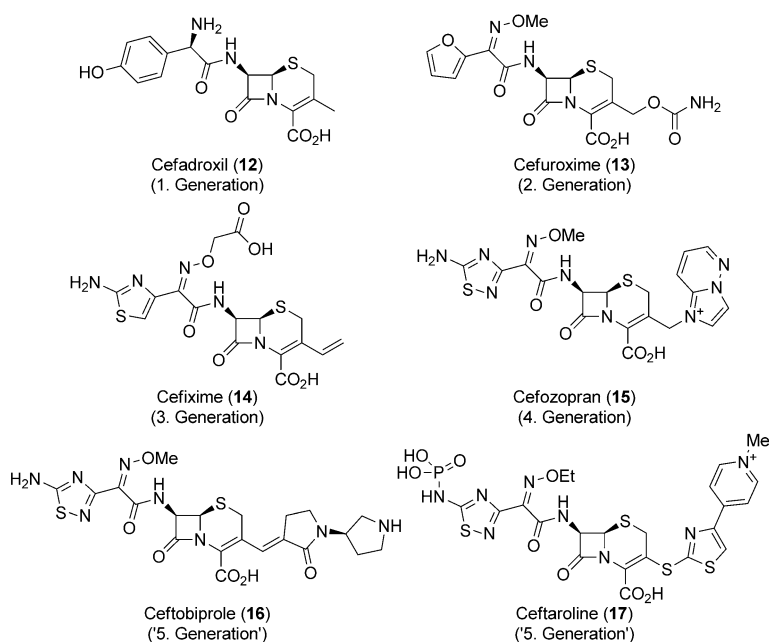
ganze Reihe neuer lantibiotischer Strukturen entdeckt, isoliert und publiziert. In neuerer Zeit waren dies Actagardin,<sup>[43]</sup> Desoxyactagardin B (DAB),<sup>[44]</sup> Entianin,<sup>[45]</sup> Curvopeptin,<sup>[46]</sup> Prochlorosine,<sup>[47]</sup> Catenuleptin,<sup>[41]</sup> Erythraeptin,<sup>[48]</sup> Avermipeptin,<sup>[48]</sup> Griseopeptin<sup>[48]</sup> und die Labyrinthopeptine.<sup>[49]</sup> Lantibiotika haben das Potenzial, in Zukunft eine neue Quelle antibakterieller Wirkstoffe zu werden. So weist Actagardin (**10**; Abbildung 6b) eine starke Aktivität gegen Gram-positive Bakterien wie *Clostridium difficile* auf: Es bindet an Lipid II und stört so die Zellbiosynthese.<sup>[43b]</sup> Das strukturell ähnliche Lantibiotikum NVB302 (**11**, Abbildung 6b), das von Novacta entdeckt wurde, durchläuft gegenwärtig die klinische Prüfung in der Phase 1 zur Behandlung von *Clostridium-difficile*-Infektionen.<sup>[43b,50]</sup>

#### 4. Die Modifizierung bestehender Verbindungsklassen

Ein erheblicher Anteil der Antiinfektiva-Forschung konzentriert sich gegenwärtig auf medizinalchemische Versuche, Aktivität oder Wirkprofil bekannter Antibiotikaklassen zu verbessern.<sup>[51]</sup> Diese Versuche können, obwohl viele der Verbindungsklassen schon über 50 Jahre im Einsatz sind, bei den richtigen Veränderungen noch immer wirksame Substanzen der nächsten Generation hervorbringen. Logische und systematische Strukturveränderungen können Wirkstärke und Aktivitätsprofil verbessern und bakterielle Resistenzmechanismen überwinden.

##### 4.1. Entwicklung von Cephalosporinen der nächsten Generation

Eine Klasse von Antibiotika, die intensiv medizinalchemisch bearbeitet wurde, sind die Cephalosporine aus der Klasse der  $\beta$ -Lactamantibiotika.  $\beta$ -Lactame hemmen die Transpeptidierung benachbarter Pentapeptide und verhindern so die Bildung von Verbindungen zwischen den Peptidoglycaneinheiten, die für die Zellwandbiosynthese essenziell sind.<sup>[52]</sup> Sie binden an die Enzyme (penicillinbindende Proteine, PBPs genannt), indem die  $\beta$ -Lactam-Amidbindung durch das nucleophile Serin im aktiven Zentrum des Enzyms acyliert wird. Das Acyl-Enzym ist stabil und verhindert damit die Bindung des natürlichen Substrats, des D-Ala-D-Ala-Abschnitts des Pentapeptids.<sup>[52]</sup> Das breite Wirkungsspektrum, die nachgewiesene Wirksamkeit und das günstige Sicherheitsprofil dieser Verbindungsklasse machen sie zu einer der am häufigsten verschriebenen Wirkstoffe. Es gibt inzwischen mindestens vier anerkannte Cephalosporin-Generationen (Abbildung 7), die eher anhand ihrer Wirksamkeit und Wirkprofile als ihrer strukturellen Unterschiede voneinander



**Abbildung 7.** Die verschiedenen Cephalosporin-Generationen.



abgegrenzt werden.<sup>[53]</sup> Die Existenz verschiedener Generationen könnte zu der Annahme verleiten, dass die frühesten zugelassenen Verbindungen inzwischen wertlos sind; dies ist jedoch nicht der Fall, Vertreter aller Klassen sind heute noch im klinischen Gebrauch.

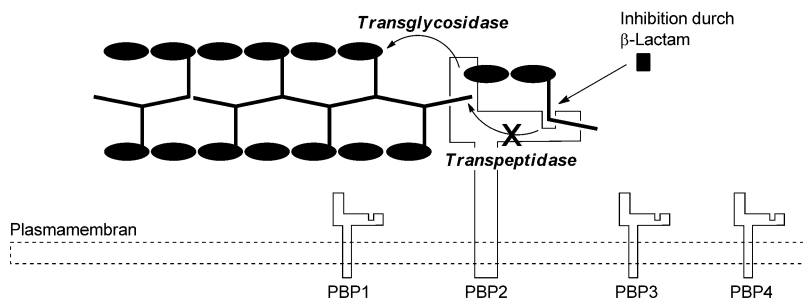
Cephalosporine der ersten Generation wirken gegen Gram-positive Kokken; Verbindungen der zweiten Generation sind zusätzlich gegen Gram-negative Bakterien aktiv. Verbindungen der dritten Generation haben eine geringere Aktivität gegen Gram-positive Bakterien, wirken aber stärker gegen Gram-negative. Cephalosporine der vierten Generation schließlich sind besser wirksam gegen Gram-positive und -negative Bakterien und sind außerdem gegen Stämme aktiv, die einige  $\beta$ -Lactamasen produzieren.

In neuerer Zeit wurden auch Cephalosporine gefunden, die gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus-aureus*-Stämme (MRSA) wirken und außerdem ein verbessertes Aktivitätsprofil gegen Gram-positive Bakterien aufweisen. Da sie aber keine wesentliche Verbesserung gegen Gram-negative Bakterien zeigen, gibt es unterschiedliche Meinungen darüber, ob sie eine neue Generation darstellen.<sup>[54]</sup> Dennoch werden die anti-MRSA-Verbindungen Ceftobiprol (**16**)<sup>[55]</sup> und Ceftarolin (**17**)<sup>[54,56]</sup> oft als Cephalosporine der fünften Generation bezeichnet.

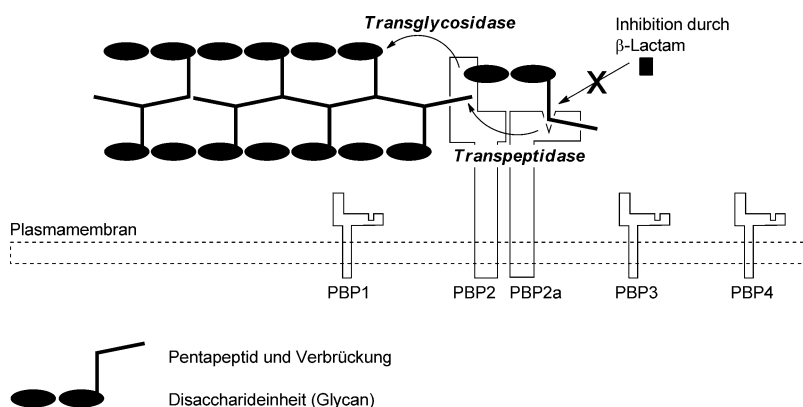
Wichtiger als die Gegenwart von  $\beta$ -Lactamasen für die Resistenz von MRSA gegen viele  $\beta$ -Lactamantibiotika ist wahrscheinlich das Vorkommen des penicillinbindenden Proteins 2a (PBP2a), das in Methicillin-empfindlichen Stämmen fehlt (Abbildung 8).<sup>[57]</sup> Es gibt verschiedene PBPs in *Staphylococcus aureus*, von denen die meisten für  $\beta$ -Lactame empfänglich sind; PBP2a allerdings hat nur eine sehr niedrige Affinität für  $\beta$ -Lactame und wird daher von den meisten Antibiotika dieser Klasse nicht beeinträchtigt. Folglich kann PBP2a auch dann, wenn die anderen PBPs effizient gehemmt werden, weiter die Zellwand-Biosynthese katalysieren und so ein hohes Maß an  $\beta$ -Lactamresistenz aufbauen.

Ceftobiprol ist ein Breitband-Antibiotikum und wirkt effizient bei Infektionen von Haut und Weichgewebe durch MRSA (und ist auch aktiv gegen *Streptococcus pneumoniae*). Die Verbindung ist sehr wirksam gegen MRSA mit einer MIC<sub>50</sub> von 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; verglichen damit hat Cefotaxim, ein ineffizientes Cephalosporin der dritten Generation, eine MIC<sub>50</sub> von > 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .<sup>[55b]</sup> Eine Monotherapie mit Ceftobiprol ist genauso wirksam gegen MRSA-Hautinfektionen wie eine Kombinationstherapie mit Vancomycin und Ceftazidim (einem Cephalosporin der dritten Generation).<sup>[58]</sup> Strynadka und Mitarbeitern gelang die Lösung einer Kristallstruktur aus Ceftobiprol gebunden an das aktive Zentrum von PBP2a, woraus sich Informationen über den Wirkme-

#### Methicillin-empfindliche Stämme



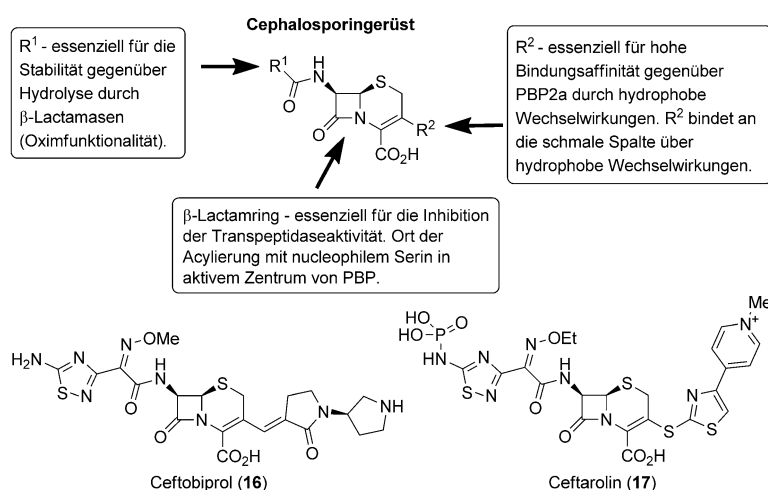
#### Methicillin-resistente Stämme



**Abbildung 8.** Die Biosynthese der bakteriellen Zellwand bei Methicillin-empfindlichen *Staphylococcus-aureus*-Stämmen (MSSA) und bei Methicillin-resistenten *Staphylococcus-aureus*-Stämmen (MRSA). Bei MSSA binden  $\beta$ -Lactamantibiotika an PBP2 und verhindern die Transpeptidierung des Pentapeptids an den Peptidoglycankomplex. Bei MRSA hat PBP2a ein abweichendes aktives Zentrum, das für  $\beta$ -Lactame weniger zugänglich ist und daher Resistenz gegen die Mehrzahl der  $\beta$ -Lactame verleiht.

chanismus von Ceftobiprol ableiten lassen.<sup>[59]</sup> Die Ausdehnung, die planare Form und der hydrophobe Charakter von R<sup>2</sup> sind die notwendigen Eigenschaften für eine effektive Bindung des Antibiotikums in der schmalen Spalte des aktiven Zentrums (Abbildung 9). Die Modifikation des aktiven Zentrums wird durch zusätzliche Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Bindungen zwischen Enzym und R<sup>2</sup> kompensiert, sodass der Komplex stabilisiert und nachfolgend acyliert wird. Die Wirkung von Ceftobiprol und Ceftarolin gegen MRSA kommt durch die gesteigerte Bindungsaffinität, die größere Acylierungsgeschwindigkeit und die langsamere Desacylierung von PBP2a zustande.<sup>[59,60]</sup>

Ceftarolin hat ein ähnliches Wirkprofil wie Ceftobiprol und wurde 2010 für die Behandlung akuter bakterieller Hautinfektionen und ansteckender bakterieller Pneumonie zugelassen. Ceftarolin ist gut wirksam gegen eine Reihe von Stämmen von *S. aureus*, darunter *S. aureus* 510 (VRS2), der gegen Methicillin und Vancomycin resistent ist und  $\beta$ -Lactamaseaktivität hat.<sup>[57b]</sup> Ceftarolin hat eine weit überlegene Aktivität gegen *S. aureus* 510 (VRS2) mit einer MIC von 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  verglichen mit anderen  $\beta$ -Lactamen mit MIC-Werten von 32 (Penicillin G), > 64 (Ceftriaxon) und > 64  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Cefotaxim). Der Mechanismus, nach dem Ceftarolin an PBP2a binden kann, wurde von Mobashery et al.



**Abbildung 9.** Die entscheidenden Strukturelemente der Cephalosporine für die Aktivität gegen Bakterien mit  $\beta$ -Lactamasen und PBP2a-Bindestellen.

untersucht.<sup>[61]</sup> Mit Röntgenstrukturanalyse fanden sie heraus, dass die Bindestelle von freiem PBP2a geschlossen ist und nur dann zugänglich wird, wenn das Enzym vorher allosterisch aktiviert wurde. Weitere Experimente deuteten darauf hin, dass Ceftarolin diese allosterische Aktivierung auslösen kann und daher durch den langgestreckten Substituenten  $R^2$  Zugang zu der Bindestelle erhält.<sup>[61]</sup>

traten zuerst in europäischen Krankenhäusern auf, haben sich seitdem allerdings weltweit ausgebreitet.<sup>[63]</sup> Die Resistenz von VRE kann horizontal übertragen worden sein, sodass inzwischen auch andere Vancomycin-resistente Pathogene aufgetaucht sind, darunter einige Staphylokokken.

Glycopeptide hemmen die Zellwandbiosynthese, allerdings über einen ungewöhnlichen Wirkmechanismus, der nicht die Bindung an eine enzymatisch aktive Zielstruktur und damit die Modulation ihrer Funktion umfasst. Stattdessen binden sie fest an die L-Lys-D-Ala-D-Ala-Reste am Ende der Peptidoglycanstränge und entziehen diese lebensnotwendigen Vorstufen damit dem Synthesegang. Durch die Bindung verhindert das Antibiotikum physisch die Transpeptidierung und Transglycosylierung und damit die Reifung der Zellwand; manchmal kommt es dadurch auch zur Zellyse. Dieser Wirkmechanismus

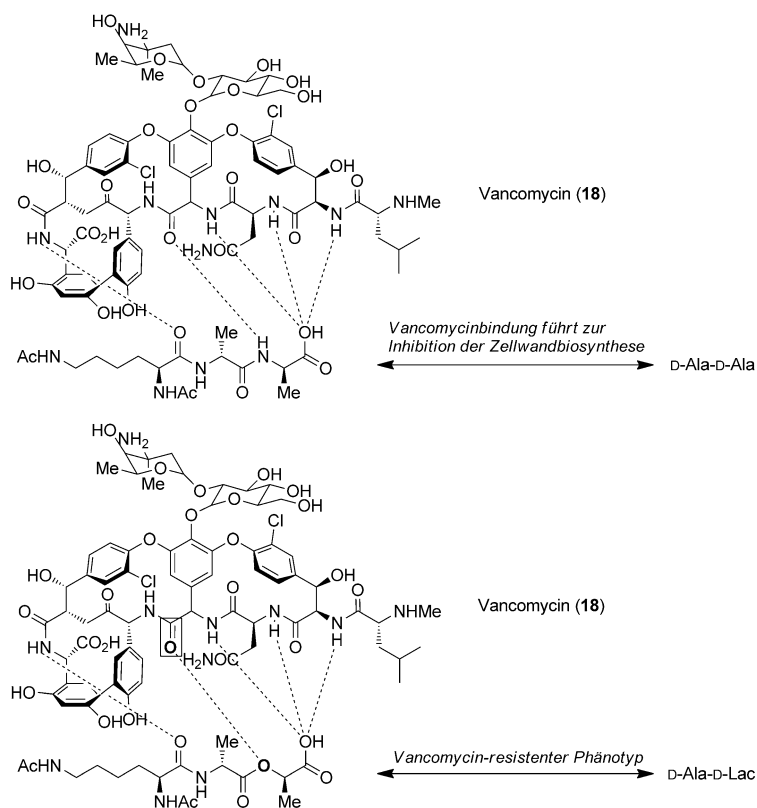
der Glycopeptide spielt sich an der Zelloberfläche ab und vermeidet einige übliche zelluläre Resistenzmechanismen wie Effluxpumpen und bakterielle Modifikation. Für Vancomycin wurden fünf spezifische Wasserstoffbrücken nachgewiesen, die an die L-Lys-D-Ala-D-Ala-Reste binden, wie in Abbildung 10 gezeigt.<sup>[64]</sup>

Die am häufigsten vorkommenden Resistenzphänotypen (VanA und VanB) entstehen durch die Substitution des ter-

#### 4.2. Die Überwindung der Vancomycinresistenz

Vancomycin (**18**; Abbildung 10) ist ein weiteres interessantes Anschauungsobjekt dafür, dass durch Einsatz der Medizinalchemie Aktivitäten verstärkt und Resistenzen überwunden werden können. Wissenschaftler von Eli Lilly entdeckten Vancomycin aus Mikroorganismen in einer Bodenprobe aus dem Dschungel von Borneo in den 1950er Jahren. Es war 1959 das erste Glycopeptid-Antibiotikum, das für die Klinik zugelassen wurde.<sup>[62]</sup> Seitdem haben sich Glycopeptide als sehr effizient für die parenterale Behandlung von Infektionen mit Gram-positiven Bakterien erwiesen. Sie sind gegenüber Gram-negativen Bakterien nicht aktiv, weil sie wegen ihrer Größe deren äußere Membran nicht überwinden können.

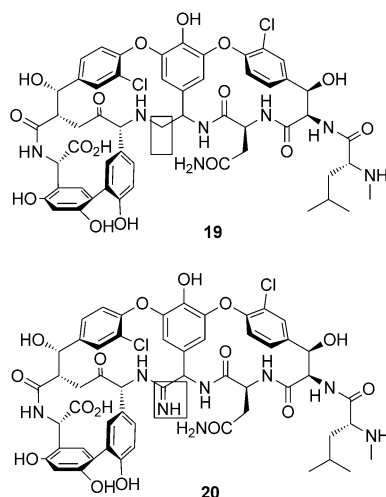
Wegen ihrer Toxizität und des Fehlens von Kreuzresistenzen mit anderen Antibiotika wurden sie als letztes Mittel bei Infektionen mit multiresistenten Keimen in Reserve gehalten. Eine Zeitlang entwickelte sich die Resistenz gegen Vancomycin nur langsam. Als jedoch Infektionen wie MRSA häufiger vorkamen, wurde auch Vancomycin verstärkt eingesetzt, und die Zahl der resistenten Stämme nahm zu. Eine massive Resistenz gegen Vancomycin wurde erstmals 1988 bekannt, etwa 30 Jahre nach dem ersten klinischen Einsatz. Die ersten Mikroorganismen, die Vancomycin-resistent waren, waren Enterokokken (VRE). Sie



**Abbildung 10.** Vancomycinresistenz, die durch die Substitution von D-Ala-D-Ala durch D-Ala-D-Lac entsteht.

minalen Alaninrestes der Peptidoglycanketten durch einen Milchsäurerest (D-Ala-D-Ala zu D-Ala-D-Lac).<sup>[65]</sup> Diese einzelne Substitution (NH zu O) entfernt eine Wasserstoffbrücke und ersetzt sie durch eine destabilisierende Wechselwirkung zwischen freien Elektronenpaaren, wodurch die Bindungsaffinität zwischen Antibiotikum und Ligand auf ein Tausendstel reduziert wird.<sup>[66]</sup>

Boger und Mitarbeiter haben viel Arbeit aufgewendet, um diese Wechselwirkungen aufzuklären und die antibakterielle Aktivität wiederherzustellen.<sup>[67]</sup> Mit einer beeindruckenden Strategie ausgehend von der De-novo-Synthese einer Serie von Vancomycin-Aglyconanaloga konnten sie die Auswirkungen kleiner Strukturänderungen auf die Bindetasche von Vancomycin ausloten. Sie konzentrierten sich auf Variationen der Carbonylgruppe an C14 in der Hoffnung, damit eine Verbindung mit einer vergleichbaren Aktivität gegen D-Ala-D-Ala- und D-Ala-D-Lac-Peptidoglycanstränge zu finden (Abbildung 11).



**Abbildung 11.** Analoga des Vancomycin-Aglycons, synthetisiert von Boger et al.

Zunächst entfernten sie das Carbonylsauerstoffatom; an dieser Stelle blieb nur die Methylengruppe zurück (**19**), sodass eine mögliche Wasserstoffbrücke zu D-Ala-D-Ala wegfiel, gleichzeitig aber auch die abstoßende Wechselwirkung zwischen den beiden freien Elektronenpaaren im Falle von D-Ala-D-Lac.<sup>[68]</sup> Dadurch nahm die Bindungsaffinität zu einem D-Ala-D-Lac-Modellliganden um das 40-Fache zu, während andererseits die Affinität zum entsprechenden D-Ala-D-Ala-Liganden auf ein Fünftel sank. Man erhielt also eine weitgehend ausgeglichene Bindungscharakteristik für beide Varianten. Dementsprechend lag auch die Wirkung gegenüber einem VanA-resistenten *Enterococcus-faecalis*-Stamm (VanA VRE BM4166) mit  $MIC_{50} = 31 \mu g mL^{-1}$  um den Faktor 40 höher als die von Vancomycin.

Beim Austausch der Amidfunktion gegen eine Amidin-Gruppe (**20**) nahm die Bindung zu beiden Liganden signifikant zu.<sup>[69]</sup> Die Affinität von **20** für D-Ala-D-Ala war 15-mal größer als die der Methylenverbindung **19** und nur etwa halb

so groß wie die Affinität des Vancomycin-Aglycons selbst, vermutlich, weil die Amidin-Gruppe als Wasserstoffbrückenakzeptor für die Amid-NH-Einheit des Liganden fungieren kann und so als Isooster der Amid-Gruppe von Vancomycin wirkt. Die Ergebnisse mit D-Ala-D-Lac waren noch eindrucksvoller: Mit **20** war die Bindungsaffinität vergleichbar mit jener des D-Ala-D-Ala-Liganden, entsprechend einer Zunahme um den Faktor 600 gegenüber der des Vancomycin-Aglycons und einer Verbesserung um mehr als das 10-Fache verglichen mit jener von **19**. Die Amidinverbindung zeigte auch eine sehr starke antimikrobielle Aktivität gegen BRE BM1466 mit einer  $MIC_{50}$  von  $0.31 \mu g mL^{-1}$ , die mit der Aktivität von Vancomycin und dem Vancomycin-Aglycon gegen empfindliche Stämme vergleichbar ist ( $MIC_{50} = 0.3\text{--}2 \mu g mL^{-1}$ ).

Statt sich auf zeitraubende und mühsame Totalsynthesen für die Herstellung von Analoga zu verlassen, stützen sich die meisten medizinisch-chemischen Kampagnen rund um antimikrobielle Leitstrukturen auf Fermentationstechniken, um Naturstoffvarianten zu erhalten, statt die Grundstruktur synthetisch zu modifizieren. Die Verbindungen, die mit solchen Verfahren hergestellt werden, variieren mit höherer Wahrscheinlichkeit in peripheren Strukturelementen als im Kerngerüst, wie dies auch bei Bogers Arbeit der Fall war.

Semisynthetische medizinisch-chemische Arbeiten an den Glycopeptiden dienten meist dazu, Strukturelemente einzuführen, die entweder eine Dimerisierung begünstigen oder die Affinität für die bakterielle Zellwand verbessern (Abbildung 12). Die Dimerisierung von Vancomycin verbessert die Ligandenbindung, indem sie das Peptidrückgrat versteift und so die Wasserstoffbrückenbildung verstärkt.<sup>[70]</sup> Hydrophobe Seitenketten wie die aus dem natürlich vorkommenden Glycopeptid Teicoplanin (**21**) wirken als Anker des Antibiotikums in der Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran, bringen es in die Nähe zu seiner Zielstruktur im Peptidoglycan und begünstigen so die bindenden Wechselwirkungen. Dimerisierung und Verankerung in der Zellmembran steigern beide erheblich die Aktivität.<sup>[71]</sup>

Drei semisynthetische Glycopeptide sind bis hin zu klinischen Studien gelangt: Oritavancin (**22**), Dalbavancin (**23**) und Telavancin (**24**; Abbildung 12). Oritavancin ist das 4-Chlorbiphenylmethyl-Analogon von Chloreremomycin, einem Glycopeptid von *Amycolatopsis orientalis*. Chloreremomycin ist 4- bis 8-mal aktiver als Vancomycin gegenüber empfindlichen Stämmen, ist gegenüber Vancomycin-resistenten Stämmen aber praktisch inaktiv.<sup>[72]</sup> Durch die Ergänzung des hydrophoben 4-Chlorbiphenylmethyl-Substituenten von Oritavancin kommt es jedoch zu einem klinisch relevanten Anstieg der Aktivität gegen Vancomycin-resistente Enterokokken.<sup>[73]</sup> Der zusätzliche Substituent hat einen tiefgreifenden Effekt auf die Fähigkeit von Oritavancin, Dimere zu bilden. Die Dimerisierungskonstante ist 100-mal größer als die von Chloreremomycin und vier Größenordnungen höher als die von Vancomycin.<sup>[74]</sup> Der Biphenyl-Substituent verbessert auch die Membranverankerung von Oritavancin. In dieser Kombination scheinen die beiden Effekte (die beide zu einer intramolekularen Ligandenbindung führen) den Verlust an Bindungsstärke überzukompensieren, der mit der Substitution von D-Ala-D-Ala durch D-Ala-D-Lac einhergeht, und

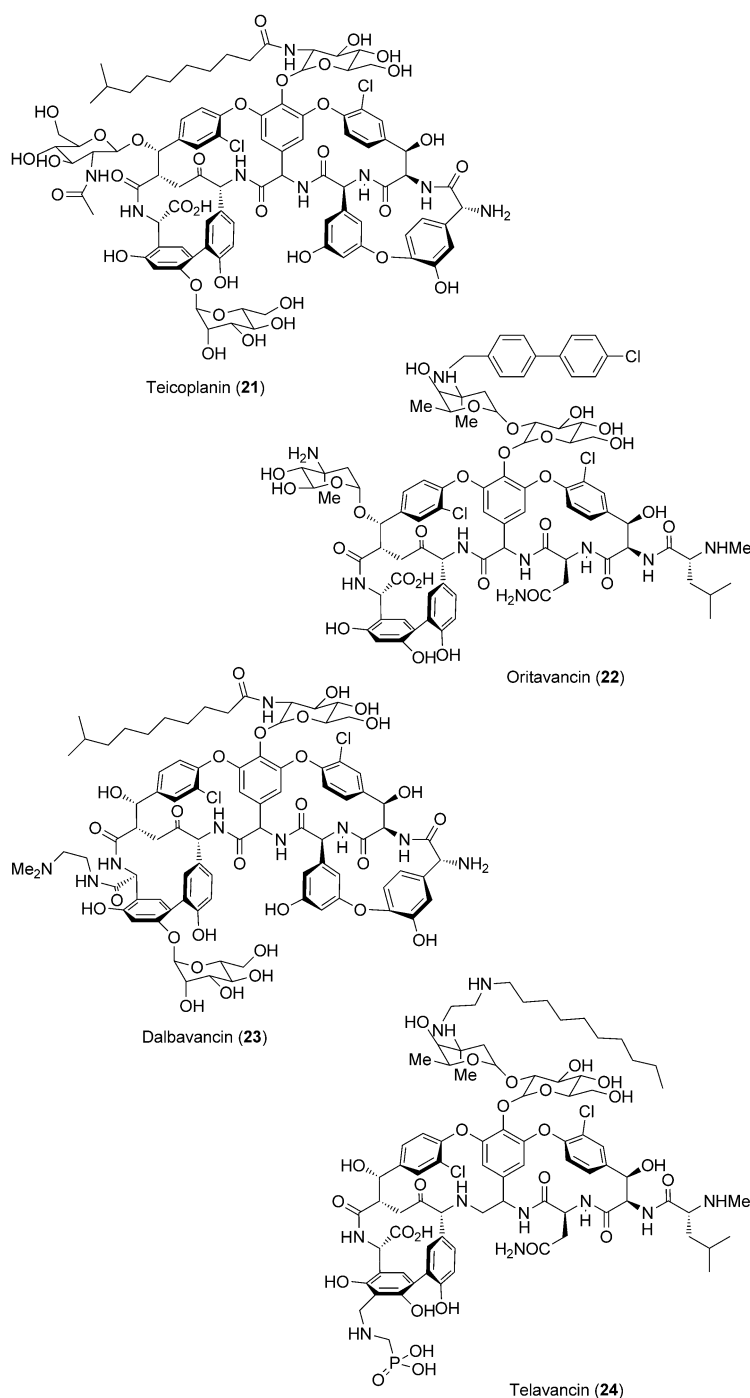


Abbildung 12. Semisynthetische Glycopeptide.

als Konsequenz eine hilfreiche Aktivität gegen VanA-resistente Organismen zu etablieren.

Dalbavancin (**23**) ist ein nahes Analogon von Teicoplanin und hat ein ähnliches Aktivitätsprofil. Es ist wirksam gegen viele Gram-positive Bakterien und ist allgemein etwas aktiver als Vancomycin. Es hat allerdings keine Wirkung gegen VanA-resistente Stämme.<sup>[75]</sup> Die andere nützliche Eigenschaft von Dalbavancin ist seine außergewöhnlich lange Halbwertszeit von 170–210 h, sodass eine Verabreichung im Wochenabstand möglich ist.<sup>[76]</sup>

Telavancin (**24**) ist die jüngste der semisynthetischen Varianten und wurde als erstes für den klinischen Einsatz freigegeben. Es wurde 2009 von der US Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung komplizierter Haut- und Hautstrukturinfektionen (cSSSI) zugelassen. Telavancin war eines von mehreren semisynthetischen Vancomycinanaloga, die von Chemikern des Unternehmens Theravance untersucht wurden, und liefert eine schöne Demonstration, wie die Prinzipien der Medizinalchemie auf die Glycopeptid-Antibiotika angewendet werden.<sup>[77]</sup> Wie erwartet brachte die hydrophobe *N*-Decylaminoethylgruppe eine erhöhte Wirksamkeit und günstige In-vitro-Aktivität gegen Vancomycin-resistente Stämme mit sich. Sie beeinflusste allerdings pharmakokinetische Faktoren in Tiermodellen ungünstig, vor allem Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung. Es musste also zum Ausgleich eine polare Gruppe, in diesem Fall eine Phosphonatgruppe, eingeführt werden, um ein Gegengewicht für den hydrophoben Substituenten zu schaffen. Dies hatte den gewünschten Effekt: Die Pharmakokinetik wurde verbessert, und die Wirkung blieb erhalten.

Telavancin wurde als multifunktionales Lipoglycopeptid beschrieben, dessen Wirkung auf einen zweifachen Mechanismus zurückgeführt wird.<sup>[78]</sup> Es hat einerseits den den Glycopeptiden gemeinsamen Mechanismus, die Zellwandbiosynthese zu hemmen, andererseits kann es wohl auch die Integrität der Zellwand stören und zu Depolarisation, Permeabilität und Zelltod führen. Es besteht die Hoffnung, dass dieser doppelte Wirkmechanismus die Entwicklung von Resistenzen gegen Telavancin verzögert.

## 5. Hybridantibiotika

Die Fusion zweier antibiotischer Wirkstoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zu einer einzigen difunktionalen Einheit ist ein Konzept, über das schon seit mehreren Jahrzehnten nachgedacht wird.<sup>[8a]</sup> Die Überlegung ist, dass die kombinierte Struktur gegenüber den Ausgangsbestandteilen ein erweitertes Wirkspektrum zeigen sollte, darunter auch gegen resistente Organismen, und mit ihrer doppelten Wirkweise das Entstehen von Resistenzen verlangsamt. Die Hauptschwierigkeit bei dieser Strategie ist, dass die Hybridverbindung, um erfolgreich sein zu können, effizienter sein muss als die Summe der Ausgangsverbindungen.

Historisch betrachtet war dieser Ansatz nicht besonders erfolgreich, vor allem, weil das Hybridantibiotikum keinen nennenswerten Vorteil gegenüber den Einzelverbindungen bot. Dies zeigte sich bei den Chinalactamen (Fluorchinolone-Cephalosporin-Hybride)<sup>[79]</sup> und den Rifamycin-Fluorchinolone-Analoga.<sup>[80]</sup> Beide Entwicklungsprogramme wurden inzwischen aufgegeben.<sup>[8a]</sup> Trotzdem geht die Forschung auf



diesem Gebiet weiter, und eine der erfolgversprechenderen Entwicklungslinien ist die Untersuchung von Aminouracil-Fluorchinolon-Hybriden.

Derivate von 6-(3-Ethyl-4-methylanilino)uracil (EMAU) sind moderat aktiv gegen eine Reihe Gram-positiver Organismen dank ihrer Fähigkeit, die DNA-Synthese durch die Hemmung der DNA-Polymerase III C (Pol III C) zu blockieren.<sup>[81]</sup> Die Fluorchinolone (FQ)-Antibiotika wirken gegen Gram-positive und -negative Arten, indem sie die bakteriellen Topoisomerasen und Gyrasen hemmen und damit das „Aufwinden“ der DNA beeinträchtigen. Butler et al. bei Microbiotix synthetisierten eine Reihe von Anilinuracil-Fluorchinolone (AU-FQ)-Hybriden (Abbildung 13) in dem Ver-

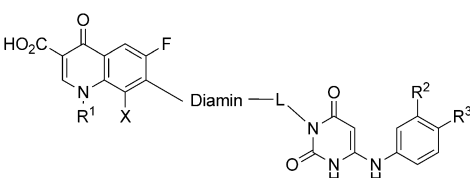
einem Dipyridyl- oder Morpholinbicyclus verringerte die antibakterielle Aktivität; eine Methylsubstitution am Piperazin dagegen erhöhte sie.

Anders als die Ausgangsverbindungen behielt die optimale Hybridverbindung (**25**) ihre In-vitro-Aktivität gegen DNA-Polymerase III C als Wirkort von AU sowie gegen Topoisomerasen und Gyrasen als Wirkorte von FQ.<sup>[82a]</sup> Die Aktivität des Hybrids **25** in Enzymtests gegen DNA-Polymerase III C lag deutlich höher als die der AU-Ausgangsverbindung. Die Aktivität des Hybrids gegen die FQ-Wirkorte entsprach der von Norflaxin, betrug aber nur ein Zehntel der Aktivität der neueren Fluorchinolone wie Ciprofloxacin.<sup>[82a]</sup> Hybrid **25** war in vitro sehr aktiv gegen ein breites Spektrum

von Gram-positiven und -negativen Stämmen mit MIC<sub>50</sub>-Werten, die bis zu 64-mal besser als die der AU-Ausgangsverbindungen waren, und einem verbesserten Aktivitätsspektrum als dem der AU- und den FQ-Ausgangsverbindungen. Die Hybridverbindung zeigte deutliche Aktivität gegen AU- und FQ-resistente Stämme wie VREF F118 (Linezolid-resistent) und MRSA B42876.<sup>[82a]</sup> Um sicherzustellen, dass die Aktivität nicht einer gleichzeitigen Verabreichung von AU und FQ entspricht, testeten Wright, Butler et al. die additive Kombination im Vergleich zum Hybrid. Das kovalent verknüpfte Hybrid aus den Ausgangsverbindungen FQ und AU war signifikant aktiver (Abbildung 14).<sup>[82a]</sup> Es greift zwei Wirkorte an und blockiert so die DNA-Replikation über zwei verschiedene Mechanismen.

Eine andere Hybridkombination, die aktuell untersucht wird, ist die der Fluorchinolone-Aminoglycosid-Antibiotika, die insbesondere aus Ciprofloxacin und Neomycin B zusammengesetzt sind.<sup>[83]</sup> Aminoglycoside hemmen selektiv die bakterielle Proteinsynthese und sind gegen Gram-positive und -negative Organismen aktiv. Sie sind bereits über 50 Jahre verbreitet im Gebrauch, sodass sich inzwischen viele Resistenzmechanismen herausgebildet haben, die ihren Nutzen erheblich beeinträchtigen.<sup>[84]</sup> Baasov et al. stellten über eine kupferkatalysierte Alkylcycloaddition (CuAAC) eine Serie von Hybriden her, in denen Ciprofloxacin und Neomycin B über ein 1,2,3-Triazol verknüpft sind.<sup>[83]</sup> Die Substanzen wurden hergestellt, um die Aktivität von Neomycin B insbesondere gegen Aminoglycosid-resistente Stämme zu verstärken.

Eine Reihe von Hybridverbindungen wurde synthetisiert, die sich nur in Art und Länge der Verbindungseinheit zwischen den antibiotischen Teilverbindungen unterscheiden (Abbildung 15).<sup>[83]</sup> Die Art des Linkers hat einen wesentlichen Einfluss auf die antibiotische Wirkung des Hybrids. Die meisten Hybridverbindungen erwiesen sich als deutlich wirksamer als die Ausgangsverbindung Neomycin B, besonders gegen Gram-negative Bakterien und MRSA. Sie waren



Diamin	K <sub>i</sub> (μM)	S.-a.-MIC (μg mL <sup>-1</sup> )	MRSA-MIC (μg mL <sup>-1</sup> )
	0.024	1.25	2.5
	0.019	0.313	1.25
	0.011	1.25	5
	0.041	2.5	>80
	0.033	1.25	5

X	K <sub>i</sub> (μM)	S.-a.-MIC (μg mL <sup>-1</sup> )	MRSA-MIC (μg mL <sup>-1</sup> )
H	0.026	0.625	1.25
(Aza)	0.018	1.25	2.5
F	0.019	0.313	1.25
Cl	0.01	0.313	1.25
OMe	0.014	0.625	1.25

R <sup>1</sup>	K <sub>i</sub> (μM)	S.-a.-MIC (μg mL <sup>-1</sup> )	MRSA-MIC (μg mL <sup>-1</sup> )
Et	0.024	1.25	2.5
cPr	0.024	1.25	2.5
tBu	0.013		1.25
3,4-F <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	0.018	0.625	1.25
4-p-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	0.017	1.25	2.5

R <sup>2</sup>	K <sub>i</sub> (μM)	S.-a.-MIC (μg mL <sup>-1</sup> )	MRSA-MIC (μg mL <sup>-1</sup> )
Et	0.024	1.25	2.5
Me	1.25	1.25	5
H	29	2.5	>40

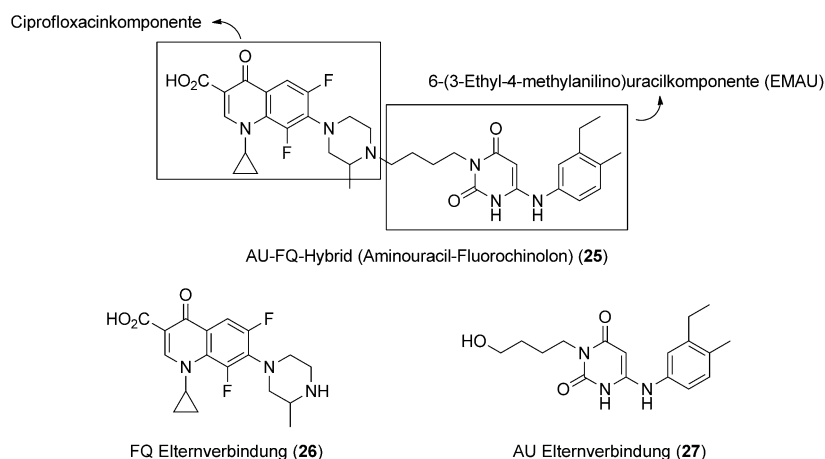
R <sup>3</sup>	K <sub>i</sub> (μM)	S.-a.-MIC (μg mL <sup>-1</sup> )	MRSA-MIC (μg mL <sup>-1</sup> )
Me	0.024	1.25	2.5
H	29	2.5	>40

L	K <sub>i</sub> (μM)	S.-a.-MIC (μg mL <sup>-1</sup> )	MRSA-MIC (μg mL <sup>-1</sup> )
(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	0.024	1.25	2.5
(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub>	0.019	1.25	2.5

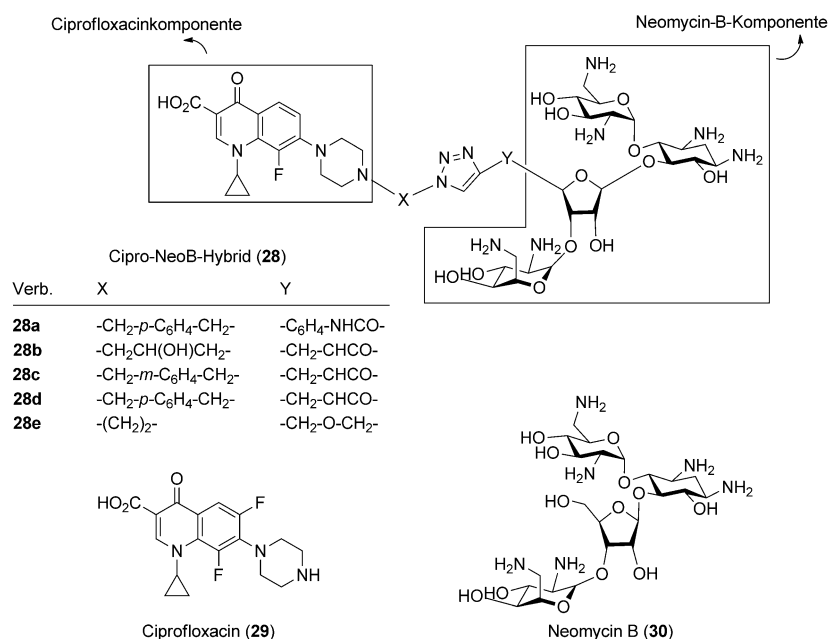
**Abbildung 13.** Hemmung der Pol III C und die antibakterielle Aktivität von Anilinuracil-Fluorchinolone (AU-FQ)-Hybriden gegen die Gram-positiven Erreger *S. aureus* 25923 und Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) 1094. cPr = Cyclopropyl.

such, Wirkung und Spektrum von Anilinuracil-basierten Verbindungen zu maximieren.<sup>[82]</sup> Die Wirkung gegen Pol III C sowie die antibakterielle Aktivität gegen *S. aureus* und Methicillin-resistente *S. aureus* änderte sich nur marginal, wenn R<sup>1</sup>, X und die Länge des Linkers L variiert wurden.<sup>[82b]</sup> Die Auswirkungen aufgrund der Variation im Diamin sowie den Substituenten R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> waren demgegenüber viel ausgeprägter und schädlicher.<sup>[82b]</sup> Die Entfernung der Substituenten in Position R<sup>2</sup> und R<sup>3</sup> am Anilinuracil-Phenylring verringerte die antibakterielle Aktivität des Hybrids deutlich. Eine Veränderung des Diamins von einem Piperazinring zu



Bakterienstamm	MIC von 25 ( $\mu\text{M}$ )	MIC von 26 ( $\mu\text{M}$ )	MIC von 27 ( $\mu\text{M}$ )	MIC von 26+27 ( $\mu\text{M}$ )
<i>S. aureus</i> Smith ATCC 13709	0.88	0.26	28	0.88
MRSA klinisches Isolat 1094	2.6	30	28	30
<i>E. faecium</i> ATCC 19434	3.75	30	30	30
VRE-Ausgangsverbindung B42762	2.1	>60	30	45

**Abbildung 14.** Vergleich der antibakteriellen Aktivität des AU-FQ-Hybridwirkstoffs mit den Elternverbindungen FQ und AU und mit FQ und AU bei gemeinsamer Verabreichung.<sup>[82a]</sup>



Verb.	MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )				
	<i>E. coli</i> AG100B	<i>E. coli</i> AG100A	MRSA ATCC 43300	<i>E. coli</i> XL1 blue	<i>E. coli</i> XL1 blue/pSF815
29	0.05	<0.005	0.20	0.10	0.38
30	384	96	384	6	>384
28a	3	0.75	3	3	24
28b	3	0.75	12	6	48
28c	6	0.75	6	6	24
28d	6	1.5	3	6	6
28e	3	0.38	6	3	12

**Abbildung 15.** Die antibakterielle Aktivität einer Reihe von Ciprofloxacin-Neomycin B-Hybridverbindungen gegen Gram-negative *E. coli*-Stämme, eine entsprechende molekularbiologisch veränderte Variante von *E. coli*, die ein Resistenzenzym trägt, und einen Gram-positiven MRSA-Stamm.

auch gut wirksam gegen *E. coli*-Stämme, die rekombinant Aminoglycosid-modifizierende Enzyme exprimieren (z.B. *E. coli* XL1 blue und die resistente Variante *E. coli* XL1 blue pSF815); ihre Wirksamkeit ist bis zu 240-mal höher als die von Neomycin B und bleibt relativ gleich gegenüber resistenten und nichtresistenten Stämmen (Abbildung 15)<sup>[83]</sup> Die Hybride waren allerdings bei weitem schwächer als Ciprofloxacin in antibakteriellen Tests, obwohl sie sich unerwartet im Enzymtest gegen DNA-Gyrase und Topoisomerase IV als überlegen zeigten. Die Diskrepanz zwischen den verschiedenen Tests wurde daher der geringeren Aufnahme der Hybride gegenüber der von Ciprofloxacin zugeschrieben.<sup>[83]</sup> Allein mit Blick auf die antibakterielle Wirksamkeit kann man für diese Hybride daher keine Überlegenheit gegenüber einer Monotherapie mit Ciprofloxacin ableiten; allerdings scheinen sie wertvoll zu sein, wenn die antibakterielle Wirksamkeit von Neomycin B gegen resistente Stämme wiederhergestellt werden soll.

Vielleicht noch interessanter war der Test der Hybride auf ihre Neigung zur Induktion von Resistenzen verglichen mit jener der einzelnen Antibiotika.<sup>[83]</sup> Dazu wurden Stämme von *E. coli* und *B. subtilis* subletalen Konzentrationen (0.5 MIC) der Antibiotika über 15 aufeinanderfolgende Kulturschritte ausgesetzt. Die Hybridverbindung wurde mit der Wirkung von Neomycin B und Ciprofloxacin einzeln und in Kombination verglichen.<sup>[83]</sup> Die relativen MIC<sub>50</sub>-Werte von Ciprofloxacin, Neomycin B und der Kombination nahmen bei *E. coli* um das 75-, 4- und 20-Fache und bei *B. subtilis* um das 37.5-, 8- und 7.6-Fache zu, während die Werte für die Hybridverbindung weitgehend unverändert blieben, ein überzeugender Hinweis auf die verminderte Neigung, unter den Testbedingungen Resistenzen zu erzeugen.

Diese beiden Kombinationen lassen darauf schließen, dass Hybridantibiotika beim Kampf gegen resistente Bakterien Vorteile bieten können. Es gibt allerdings keinen Grund, Hybridverbindungen auf den Ansatz mit „dualem Gefechtskopf“ zu beschränken. Eine Alternative ist, eine antibiotische Substanz mit einer Substanz zu koppeln, die entweder ihre Aktivität erhöht oder einen effizienteren Zugang zum Wirkort ermöglicht. Solche Verbindungen könnten Komponenten enthalten, die der Resistenz begegnen oder den Transport in die Zelle ermöglichen.

Ein interessantes Beispiel für den letztgenannten Ansatz ist die Kombination einer antibakteriellen mit einer Eisen-(III)-chelierenden Siderophorgruppe. Diese Siderophor-Wirkstoffkonjugate könnten sich für die Behandlung Gram-negativer Pathogene wie *P. aeruginosa* als nützlich erweisen, die gegen viele Antibiotikaklassen resistent sind. Ein wichtiger Faktor für die Resistenz Gram-negativer Bakterien ist die Zellwand, die für viele Antibiotika undurchlässig ist. Andererseits transportieren Gram-negative Bakterien aktiv  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Siderophorkomplexe über spezifische Rezeptoren in die Zelle.<sup>[85]</sup> Hängt man ein Antibiotikum an einen solchen Siderophor an, hofft man, eine Verbindung nach Art eines Trojanischen Pferdes zu erhalten, die den Wirkstoff zu seinem Wirkort bringt.<sup>[86]</sup>

Miller et al. berichteten kürzlich über ein Beispiel für einen solchen Ansatz, bei dem sie ein Konjugat aus einem Penicillinderivat und einem künstlichen Tris(catechol)-Siderophor hergestellt hatten (Abbildung 16).<sup>[87]</sup> Das

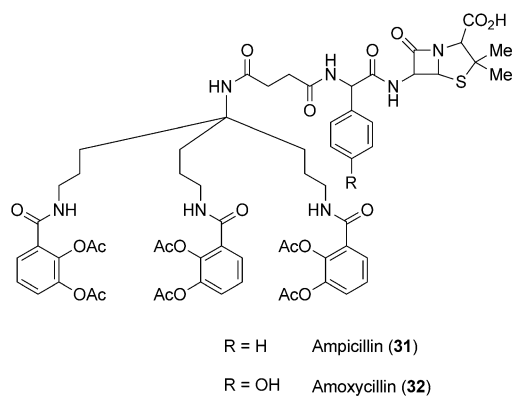


Abbildung 16. Penicillin-Siderophor-Konjugat von Miller et al.

Tris(catechol)-Siderophor bietet einen leicht zugänglichen Ersatz für das natürlich vorkommende Siderophor Enterobactin. Konjugate mit Ampicillin und Amoxycillin wurden hergestellt und zusammen mit den Ausgangsverbindungen auf ihre Effektivität gegen verschiedene *P. aeruginosa*-Stämme getestet. Wie erwartet waren die Ausgangsverbindungen weitgehend inaktiv gegen die Mehrzahl der Stämme ( $\text{MIC}_{90}$ -Werte meist  $> 200 \mu\text{M}$ ); im Unterschied dazu erreichten die Konjugate oft Werte von  $< 0.5 \mu\text{M}$ , waren also sehr aktiv. Die Konjugate wirkten am besten in Eisenmangelmedium, in dem die Aufnahme der Komplexe am ehesten induziert wird. Diese enorme Verstärkung der antibakteriellen Aktivität als Ergebnis der Konjugation an ein Siderophor ist vielversprechend, auch wenn noch weitere Untersuchungen notwendig sind, um die Brauchbarkeit zu bestätigen.

## 6. Antimikrobielle Peptide

Antimikrobielle Peptide (AMPs) werden praktisch von jeder eukaryotischen Lebensform freigesetzt, angefangen von Insekten und Pflanzen bis hin zum Menschen, und zwar als Teil des angeborenen Immunsystems gegen Infektionen.<sup>[88]</sup>

Über 600 solcher Verteidigungspeptide (host defence peptides) sind in der Lage, pathogene Mikroorganismen abzutöten, darunter Gram-positive und -negative Bakterien, Viren, Protozoen und Pilze, und sind auch an der Verstärkung und Regulation der Immunantwort beteiligt.<sup>[89]</sup> Auch wenn sich die Strukturen stark unterscheiden, haben diese Peptide dennoch eine Reihe wichtiger Eigenschaften gemein: Sie sind relativ klein, bestehen meist aus weniger als 50 Aminosäureresten, sind insgesamt positiv geladen, vor allem wegen mehrerer Arginin- und Lysinreste, und enthalten einen größeren Anteil an hydrophoben Resten (typischerweise mehr als 50% aller Aminosäuren).<sup>[90]</sup> Wegen dieser Verteilung von hydrophilen (kationischen) und hydrophoben Aminosäuren können die Peptide amphipathische Konformationen annehmen, oft als Ergebnis der Wechselwirkung mit den mikrobiellen Zielstrukturen, die für den Wirkmechanismus grundlegend sind.

### 6.1. Wirkmechanismus

Antimikrobielle Peptide sind grundsätzlich gegen die Phospholipidmembranen von Bakterienzellen gerichtet. Ihre Selektivität für dieses Ziel ist in ihrer kationischen Natur begründet. Im Unterschied zu eukaryotischen Zellen ist bei Gram-positiven und -negativen Bakterienzellen die äußere Membranoberfläche dicht mit anionischen Phosphatkopfgruppen besetzt. Diese negativ geladenen Gruppen ziehen die kationischen Peptide elektrostatisch an, sodass diese sich an der Membranoberfläche anlagern und dort ihre antimikrobielle Wirkung entfalten. Im Falle Gram-negativer Bakterien überwinden die Peptide die äußere Membran, indem sie ihre Aufnahme selbst verstärken.<sup>[91]</sup> Die kationischen Peptide konkurrieren mit den  $\text{Mg}^{2+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die normalerweise an das Lipopolysaccharid gebunden sind, und verdrängen sie. Durch die so destabilisierten Regionen dringen die Peptide dann ein. Die äußere Membranoberfläche eukaryotischer Zellen ist im Allgemeinen neutral, daher ist die Affinität zu den kationischen Peptiden geringer. In diesen Membranen sind die negativ geladenen Gruppen stattdessen nach innen zum Cytoplasma hin orientiert. Das Vorkommen von Kollagen in eukaryotischen Membranen steigert ebenfalls die Stabilität und schützt gegen Host-Defence-Peptide.

Sind die Peptide erst an der Membranoberfläche aggregiert, können sie in die Membran inserieren und dort ihre Wirkung entfalten. Sie bilden micellare Aggregate, die entweder die physische Integrität der Membrandoppelschicht stören oder den Transport der Peptide ins bakterielle Cytoplasma erleichtern. Dort können die Peptide dann gegen zelluläre Zielstrukturen wirken. Es wurden bereits verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, nach denen die antimikrobiellen Peptide die Membranfunktion stören.<sup>[92]</sup> Die Peptide können sich senkrecht zur Membran anordnen und entweder daubenförmige oder toroidale Transmembranporen bilden. Alternativ können sich die Peptide auch parallel zur Membran anordnen, wie im „Teppich-Modell“, wo sie von vielen Stellen der Membranoberfläche angezogen werden und anschließend eine durchgehende teppichähnliche Schicht bilden. Wenn eine kritische Konzentration erreicht ist, zer-

stören die Peptide die Membran ähnlich wie ein Detergenz und bilden Spalten, Poren und Löcher in der Membran. Die Folge sind eine vollständige Desintegration der Zellmembran in Micellen und der Zelltod. Der genaue Mechanismus, der im Einzelfall zugrunde liegt, kann von der Struktur der AMPs oder der Zellmembran und der Konzentration der AMPs abhängen.

Es ist nicht immer klar, ob die Zerstörung der Zellmembran der primäre Abtötungsmechanismus ist, denn außerdem verlangsamten AMPs eine ganze Reihe cytoplasmatischer Vorgänge wie Nucleinsäuresynthese, Proteinsynthese, Zellwandsynthese und Proteinfaltung.<sup>[93]</sup> Zu AMPs, bei denen man intrazelluläre Effekte nachweisen konnte, gehören PR 39,<sup>[94]</sup> CP 10A,<sup>[95]</sup> Pleurocidin,<sup>[96]</sup> Indolicidin<sup>[97]</sup> und Buforin II.<sup>[98]</sup> Interessanterweise scheinen AMPs oft verschiedene Zielstrukturen mit ähnlicher moderater Wirkstärke zu beeinflussen, was in deutlichem Gegensatz zu den meisten klinisch entwickelten Antibiotika steht, die bevorzugt mit hoher Affinität an eine einzelne Zielstruktur binden. Die Evolution der AMPs ist also einem anderen Weg gefolgt als die der von Bakterien gebildeten Antibiotika; die wirksamsten AMPs scheinen die universellen Binder zu sein.<sup>[99]</sup> Daher vermutet man, dass die Aktivität der AMPs eine Folge ihrer Fähigkeit sein könnte, gleichzeitig auf mehrere Strukturen einzuwirken, darunter die Zellmembran sowie intra- und extrazelluläre Strukturen, sodass die Zelle vielen Stressfaktoren auf einmal ausgesetzt ist, die in ihrer Summe zum Zelltod führen.

## 6.2. Antimikrobielle Peptide als mögliche antibakterielle Wirkstoffe

Die Erforschung von AMPs als antibakterielle Wirkstoffe zieht gegenwärtig viel Aufmerksamkeit auf sich, weil man glaubt, dass AMPs eine Reihe von Vorteilen gegenüber traditionellen Antibiotika haben. Ein Aspekt von überragender Bedeutung bei der Entwicklung neuer Antibiotika ist deren Eigenart, Resistenzen zu induzieren. Es ist unvermeidlich, dass AMPs Resistenzen induzieren, doch es gibt zahlreiche Hinweise, dass das Auftreten solcher Resistenzen langsamer erfolgt als bei traditionellen Antibiotika. So ergab eine Untersuchung von 30 Übertragungszyklen von *Pseudomonas aeruginosa* mit subletalen Dosen synthetischer AMPs nur eine zwei- bis vierfache Zunahme der Resistenzen.<sup>[100]</sup> Eine ähnliche Untersuchung mit dem Antibiotikum Gentamycin führte nach nur 11 Übertragungszyklen schon zu einer 190-fachen Resistenzzunahme.<sup>[101]</sup> In der gleichen Untersuchung wurde auch das AMP Protegrin-1 getestet. Dieses induzierte überhaupt keine merkliche Resistenzzunahme.

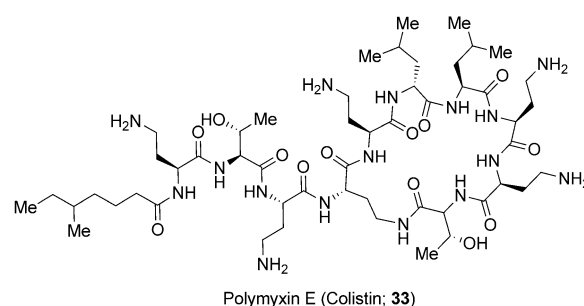
Diese langsame Resistenzbildung wurde der Kombination aus der Wechselwirkung der AMPs mit der Zellmembran und der parallelen Wirkung auf verschiedene Zielstrukturen zugeschrieben. Man vermutet daher, dass sich eine Mutation, die eine Resistenz durch Reorganisation der Zellmembran erzielt, oft als metabolisch zu aufwändig für ein Überleben herausstellt.<sup>[93]</sup> Wenn zudem mehrere zelluläre Ziele mit vergleichbarer Wirksamkeit angegriffen werden können, wird die Resistenz gegen einen einzelnen Wirkmechanismus nicht

notwendigerweise eine vollständige Resistenz gegen das AMP verleihen.

Auch wenn sich Resistenzen gegen AMPs offenbar nur langsam entwickeln, könnte eine hochgradige Resistenz schwerwiegende Folgen haben, wenn der therapeutische Einsatz von AMPs zu Kreuzresistenzen mit den Abwehrpeptiden des angeborenen Immunsystems führen würde.<sup>[102]</sup> Laboruntersuchungen haben jedoch ergeben, dass das Vorkommen von Kreuzresistenzen als Folge der wiederholten Anwendung eines einzelnen AMP nur gering ausfällt und keine allgemeine Erscheinung ist.<sup>[103]</sup> Außerdem würden die immunmodulatorischen und Anti-Endotoxin-Effekte der Abwehrpeptide von der Entwicklung von Resistenzen gegen ihre antibiotische Wirkung unberührt bleiben. Erwähnenswert ist, dass Resistenzmechanismen gegen native Abwehrpeptide beobachtet wurden; eine andere mögliche Strategie für eine Chemotherapie wäre, diese Mechanismen auszuschalten und so die Abwehr der Pathogene gegen endogene AMPs zu überwinden.<sup>[104]</sup>

Außer der offensichtlich geringeren Neigung zur Resistenzinduktion sind auch die immunmodulatorischen, entzündungshemmenden und Endotoxin-neutralisierenden Aktivitäten der AMPs aus therapeutischer Sicht faszinierend. Sie sind mit Blick auf synergistische Wirkungen mit anderen Antibiotika ebenso vielversprechend wie in antibiotischer Monotherapie. Als vorteilhaft gilt auch, dass sie meist bakteriozid, weniger bakteriostatisch sind.

Trotz zahlreicher günstiger Eigenschaften wurden erst wenige AMPs klinisch zugelassen. Die bedeutsame Ausnahme sind die Polymyxine, kationische Lipopeptide des Gram-positiven Bakteriums *Bacillus polymyxa*. Polymyxin E (Colistin, **33**; Abbildung 17) wird gegenwärtig als letzte Verwei-





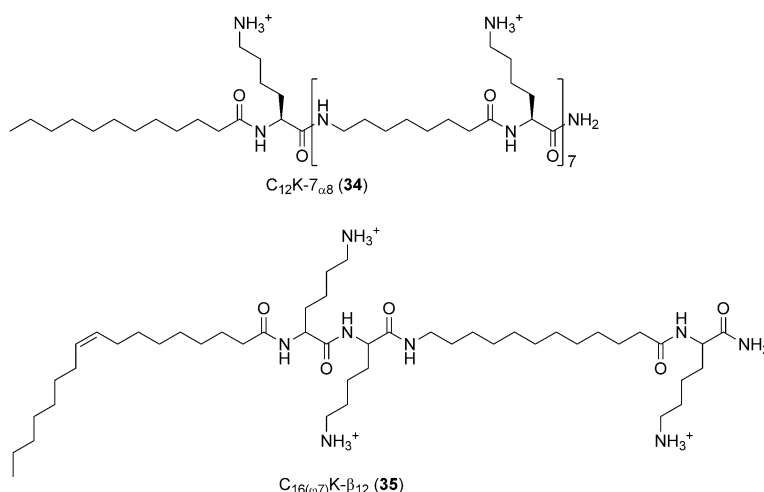
gelassen, weil sie keine bessere Wirksamkeit als herkömmliche Präparate zeigten.<sup>[107]</sup>

Außer der zu geringen Wirksamkeit werden noch weitere Gründe für die wenig erfolgreiche Geschichte der AMPs als Therapeutika angeführt.<sup>[108]</sup> Am schwersten fallen dabei die hohen Synthesekosten für die Peptide ins Gewicht. Außerdem sind die Halbwertszeiten in vivo wegen der Anfälligkeit gegen Proteasen zu kurz, und es gibt toxische Vertreter. Daher besteht großes Interesse an der Entwicklung von Peptidmimetika, um so einige der genannten Schwierigkeiten zu umgehen.<sup>[109]</sup>

### 6.3. Aktuelle Fortschritte bei der Entwicklung antimikrobieller Peptide

Ein hochinteressantes Feld der Infektionsforschung besteht aus der Untersuchung und Entwicklung chemischer Mimetika der wirteigenen Abwehrpeptide. Man hofft, mit neuen AMPs einige der Nachteile natürlicher AMPs zu überwinden, und strebt nach einfacherer Synthese, verbesserter Stabilität und verringerter Toxizität. Eine Strategie mit einiger Erfolgsaussicht ist der Einsatz von Acyllysins-Oligomeren, um die Effekte natürlich vorkommender Peptide nachzuahmen.<sup>[110]</sup> Mor et al. entwarfen solche Peptidmimetika mit abwechselnd einem Aminosäurerest mit einer Acylkette (A) und einer kationischen Seitenkette (K), um die Bildung einer stabilen Sekundärstruktur in den entstehenden Oligo-AKs (OAKs) auszuschießen. So könnten sich stattdessen die amphipathischen Strukturen, die für die Aktivität erforderlich sind, bei der Wechselwirkung mit der bakteriellen Zellmembran bilden.<sup>[111]</sup> Die ersten Arbeiten über OAKs befassten sich mit der Variation der Zahl und Identität der Reste A und K, um die Gesamtladung und Hydrophobie auszubalancieren und so die optimale Aktivität zu erhalten. Nach Synthese und Test einer Bibliothek linearer peptidmimetischer Sequenzen stellten sich als die aktivsten Verbindungen Cooligomere aus Lysin und 8-Aminooctansäure heraus.<sup>[111]</sup> Die Aktivität dieser Verbindungen wurde weiter verbessert, indem der N-Terminus mit einer Dodecanoylgruppe derivatisiert wurde, um größere Hydrophobie zu erreichen. Das beste Lysin-Aminooctansäure-Oligomer war die oktamere Verbindung mit der Bezeichnung  $C_{12}K-7_{\alpha 8}$  (Abbildung 18).<sup>[111]</sup>

$C_{12}K-7_{\alpha 8}$  wirkte schnell bakterizid mit hoher Aktivität (MIC-Bereich: 1.6–12.5  $\mu\text{M}$ ) gegen eine Reihe Gram-negativer Bakterien, darunter *Acinetobacter*-, *Klebsiella*- und *Pseudomonas*-Stämme, und induzierte keine Resistenz in *E. coli* über 15 Passagen. Außerdem ließen sich damit systemische *E.-coli*-Infektionen in Mäusen mit ähnlicher Effizienz behandeln wie mit den konventionellen Antibiotika Ciprofloxacin und Imipenem und mit wesentlich besserer Wirkung als mit den natürlich vorkommenden AMPs MSI-78 und S4 (1–16), die völlig unwirksam waren.<sup>[111]</sup> Untersuchungen des Wirkmechanismus von  $C_{12}K-7_{\alpha 8}$  ergaben, dass die Verbindung wahrscheinlich die bakteriellen Zellmembranen auf ähnliche Weise zerstört wie die getesteten natürlichen AMPs.<sup>[111]</sup> Zu-

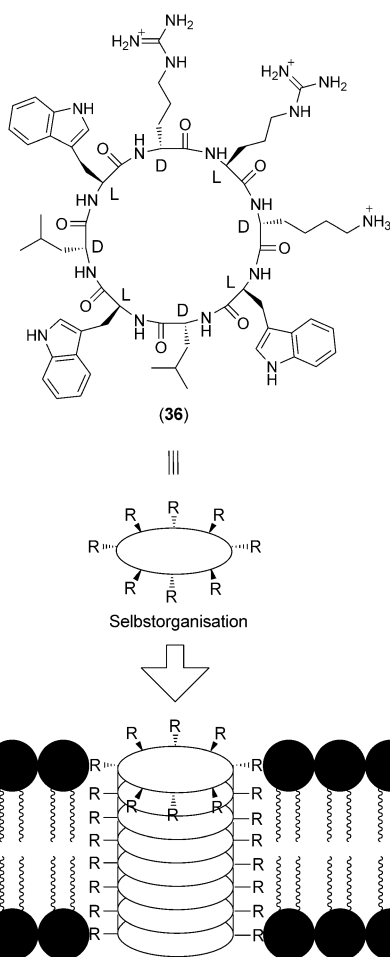


**Abbildung 18.** Die molekulare Struktur von zwei hochwirksamen OAKs,  $C_{12}K-7_{\alpha 8}$  und  $C_{16(\omega 7)}K-\beta_{12}$ .

sammengenommen lassen diese Befunde darauf schließen, dass die OAKs einen Großteil der Probleme lösen können, die man mit den Standard-AMPs hat.

Eine neue Untersuchung von Mor et al. hat ergeben, dass das kationische peptidische OAK-Antibiotikum  $C_{16(\omega 7)}K-\beta_{12}$  hochwirksam gegen eine Reihe von Bakterien ist, darunter 50 verschiedene Bakterienstämme mit MICs zwischen 1.2 und 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Abbildung 18).<sup>[112]</sup> Wirksamkeit und Mechanismus können dabei von Umgebungseinflüssen wie pH-Wert, Salzkonzentration und Temperatur beeinflusst werden.<sup>[112,113]</sup> Unter optimalen Inkubationsbedingungen von pH 8.5, 85 mM NaCl und 48 °C hatte  $C_{16(\omega 7)}K-\beta_{12}$  eine MIC von 0.08  $\mu\text{g mL}^{-1}$  gegen *E. coli* mit schneller bakterizider Wirkungskinetik (0.25 h). Die meisten Erkenntnisse über den Wirkmechanismus lieferte die Geschwindigkeit der bakteriziden Aktivität gegen einen bestimmten Stamm: Hohe Geschwindigkeit deutet auf eine Zerstörung der Zellmembran oder der Zellwand hin, niedrigere Geschwindigkeiten sind eher mit intrazellulären Vorgängen wie der Hemmung von Makromolekülsynthesen oder der DNA-Replikation assoziiert.<sup>[112]</sup> Mor et al. schlugen allerdings vor, dass  $C_{16(\omega 7)}K-\beta_{12}$  bei einem bestimmten Stamm nach einem anderen Mechanismus wirken solle und dass dieser Wirkmechanismus, der von den OAKs übernommen worden sei, zwischen den Stämmen variere. In einer ähnlichen Untersuchung von Gellman et al. hatte auch die AMP-Konzentration einen Einfluss auf den Mechanismus; niedrigere Konzentrationen zogen niedrigere Abtötungsgeschwindigkeiten nach sich, waren also intrazellulär aktiv, während höhere AMP-Konzentrationen schnelle Abtötungsgeschwindigkeiten auslösten, was darauf hindeutete, dass genug Peptid vorhanden war, um die Zellwand- oder Membransynthese zu hemmen.<sup>[114]</sup>

Ein alternativer Ansatz für die Entwicklung neuer AMPs beruht auf dem Konzept, die Bakterienzellmembran mit tubulären Strukturen zu zerstören (Abbildung 19).<sup>[115]</sup> Hohe antibakterielle Aktivität ließ sich mit einer Serie von cyclischen Peptiden aus sechs bis acht Resten erzielen, die in Bakterienmembranen zu hohlen, tubulären, offenen Struk-



**Abbildung 19.** Gut wirksames antibakterielles cyclisches D,L- $\alpha$ -Peptid (36) mit einer MIC von  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$  gegen *S. aureus* (MRSA). Die cyclischen Peptide ordnen sich zu röhrenförmigen Strukturen innerhalb der bakteriellen Zellmembran an, was letztlich zu erhöhter Durchlässigkeit und zum Zelltod führt.

turen aggregieren, wodurch die Permeabilität zunimmt und die Bakterienzelle abstirbt.<sup>[115b]</sup> Die cyclischen Peptide wurden aus D- und L- $\alpha$ -Aminosäuren in alternierender Reihenfolge konstruiert; dadurch entstehen flache Ringkonformationen mit nach außen orientierten Seitenketten und einem Amidrückgrat, das rechtwinklig zur Ringebeine liegt. In der Bakterienzellmembran sind die cyclischen Peptide aufeinander gestapelt, wobei die Amidrückgrate Wasserstoffbrücken zwischen den Ringen bilden und so die Röhrenstruktur aufbauen. Die chemische Natur der Gruppen R ist ausschlaggebend für die Fähigkeit dieser Röhren, mit der Bakterienmembran in Wechselwirkung zu treten. So nahm, wenn man die Zahl der basischen Gruppen im Peptid von zwei auf drei Reste erhöhte, die Aktivität gegen MRSA bis zu einem Bereich von 6 bis  $12 \mu\text{g mL}^{-1}$  zu, während saure Gruppen wegen der störenden elektrostatischen Wechselwirkungen mit der Zellmembran ungünstig für die Wirkung waren.<sup>[115b]</sup> Die schnelle Abtötung der Bakterien durch die selbstorganisierten Peptidröhren und die Geschwindigkeit der Membrandepolarisation sind in Einklang mit dem vorgeschlagenen Wirkmechanismus.<sup>[115b, 116]</sup>

Ein anderer Ansatz, der gerade verfolgt wird, ist die Verwendung von  $\beta$ -Peptiden, um die Bakterienzellmembran zu stören.<sup>[117]</sup> Amphiphile  $\beta$ -Peptide nehmen oft eine Reihe helikaler Strukturen an und verhalten sich in biologischen Systemen ähnlich wie die verwandten  $\alpha$ -Peptide wie Magainin und Cecropin.<sup>[118]</sup>  $\beta$ -Peptidmimetika sind stabiler in ihrer Konformation, widerstandsfähig gegen Proteasen und haben ein besseres Aktivitätsprofil als natürliche antibakterielle Peptide aus  $\alpha$ -Aminosäuren.<sup>[119]</sup> Die frühen  $\beta$ -Peptidanaloga hatten den großen Nachteil einer mangelnden Selektivität, denn außer dem antibakteriellen Profil zeigten sie oft auch hämolytische Wirkung.<sup>[118a, 120]</sup> In umfangreichen Arbeiten identifizierten DeGrado und Liu,<sup>[118a]</sup> Gellman et al.<sup>[118b, 121]</sup> und Seebach et al.<sup>[120]</sup>  $\beta$ -Peptide, die die antimikrobielle Aktivität behielten, gleichzeitig aber selektiver für Bakterienzellen als für menschliche Erythrozyten waren.

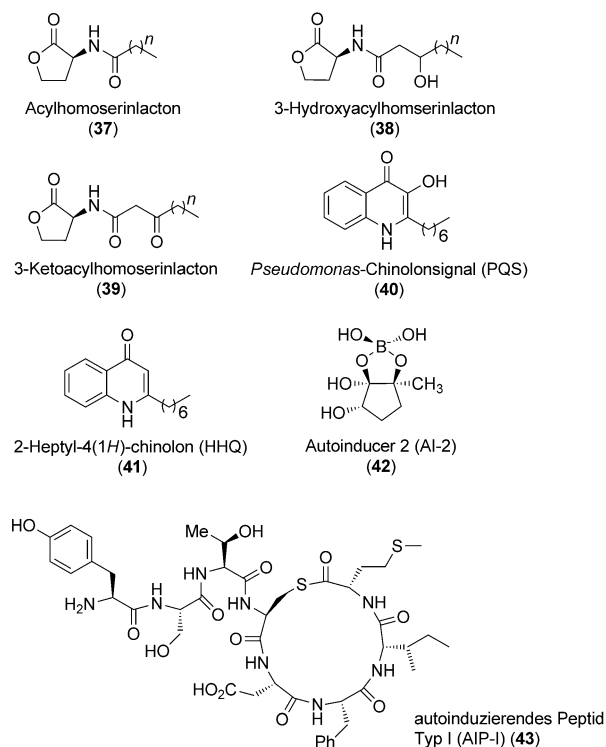
## 7. Antivirulenz-Strategien durch Hemmung des Quorum Sensing

Quorum Sensing (QS) ist ein interzelluläres Signalphänomen, mit dem Bakterienzellen einer Population kollektiv und koordiniert bestimmte Gene exprimieren. Die Hemmung des QS hat im Verlauf der Entwicklung zweier antibakterieller Substanzen viel Aufmerksamkeit erhalten.<sup>[18a, 122]</sup> Der erste Phänotyp, bei dem man in den 1970er Jahren die Regulation durch QS erkannte, war die Biolumineszenz des marinen Bakteriums *Vibrio fischeri*.<sup>[123]</sup> Der Begriff „Quorum Sensing“ wurde allerdings erst 1994 von Fuqua et al. eingeführt.<sup>[124]</sup> QS geschieht durch die freie Diffusion (oder den aktiven Transport) chemischer Signalmoleküle zwischen Zellen einer Population.<sup>[125]</sup> Diese Signalmoleküle werden von spezifischen verwandten Rezeptorproteinen aufgespürt, von denen manche membranassoziiert sein können.<sup>[126]</sup> Das Signalmolekül („Autoinduktor“) wird in einer Konzentration proportional zur Zelldichte in der Population gebildet; wenn die Konzentration einen kritischen Schwellenwert erreicht (der das notwendige Bakterienquorum widerspiegelt), bindet der Autoinduktor sein spezifisches Rezeptorprotein.<sup>[127]</sup> Der beladene Rezeptor wirkt als Transkriptionsregulator und aktiviert (oder reprimiert) die Expression der Gene unter QS-Kontrolle.<sup>[128]</sup> Die Signalmoleküle werden oft als Autoinduktoren bezeichnet, weil sie in einigen Fällen, wenn sie an ihren spezifischen Rezeptor gebunden sind, die eigene Biosynthese hochregulieren können und so eine positive Rückkopplungsschleife erzeugen.<sup>[129]</sup>

Viele Gram-negative und -positive Bakterien nutzen QS, um eine Reihe von Phänotypen zu regulieren. Dazu gehören die Produktion von Virulenzfaktoren, Biofilmbildung, Biolumineszenz, Schwärmen und Sporulierung.<sup>[130]</sup> Klinisch relevante Pathogene wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* und *Staphylococcus aureus* nutzen eine Form des QS, um die Produktion von Virulenzfaktoren zu regulieren.<sup>[131]</sup> QS ermöglicht solchen Pathogenen einen koordinierten Angriff auf den Wirt, wenn die Bakterienpopulation groß genug ist, um die Abwehr des Wirts zu überwinden, und vergrößert damit die Überlebenschancen der Bakterien.<sup>[130a, 132]</sup> Die am intensivsten untersuchten Signalmole-

küle sind die Acylhomoserinlactone (AHLs) der Gram-negativen Bakterien. Für die Biosynthese sind Synthasen vom LuxI-Typ erforderlich; die AHLs werden dann von verwandten Rezeptormolekülen des LuxR-Typs erkannt.<sup>[130b,133]</sup>

Die chemische Struktur der AHLs variiert zwischen den verschiedenen Bakterienstämmen; insbesondere gibt es Unterschiede bei den Acylkettenlängen und dem Vorhandensein einer Hydroxy- oder Ketogruppe an der dritten Position der Acylkette<sup>[134]</sup> (**37–39**; Abbildung 20). Dies führte zu der Hy-



**Abbildung 20.** Quorum-Sensing-Signalmoleküle, die von Bakterien produziert werden. Acylhomoserinlactone (AHLs) werden von vielen Gram-negativen Bakterien gebildet, wobei es Unterschiede zwischen den Arten gibt, vor allem bezüglich der Gegenwart eines Sauerstoffatoms an Position 3 des AHL und verschiedener Alkylkettenlängen ( $n$ ). PQS und HHQ sind die einzigen Chinolon-QS-Moleküle, die bislang von dem opportunistischen Pathogen *P. aeruginosa* bekannt sind. Boratdiester als Signalmoleküle, darunter AI-2, kommen bei Gram-negativen und -positiven Bakterien vor. QS mit Peptiden als Signal finden sich bei Gram-positiven Bakterien, z.B. beim opportunistischen Pathogen *S. aureus*, das eines von vier AIP-Signalmolekülen, darunter AIP-I, nutzt.

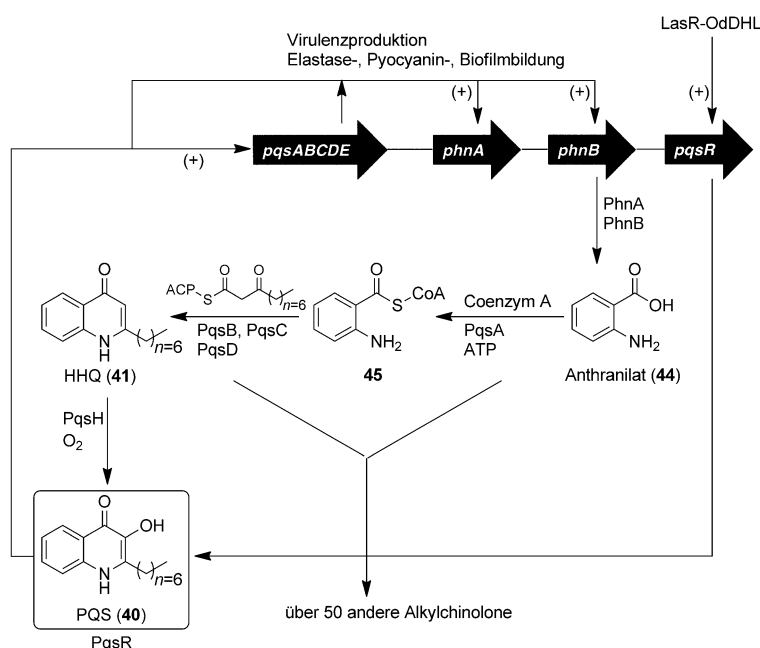
pothese, dass verschiedene Bakterienarten in einer Gesamtpopulation an einer Signalübermittlung über die Artgrenzen hinweg („bacterial cross talk“) über LuxR-Homologe und AHL-Signalmoleküle beteiligt sind.<sup>[135]</sup> Inzwischen ist gut belegt, dass die Genregulation in spezifischen Bakterienarten durch nicht endogene QS-Signale beeinflusst werden kann.<sup>[136]</sup> Außer den AHLs gibt es noch andere Klassen von QS-Molekülen mit einer anderen Struktur.<sup>[130a]</sup> Zu diesen weiteren chemischen Strukturen gehören Chinolone (**40** und **41**), cyclische Peptide (**43**) und Borsäurediester (**42**; Abbildung 20 < xfigr20).

Eine hochinteressante mögliche neue antibakterielle Strategie ist die Abschwächung von Virulenz durch die Hemmung des QS („quorum quenching“).<sup>[137]</sup> Ein solches Vorgehen könnte dem Immunsystem des Wirts die Möglichkeit geben, die bakterielle Infektion ohne oder in Kombination mit einer Antibiotikabehandlung zu überwinden. Entsprechend wurden bereits viele kompetitive Antagonisten der QS-Signalverbindungen und ihrer Rezeptorproteine gefunden.<sup>[137]</sup> Es gab In-vivo-Untersuchungen in Tieren mit QS-Inhibitoren, bei denen in vielen Fällen eine Reduktion der Virulenz und eine Abschwächung der Infektion beobachtet wurden.<sup>[138]</sup> Eine vielversprechende Vorstellung ist, dass gegenüber dem Fall cytotoxischer Antibiotika bei QS-Inhibitoren der Selektionsdruck verringert oder nicht vorhanden ist, weil diese das Bakterienwachstum nicht beeinträchtigen.<sup>[122]</sup> Dies könnte aber auch eine naive Vorstellung auf der Basis von Laboruntersuchungen sein, denn der Einfluss des Verlusts von QS in Bakterien auf die Fitness im „wahren Leben“ ist nicht klar. Auch wenn die Hypothese, dass die Resistenzentwicklung durch Quorum-Quenching-Strategien umgangen oder zumindest stark eingeschränkt werden könne, angezweifelt wurde,<sup>[139]</sup> ist die Hemmung des QS als neuer antibakterieller Ansatz ein noch junges Gebiet und bleibt verfolgenswert. Von allen bekannten QS-Molekülen sind die AHL- und die AI-2-Derivate am intensivsten untersucht worden; es gibt umfassende Aufsätze über die Störung der Virulenzfaktor-Produktion durch die Hemmung der AHL- und AI-2-QS-Signalwege.<sup>[140]</sup> In unserer und in anderen Arbeitsgruppen haben die PQS- und Chinolon-Signalwege zuletzt einige Aufmerksamkeit erregt. Aus diesem Grund wird sich der nächste Abschnitt stärker auf der Vorteile der QS-Hemmung bei Signalen durch Chinolone und cyclische Peptide konzentrieren.

## 7.1. Chinolon-Quorum-Sensing

2-Heptyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolon (**40**), auch als *Pseudomonas*-Chinolonsignal (PQS) bezeichnet, ist ein QS-Molekül aus *P. aeruginosa*, das zuerst 1999 von Pesci et al. beschrieben wurde (Abbildung 21).<sup>[141]</sup> Bakterienarten der Gattung *Burkholderia* und *Alteromonas* produzieren auch Chinolone, allerdings wurde noch kein QS-Signalsystem (Rezeptorproteine) identifiziert.<sup>[142]</sup> Das Chinolon-Signalsystem von *P. aeruginosa* ist an der Regulation einer ganzen Reihe von Virulenz-Phänotypen beteiligt, darunter die Produktion von Elastase, Pyocyanin, Biofilmen, Pyoverdin und Membranvesikeln.<sup>[141,143]</sup> In diesem Organismus sind die *las*- und *rhl*-QS-Systeme, in denen AHLs als Signalsubstanzen wirken, auch mit dem PQS-Signalsystem verknüpft. Die Enzyme PqsA, PqsB, PqsC und PqsD, die im *pqsABCDE*-Operon kodiert sind, wandeln Anthranilsäure (**44**) in über 50 Alkylchinolone um, darunter 2-Heptyl-4(1H)-chinolon (HHQ, **41**), die Vorstufe in der Biosynthese von PQS (**40**; Abbildung 21).<sup>[144]</sup>

HHQ wird durch die Monooxygenase PqsH zu PQS oxidiert.<sup>[145]</sup> An PqsR gebunden geht PQS eine Wechselwirkung mit der *pqsA*-Promotorregion ein, wodurch die Transkription des *pqsABCDE*-Operons und die weitere Biosynthese von



**Abbildung 21.** Biosyntheseweg und positive Rückkopplungsschleife von Pqs. PhnA und PhnB sind für die Anthranilsäurebildung verantwortlich. PqsA ist eine Acyl-CoA-Ligase, die an der Anthranilsäureaktivierung beteiligt ist. PqsA, PqsB, PqsC und PqsD sind für die Biosynthese von HHQ und 50 weiteren Alkylchinolonen erforderlich, die von *P. aeruginosa* gebildet werden. PqsH oxidiert HHQ zu Pqs. Pqs bindet PqsR und regelt die Transkription des pqsABCDE-Operons und von phnA und phnB hoch, wodurch die weitere Biosynthese von Pqs und anderen Alkylchinolonen sichergestellt wird. In diesem Zusammenhang ist wichtig, dass HHQ PqsR binden kann und damit die Chinolon-Biosynthese und die Virulenz hochreguliert. Das Pqs-Signalsystem ist auch mit den las- und rhl-Signalsystemen verbunden (nicht im Diagramm gezeigt).

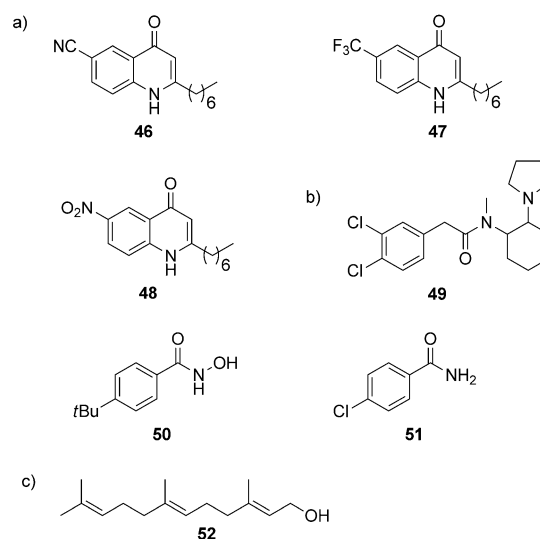
Pqs und Alkylchinolonen ausgelöst werden und eine positive Rückkopplungsschleife entsteht.<sup>[146]</sup> HHQ wird ebenfalls als Signalmolekül angesehen, denn es kann auch an PqsR binden und die Biosynthese der Alkylchinolone über die pqsA-Promotorregion hochregulieren.<sup>[146]</sup> Die genaue Funktion von PqsE ist zwar unbekannt, das Protein ist aber für die volle Virulenzbildung notwendig.<sup>[147]</sup> Es wurde auch vermutet, dass eine der Hauptfunktionen des Pqs-PqsR-Komplexes das Hochregulieren von PqsE für die Virulenzausprägung ist.<sup>[148]</sup>

## 7.2. Chinolon-Quorum-Quenching durch Modulation von PqsR

Auch wenn die Entdeckung von Pqs als Signalmolekül bereits über zehn Jahre zurückliegt, ist die gezielte Hemmung und Modulation des Pqs-Rezeptorproteins (PqsR) durch synthetische QS-Modulatorverbindungen ein relativ neues Arbeitsgebiet. Wir haben kürzlich die Entwicklung eines einfachen zweistufigen Verfahrens zur Generierung von Pqs-Analoga durch Mikrowellenbestrahlung veröffentlicht.<sup>[149]</sup> Diese Analoga wurden in einer Reihe von phänotypischen Tests auf ihre Fähigkeit untersucht, PqsR zu aktivieren, woraus sich Aussagen zur Struktur-Wirkungs-Beziehung der Pqs-PqsR-Wechselwirkung ableiten ließen.<sup>[150]</sup> Getestet wurden die Analoga auf die Stimulation der PqsR-abhängigen Transkription vom psqA-Promotor aus, der im *E. coli*-

Stamm DH5α auf dem Plasmid pEAL08-2 (konstruiert von Hogan et al.<sup>[151]</sup>) vorlag. Ein solcher heterologer Reportertest umgeht andere mögliche Komplikationen, die in *P. aeruginosa* auftreten können, und ermöglicht eine direktere Bestimmung der PqsR-Stimulation. Es stellte sich heraus, dass kleine Veränderungen in der Kettenlänge (Verlängerung/Verkürzung) die Aktivität des Agonisten kaum verringerten. Dagegen führten große Modifikationen wie die Einführung von Phenylsubstituenten an der Heptylkette oder das Ersetzen der Heptylkette durch eine Methylgruppe zu einer drastischen Abnahme oder einem vollständigen Verschwinden der agonistischen Aktivität. Die Einführung von Substituenten am Chinolonring beeinträchtigte die Agonistaktivität ebenfalls, vor allem bei stark elektronenschiebenden Gruppen. Eine auffällige kompetitive antagonistische Aktivität gegenüber PqsR wurde jedoch bei keinem der Pqs-Analoga beobachtet.

Lu et al. berichteten von den ersten kompetitiven PqsR-Antagonisten auf der Basis von HHQ-Analoga.<sup>[152]</sup> Sie hatten 30 HHQ-Analoga synthetisiert und im gleichen *E. coli*-Stamm getestet. Als Modifikationen waren Veränderungen der Heptylkette und die Einführung von Substituenten rund um den Chinolonring eingeführt worden. Drei der wirksamsten Antagonisten, **46**, **47** und **48** (Abbildung 22 a), enthielten stark elektronenziehende Gruppen an der Position 6 des Chinolons und hatten IC<sub>50</sub>-Werte von etwa 259, 54 bzw. 51 nM in Konkurrenz mit 50 nM Pqs. Mit den gleichen Substituenten an den Positionen 7 oder 8 des Chinolonrings nahm die antagonistische Aktivität stark ab. Dies verdeutlicht die Bedeutung der elektronischen Verhältnisse und der Position der Substituenten am Chinolonring



**Abbildung 22.** Veröffentlichte PqsR-Antagonisten: a) HHQ-Chinolonanaloga; b) K-Opioidrezeptor-Agonisten und fragmentbasierte Analoga; c) das natürliche Sesquiterpen Farnesol.



für die agonistische oder antagonistische Aktivität. In phänotypischen Virulenztests mit *P. aeruginosa* waren die Analoga **46** und **47** (Abbildung 22a) in der Lage, die Pyocyaninbildung im niedrigen  $\mu\text{M}$  Bereich zu hemmen; das Wachstum von *P. aeruginosa* wurde von den Antagonisten jedoch nicht beeinträchtigt. Aus dieser Untersuchung stammen die ersten synthetischen PqsR-Antagonisten, die von Chinolon-Signalmolekülen abgeleitet sind. Betrachtet man die Vielfalt der AHL- und AI-2-basierten Antagonisten, sollte diese Arbeit den Weg für zukünftige Chinolon-basierte QS-Inhibitoren ebnen.

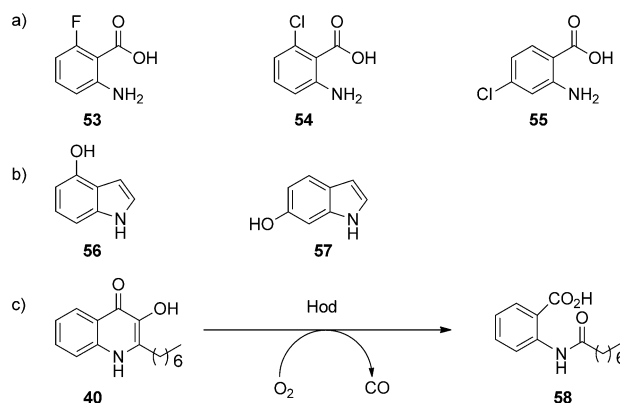
Klein et al. haben von der Synthese und der Identifizierung einer Reihe von Benzamid-Derivaten berichtet, die als PqsR-Antagonisten wirken.<sup>[153]</sup> Der K-Opioid-Rezeptoragonist (**49**; Abbildung 22b) beeinflusst die Transkription von *pqsABCDE* in *P. aeruginosa*. Die Autoren führten diesen Effekt auf die Hemmung von PqsR zurück, und in dem *E. coli*-Reporterstamm, der in früheren Untersuchungen verwendet worden war, wirkte **49** als moderater Antagonist. Klein et al. griffen zu einer rationalen Strategie, nach der sie **49** vereinfachten und in kleinere Fragmente und verwandte Analoga überführten. Mithilfe einer Kombination des *E. coli*-Reporterstamms mit biophysikalischen Techniken (Oberflächenplasmonresonanz (SPR) und isothermale Kalorimetrie (ITC)) identifizierten die Autoren eine kleine Zahl von PqsR-Antagonisten, darunter **50** und **51** (Abbildung 22b). Ortschaftsspezifische Mutagenese und ICT ergaben, dass die Reste Gln194 und Phe221 von PqsR erforderlich für die Antagonistenbindung sind. Antagonist **50** hatte einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $12.5 \mu\text{M}$  im *E. coli*-Reporterstamm und einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $23.6 \mu\text{M}$  für die Pyocyaninhemmung in *P. aeruginosa*. Zwar sind die  $\text{IC}_{50}$ -Werte höher als jene, die Lu et al. für ihre Antagonisten veröffentlicht haben, jedoch macht allein die Tatsache, dass diese Antagonisten kaum Ähnlichkeit mit HHQ oder QPS haben und dass es keine Kristallstruktur als Orientierung für die Strukturfindung gibt, diese Untersuchung zu einer bemerkenswerten Leistung.

Hogan und Mitarbeiter haben herausgefunden, dass die Zugabe des natürlichen Sesquiterpens Farnesol (**52**; Abbildung 22c) zu *P. aeruginosa* die Bildung von Pyocyanin und Alkylchinolon reduziert.<sup>[151]</sup> Die Verschiebung der elektrophoretischen Beweglichkeit der DNA lässt darauf schließen, dass Farnesol ähnlich wie PQS mit PqsR wechselwirkt und so die Transkription der *pqsA*-Promotorregion beeinträchtigt. Eine dosisabhängige Hemmung der PqsR-Bindung an die *pqsA*-Promotorregion wurde in Gegenwart von Farnesol beobachtet. Der langkettige Alkohol Dodecanol war inaktiv, während die Farnesolderivate Farnesylacetat und Geranylinalool zwar mäßig aktiv, aber nicht so wirksam waren wie Farnesol. Wichtig ist, dass diese Untersuchung die Bedeutung von Naturstoffen als potenziellen Quellen für künftige PqsR-Antagonisten beleuchtet.

### 7.3. Andere Hemmstrategien für das Chinolon-QS

Zusätzlich zur Hemmung von PqsR haben sich auch andere Ansätze für die Inhibition der Chinolon-Signalgebung als interessant erwiesen. Mehrere Arbeitsgruppen versuchten

sich an der Unterbrechung des PQS-Biosyntheseweges. Pesci und Mitarbeiter identifizierten Anthranilsäure als Vorstufe für die Biosynthese von PQS und anderen Alkylchinolonen durch *P. aeruginosa*.<sup>[154]</sup> Dabei stellte sich heraus, dass die Zugabe von Methylantranilsäure zu *P. aeruginosa*-Kulturen die Produktion von Alkylchinolon und dem Virulenzfaktor Elastase hemmt.<sup>[155]</sup> Die Autoren vermuteten, dass dies eine Folge der Biosynthesehemmung von PQS durch Methylantranilsäure sei, da die Synthese selbst über Anthranilsäure verläuft. In weiteren Untersuchungen von Lecis et al. wurden auch einige halogensubstituierte Anthranilsäurederivate, **53–55** (Abbildung 23a), gefunden, die PQS-Bildung und Viru-



**Abbildung 23.** Alternative Strategien zur Dämpfung des QS: a) Die substituierten Anthranilsäuren konkurrieren um die PqsA-Bindestelle, verhindern damit die Chinolonbiosynthese und verringern die Virulenz; b) von Indolen nimmt man an, dass sie den Tryptophanabbau und so die Anthranilsäurebildung kompetitiv hemmen; dadurch reduzieren sie die Alkylchinolonbiosynthese; c) das Enzym Hod baut PQS ab und bietet so einen alternativen enzymatischen Ansatz zur Hemmung des Chinolon-QS.

lenzausprägung in *P. aeruginosa* hemmten. Nicht alle halogenierten Anthranilsäurederivate waren aktiv; die Position des Halogensubstituenten war für die Hemmwirkung wichtig.<sup>[156]</sup> Die Autoren sammelten Indizien dafür, dass die substituierten Anthranilsäuren mit Anthranilsäure selbst um die Bindestelle von PqsA konkurrieren. In *P. aeruginosa*-infizierten Mäusen reduzierten die substituierten Anthranilsäuren die Virulenz und erhöhten die Überlebensraten; damit bestätigten sie das Konzept, die Chinolon-Signalgebung als mögliche neue antibakterielle Strategie zu verfolgen.

Indol sowie die Hydroxyindole **56** und **57** (Abbildung 23b) hemmen ebenfalls die Synthese von PQS, Pyocyanin, Pyoverdin und Rhamnolipid in *P. aeruginosa*.<sup>[157]</sup> Gleichzeitig steigern sie interessanterweise auch die Empfindlichkeit von *P. aeruginosa* für Antibiotika. In einer ähnlichen Untersuchung von Tasherio et al. mit Indol und substituierten Indolen zeigte sich, dass letztere auch die Bildung von Membranvesikeln unterdrücken können.<sup>[158]</sup> Auch wenn der genaue Mechanismus, nach dem Indol die Virulenz von *P. aeruginosa* hemmt, unbekannt ist, wird doch vermutet, dass die Anthranilsäurebildung beeinträchtigt wird, denn Indol kann den Abbau von Tryptophan zu Anthranilsäure stören.

Eine weitere interessante Strategie zur Hemmung des Chinolon-Quorum-Sensing ist der Einsatz Chinolon-abbauender Enzyme; ähnliche Strategien wurden auch auf die AHL-Signalmoleküle angewendet. Pultensy et al. glaubten, dass das Enzym Hod (1*H*-3-Hydroxy-4-oxochinaldin-2,4-dioxygenase) aus dem Bodenbakterium *Arthrobacter nitroguajacolicus* zum Abbau von PQS eingesetzt werden könnte (Abbildung 23c).<sup>[159]</sup> In natürlicher Umgebung katalysiert Hod den Abbau von 3-Hydroxy-2-methyl-4(1*H*)-chinolon zu *N*-Acetylanthranilsäure und Kohlenmonoxid. Hod kann PQS zu *N*-Octanoylanthranilsäure spalten und verringert damit die Bildung von PQS, Pyocyanin und Rhamnolipid in *P. aeruginosa*. Die Spaltung von Hod durch extrazelluläre Proteasen von *P. aeruginosa* und die Hemmung durch HHQ reduzierten allerdings die Wirksamkeit von Hod. Dennoch ist der enzymatische Abbau von Chinolon-Signalmolekülen ein vielversprechender Ansatz.

#### 7.4. Antibiotische Aktivität von Chinolon-Quorum-Sensing-Molekülen

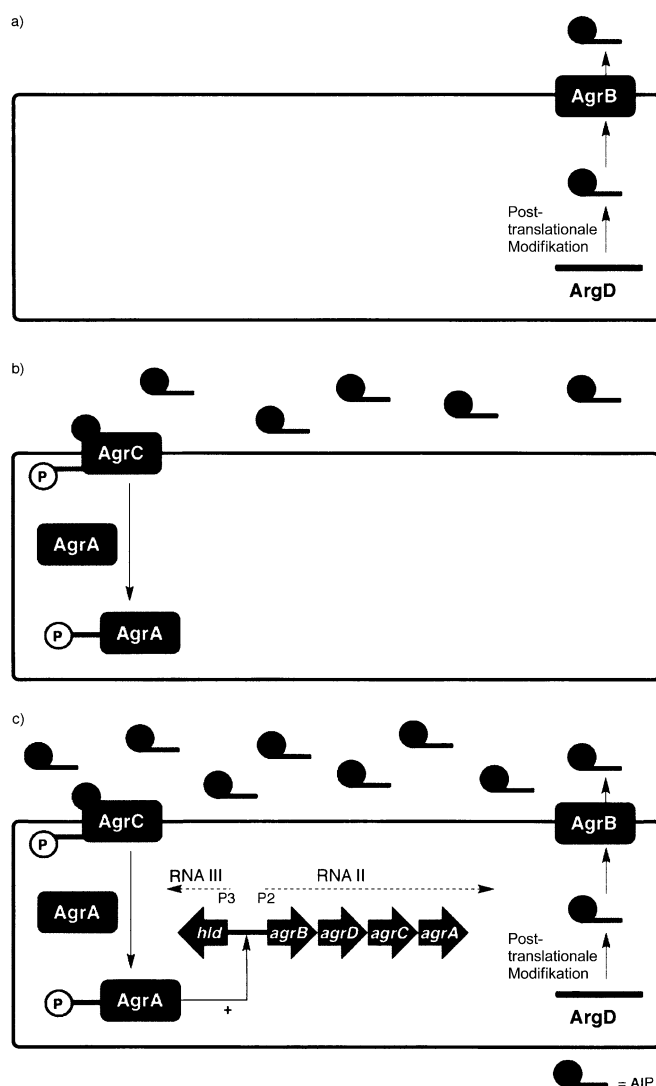
Obwohl PQS und HHQ in erster Linie als Signalmoleküle angesehen werden, haben neuere Untersuchungen auch die antibiotische Aktivität beider Moleküle gegen manche Bakterienarten thematisiert. Von den Chinolonen von *P. aeruginosa* ist die antibakterielle Aktivität seit den 1950er Jahren bekannt.<sup>[160]</sup> Die antibiotische Aktivität von PQS und HHQ wurde allerdings erst vor wenigen Jahren entdeckt. Diese zweifache Eigenschaft ist nicht ungewöhnlich für QS-Signalmoleküle, auch die Abbauprodukte von AHLs (Tetramsäuren) sind antibiotisch sehr wirksam.<sup>[161]</sup> Toyofuku et al. wiesen nach, dass PQS das Wachstum verschiedener Gram-positiver und -negativer Bakterien unterdrückt.<sup>[162]</sup> In dieser Untersuchung zeigten Bakterienarten, die während des Wachstums PQS ausgesetzt wurden, eine verlängerte lag-Phase und verringerte Wachstumsgeschwindigkeit. Der Grad der Hemmung variiert mit der Bakterienart. Die Autoren bemerkten, dass dieser Effekt auf das Wachstum nicht vergleichbar war mit dem traditioneller bakteriostatischer oder bakteriolytischer Antibiotika; stattdessen verursachte PQS ein langsames Wachstum. Bei einigen Bakterienarten war auch der Sauerstoffverbrauch beeinträchtigt, was der Auslöser für die Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit sein könnte. Die Zugabe von Eisen verhinderte ebenfalls die Wachstumsverlangsamung; dies ist jedoch vermutlich Folge der Bildung des PQS-Fe-Chelatkomplexes, der das PQS inaktiviert.

Reen et al. haben über die antibakteriellen Effekte von HHQ berichtet, das ein wirksames Bakteriostaticum gegen verschiedene Gram-negative Arten ist, darunter die humanpathogenen *Vibrio cholerae* und *Vibrio vulnificus* bei 10  $\mu\text{M}$ .<sup>[163]</sup> HHQ und PQS hemmen auch die Bakterienbeweglichkeit, die in *E. coli* und *S. aureus* mit der Virulenzausprägung assoziiert ist. *Burkholderia* und *Alteromonas* spp. bilden ebenfalls über 50 Chinolone wie *P. aeruginosa*. Diese Untersuchungen verdeutlichen, dass die Signalmoleküle zusätzlich zu ihrem Potenzial zur Signalmodulation auch immer auf ihre antibakterielle Aktivität getestet werden sollten.

#### 7.5. Autoinduktor-Peptid-Signalgebung in Gram-positiven Bakterien

Eine Reihe Gram-positiver Bakterien nutzt Oligopeptide als QS-Signale; diese werden meist als Autoinduktorpeptide (AIPs) bezeichnet. Wegen der klinischen Relevanz ist das am besten untersuchte AIP-Signalsystem das von *S. aureus*. Die AIPs werden ribosomal als Propeptide (AgrD) synthetisiert. Nach posttranslationaler Modifikation wird das AIP in aktiver Form von einem membranassoziierten Transportprotein (AgrB) in den extrazellulären Raum exportiert (Abbildung 24).<sup>[164]</sup>

Bakterienzellen registrieren die AI-Peptide mit einem System aus zwei Komponenten: einem Rezeptor und einem intrazellulären, die Reaktion regulierenden Protein (AgrA).



**Abbildung 24.** Der AIP-Signalsystem in *S. aureus*. a) Das Propeptid (AgrD) wird posttranslational modifiziert und von AgrB aus der Zelle exportiert. b) Wenn der Schwellenwert erreicht ist, bindet das AIP an den Rezeptor AgrC, der dann AgrA phosphoryliert. c) AgrA wirkt dadurch als Transkriptionsaktivator und aktiviert die Gene, die für die weitere AIP-Biosynthese (über RNA II) und die Steigerung der Virulenz (über RNA III) verantwortlich sind.

Als Rezeptor fungiert ein membranassoziertes Histidinkinaseprotein (AgrC).<sup>[165]</sup> Bei einem kritischen Schwellenwert von AIP bindet dieses AgrC und löst eine Autophosphorylierung und die nachfolgende Phosphorylierung von AgrA aus.<sup>[165]</sup> AgrA wirkt als Transkriptionsregulator, der die Transkription der Gene für die AIP-Biosynthese und die Virulenzausprägung aktiviert.<sup>[166]</sup> Zu den Virulenzphänotypen, die durch das AIP-Signalsystem reguliert werden, gehören unter anderen extrazelluläre Toxine, Zelloberflächen-Adhäsionsfaktoren, gewebeabbauende Enzyme und Exoproteine.<sup>[167]</sup> Anders als die AHL-Signalsysteme in Gram-negativen Bakterien, die meist speziesspezifisch sind, hat *S. aureus* ein AIP-Signalsystem mit vier unterschiedlichen Autoinduktorpeptiden (I–IV, **59–62**) entwickelt (Abbildung 25).<sup>[168]</sup> Unterschiedliche *S. aureus*-Stämme nutzen eines der vier verschiedenen AIP-Signalsysteme; so würde AIP-II (**60**) einen speziellen AgrC-Rezeptor in einem spezifischen *S. aureus*-Stamm, in diesem

Fall Agr-II, aktivieren, um die Signalkaskade zu induzieren. Die vier AIP-Signalmoleküle von *S. aureus* sind 7–9 Aminosäuren lang und bestehen aus einem N-terminalen Schwanz und einem Thiolactonmakrocyclus (Abbildung 25).

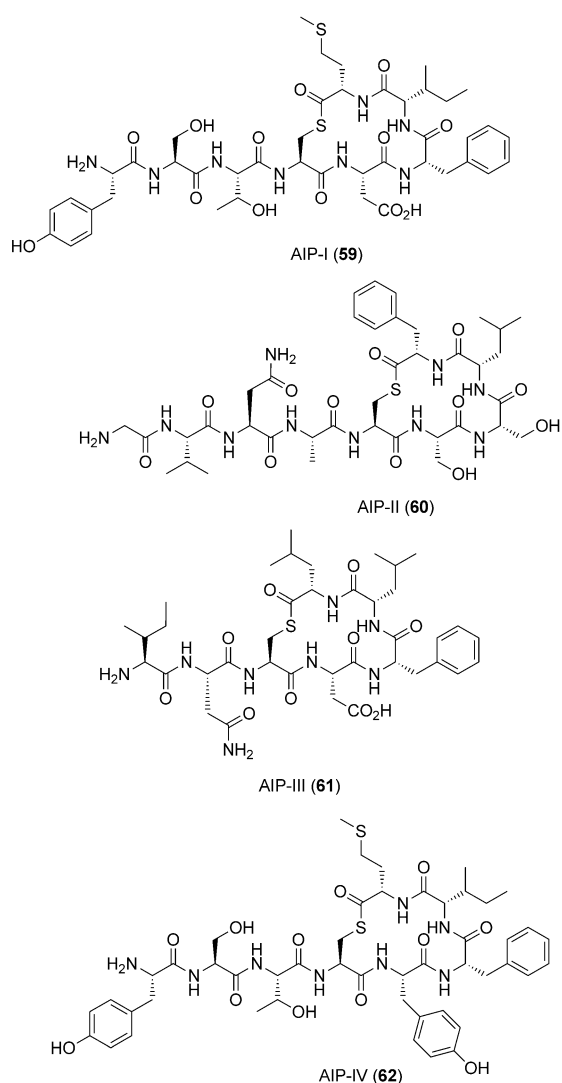
#### 7.6. Hemmung des Quorum-Sensing durch Modulation von AgrC

Die Hemmung von AgrC würde die weitere Biosynthese der AIPs ebenso verhindern wie die Initiation der Virulenzfaktorsynthese; daher ist dies ein mögliches Ziel für neue antibakterielle Therapien. Natürliche AIPs können starke Hemmwirkung auf andere, nicht verwandte AgrC-Rezeptoren, sog. Kreuzinhibition, aufweisen.<sup>[168,169]</sup> So kann AIP-I AgrC-II und AgrC-III hemmen, während AIP-II AgrC-I und AgrC-III hemmt. Untersuchungen an Mäusen, die mit *S. aureus*, Typ I, infiziert waren, ergaben eine Abschwächung der Infektion durch Behandlung mit AIP-II; dies deutet auf das Potenzial einer Hemmung des AIP-Signalsystems als neue antibakterielle Strategie hin.<sup>[169]</sup> Viele Studien zur Struktur-Wirkungs-Beziehung von AIP-Analoga auf verwandte und nichtverwandte AgrC-Rezeptoren wurden durchgeführt, und die meisten in der Literatur veröffentlichten AgrC-Inhibitoren sind von AIP-Analoga abgeleitet.<sup>[169,170]</sup> Auch wenn verschiedene Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen jedem AIP und AgrC-Rezeptor gefunden wurden, lassen sich folgende allgemeine Tendenzen ausmachen:<sup>[171]</sup>

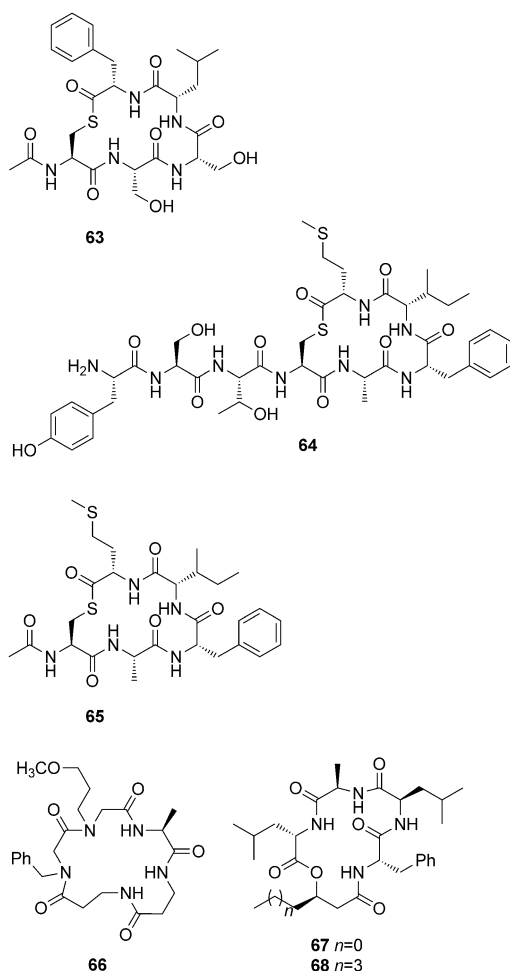
- 1) Lineare, nichtcyclische AIP-Peptidderivate sind inaktiv.
- 2) Ersetzt man die Thiolactonbindung durch eine Lacton- oder Lactambindung, nimmt die agonistische Aktivität gegenüber verwandten Rezeptoren drastisch ab, wobei solche Analoga noch die antagonistische Aktivität behalten können.
- 3) Die Modifikation der Aminosäuren am linearen Ende reduziert die agonistische Aktivität stark, die antagonistische Aktivität kann jedoch erhalten bleiben.
- 4) Die Modifikation von Resten innerhalb des Makrocyclus beeinträchtigt die agonistische und die antagonistische Aktivität.

Wohl einer der vielversprechendsten Fortschritte der letzten Zeit war die Identifizierung eines wirkungsvollen AgrC-Antagonisten durch Novick et al.<sup>[172]</sup> Die Autoren synthetisierten ein verkürztes Analogon von AIP-II **63** (Abbildung 26), das alle vier AgrC-Rezeptoren effizient hemmt. Die Toxinbildung in *S. aureus* wurde mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 10 nM unterdrückt. In Folgeuntersuchungen wurden in einer Parallelsynthese zehn Analoga mit einer neuen Linker-Strategie für Fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)-basierte Thioester hergestellt.<sup>[170a]</sup> Die Cystein-, Leucin- und Phenylalaninreste von **63** erwiesen sich als essenziell für die Hemmwirkung.

AIP-I und AIP-IV unterscheiden sich in einer Aminosäure im Makrocyclus: Das Aspartat von AIP-I ist in AIP-IV durch Tyrosin ersetzt. Lyon et al. synthetisierten drei AIP-I- und AIP-IV-Analoga, bei denen die Schlüsselaminosäure verändert wurde, mit dem Ziel, die Struktur-Wirkungs-Beziehung, die für die unterschiedliche Aktivität von AIP-I und AIP-IV gegenüber AgrC-I und AgrC-IV verantwortlich ist,



**Abbildung 25.** Chemische Strukturen der vier AIP-Signalsubstanzen aus *S. aureus*. AIP-I und AIP-IV unterscheiden sich nur in einer Aminosäure, haben aber unterschiedliche Rezeptoren AgrC-I bzw. AgrC-IV. Die Aminosäuresequenzen sind: Typ I YSTCDFIM, Typ II GVNACSSLF, Typ III INCDFLL, Typ IV YSTCYFIM.



**Abbildung 26.** Aktuell veröffentlichte Agr-modulierende Verbindungen. **63–65** sind wirksame Antagonisten von AgrC I–IV. **66** beeinflusst die Biofilmbildung in *S. aureus* und kann vermutlich Agr modulieren. Die Solonamide A und B (**67** und **68**) hemmen die Virulenz von *S. aureus* ohne das Wachstum zu beeinträchtigen; wegen ihrer AIP-ähnlichen Struktur vermutet man, dass sie AgrC hemmen.

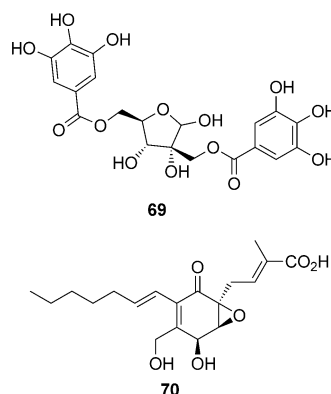
zu verstehen.<sup>[170e]</sup> Das Analogon **64**, bei dem das Aspartat von AIP-I durch Alanin ersetzt wurde, zeigte eindrucksvolle  $IC_{50}$ -Werte von 5, 8, 0,3 und 3 nM gegen AgrC I, II, III bzw. IV (Abbildung 26).

Williams und Mitarbeiter identifizierten die Minimalstruktur von AIP-I, die für die antagonistische Aktivität gegen alle *S. aureus*-AgrC-Varianten erforderlich ist.<sup>[173]</sup> Das AIP-Analogon **65** hatte  $IC_{50}$ -Werte von 5, 5, 0,1 und 5 nM gegen AgrC I, II, III bzw. IV (Abbildung 26).<sup>[173]</sup> Blackwell et al. gingen vom Peptidgerüst **65** aus, um eine Serie von Peptid-Peptoid-Hybriden (Peptomere) zu synthetisieren, mit denen das AgrC-AIP-Signalsystem moduliert werden sollte.<sup>[174]</sup> Das in der Untersuchung hergestellte Analogon **66** zeigte sich auch wirksam in der Modulation der Biofilmbildung bei *S. aureus*. Obwohl keine Antagonisten identifiziert wurden, ist die einfache Synthese solcher Peptomere eine vielversprechende Alternative zu den langwierigen Synthesewegen zu AIP-Analoga. Auch Naturstoffe haben sich als Quelle für die AIP-Signalhemmung erwiesen. So haben

Larsen et al. kürzlich zwei Naturstoffe, Solonamid A und B (**67** und **68**), aus marinen Photobakterien isoliert, die die *agr*-Regulation in Reportergentests hemmen.<sup>[175]</sup> Zwar ist das genaue Ziel der Naturstoffe unbekannt, allerdings weist die Strukturähnlichkeit mit den AIP-Signalmolekülen darauf hin, dass die Solonamide AgrC-Antagonisten sein könnten.

### 7.7. Andere Strategien zur Hemmung des QS durch AIPs

Balaban und Mitarbeiter haben nachgewiesen, dass der Naturstoff Hamamelitannin (**69**) MRSA-Infektionen in vivo hemmt, ohne das Wachstum zu beeinträchtigen, was für eine QS-Hemmung durch Hamamelitannin spricht (Abbildung 27).<sup>[176]</sup> Hamamelitannin, das aus der Rinde von *Hamamelis virginia* isoliert wurde, hemmt auch RNA III und



**Abbildung 27.** Die Naturstoffe Hamamelitannin (**69**) und Ambuinsäure (**70**). Hamamelitannin reduziert die Produktion von RNA III und die Virulenz. Ambuinsäure hemmt die AIP-Biosynthese.

reduziert die Produktion von Virulenzfaktoren. Der genaue Wirkungsmechanismus ist unbekannt, die Autoren vermuten jedoch, dass Hamamelitannin nicht AgrC hemmt, sondern zelluläre Vorgänge oberhalb der *agr*-Signale beeinflusst. Es sind weitere mechanistische Untersuchungen notwendig, da solche Studien zu neuen Strategien gegen QS in *S. aureus* führen könnten. Ambuinsäure (**70**) reduziert die Expression der *agr*-Gene in *S. aureus* (Abbildung 27).<sup>[177]</sup> Die Autoren nehmen als Wirkmechanismus eine Hemmung der AIP-Biosynthese an, denn die AIP-Produktion wird unterdrückt; das genaue Angriffsziel ist allerdings unbekannt. Die Virulenz wird ebenfalls beeinflusst, aber die Autoren wiesen auf die Notwendigkeit hin, in weiteren Untersuchungen wirksamere Inhibitoren herzustellen.

Janda und Mitarbeiter haben einen weiteren Ansatz zur Hemmung des AIP Quorum Sensing eingeführt, den Einsatz von AIP-Antikörpern.<sup>[178]</sup> Die Autoren entwickelten eine rationale Synthese eines Haptens auf Basis von AIP-IV, um damit eine Immunantwort in Mäusen zu induzieren. Das Hapten enthielt eine Lactonbindung anstelle der natürlichen Thiolactonbindung in den AIPs, weil die Autoren besonders an dem Thiolacton eine Aminolyse und die Bildung unerwünschter Abbauprodukte während des Immunisierungs-



prozesses erwarteten. Der erhaltene Antikörper (AP4-24h11) konnte die Produktion von Virulenzfaktoren in *S. aureus* verringern und hemmte die Abszessbildung durch *S. aureus* in Mäusen. AP4-24h11 hatte auch eine hohe Bindungsaffinität zu AgrC-IV, die auch für das Peptid spezifisch war. Solche immunpharmakotherapeutischen Strategien könnten eine ausgezeichnete Alternative oder Ergänzung zu rezeptorbasierten Antagonisten sein.

## 8. Zusammenfassung und Ausblick

Antibiotikaresistenzen sind in den letzten Jahrzehnten zu einem wichtigen Thema geworden, vor allem, weil die Entwicklung neuer Antibiotika offenbar fast zum Erliegen gekommen ist. Wie dieser Aufsatz gezeigt hat, ist nicht alles verloren. Es gibt viele aktive Forschungsrichtungen, um die nächste Generation antibakterieller Wirkstoffe zu entwickeln. Die Suche nach neuen Antibiotika, die effizienter sind und bakterielle Resistenzmechanismen überwinden können, geht weiter, sowohl in Forschungseinrichtungen als auch in kleinen und mittleren Biotechnologieunternehmen, aber auch mit erneuertem Interesse in großen pharmazeutischen Unternehmen. Vor kurzem identifizierte Naturstoffe und Produkte, die sich auf modifizierte Formen vorhandener Antibiotikaklassen zurückführen lassen, haben sich als vielversprechende Substanzen erwiesen. Erste Arbeiten zur Kombination von zwei aktiven Antibiotika in einer Hybridverbindung haben das Potenzial aufgezeigt, mit diesem Ansatz teilweise die Resistenzmechanismen zu überwinden. Ein weiteres Feld mit enormem Potenzial ist die Entwicklung antimikrobieller Peptide und Peptidmimetika. Diese wirken nach allgemeiner Ansicht auf viele Zielstrukturen und verringern dadurch möglicherweise die Geschwindigkeit für die Entwicklung von Resistenzen. Außer den in diesem Aufsatz diskutierten Verfahren werden zahlreiche weitere Ansätze getestet, um damit die Resistenzbildung gegen Antibiotika möglicherweise zu überwinden. Dazu gehören auch die Modulation oder Stimulation der Immunantwort,<sup>[179]</sup> Kombinationstherapien und die erneute Entwicklung patentfreier Wirkstoffe oder verworfener Wirkstoffkandidaten.

Der Hauptanteil von auf dem Markt oder in der klinischen Entwicklung befindlichen Antibiotika ist gegenwärtig nur gegen eine kleine Zahl biologischer Ziele gerichtet. Mit zunehmender Resistenz gegen die Substanzen, die gegen diese wenigen Wirkorte gerichtet sind, entsteht auch ein dringender Bedarf für die Suche nach neuen Zielstrukturen. Die Identifizierung neuer biologischer Wirkorte und Ansätze, die zu Antibiotika führen, die mit neuen Wirkmechanismen gegen Vorgänge wie bakterielle Biosynthesen oder essenzielle Stoffwechselwege gerichtet sind oder die Membranfunktion<sup>[180]</sup> oder die Zellwandsynthese stören, sind entscheidende und aktiv bearbeitete Forschungsfelder. Ein interessantes Beispiel ist die Entdeckung des neuen Ziels FabF 1B, das an der Lipidbiosynthese beteiligt ist.<sup>[181]</sup> Man hofft, dass sich gegen Substanzen mit neuem Wirkmechanismus Resistenzen langsamer entwickeln, doch könnte das aus evolutionärer Sicht eine naive Vorstellung sein. Das Quorum Sensing könnte ein physiologischer Vorgang sein, der eine

Reihe neuer Angriffsziele für antibakterielle Substanzen bietet.

Anders als die zahlreichen Strategien zur Hemmung des AHL-QS sind analoge Strategien bei AIP- und Chinolon-QS noch weitgehend unerschlossen. PqsR-Antagonisten sind selten, es besteht Bedarf an weiteren Verbindungen, an Hemmstoffen für Chinolone und andere. Chinolonanaloga sollten sich als Verbindungen mit sehr interessanten biologischen Aktivitäten erweisen hinsichtlich der Aktivierung von PqsR und der Hemmung von Bakterien sowie der Bildung von Membranvesikeln und der Beteiligung an der Signalgebung zwischen verschiedenen Arten. Ein anderer Vorteil von Chinolonanaloga ist, dass Chinolonantibiotika (wie Ciprofloxacin) bereits als Wirkstoffe eingesetzt werden. Es könnte also sein, dass QS-Hemmstoffe, die antibakteriell wirken und günstige pharmakokinetische Eigenschaften haben, entwickelt werden können. Auch andere Angriffspunkte für die Dämpfung des Chinolon-QS müssen noch untersucht werden. Zu diesen könnten PqsB, PqsC, PqsD und vielleicht PqsE gehören. Die Synthese von AIP-Analoga und die Modulation der AgrC-Rezeptoren durch diese Verbindungen sind in der Literatur gut beschrieben. Ansonsten gibt es nur noch wenige Möglichkeiten, das AIP-QS zu unterdrücken, und die spezifischen Wirkorte sind oft unbekannt. Hemmstoffe für andere Ziele des AIP-QS-Signalweges müssen ebenfalls weiter bearbeitet werden. Dazu könnten Kinase-Inhibitoren für AgrC, die Hemmung des Exportes von AIPs über AgrB und die Hemmung der Enzyme, die an der posttranslationalen Modifikation von AgrD beteiligt sind, gehören. Solche Strategien sollten zu neuen QS-Inhibitoren führen und bieten eine aussichtsreiche Perspektive für die Zukunft.

Eingegangen am 13. Dezember 2012,  
veränderte Fassung am 25. Februar 2013  
Online veröffentlicht am 5. September 2013

Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] N. C. Lloyd, H. W. Morgan, B. K. Nicholson, R. S. Ronimus, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 963–966; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 941–944.
- [2] J. Davies, *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2006**, *17*, 287–290.
- [3] C. Walsh, *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1*, 65–70.
- [4] P. Fernandes, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1497–1503.
- [5] S. Rachakonda, L. Cartee, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 775–793.
- [6] a) H. Kresse, M. J. Belsey, H. Rovini, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 19–20; b) S. J. Projan, P. A. Bradford, *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, *10*, 441–446.
- [7] a) S. J. Projan, D. M. Shlaes, *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**, *10*, 18–22; b) B. Spellberg, J. H. Powers, E. P. Brass, L. G. Miller, J. E. Edwards, Jr., *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *38*, 1279–1286; c) M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Science* **2009**, *325*, 1089–1093.
- [8] a) R. C. Moellering, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *37*, 2–9; b) D. Jabes, *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, *14*, 564–569.
- [9] a) H. Neu, *Science* **1992**, *257*, 1064–1073; b) A. Coates, Y. Hu, R. Bax, C. Page, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 895–910; c) M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, J. J. Collins, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 423–435.
- [10] G. D. Wright, *Nat. Rev. Microbiol.* **2007**, *5*, 175–186.
- [11] M. N. Alekshun, S. B. Levy, *Cell* **2007**, *128*, 1037–1050.

- [12] S. G. B. Amyes, J. T. Smith, *J. Gen. Microbiol.* **1978**, *107*, 263–271.
- [13] a) D. M. Livermore, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 457–470; b) F. Van Bambeke, E. Balzi, P. M. Tulkens, *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 457–470.
- [14] a) R. B. Sykes, M. Matthew, *J. Antimicrob. Chemother.* **1976**, *2*, 115–157; b) G. A. Jacoby, A. A. Medeiros, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1991**, *35*, 1697–1704; c) J. Davies, D. Davies, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 417–433.
- [15] I. M. Gould, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *34*, S2–S5.
- [16] V. M. D'Costa et al., *Nature* **2011**, *477*, 457–461.
- [17] a) G. D. Wright, H. Poinar, *Trends Microbiol.* **2012**, *20*, 157–159; b) R. H. Baltz, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, *8*, 557–563.
- [18] a) A. E. Clatworthy, E. Pierson, D. T. Hung, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 541–548; b) S. R. Palumbi, *Science* **2001**, *293*, 1786–1790.
- [19] European Centre for Disease Prevention and Control., Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm, ECDC; **2012**.
- [20] J. Clardy, M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1541–1550.
- [21] B. Bister, D. Bischoff, M. Ströbele, J. Riedlinger, A. Reicke, F. Wolter, A. T. Bull, H. Zähler, H.-P. Fiedler, R. D. Süssmuth, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 2628–2630; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 2574–2576.
- [22] J. Riedlinger et al., *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 271–279.
- [23] I. A. MacNeil et al., *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *3*, 301–308.
- [24] A. T. Bull, A. C. Ward, M. Goodfellow, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 573–606.
- [25] J. T. Staley, A. Konopka, *Annu. Rev. Microbiol.* **1985**, *39*, 321–346.
- [26] K. Lewis, S. Epstein, A. D'Onofrio, L. L. Ling, *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 468–476.
- [27] T. Kaerberlein, K. Lewis, S. S. Epstein, *Science* **2002**, *296*, 1127–1129.
- [28] S. C. Wenzel, R. Muller, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 594–606.
- [29] C. Gustafsson, S. Govindarajan, J. Minshull, *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 346–353.
- [30] R. H. Lambalot, A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla, C. T. Walsh, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 923–936.
- [31] M. Jin, L. Liu, S. A. I. Wright, S. V. Beer, J. Clardy, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3004–3007; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2898–2901.
- [32] a) R. Daniel, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 199–204; b) F. Lefevre, P. Robe, C. Jarrin, A. Ginolhac, C. Zago, D. Auriol, T. M. Vogel, P. Simonet, R. Nalin, *Res. Microbiol.* **2008**, *159*, 153–161; c) B. K. Singh, C. A. Macdonald, *Drug Discovery Today* **2010**, *15*, 792–799.
- [33] J. J. Banik, S. F. Brady, *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, *13*, 603–609.
- [34] J. Handelsman, M. R. Rondon, S. F. Brady, J. Clardy, R. M. Goodman, *Chem. Biol.* **1998**, *5*, R245–R249.
- [35] S. F. Brady, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12903–12904.
- [36] S. F. Brady, J. Clardy, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 7225–7227; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 7063–7065.
- [37] D. E. Gillespie, S. F. Brady, A. D. Bettermann, N. P. Cianciotto, M. R. Liles, M. R. Rondon, J. Clardy, R. M. Goodman, J. Handelsman, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 4301–4306.
- [38] H. Budzikiewicz, H. Eckau, M. Ehrenber, *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 3807–3810.
- [39] R. Schmieder, R. Edwards, *Future Microbiol.* **2012**, *7*, 73–89.
- [40] a) O. McAuliffe, R. P. Ross, C. Hill, *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, *25*, 285–308; b) C. Chatterjee, M. Paul, L. Xie, W. A. van der Donk, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 633–683; c) J. M. Willey, W. A. van der Donk, *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 477–501.
- [41] H. Wang, W. A. van der Donk, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1529–1535.
- [42] N. Schnell, K.-D. Entian, U. Schneider, F. Götz, H. Zähler, R. Kellner, G. Jung, *Nature* **1988**, *333*, 276–278.
- [43] a) L. Vértessy, W. Aretz, A. Bonnefoy, E. Ehlers, M. Kurz, A. Markus, M. Schiell, M. Vogel, J. Wink, H. Kogler, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 730–741; b) Y. Shi, A. Bueno, W. A. van der Donk, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10966–10968.
- [44] S. Boakes, A. N. Appleyard, J. Cortes, M. J. Dawson, *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 351–358.
- [45] S. W. Fuchs, T. W. Jaskolla, S. Bochmann, P. Kotter, T. Wichelhaus, M. Karas, T. Stein, K.-D. Entian, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 1698–1707.
- [46] B. Krawczyk, G. H. Voller, J. Voller, P. Ensle, R. D. Süssmuth, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2065–2071.
- [47] W. Tang, W. A. van der Donk, *Biochemistry* **2012**, *51*, 4271–4279.
- [48] G. H. Voller, J. M. Krawczyk, A. Pesic, B. Krawczyk, J. Nachtigall, R. D. Süssmuth, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1174–1183.
- [49] K. Meindl et al., *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 1169–1173; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1151–1154.
- [50] G. S. Crowther, S. D. Baines, S. L. Todhunter, J. Freeman, C. H. Chilton, M. H. Wilcox, *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 168–176.
- [51] F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Haebeich, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5194–5254; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072–5129.
- [52] a) J. M. Ghuysen, *Trends Microbiol.* **1994**, *2*, 372–380; b) C. Goffin, J. M. Ghuysen, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, *62*, 1079–1093.
- [53] M. G. Page, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2004**, *13*, 973–985.
- [54] J. B. Laudano, *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, *66*, iii11–iii18.
- [55] a) A. F. Widmer, *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46*, 656–658; b) P. Hebeisen, I. Heinze-Krauss, P. Angehrn, P. Hohl, M. G. P. Page, R. L. Then, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 825–836; c) Y. P. Chong, S. J. Park, H. S. Kim, E. S. Kim, M. N. Kim, S. H. Kim, S. O. Lee, S. H. Choi, J. Y. Jeong, J. H. Woo, Y. S. Kim, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, *73*, 264–266.
- [56] a) L. D. Saravolatz, G. E. Stein, L. B. Johnson, *Clin. Infect. Dis.* **2011**, *52*, 1156–1163; b) T. Ishikawa et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *11*, 2427–2437.
- [57] a) B. Guignard, J. M. Entenza, P. Moreillon, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, *5*, 479–489; b) K. Kosowska-Shick, P. L. McGhee, P. C. Appelbaum, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 1670–1677; c) M. G. Pinho, H. de Lencastre, A. Tomasz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10886–10891.
- [58] G. J. Noel, K. Bush, P. Bagchi, J. Ianus, R. S. Strauss, *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46*, 647–655.
- [59] A. L. Lovering, M. C. Gretes, S. S. Safadi, F. Danel, L. de Castro, M. G. P. Page, N. C. J. Strynadka, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 32096–32102.
- [60] L. I. Llarrull, J. F. Fisher, S. Mobashery, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 4051–4063.
- [61] A. Villegas-Estrada, M. Lee, D. Heseck, S. B. Vakulenko, S. Mobashery, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9212–9213.
- [62] K. C. Nicolaou, C. N. C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 2230–2287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2096–2152.
- [63] P. Courvalin, *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, S25–S34.
- [64] a) D. H. Williams, B. Bardsley, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1264–1286; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1172–1193; b) D. Kahne, C. Leimkuhler, W. Lu, C. Walsh, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 425–448.

- [65] B. Perichon, P. Courvalin, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, 4580–4587.
- [66] a) T. D. H. Bugg, G. D. Wright, S. Dutka-Malen, M. Arthur, P. Courvalin, C. T. Walsh, *Biochemistry* **1991**, 30, 10408–10415; b) C. C. McComas, B. M. Crowley, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9314–9315.
- [67] R. C. James, J. G. Pierce, A. Okano, J. Xie, D. L. Boger, *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 797–804.
- [68] B. M. Crowley, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2885–2892.
- [69] a) J. Xie, J. G. Pierce, R. C. James, A. Okano, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 13946–13949; b) J. Xie, A. Okano, J. G. Pierce, R. C. James, S. Stamm, C. M. Crane, D. L. Boger, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 1284–1297.
- [70] a) J. P. Mackay, U. Gerhard, D. A. Beauregard, D. H. Williams, M. S. Westwell, M. S. Searle, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4581–4590; b) D. H. Williams, A. J. Maguire, W. Tsuzuki, M. S. Westwell, *Science* **1998**, 280, 711–714; c) K. C. Nicolaou, R. Hughes, S. Y. Cho, N. Winssinger, C. Smethurst, H. Labischinski, R. Endermann, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 3981–3986; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3823–3828.
- [71] N. E. Allen, D. L. LeTourneau, J. N. Hobbs, *J. Antibiot.* **1997**, 50, 677–684.
- [72] T. I. Nicas, D. L. Mullen, J. E. Flokowitsch, D. A. Preston, N. J. Snyder, R. E. Stratford, R. D. G. Cooper, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, 2585–2587.
- [73] a) T. I. Nicas, D. L. Mullen, J. E. Flokowitsch, D. A. Preston, N. J. Snyder, M. J. Zweifel, S. C. Wilkie, M. J. Rodriguez, R. C. Thompson, R. D. Cooper, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40, 2194–2199; b) M. E. Rupp, P. D. Fey, G. M. Longo, *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, 47, 705–707.
- [74] N. E. Allen, T. I. Nicas, *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, 26, 511–532.
- [75] J. M. Streit, T. R. Fritsche, H. S. Sader, R. N. Jones, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, 48, 137–143.
- [76] a) A. Leighton, A. B. Gottlieb, M. B. Dorr, D. Jabes, G. Mosconi, C. VanSaders, E. J. Mroczak, K. C. M. Campbell, E. Kelly, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 940–945; b) A. Y. Chen, M. J. Zervos, J. A. Vazquez, *Int. J. Clin. Pract.* **2007**, 61, 853–863.
- [77] J. K. Judice, J. L. Pace, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 4165–4168.
- [78] a) D. L. Higgins et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 1127–1134; b) C. S. Lunde, S. R. Hartouni, J. W. Janc, M. Mammen, P. P. Humphrey, B. M. Benton, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, 3375–3383.
- [79] N. H. Georgopapadakou, A. Bertasso, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37, 559–565.
- [80] a) G. T. Robertson, E. J. Bonventre, T. B. Doyle, Q. Du, L. Duncan, T. W. Morris, E. D. Roche, D. Yan, A. S. Lynch, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 2313–2323; b) G. T. Robertson, E. J. Bonventre, T. B. Doyle, Q. Du, L. Duncan, T. W. Morris, E. D. Roche, D. Yan, A. S. Lynch, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 2324–2334.
- [81] a) C. Zhi, Z.-Y. Long, J. Gambino, W.-C. Xu, N. C. Brown, M. Barnes, M. Butler, W. LaMarr, G. E. Wright, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 2731–2739; b) C. Zhi et al., *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 7063–7074.
- [82] a) M. M. Butler et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, 51, 119–127; b) C. X. Zhi et al., *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 1455–1465.
- [83] V. Pokrovskaya, V. Belakhov, M. Hainrichson, S. Yaron, T. Baasov, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 2243–2254.
- [84] S. Magnet, J. S. Blanchard, *Chem. Rev.* **2005**, 105, 477–498.
- [85] R. C. Hider, X. Kong, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, 27, 637–657.
- [86] C. Ji, R. E. Juarez-Hernandez, M. J. Miller, *Future Med. Chem.* **2012**, 4, 297–313.
- [87] C. Ji, P. A. Miller, M. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9898–9901.
- [88] M. Zasloff, *Nature* **2002**, 415, 389–395.
- [89] A. K. Marr, W. J. Gooderham, R. E. W. Hancock, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6, 468–472.
- [90] J.-P. S. Powers, R. E. W. Hancock, *Peptides* **2003**, 24, 1681–1691.
- [91] R. E. W. Hancock, D. S. Chapple, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 1317–1323.
- [92] K. A. Brogden, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, 3, 238–250.
- [93] A. T. Y. Yeung, S. L. Gellatly, R. E. W. Hancock, *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, 68, 2161–2176.
- [94] H. G. Boman, B. Agerberth, A. Boman, *Infect. Immun.* **1993**, 61, 2978–2984.
- [95] C. L. Friedrich, A. Rozek, A. Patrzykat, R. E. W. Hancock, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 24015–24022.
- [96] A. Patrzykat, C. L. Friedrich, L. J. Zhang, V. Mendoza, R. E. W. Hancock, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 605–614.
- [97] C. Subbalakshmi, N. Sitaram, *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, 160, 91–96.
- [98] C. B. Park, H. S. Kim, S. C. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 244, 253–257.
- [99] A. Peschel, H.-G. Sahl, *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, 4, 529–536.
- [100] L. J. Zhang, J. Parente, S. A. Harris, D. E. Woods, R. E. W. Hancock, T. J. Fallal, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 2921–2927.
- [101] D. A. Steinberg, M. A. Hurst, C. A. Fujii, A. H. C. Kung, J. F. Ho, F. C. Cheng, D. J. Loury, J. C. Fiddes, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 1738–1742.
- [102] G. G. Perron, M. Zasloff, G. Bell, *Proc. R. Soc. B* **2006**, 273, 251–256.
- [103] Ø. Samuelsen, H. H. Haukland, H. Jenssen, M. Krämer, K. Sandvik, H. Ulvatne, L. H. Vorland, *FEBS Lett.* **2005**, 579, 3421–3426.
- [104] S. Gruenheid, H. Le Moual, *FEMS Microbiol. Lett.* **2012**, 330, 81–89.
- [105] M. E. Falagas, A. P. Grammatikos, A. Michalopoulos, *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2008**, 6, 593–600.
- [106] S. P. Conway, H. N. Pond, A. Watson, C. Etherington, H. L. Robey, M. H. Goldman, *Thorax* **1997**, 52, 987–993.
- [107] E. Andrés, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2012**, 31, 881–888.
- [108] N. K. Brogden, K. A. Brogden, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, 38, 217–225.
- [109] a) A. Giuliani, A. C. Rinaldi, *Cell. Mol. Life Sci.* **2011**, 68, 2255–2266; b) S. Rotem, A. Mor, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2009**, 1788, 1582–1592.
- [110] a) H. Sarig, S. Rotem, L. Ziserman, D. Danino, A. Mor, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 4308–4314; b) I. S. Radzishvsky, T. Kovachi, Y. Porat, L. Ziserman, F. Zaknoon, D. Danino, A. Mor, *Chem. Biol.* **2008**, 15, 354–362.
- [111] I. S. Radzishvsky, S. Rotem, D. Bourdetsky, S. Navon-Venezia, Y. Carmeli, A. Mor, *Nat. Biotechnol.* **2007**, 25, 657–659.
- [112] H. Sarig, Y. Goldfeder, S. Rotem, A. Mor, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55, 688–695.
- [113] Y. Goldfeder, F. Zaknoon, A. Mor, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54, 2590–2595.
- [114] R. F. Epand, B. P. Mowery, S. E. Lee, S. S. Stahl, R. I. Lehrer, S. H. Gellman, R. M. Epand, *J. Mol. Biol.* **2008**, 379, 38–50.
- [115] a) H. S. Kim, J. D. Hartgerink, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 4417–4424; b) S. Fernandez-Lopez et al., *Nature* **2001**, 412, 452–456.
- [116] V. Dartois, J. Sanchez-Quesada, J. Cabezas, C. Gritzen, D. Weinberger, M. R. Ghadiri, T. R. Parr, Jr., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, 49, 3302–3310.
- [117] D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, *Chem. Biodiversity* **2004**, 1, 1111–1239.

- [118] a) D. Liu, W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7553–7559; b) E. A. Porter, B. Weisblum, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11516–11529.
- [119] A. J. Karlsson, W. C. Pomerantz, K. J. Neilsen, S. H. Gellman, S. P. Palecek, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 567–579.
- [120] P. I. Arvidsson, J. Frackenphol, N. S. Ryder, B. Liechty, F. Petersen, H. Zimmermann, G. P. Camenisch, R. Woessner, D. Seebach, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 771–773.
- [121] a) T. L. Raguse, E. A. Porter, B. Weisblum, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12774–12785; b) E. A. Porter, B. Weisblum, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7324–7330.
- [122] J. Njoroge, V. Sperandio, *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 201–210.
- [123] a) A. Eberhard, *J. Bacteriol.* **1972**, *109*, 1101–1105; b) K. H. Nealson, T. Platt, J. W. Hastings, *J. Bacteriol.* **1970**, *104*, 313–322.
- [124] W. C. Fuqua, S. C. Winans, E. P. Greenberg, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 269–275.
- [125] J. P. Pearson, C. Van Delden, B. H. Iglewski, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 1203–1210.
- [126] a) D. Kolibachuk, E. P. Greenberg, *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 7307–7312; b) Y. Qin, Z. Q. Luo, A. J. Smyth, P. Gao, S. Beck von Bodman, S. K. Farrand, *EMBO J.* **2000**, *19*, 5212–5221.
- [127] a) S. Swift et al., *Mol. Microbiol.* **1993**, *10*, 511–520; b) M. Schuster, M. L. Urbanowski, E. P. Greenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15833–15839.
- [128] K. B. Gilbert, T. H. Kim, R. Gupta, E. P. Greenberg, M. Schuster, *Mol. Microbiol.* **2009**, *73*, 1072–1085.
- [129] P. Williams, N. J. Bainton, S. Swift, S. R. Chhabra, M. K. Winson, G. S. Steward, G. P. Salmond, B. W. Bycroft, *FEMS Microbiol. Lett.* **1992**, *79*, 161–224.
- [130] a) S. Atkinson, P. Williams, *J. R. Soc. Interface* **2009**, *6*, 959–978; b) B. L. Hanzelka, E. P. Greenberg, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 815–817; c) P. W. Lindum, U. Anthoni, C. Christophersen, L. Eberl, S. Molin, M. Givskov, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 6384–6388; d) D. J. Stickler, N. S. Morris, R. J. McLean, C. Fuqua, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 3486–3490; e) C. M. Miyamoto, Y. H. Lin, E. A. Meighen, *Mol. Microbiol.* **2000**, *36*, 594–607; f) E. Steiner, J. Scott, N. P. Minton, K. Winzer, *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 1113–1122.
- [131] a) M. Otto, R. Süssmuth, C. Vuong, G. Jung, F. Götz, *FEBS Lett.* **1999**, *450*, 257–262; b) M. Whiteley, K. M. Lee, E. P. Greenberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13904–13909; c) C. Niu, K. M. Clemmer, R. A. Bonomo, P. N. Rather, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 3386–3392.
- [132] S. Raina, D. De Vizio, M. Odell, M. Clements, S. Vanhulle, T. Keshavarz, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2009**, *54*, 65–84.
- [133] a) M. K. Winson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9427–9431; b) Y. Jiang, M. Camara, S. R. Chhabra, K. R. Hardie, B. W. Bycroft, A. Lazdunski, G. P. Salmond, G. S. Stewart, P. Williams, *Mol. Microbiol.* **1998**, *28*, 193–203.
- [134] W. R. D. J. Galloway, J. T. Hodgkinson, S. D. Bowden, M. Welch, D. R. Spring, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 28–67.
- [135] R. Di Cagno, M. De Angelis, M. Calasso, M. Gobbetti, *J. Proteomics* **2011**, *74*, 19–34.
- [136] G. D. Geske, J. C. O'Neill, D. M. Miller, M. E. Mattmann, H. E. Blackwell, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 13613–13625.
- [137] V. C. Kalia, H. J. Purohit, *Crit. Rev. Microbiol.* **2011**, *37*, 121–140.
- [138] a) R. Le Berre, K. Faure, S. Nguyen, M. Pierre, F. Ader, B. Guery, *Med. Mal. Infect.* **2006**, *36*, 349–357; b) J. S. Wright III, R. Jin, R. P. Novick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 1691–1696.
- [139] T. Maeda, R. Garcia-Contreras, M. Pu, L. Sheng, L. R. Garcia, M. Tomas, T. K. Wood, *ISME J.* **2012**, *6*, 493–501.
- [140] a) W. R. Galloway, J. T. Hodgkinson, S. Bowden, M. Welch, D. R. Spring, *Trends Microbiol.* **2012**, *20*, 449–458; b) P. Zhu, M. Li, *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 174–186; c) siehe Lit. [134].
- [141] E. C. Pesci, J. B. Milbank, J. P. Pearson, S. McKnight, A. S. Kende, E. P. Greenberg, B. H. Iglewski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 11229–11234.
- [142] L. Vial, F. Lepine, S. Milot, M. C. Groleau, V. Dekimpe, D. E. Woods, E. Deziel, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 5339–5352.
- [143] a) S. Heeb, M. P. Fletcher, S. R. Chhabra, S. P. Diggle, P. Williams, M. Camara, *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35*, 247–274; b) S. P. Diggle, K. Winzer, S. R. Chhabra, K. E. Worrall, M. Camara, P. Williams, *Mol. Microbiol.* **2003**, *50*, 29–43; c) L. Mashburn-Warren, J. Howe, K. Brandenburg, M. Whiteley, *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 3411–3414.
- [144] L. A. Gallagher, S. L. McKnight, M. S. Kuznetsova, E. C. Pesci, C. Manoil, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 6472–6480.
- [145] J. W. Schertzer, S. A. Brown, M. Whiteley, *Mol. Microbiol.* **2010**, *77*, 1527–1538.
- [146] G. Xiao, E. Déziel, J. He, F. Lépine, B. Lesic, M. H. Castonguay, S. Milot, A. P. Tampakaki, S. E. Stachel, L. G. Rahme, *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 1689–1699.
- [147] S. Yu, V. Jensen, J. Seeliger, I. Feldmann, S. Weber, E. Schleicher, S. Haussler, W. Blankenfeldt, *Biochemistry* **2009**, *48*, 10298–10307.
- [148] G. Rampioni, C. Pustelny, M. P. Fletcher, V. J. Wright, M. Bruce, K. P. Rumbaugh, S. Heeb, M. Camara, P. Williams, *Environ. Microbiol.* **2010**, *12*, 1659–1673.
- [149] a) J. T. Hodgkinson, W. R. Galloway, S. Saraf, I. R. Baxendale, S. V. Ley, M. Ladlow, M. Welch, D. R. Spring, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 57–61; b) J. T. Hodgkinson, W. R. Galloway, M. Welch, D. R. Spring, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1184–1192.
- [150] J. Hodgkinson, S. D. Bowden, W. R. Galloway, D. R. Spring, M. Welch, *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 3833–3837.
- [151] C. Cugini, M. W. Calfee, J. M. Farrow III, D. K. Morales, E. C. Pesci, D. A. Hogan, *Mol. Microbiol.* **2007**, *65*, 896–906.
- [152] C. Lu, B. Kirsch, C. Zimmer, J. C. de Jong, C. Henn, C. K. Maurer, M. Müschen, S. Häussler, A. Steinbach, R. W. Hartmann, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 381–390.
- [153] T. Klein, C. Henn, J. C. de Jong, C. Zimmer, B. Kirsch, C. K. Maurer, D. Pistorius, R. Müller, A. Steinbach, R. W. Hartmann, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1496–1501.
- [154] J. P. Coleman, L. L. Hudson, S. L. McKnight, J. M. Farrow III, M. W. Calfee, C. A. Lindsey, E. C. Pesci, *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 1247–1255.
- [155] M. W. Calfee, J. P. Coleman, E. C. Pesci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11633–11637.
- [156] B. Lesic et al., *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, 1229–1239.
- [157] J. Lee, C. Attila, S. L. Cirillo, J. D. Cirillo, T. K. Wood, *Microb. Biotechnol.* **2009**, *2*, 75–90.
- [158] Y. Tashiro, M. Toyofuku, T. Nakajima-Kambe, H. Uchiyama, N. Nomura, *FEMS Microbiol. Lett.* **2010**, *304*, 123–130.
- [159] C. Pustelny, A. Albers, K. Buldt-Karentzopoulos, K. Parschat, S. R. Chhabra, M. Camara, P. Williams, S. Fetzner, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1259–1267.
- [160] J. W. Lightbown, F. L. Jackson, *Biochem. J.* **1956**, *63*, 130–137.
- [161] C. A. Lowery et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14473–14479.
- [162] M. Toyofuku, T. Nakajima-Kambe, H. Uchiyama, N. Nomura, *Microbes Environ.* **2010**, *25*, 1–7.
- [163] F. J. Reen, M. J. Mooij, L. J. Holcombe, C. M. McSweeney, G. P. McGlacken, J. P. Morrissey, F. O'Gara, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2011**, *77*, 413–428.
- [164] M. Thoendel, A. R. Horswill, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 21828–21838.
- [165] G. Lina, S. Jarraud, G. Ji, T. Greenland, A. Pedraza, J. Etienne, R. P. Novick, F. Vandenesch, *Mol. Microbiol.* **1998**, *28*, 655–662.

- [166] R. L. Koenig, J. L. Ray, S. J. Maleki, M. S. Smeltzer, B. K. Hurlburt, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 7549–7555.
- [167] Y. Oogai, M. Matsuo, M. Hashimoto, F. Kato, M. Sugai, H. Komatsuzawa, *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 8097–8105.
- [168] G. Ji, R. Beavis, R. P. Novick, *Science* **1997**, *276*, 2027–2030.
- [169] P. Mayville, G. Ji, R. Beavis, H. Yang, M. Goger, R. P. Novick, T. W. Muir, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1218–1223.
- [170] a) E. A. George, R. P. Novick, T. W. Muir, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4914–4924; b) E. Geisinger, E. A. George, J. Chen, T. W. Muir, R. P. Novick, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8930–8938; c) R. J. Scott, L. Y. Lian, S. H. Muharram, A. Cockayne, S. J. Wood, B. W. Bycroft, P. Williams, W. C. Chan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2449–2453; d) P. McDowell et al., *Mol. Microbiol.* **2001**, *41*, 503–512; e) G. J. Lyon, J. S. Wright, T. W. Muir, R. P. Novick, *Biochemistry* **2002**, *41*, 10095–10104.
- [171] T. W. Muir, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 612–619.
- [172] G. J. Lyon, P. Mayville, T. W. Muir, R. P. Novick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13330–13335.
- [173] W. C. Chan, B. J. Coyle, P. Williams, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4633–4641.
- [174] S. A. Fowler, D. M. Stacy, H. E. Blackwell, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2329–2332.
- [175] M. Mansson, A. Nielsen, L. Kjaerulff, C. H. Gotfredsen, M. Wietz, H. Ingmer, L. Gram, T. O. Larsen, *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 2537–2552.
- [176] M. D. Kiran, N. V. Adikesavan, O. Cirioni, A. Giacometti, C. Silvestri, G. Scalise, R. Ghiselli, V. Saba, F. Orlando, M. Shoham, N. Balaban, *Mol. Pharmacol.* **2008**, *73*, 1578–1586.
- [177] J. Nakayama, Y. Uemura, K. Nishiguchi, N. Yoshimura, Y. Igarashi, K. Sonomoto, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 580–586.
- [178] G. F. Kaufmann, J. Park, A. V. Mayorov, D. M. Kubitz, K. D. Janda, *Quorum Sensing: Methods and Protocols*, 2011 ed., Springer, Vol. 692, S. 299–311.
- [179] R. E. W. Hancock, A. Nijnik, D. J. Philpott, *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 243–254.
- [180] J. G. Hurdle, A. J. O'Neill, I. Chopra, R. E. Lee, *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 62–75.
- [181] J. Wang et al., *Nature* **2006**, *441*, 358–361.