

Prolinreiche antimikrobielle Peptide aus Insekten töten Bakterien durch Hemmung der Proteinbiosynthese am 70S-Ribosom**

Andor Krizsan, Daniela Volke, Stefanie Weinert, Norbert Sträter, Daniel Knappe und Ralf Hoffmann*

Abstract: Prolinreiche antimikrobielle Peptide (PrAMPs) wurden bereits von mehreren Forschungsgruppen und Firmen als vielversprechende Leitverbindungen zur Behandlung systemischer Infektionen mit Gram-negativen Bakterien untersucht und optimiert. PrAMPs, wie Apidaecine und Oncocine, dringen in Bakterien ein und töten diese wahrscheinlich durch Inhibition spezifischer Zielstrukturen, ohne lytische Wirkung auf die Membranen. Wir zeigen hier, dass Apidaecine und Oncocine mit Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich an das 70S-Ribosom binden. Apidaecine wechselwirken mindestens über die beiden C-terminalen Reste (Arg-17 und Leu-18) stark mit dem 70S-Ribosom, während die Reste Lys-3, Tyr-6, Leu-7 und Arg-11 die wichtigsten Bindungsstellen der Oncocine sind. Letztere inhibierten die Proteinbiosynthese *in vitro* sehr effizient mit IC_{50} -Werten von 150–240 nmol L⁻¹. Das Chaperon DnaK ist höchstwahrscheinlich kein Ziel der PrAMPs, bindet diese aber mit niedrigerer Affinität.

Die chemische und pharmazeutische Entwicklung neuer Antibiotika ist eine therapeutische Erfolgsgeschichte, welche die Behandlung bakterieller Infektionen revolutioniert hat und den Ausbruch bakterieller Epidemien seit fast 70 Jahren verhindert. Leider werden diese Erfolge durch verschiedene Resistenzmechanismen infrage gestellt, durch die Bakterien nahezu alle zugelassenen Antibiotikabehandlungen überwinden können.^[1] Dieses latente Gesundheitsrisiko wurde immerhin für Gram-positive Pathogene wie Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) zwischenzeitlich reduziert.^[2] Allerdings steigt die Gefährdung durch multi- oder pan-resistente Gram-negative Erreger, beispielsweise *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii* und *Pseudomonas aeruginosa*.^[1] Daher besteht dringender Handlungsbedarf zur Identifizierung neuer Wirkstoffklassen, die dann in etwa zehn bis fünfzehn Jahren klinisch genutzt werden könnten. Antimikrobielle Peptide repräsentieren eine aussichtsreiche Verbindungsklasse, die noch nicht pharmazeutisch genutzt wird.

Besonders vielversprechend erscheinen dabei Prolin-reiche antimikrobielle Peptide (PrAMPs), die Bakterien nicht durch einen lytischen oder membranaktiven Mechanismus, sondern über die Wechselwirkung mit spezifischen Zielproteinen in der Bakterienzelle abtöten, wodurch Nebenwirkungen beim Menschen vermieden werden könnten.^[3] PrAMPs, die in Säugetieren und Insekten exprimiert werden, wurden von mehreren Forschergruppen in ihrer nativen Struktur, in chemisch optimierter Form oder als „Designer-Peptide“ in verschiedenen Infektionsmodellen getestet.^[4] PrAMPs haben niedrige Sequenzhomologien, weisen jedoch strukturelle Ähnlichkeiten auf (ca. 30 % Prolinanteil, eines oder mehrere Pro-Arg-Pro-Motive, ungeordnete Struktur in Lösung) und töten Bakterien wahrscheinlich über ähnliche Mechanismen.^[3] Dabei scheinen sie die äußere Membran ungehindert zu passieren, bevor sie durch den SbmA-Transporter in das Cytosol transportiert werden.^[5] Die Gruppe um Otvos zeigte, dass typische Vertreter der in Insekten produzierten PrAMPs in *E.-coli*-Lysat an das bakterielle 70-kDa-Hitzeschockprotein DnaK binden. Dabei konnten Dissoziationskonstanten (K_d) im niedrigen mikromolaren Bereich ermittelt werden.^[6] Wir konnten diese Interaktionen bestätigen und PrAMPs über ihre Bindung an die Substratbindedomäne von DnaK in zwei Gruppen einteilen.^[7] Eine kürzlich von uns veröffentlichte Studie zur Aufnahme Carboxyfluorescein-markierter Apidaecinderivate durch Bakterien^[8] steht jedoch im Gegensatz zur allgemein akzeptierten Hypothese von DnaK als bevorzugtem Zielprotein von PrAMPs. Wir konnten zeigen, dass das von Apidaecin 1b abgeleitete Api88 und zwei C-terminal verkürzte Api88-Varianten unterschiedliche antimikrobielle Aktivitäten aufweisen, obwohl sie in vergleichbaren Mengen von *E. coli* aufgenommen werden und gleich gut an DnaK binden.^[8]

Daher haben wir den *E.-coli*-Stamm BW25113 und die davon abgeleitete DnaK-Nullmutante JW0013^[9] auf ihre Empfindlichkeit gegen PrAMPs getestet (Tabelle 1). Die getesteten Oncocinderivate Onc72 und Onc112 zeigten gleiche Aktivitäten gegen JW0013 und den Wildtypstamm, während die Nullmutante sogar zweifach besser auf die Apidaecine Api88 und Api137 ansprach. Dies zeigt deutlich, dass DnaK nicht das wichtigste Zielprotein der PrAMPs ist. Diese Hypothese wird durch eine weitere Studie gestützt, in der die für eine bessere DnaK-Bindung optimierten Peptide nicht mehr gegen *E. coli* aktiv waren.^[10]

Auf Grundlage dieser Befunde haben wir biotinylierte L- und all-D-Api88-Analoga synthetisiert, bei denen Tyr-7 durch ein mit UV-Licht aktivierbares *p*-Benzoylphenylalanin substituiert wurde.^[20] *E.-coli*-BL21AI wurde in Gegenwart eines der beiden Peptide oder ohne diese kultiviert und danach mit

[*] A. Krizsan, Dr. D. Volke, S. Weinert, Prof. Dr. N. Sträter, Dr. D. Knappe, Prof. Dr. R. Hoffmann
Institut für Bioanalytische Chemie, Biotechnologisch-Biomedizinisches Zentrum (BBZ), Universität Leipzig
Deutscher Platz 5, 04103 Leipzig (Deutschland)
E-Mail: hoffmann@chemie.uni-leipzig.de

[**] Diese Forschung wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, Förderkennzeichen 01GU1104A) und dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung (EFRE, Europäische Union und Freistaat Sachsen; 10012675) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201407145> zu finden.

Tabelle 1: Sequenzen und minimale Hemmkonzentrationen (MHK) der Oncocin- und Apidaecinderivate.

Peptid	Sequenz ^[a]	MHK [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	
		BW25113	JW0013 (BW25113 ΔdnaK)
Api88	gu-ONNRPVYIPRPRPPHRL-NH ₂	0.44	0.27
Api137	gu-ONNRPVYIPRPRPPHRL-OH	1.75	0.87
Onc72	VDKPPYLPRPRPPROIYNO-NH ₂	6.7	6.7
Onc112	VDKPPYLPRPRPPRrIYNr-NH ₂	1.7	1.7

[a] gu, O und r stehen für *N,N,N',N'*-Tetramethylguanidinogruppe, L-Ornithin bzw. D-Arginin.

UV-Licht bestrahlt.^[11] Die verknüpften Biotin-Api88-Protein-Konjugate wurden mit magnetischen Streptavidinpartikeln (magnetic beads) aus den Zelllysaten angereichert und mittels SDS-PAGE getrennt. Die Spuren der drei Proben wurden in je 24 gleich große Stücke geschnitten und mit Trypsin verdaut. Die Spaltpeptide wurden durch nanoRP-UPLC-ESI-QqTOF-MS analysiert und relativ quantifiziert. Während einige Proteine mit ähnlichen Intensitäten identifiziert wurden, wurden viele Proteine in der L-Api88-Probe mit deutlich höheren Intensitäten detektiert als in der Kontrolle. Besonders interessant war das 50S-ribosomale Protein L10, was auf eine mögliche Interaktion der PrAMPs mit dem bakteriellen 70S-Ribosom hinweist, das aus je einer 50S- und einer 30S-Untereinheit besteht. Somit könnten PrAMPs die Proteinbiosynthese inhibieren.

Auf Basis dieser Daten untersuchten wir *in vitro* die Bindung zweier Apidaecin- und zweier Oncocinanaloga mit dem *E. coli*-70S-Ribosom. Das 70S-Ribosom wurde aus dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)RIL isoliert, der auf Api88, Api137, Onc72 und Onc112 mit MHK-Werten im Bereich von 1–7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ anspricht (Tabelle 2).

Onc72 und Onc112 zeigten mit K_d -Werten von 450 bzw. 90 nmol L^{-1} eine starke Bindung an das 70S-Ribosom (Tabelle 2, Abbildung 1 A). Diese K_d -Werte sind etwa 10- bis 40-mal niedriger als der entsprechende K_d -Wert von Onc72 und DnaK (4 $\mu\text{mol L}^{-1}$).^[12] Api88 und Api137 wechselwirkten etwas schwächer als die Oncocine ($K_d = 1.22$ und 0.56 $\mu\text{mol L}^{-1}$; Abbildung 1 B), aber immer noch 4- bis 15-mal stärker als mit DnaK ($K_d = 5$ bzw. 8.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$).^[4d] Die entsprechenden D-Peptide waren gegenüber *E. coli* nicht aktiv und zeigten deutlich höhere K_d -Werte. Diese schwächere Bindung könnte auf eine stereospezifische Wechselwirkung zwischen Peptid und Ribosom schließen lassen.

Zwei frühere Studien hatten bereits gezeigt, dass Ala-Substitutionen an Lys-3, Tyr-6, Leu-7 und Arg-11 in Onc72 und Arg-17 in Api137 zu einem Verlust der antibakteriellen Aktivität beider Peptide führen.^[12,4d] Dieser Befund konnte hier für *E. coli*-BL21(DE3)RIL bestätigt werden (Tabelle 2). Die entsprechenden Cf-markierten Onc72-Peptide wechselwirkten ca. 4.3–7.5-mal schwächer mit dem 70S-Ribosom als Onc72 und sogar schwächer als das D-Peptid (Tabelle 2, Abbildung 1 C). Die Cf-markierten substituierten bzw. verkürzten Analoga Api137 (R17A) bzw. Api137^{1–17} und Api137^{1–16} Peptide, denen ein (Leu-18) oder zwei C-terminale Reste (Arg-17 und Leu-18) fehlten, hatten etwa 4.6-mal schlechtere K_d -Werte als Api137, während Substitutionen an Arg-4 und

Pro-14 keine Auswirkungen zeigten (Tabelle 2, Abbildung 1 D). Interessanterweise enthalten diese wichtigen Interaktionsstellen basische (Arg und Lys) und hydrophobe Reste (Tyr und Leu), wobei jeder Rest einen ähnlichen Beitrag zur Bindung beisteuert.

Der Einfluss beider Peptidfamilien auf die Proteinbiosynthese wurde anhand der Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in einem zellfreien System (*In-vitro*-Translation) untersucht. Die Menge des erhaltenen GFP wurde über die Fluoreszenzintensität und eine SDS-PAGE verfolgt. Weder die Apidaecin- noch die Oncocinpeptide in-

Tabelle 2: Untersuchung der Apidaecin- und Oncocinpeptide auf ihre Aktivität gegen *E. coli*-BL21(DE3)RIL (MHK), der Bindung der entsprechenden Carboxyfluorescein(Cf)-markierten Derivate an das *E. coli*-70S-Ribosom (ausgedrückt als K_d) und ihre Inhibierung der zellfreien GFP-Expression (IC_{50})

Peptid ^[a]	MHK [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	K_d [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	IC_{50} [$\mu\text{mol L}^{-1}$]
Api88	0.9	1.22 ± 0.09	> 10 ^[b]
Api137	1.8	0.56 ± 0.06	> 10
Onc72	6.9	0.45 ± 0.03	0.24 ± 0.04
Onc112	3.4	0.09 ± 0.003	0.15 ± 0.03
D-Api88	56	n.b. ^[c]	> 10
D-Api137	112	2.95 ± 0.15	> 10
D-Onc72	112	1.31 ± 0.06	> 10
D-Onc112	54	n.b.	> 10
Onc72 (K3A)	56	1.95 ± 0.19	4.5 ± 2.7
Onc72 (Y6A)	112	3.31 ± 0.16	> 10
Onc72 (L7A)	112	3.38 ± 0.22	> 10
Onc72 (R11A)	56	2.71 ± 0.10	3.3 ± 1.8
Api137 (R4A)	1.8	0.40 ± 0.01	n.b.
Api137 (P14A)	14	0.42 ± 0.02	n.b.
Api137 (R17A)	112	2.58 ± 0.11	n.b.
Api137 ^{1–16}	253	2.54 ± 0.11	n.b.
Api137 ^{1–17}	29	2.63 ± 0.15	n.b.
Streptomycin	1.7	n.b.	0.08 ± 0.002

[a] D- steht für all-D-Peptide (siehe Tabelle S1 in Hintergrundinformationen). [b] > 10 zeigt an, dass Hemmung auftrat, jedoch zu gering war, um einen IC_{50} -Wert zu berechnen. [c] n.b. = nicht bestimmt.

hibitierten die T7-RNA-Polymerase, die zur Transkription des Plasmids eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt). Die zellfreie Proteinexpression von GFP resultierte in einer maximalen Fluoreszenzintensität von ca. 7000. Die korrekte GFP-Expression wurde durch die SDS-PAGE bestätigt (Abbildung 2). Reaktionen ohne Plasmid-DNA oder mit einem Plasmid, das nicht für GFP kodiert, ergaben Fluoreszenzintensitäten von nur ca. 300 und keine nachweisbaren GFP-Banden in der SDS-PAGE (Abbildung 2).

Das Antibiotikum Streptomycin, das bekanntermaßen die bakterielle Proteinbiosynthese inhibiert und auch gegen *E. coli*-BL21(DE3)RIL aktiv war ($\text{MHK} \approx 1.7 \mu\text{mol L}^{-1}$), zeigte mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 80 nmol L^{-1} und einer vollständigen Hemmung oberhalb von 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ eine starke Hemmung der zellfreien GFP-Synthese (Tabelle 2, Abbildung 3). Für Onc72 und Onc112 konnten sehr ähnliche Hemmkurven mit IC_{50} -Werten von 240 bzw. 150 nmol L^{-1} bestimmt werden (Tabelle 2, Abbil-

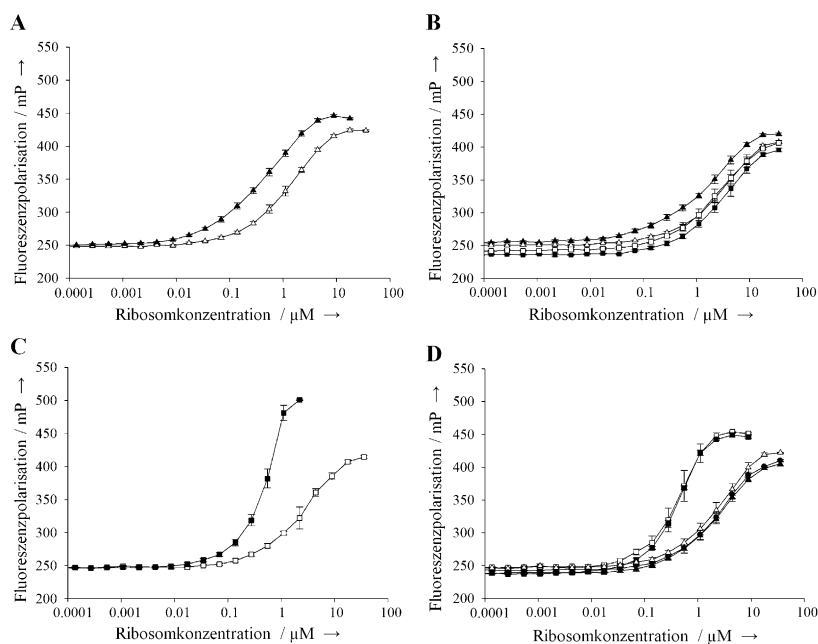


Abbildung 1. Fluoreszenzpolarisationskurven der Oncocin- und Apidaecinderivate mit dem *E. coli*-70S-Ribosom nach einer Inkubation von 90 min bei 28 °C. A) L/D-Onc72 (\blacktriangle/\triangle), B) Onc72 (K3A) (\blacktriangle), Onc72 (Y6A) (\blacksquare), Onc72 (L7A) (\triangle), Onc72 (R11A) (\square), C) L/D-Api137 (\blacksquare/\square) und D) Api137 (R4A) (\blacksquare), Api137 (P14A) (\square), Api137 (R17A) (\bullet), Api137¹⁻¹⁶ (\blacktriangle), Api137¹⁻¹⁷ (\triangle).

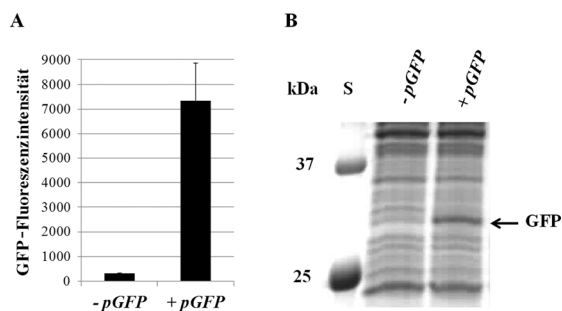


Abbildung 2. Zellfreie Proteinexpression von GFP. A) Fluoreszenzintensität und B) mit Coomassie gefärbte SDS-PAGE einer zellfreien Proteinexpression nach einer Inkubation von 4 h bei 37 °C in Ab- (–) oder Anwesenheit (+) von pGFP. S steht für den Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad Laboratories).

dung 3A). Die IC_{50} -Werte von Onc72 (K3A) und Onc72 (R11A) lagen bei 4.5 bzw. 3.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, wogegen Onc72 (Y6A) und Onc72 (L7A) die GFP-Expression nur minimal reduzierten ($IC_{50} > 10$; Tabelle 2, Abbildung 3C). Dies korreliert gut mit den ermittelten K_d - und MHK-Werten. So waren Onc72 (K3A) und Onc72 (R11A) nur schwach aktiv (MHK = 56 $\mu\text{mol L}^{-1}$), während die anderen beiden Analoga inaktiv waren.

Api88 und Api137 reduzierten zwar die GFP-Expression mit zunehmender Peptidkonzentration, allerdings nur zu etwa 40 % bei der höchsten Konzentration (Tabelle 2, Abbildung 3B) und damit weniger effizient als die Oncocine. Die schwächere Hemmung könnte dem In-vitro-Experiment geschuldet sein oder auf einen alternativen Hemm-

mechanismus am Ribosom schließen lassen, der in vitro nicht so stark ausgeprägt oder detektierbar ist.

Gel-Shift-Experimente legen nahe, dass Api88, Api137, Onc72 und Onc112 nur bei hohen Konzentrationen mit DNA und tRNA interagieren (Abbildungen S1 und S2 in Hintergrundinformationen), wobei die entsprechenden inaktiven D-Peptide genau die gleichen Unterschiede im Bandenmuster zeigten. Damit ist die Bindung der positiv geladenen AMPs an das Ribosom nicht auf unspezifische elektrostatische Wechselwirkungen mit RNA zurückzuführen. Mögliche spezifische Wechselwirkungen der am Ribosom gefalteten ribosomalen RNA müssen jedoch noch untersucht werden.

Unsere Daten zeigen erstmals, dass Oncocine und wahrscheinlich auch das verwandte Pyrrhocoricin^[13] und andere PrAMPs das bakterielle 70S-Ribosom mit IC_{50} -Werten im nanomolaren-Bereich hemmen. Dies entspräche einem neuartigen Wirkmechanismus Gen-kodierter AMPs. Dagegen binden Apidaecine zwar sehr stark an das Ribosom, zeigen aber in vitro deutlich höhere IC_{50} -Werte. Sie könnten also in anderer Weise und an anderer Stelle mit dem Ribosom wechselwirken als die Oncocine. Wahrscheinlich haben PrAMPs auch andere Bindungsstellen als Aminoglycoside (z. B. Streptomycin), Tetracycline und cyclische Peptide.^[14] Oncocine binden mit mindestens zwei basischen und zwei hydrophoben Seitenketten im Sequenzabschnitt von Position 3–11 an das 70S-Ribosom. Diese große Interaktionsfläche könnte Resistenzen als Folge von Einzelmutationen der ribosomalen Proteine reduzieren. Bei den Apidaecinen wurden die Positionen Arg-17 und Leu-18 als Hauptinteraktionsstellen identifiziert, was jedoch nicht ausschließt, dass andere Positionen ebenfalls relevant sind. Schon früher konnte gezeigt werden, dass selbst geringe Strukturveränderungen wie die Substitution von Arg-17 durch Lysin, Ornithin oder Homarginin die antibakterielle Aktivität der Apidaecine stark reduzieren.^[14d] Diese Bindungsstelle wird zudem durch die oben erwähnte Beobachtung gestützt, dass verkürzte Sequenzen von Api88/Api137 inaktiv sind^[7] und auch nur schwach an das Ribosom binden (Tabelle 2). Die Hemmung des 70S-Ribosoms als Wirkmechanismus erklärt die Aktivitäten verschiedener Apidaecin- und Oncocinpeptide und zugleich, warum sie nicht toxisch gegen menschliche Zelllinien sind.^[15] PrAMPs binden schwächer an DnaK, was aber dennoch die Menge an freien PrAMPs und damit die antimikrobielle Aktivität reduzieren könnte. Dies würde auch erklären, warum DnaK-Nullmutanten gleich oder sogar stärker auf Oncocine und Apidaecine reagieren und warum für die DnaK-Bindung optimierte Peptide nicht mehr antimikrobiell aktiv sind. Auch wenn weitere Untersuchungen erforderlich sind, um den genauen Bindungsbereich der PrAMPs an das 70S-Ribosom zu identifizieren, kann der von uns verwendete Fluoreszenzpolarisations-Assay zum Screening effizienterer

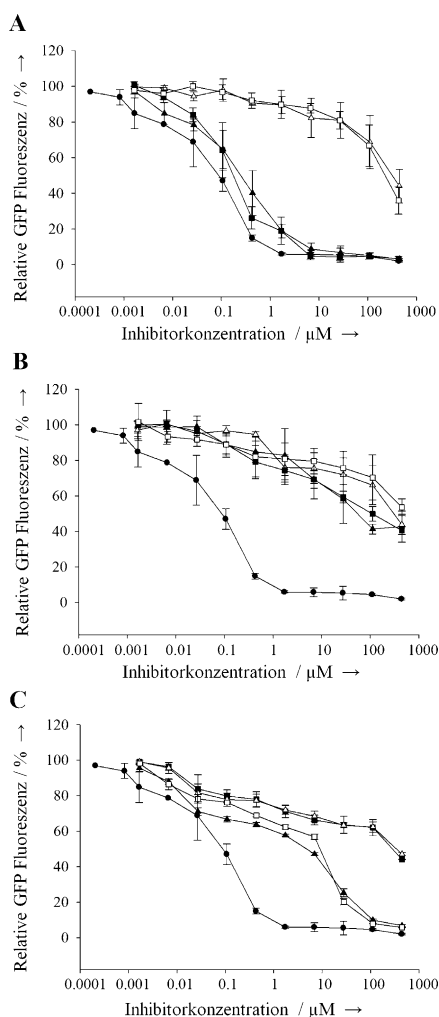


Abbildung 3. Wirkung der Oncocin- und Apidaecinderivate auf die zellfreie GFP-Expression. Die GFP-Expression wurde mittels Fluoreszenz verfolgt, und die Intensitäten wurden relativ zur Kontrollprobe ohne hemmende Verbindung (100%) aufgetragen. A) L/D-Onc72 (▲/△) und L/D-Onc112 (■/□); B) L/D-Api88 (▲/△) und L/D-Api137 (■/□); C) Onc72 (K3A) (▲), Onc72 (Y6A) (■), Onc72 (L7A) (△), Onc72 (R11A) (□) mit steigenden Konzentrationen. Streptomycin (●) fungiert als Kontrolle.

Peptidinhibitoren und niedermolekularer Substanzen verwendet werden, welche die gleichen Bindungsstellen wie Apidaecine oder Onocine besetzen.

Experimentelles

Die Peptide wurden an Rink-Amid- oder Wang-Harz unter Verwendung der Fmoc/tBu-Chemie synthetisiert, mit Trifluoressigsäure (TFA) abgespalten und mithilfe von RP-HPLC an einer C₁₈-Phase mit einem wässrigen Acetonitrilgradienten in Gegenwart von 0.1 % (v/v) TFA gereinigt (Details siehe Hintergrundinformationen).^[4d,16] Die Peptidmassen wurden durch MALDI-TOF-MS bestätigt.

Die Bakterienkulturen (siehe Hintergrundinformationen) wurden bei 37 °C unter aeroben Bedingungen in LB-Miller-Medium (10 g L⁻¹ NaCl) oder 1 % (w/v) TSB (tryptic soy broth; 33 % TSB-Medium) angezogen. Die antibakteriellen Aktivitäten wurden durch Dreifachbestimmung mittels Mikrodilutionstest in sterilen 96-Well-Platten mit 33 % TSB-Medium ermittelt (7.5 × 10⁵ Zellen/Well, 20 ±

2 h, 37 °C).^[4d] Der MHK-Wert wurde als die niedrigste Substanzkonzentration definiert, bei der die Trübung bei 595 nm dem Medium entsprach.

Das 70S-Ribosom wurde aus einem Rohextrakt des *E. coli*-Stammes BL21(DE3)RIL (Stratagene, Cedar Creek), der über Nacht in LB-Miller-Medium kultiviert wurde (OD₆₀₀ ≈ 4), isoliert (Details siehe Hintergrundinformationen).^[18]

Die Bindung der Cf-markierten Peptide an das 70S-Ribosom wurde mit Fluoreszenzpolarisation (FP) bestimmt. Dies geschah in einer zweifachen Verdünnungsreihe des 70S-Ribosoms beginnend bei 71 μmol L⁻¹ in Gegenwart von Cf-markiertem Peptid (20 nmol L⁻¹, (28 ± 1) °C). Die FP wurde nach einer Inkubationszeit von 90 min (λ_{Exc} = 485 nm, λ_{Em} = 535 nm) an zwei verschiedenen Tagen in jeweils dreifacher Ausführung bestimmt. An die Datenpunkte wurde eine Trendlinie mit der Funktion $y = y_0 + a/(1 + (x/x_0)^b)$ und dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus angelegt („nonlinear, dose-response logistical transition“), wobei der K_d-Wert durch den Faktor x_0 repräsentiert wird (SigmaPlot, Systat Software Inc.).

Die zellfreie Proteinexpression, einschließlich der Herstellung der S30- und S30-T7-Lysate, basierte auf der Vorschrift von Kim et al.^[17] (Details siehe Hintergrundinformationen). GFP wurde durch das Plasmid pGFP kodiert (Addgene) und durch die Zunahme der Fluoreszenzintensität nach 4 h (λ_{Exc} = 489 nm, λ_{Em} = 510 nm) quantifiziert. Um die Wirkung der Apidaecin- und Oncocinderivate auf die Proteinexpression zu untersuchen, wurden diese Peptide oder Streptomycin^[19] bei verschiedenen Konzentrationen zugegeben.

Eingegangen am 12. Juli 2014

Online veröffentlicht am 12. September 2014

Stichwörter: Chaperone · Gram-negative Bakterien · Inhibitoren · Peptide · Ribosomen

- [1] O. Nolte, *Protein Pept. Lett.* **2014**, *21*, 330–335.
- [2] K. Kumar, S. Chopra, *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 1465–1470.
- [3] L. Otvos, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1138–1150.
- [4] a) E. Ostorházi, M. C. Holub, F. Rozgonyi, F. Harmos, M. Cassone, J. D. Wade, L. Otvos, Jr., *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, *37*, 480–484; b) D. Szabo, E. Ostorházi, A. Binas, F. Rozgonyi, B. Kocsis, M. Cassone, J. D. Wade, O. Nolte, L. Otvos, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 357–361; c) M. Benincasa, C. Pellillo, S. Zorzet, C. Garrovo, S. Biffi, R. Gennaro, M. Scocchi, *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 178; d) P. Czihal, D. Knappe, F. Fritzsche, M. Zahn, N. Berthold, S. Piantavigna, U. Müller, S. Van Dorpe, N. Herth, A. Binas, G. Köhler, B. De Spiegeleer, L. L. Martin, O. Nolte, N. Strater, G. Alber, R. Hoffmann, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1281–1291; e) N. Berthold, P. Czihal, S. Fritzsche, U. Sauer, G. Schiffer, D. Knappe, G. Alber, R. Hoffmann, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 402–409; f) E. Ostorházi, E. Nemes-Nikodém, D. Knappe, R. Hoffmann, *Protein Pept. Lett.* **2014**, *21*, 368–373.
- [5] a) M. Mattiuzzo, A. Bandiera, R. Gennaro, M. Benincasa, S. Pacor, N. Antcheva, M. Scocchi, *Mol. Microbiol.* **2007**, *66*, 151–163; b) G. Runti, C. Lopez Ruiz Mdel, T. Stoilova, R. Hussain, M. Jennions, H. G. Choudhury, M. Benincasa, R. Gennaro, K. Beis, M. Scocchi, *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 5343–5351.
- [6] L. Otvos, Jr., I. O. M. E. Rogers, P. J. Consolvo, B. A. Condie, S. Lovas, P. Bulet, M. Blaszczyk-Thurin, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14150–14159.
- [7] M. Zahn, N. Berthold, B. Kieslich, D. Knappe, R. Hoffmann, N. Strater, *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 2463–2479.
- [8] N. Berthold, R. Hoffmann, *Protein Pept. Lett.* **2014**, *21*, 391–398.
- [9] T. Baba, T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, H. Mori, *Mol. Syst. Biol.* **2006**, *2*, 2006.0008.

- [10] M. Liebscher, A. Roujeinikova, *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 1456–1462.
- [11] G. Dörmán, G. D. Prestwich, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64–77.
- [12] D. Knappe, M. Zahn, U. Sauer, G. Schiffer, N. Sträter, R. Hoffmann, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 874–876.
- [13] G. Kragol, R. Hoffmann, M. A. Chattergoon, S. Lovas, M. Cudic, P. Bulet, B. A. Condie, K. J. Rosengren, L. J. Montaner, L. Otvos, Jr., *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 4226–4237.
- [14] J. Poehlsgaard, S. Douthwaite, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 870–881.
- [15] A. Hansen, I. Schäfer, D. Knappe, P. Seibel, R. Hoffmann, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 5194–5201.
- [16] F. I. Nollmann, T. Goldbach, N. Berthold, R. Hoffmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7597–7599; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 7747–7750.
- [17] T. W. Kim, J. W. Keum, I. S. Oh, C. Y. Choi, C. G. Park, D. M. Kim, *J. Biotechnol.* **2006**, *126*, 554–561.
- [18] U. Bommer, N. Burkhardt, R. Jünemann, C. M. T. Spahn, F. J. Triana-Alonso, K. H. Nierhaus, *Subcellular fractionation. A practical approach* (Hrsg.: J. Graham, D. Rickwoods), IRL Press, Oxford University Press, Oxford, S. 271–301, **1996**.
- [19] L. Luzzatto, D. Apirion, D. Schlessinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1968**, *60*, 873–880.
- [20] D. Volke, A. Krizsan, N. Berthold, D. Knappe, R. Hoffmann, unveröffentlichte Ergebnisse.