

Cystobactamide: Topoisomerase-Inhibitoren aus Myxobakterien mit hoher antibakterieller Aktivität**

Sascha Baumann, Jennifer Herrmann, Ritesh Raju, Heinrich Steinmetz, Kathrin I. Mohr, Stephan Hüttel, Kirsten Harmrolfs, Marc Stadler und Rolf Müller*

Abstract: Die Entwicklung neuer Antibiotika befindet sich in einer ernsthaften Krise, die unter anderem dadurch begründet ist, dass kaum innovative chemische Grundstrukturen mit Aktivität gegen Gram-negative und multiresistente Bakterien gefunden werden. Hier berichten wir über die Entdeckung neuer hochwirksamer Antibiotika aus Myxobakterien, den Cystobactamiden **1–3**, die aus *Cystobacter* sp. isoliert wurden und minimale Hemmkonzentrationen im niedrigen $\mu\text{g mL}^{-1}$ -Bereich aufweisen. Wir beschreiben die Aufreinigung und Strukturaufklärung von drei Derivaten und die Identifizierung und Annotation des dazugehörigen Biosynthetisegencusters. Die molekularen Zielstrukturen der Cystobactamide konnten über die Analyse des Eigenresistenzmechanismus des Produzentenstammes als bakterielle Typ-IIa-Topoisomerasen identifiziert werden. Da die Optimierungsmöglichkeiten von Chinolonen als Basis für neue Inhibitoren der Typ-II-Topoisomerasen weitgehend ausgereizt sind, erscheinen die Cystobactamide als hochinteressante Alternativen, die durch Medizinalchemie und biosynthetisches Engineering der Entwicklung neuartiger Antibiotika dienen können.

Die moderne Medizin wurde im vergangenen Jahrhundert durch die Entdeckung von Antibiotika und deren Einsatz zur

Behandlung zahlreicher Infektionskrankheiten revolutioniert. Zunehmende Antibiotikaresistenz wird jedoch als schwerwiegende Bedrohung der öffentlichen Gesundheit gesehen. Diese Situation wird zusätzlich dadurch verschärft, dass die schwierige und wenig profitable Entwicklung neuer Antibiotika in der pharmazeutischen Industrie weitestgehend minimiert oder sogar eingestellt wurde.^[1] Die Anzahl neuartiger Antibiotika, die in Target-orientierten Ansätzen mit chemischen Substanzbibliotheken gefunden wurde, ist nicht ausreichend, um das Problem der Antibiotikaresistenz zu bekämpfen, was insbesondere bei den ESKAPE-Pathogenen (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) gilt.^[2] Diese Bakterien sind die Ursache eines Großteils nosokomialer Infektionen, die nur bedingt behandelbar sind, da die Keime eine Vielzahl intrinsischer Multiwirkstoffresistenzmechanismen (MDR) besitzen oder Resistenzen gegen antimikrobielle Wirkstoffe entwickelt haben.^[3] Antiinfektiva wurden üblicherweise ausgehend von mikrobiellen Naturstoffen entwickelt, was die Goldene Ära der Antibiotika in den 60er und 70er Jahren des letzten Jahrhunderts begründete. Seitdem wurden nur vereinzelt neue Substanzklassen identifiziert und für die Anwendung entwickelt. In Bezug auf die sehr problembehaftete Durchdringung der bakteriellen Zellwand gelten Naturstoffe als evolutionär optimiert. Allerdings kommt es auch auf dem Gebiet der Naturstoffe zu hohen Ausfallraten im Entwicklungsprozess, was durch die wiederholte Entdeckung bereits bekannter Grundstrukturen begründet ist. Daher gelten neue Screening-Verfahren^[4] und die Untersuchung noch nicht erschlossener oder weitgehend unerforschter Ressourcen als vielversprechende Ansatzpunkte zur Auffindung neuartiger antibakterieller Substanzen.^[5]

Um neuartige antibakterielle Naturstoffe zu entdecken, haben wir unseren Fokus auf gleitende Bakterien einschließlich der Myxobakterien als Quellen gelegt.^[6] So konnten wir beispielweise vor kurzem mit den Disciformycinen neuartige Antibiotika identifizieren, welche einen neuen Wirkmechanismus aufweisen und gegen multiresistente *Staphylococcus aureus*-Isolate bei minimalen Hemmkonzentrationen (MIC) $< 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ wirksam sind.^[7]

Im Verlauf der Suche nach neuen Substanzen mit Aktivität gegen Gram-negative Bakterien fiel unsere Aufmerksamkeit auf eine neuartige Naturstoffklasse aus *Cystobacter* sp., deren Isolierung und Strukturaufklärung im Folgenden beschrieben ist. Darüber hinaus zeigen wir, dass diese Substanzklasse der Cystobactamide biosynthetisch durch eine nichtribosomale Peptidsynthetase gebildet wird und beschreiben ihre molekularen Zielstrukturen.

[*] Dr. S. Baumann, [+] Dr. J. Herrmann, [+] Dr. R. Raju, Dr. S. Hüttel, Dr. K. Harmrolfs, Prof. Dr. R. Müller
Abteilung Mikrobielle Naturstoffe, Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Universität des Saarlandes
Campus C2.3, 66123 Saarbrücken (Deutschland)
E-Mail: rom@helmholtz-hzi.de

Dipl.-Ing. H. Steinmetz
Mikrobielle Stammsammlung
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)
Dr. K. I. Mohr, Prof. Dr. M. Stadler
Mikrobielle Wirkstoffe
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig (Deutschland)
Dr. S. Baumann, [+] Dr. J. Herrmann, [+] Dr. R. Raju,
Dipl.-Ing. H. Steinmetz, Dr. K. I. Mohr, Dr. S. Hüttel,
Dr. K. Harmrolfs, Prof. Dr. M. Stadler, Prof. Dr. R. Müller
Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF)
Standort Hannover-Braunschweig (Deutschland)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Wir danken Dr. Yohei Katsuyama für initiale Genclusteranalysen sowie Prof. Dr. Mark Brönstrup und Dr. Kevin Sours für das kritische Korrekturlesen des Manuskripts.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (exakte experimentelle Vorgehensweisen) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201409964> zu finden.

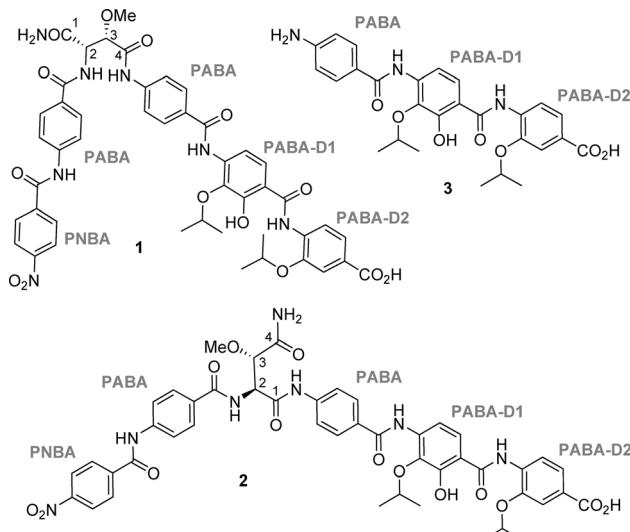


Abbildung 1. Chemische Strukturen der Cystobactamide 919-1 (1), 919-2 (2) und 507 (3).

Cystobacter sp. Cbv34 wurde in kleinem Maßstab kultiviert. Aus diesen Fermentationen gewonnene Rohextrakte wiesen eine beachtliche Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien auf. Cystobactamide 919-1 (1), 919-2 (2) und 507 (3) konnten im Zuge eines LC-HRMS-unterstützten und bioaktivitätsgeleiteten Screening-Ansatzes als aktive Bestandteile identifiziert werden (Abbildung 1). Der Produzentenstamm Cbv34 wurde anschließend im 10-L-Maßstab kultiviert, um je ungefähr 1 mg der drei Derivate für eine vollständige Charakterisierung zu erhalten (Details zum Isolierungsverfahren sind in den Hintergrundinformationen beschrieben).

Die Aufklärung der planaren Strukturen wurde mittels verschiedener spektroskopischer/spektrometrischer Techniken inklusive HRESIMS sowie 1D- und 2D-NMR-Experimenten (HSQC, HMBC, COSY, ROESY) durchgeführt (siehe Hintergrundinformationen). Cystobactamid 919-1 (1) und Cystobactamid 919-2 (2) bestehen aus fünf aromatischen Einheiten: *p*-Nitrobenzoësäure (PNBA), zwei *p*-Aminobenzoësäureeinheiten (PABA) und zwei PABA-Derivaten mit unterschiedlichen Oxidationsmustern (PABA-D1 und PABA-D2), welche über eine Iso- β -methoxyasparagineinheit (1) oder eine β -Methoxyasparagineinheit (2) zwischen den beiden PABA-Einheiten verknüpft sind. Cystobactamid 507 (3) entspricht der tripeptidischen Sequenz PABA-PABA-D1-PABA-D2 und stellt somit ein Fragment von 1 und 2 dar.

Strukturell zeigen die Cystobactamide einige bemerkenswerte Merkmale. Die PABA-Kettenstruktur ist einzigartig innerhalb der Naturstoffe und unseres Wissens das erste Beispiel dieser Verbindungsklasse. Darauf hinaus zeichnen sich Cystobactamide 919-1 (1) und 919-2 (2) durch eine seltene Nitrogruppe aus, welche wahrscheinlich durch Oxidation der Aminogruppe von PABA entsteht. Auch die Isopropoxylierung der 3-Hydroxy-4-aminobenzoësäureeinheit (PABA-D1 und PABA-D2) scheint bisher beispiellos innerhalb der Naturstoffe zu sein. Die Tatsache, dass die β -Methoxyasparagineinheit entweder 1,2- (1) oder 2,4-verknüpft (2) ist, ist eine weitere nennenswerte Besonderheit der Struktur.

Die relative Konfiguration der β -Methoxyasparagineinheit konnte mittels der homonuklearen vicinalen Kopplungskonstante ($^3J_{H,H} \approx 7-8$ Hz) als *anti* bestimmt werden. Die Interpretation der ROESY-NMR-Daten für Verbindung 1 und 2 zeigte eine *threo*-Konfiguration auf. Die absolute Konfiguration wurde mithilfe optischer Rotationsmessungen und dem Vergleich mit Literaturwerten für β -Oxyasparagine-Derivate als „SS“ bestimmt. Details der Strukturbestimmung sowie der Analyse der chemischen Konfiguration sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.

Bei der Analyse der antibakteriellen Aktivitäten der gereinigten Verbindungen (Tabelle 1 und S1 in den Hintergrundinformationen) stellten wir fest, dass 1–3 eine vergleichbare Aktivität wie die Rohextrakte von Cbv34 aufwiesen. Dies bestätigte, dass die neue Substanzfamilie zumindest

Tabelle 1: Minimale Hemmkonzentrationen (MIC in $\mu\text{g mL}^{-1}$) von 1–3 und Cp.

| | 1 | 2 | 3 | Cp |
|---------------------------------|-----------|-----|-----------|----------|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | >59 | 7.4 | 32.5–65.0 | 0.2–0.4 |
| <i>Escherichia coli</i> | 14.7–29.4 | 0.9 | 16.3 | 0.013 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 3.7–7.4 | 0.1 | 4.1 | 0.8 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 32.5 | 0.1 | 8.1 | 0.05–0.1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 14.7 | 0.1 | 4.1 | 0.8–1.6 |

zum Teil für die starke antibakterielle Wirksamkeit der Extrakte verantwortlich war. Jedes Derivat hemmte das Wachstum von *E. coli*, zum Teil bereits bei einer Konzentration von $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Vor allem 2 inhibierte das Wachstum einer Vielzahl von Pathogenen besonders stark, einschließlich des zu den Gram-negativen ESKAPE-Bakterien gehörenden *A. baumannii*. Das Hexapeptid 2 inhibierte außerdem effektiv das Wachstum einer Vielzahl Gram-positiver Bakterien, wie z.B. *E. faecalis* und *S. pneumoniae* bei Konzentrationen von ca. $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Diese Aktivität gleicht oder übertrifft sogar diejenige von Ciprofloxacin (Cp), einem Fluorchinolon-Antibiotikum der zweiten Generation, welches zurzeit in der Klinik verwendet wird.^[8] Es ist hervorzuheben, dass keines der getesteten Moleküle, bis hin zu einer Konzentration von ca. $50-100 \mu\text{g mL}^{-1}$, eine auffällige antifungale oder zytotoxische Aktivität (Tabellen S1 und S3) aufwies.

Angesichts ihrer chemischen Strukturen erschien es wahrscheinlich, dass die Cystobactamide Produkte nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen (NRPS) sind.^[9] Der Hauptbaustein dieser Verbindungen ist PABA, ein Fragment, welches nur selten in Sekundärmetaboliten zu finden ist.^[10] PABA wurde zwar als Starteinheit der Polyketidsynthase-getriebenen Biosynthese von Candicidin beschrieben, jedoch unseres Wissens noch nicht in NRPS-basierten Peptiden. Interessanterweise beinhaltete das Candicidin-Biosynthese-Cluster zwei Gene, welche für die Biosynthese von PABA benötigt werden: Aminodeoxychorismatsynthase (ADC) und ADC-Lyase.^[10] Die Anwesenheit zusätzlicher ADC-Lyase- und Anthranilatsynthase-Homologe im Genom von Cbv34 erlaubte so auch die Identifizierung des Biosynthese-Genkластus der Cystobactamide. Das Gencluster beinhaltet drei große NRPS-Gene sowie eine Vielzahl von Tailoring-Enzy-

men, Transportern und möglichen Resistenzgenen (Tabelle S4 und S5). Die detaillierte Analyse der modularen Struktur der NRPS sowie die Durchführung von Fütte-

rungsexperimenten (Abbildung S1 und S2) erlaubte die Entwicklung eines Modells für die Cystobactamid-Biosynthese, wie sie in Abbildung 2 dargestellt ist. Die Biosynthese

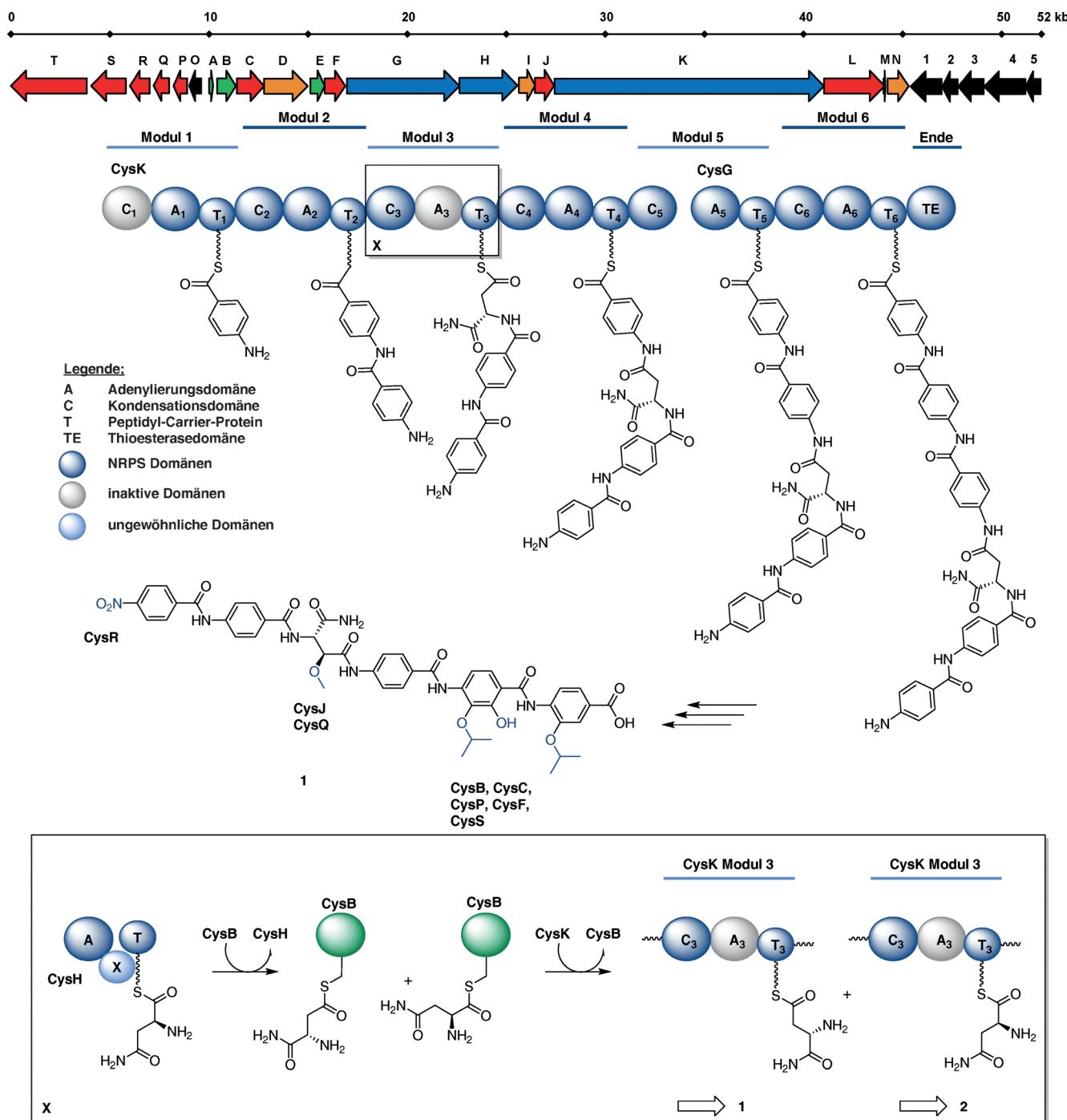


Abbildung 2. Modell der Cystobactamid-Biosynthese. Zwei PABA-Einheiten werden durch die Adenylierungsdomänen A1 und A2 von CysK aktiviert. A3 in CysK ist voraussichtlich inaktiv, und es wird angenommen, dass T3 von CysK in *trans* durch CysH/CysB beladen wird. CysH aktiviert eine Asparagineinheit, welche entweder direkt geladen (2) oder zunächst durch die ungewöhnlich Ammoniak/Amin-Ligase-ähnliche Domäne von CysH zu Isoasparagin isomerisiert und dann auf die T-Domäne von CysK in Modul 3 geladen wird. Der Transfer des Asn oder iso-Asn-Bausteins auf T3 von CysK könnte hierbei direkt oder mithilfe von CysB realisiert werden, welches als Transportprotein fungiert. Nach der Elongation des Bis-PABA-Intermediats auf Modul 2 von CysK durch Modul 3 wird die Biosynthese durch Modul 4, dem geteilten Modul 5 lokalisiert auf CysK und CysG sowie Modul 6 weitergeführt, was im Einbau von drei weiteren PABA-Bausteinen resultiert. CysG setzt dann das lineare Hexapeptid frei, welches im Anschluss durch eine Vielzahl von Tailoring-Enzymen modifiziert wird. Farbcodes des Genclusters: NRPS-Gene (blau); regulatorische und „Helfer“-Protein-Gene (grün); Tailoring-Gene (rot); PABA-Biosynthetegene (orange); Resistenz- und Effluxgene (schwarz). Für Details siehe Hintergrundinformationen.

weist einige bemerkenswerte und ungewöhnliche Aspekte auf, wie z.B. einen Beladungsprozess für eine Verlängerungseinheit, welcher in *trans* erfolgt (für Isoasparagin oder Asparagin), eine Isopropoxylierung durch eine SAM-abhängige Methylierung einer phenolischen Hydroxygruppe gefolgt von zwei weiteren Methylierungen, katalysiert durch eine radikalische SAM-Methyltransferase, sowie die Oxidation einer Amino- zur Nitrogruppe. Der Genlokus kodiert außerdem für das mögliche Resistenzprotein CysO, welches zur Familie der Pentapeptid-Repeat-Proteine gehört. Manche dieser Proteine sind als Resistenzfaktoren gegen Topoisomerasegifte, wie z.B. Fluorochinolone (Qnr und MfpA), Microcin B17 (McG) und Albicidin (AlbG), bekannt^[11] und legen so eine Wirkung der Cystobactamide als Inhibitoren bakterieller Typ-IIa-Topoisomerasen nahe.

Anschließende biochemische Experimente zeigten in der Tat, dass die Cystobactamide in der Lage waren, die Aktivität bakterieller Topoisomerasen, wie Gyrase und Topoisomerase IV aus *E. coli*, zu inhibieren (Tabellen 2 und S6; Abbildungen 3, S3, S4 und S7). Für Verbindung **2** konnten IC₅₀-Werte

Tabelle 2: Mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀ in μM) von **1–3** und Cp in Gyrase-Superspiralisierungssassays und Topoisomerase-IV-Relaxierungssassays.

| | 1 | 2 | 3 | Cp |
|------------------------|----------------|-----------------|----------------|-------------------|
| <i>E. coli</i> -Gyrase | 21.3 \pm 6.0 | 0.26 \pm 0.06 | 20.2 \pm 2.2 | 0.40 \pm 0.05 |
| <i>E. coli</i> Topo IV | 89.5 \pm 0.8 | 38.0 \pm 0.7 | 86.0 \pm 2.8 | nb ^[a] |

[a] nb: nicht bestimmt.

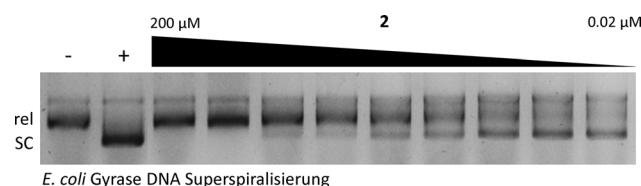


Abbildung 3. Titration von Superspiralisierungsreaktionen der *E. coli*-Gyrase mit Cystobactamid 919-2 (**2**). Kontrollen: (–) ohne Enzym; (+) unbehandelt. Für Details des Assays siehe die Hintergrundinformationen. rel und SC bezeichnen relaxierte bzw. superspiralisierte *E. coli*-DNA.

für *E. coli*-Gyrase im nanomolaren Bereich bestimmt werden, sodass **2** genauso wirksam ist wie Cp. Für das gleiche Enzym zeigten **1** und **3** mindestens 80-fach höhere IC₅₀-Werte (zweistelliger mikromolarer Bereich). Die Anwesenheit der ersten beiden PABA-Einheiten und insbesondere die Anordnung der zentralen Aminosäure (L-iso-Asn vs. L-Asn) und somit die Gesamtstruktur des Moleküls optimieren hierbei die Aktivität aus dem μM - in den nm-Bereich. Überraschenderweise zeigten **1–3** nur moderate Aktivitäten in Topoisomerase-IV-Relaxierungsexperimenten (Tabelle 2). Dies wies darauf hin, dass die primäre Zielstruktur der Cystobactamide in *E. coli* die DNA-Gyrase ist.

Inhibitoren der Typ-IIa-Topoisomerasen können generell in zwei Klassen unterteilt werden: Topoisomerasegifte und kompetitive ATP-Bindetascheinhibitoren, wie z.B. der Aminocumarin-Naturstoff Novobiocin.^[12] Topoisomerasegifte wie

die Chinolone fördern die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Stabilisierung der auftretenden kovalenten GyrA-Tyrosyl-DNA-Addukte, welche *in vitro* durch Plasmid-Linearisierungssassays sichtbar gemacht werden können.^[13] Die Bildung solcher linearisierter Plasmide ist für Cp und **2** klar ersichtlich (Abbildung S6). Darüber hinaus konnte die inhibitorische Aktivität von **2** durch die Zugabe hoher ATP-Konzentration nicht reduziert werden (Abbildung S6), was nahelegt, dass Cystobactamide nicht an der ATP-Bindetasche binden, welche sich in der GyrB-Untereinheit der Gyrase befindet. Zusammengefasst zeigt dies, dass die Cystobactamide in der Tat Typ-II-Topoisomerasegifte sind und somit als „natürliche Chinolone“ betrachtet werden können, welche eine der erfolgreichsten Antibiotikaklassen darstellen. Die Ergebnisse legen zudem nahe, dass die primäre Bindestelle der Cystobactamide an der GyrA-DNA-Schnittstelle lokalisiert ist.

Diese Hypothese veranlasste uns, eine mögliche Kreuzresistenz zwischen **1–3** und Cp zu analysieren. Resistzenzen gegen Chinolone manifestieren sich durch Mutationen in *gyrA* und *parC*, welche zu Veränderungen der Wirkstoffbindestelle führen. In GyrA befindet sich die so genannte Chinolonresistenz-vermittelnde Region (QRDR) zwischen Aminosäure 67 und 106, wobei S83 und D87 am häufigsten involviert sind.^[14] Wir verglichen die MIC-Werte von **1–3** mit Cp in einem Chinolon-sensitiven *E. coli*-Stamm, sowie in Stämmen mit isogenen Mutationen im *gyrA*-Gen (Tabelle S2). Die erhaltenen minimalen Hemmkonzentrationen für Cp waren im Einklang mit den Literaturdaten;^[15] MIC-Werte stiegen um das 30- bis 60-fache für GyrA-Einzelmutanten. Eine Kombination beider Mutationen resultierte in klinischer Resistenz ($\text{MIC} \geq 1 \text{ mg L}^{-1}$). Die Aktivität von **2**, des wirksamsten hier beschriebenen Derivats, war bei S83- und D87-Mutanten weniger stark reduziert (2- bis 7-fach), die Kombination beider GyrA-Mutationen hatte hingegen einen größeren Einfluss. Diese Resultate legen eine überlappende, jedoch nicht identische Bindestelle der Cystobactamide und der Chinolone an GyrA nahe, da der Einfluss der Chinolon-Resistenzmutationen bei den Cystobactamiden weniger stark ausfällt.

Zusammenfassend haben wir eine neue Klasse von Antibiotika identifiziert, welche eine vielversprechende Aktivität gegen eine validierte Zielstruktur aufweist. Cystobactamide waren hochaktiv gegen eine Vielzahl Gram-positiver Pathogene. Darüber hinaus hemmte **2** effizient das Wachstum von *E. coli* und *A. baumannii* und bewies so, dass diese Verbindungen in der Lage sind, die äußere Membran Gram-negativer Bakterien zu durchdringen. In *Cystobacter*-Extrakten konnte außerdem eine Vielzahl weiterer Cystobactamid-Derivate identifiziert werden, die zum Teil nur in Spuren vorkommen und sich schwer voneinander trennen lassen. Folglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die moderate Aktivität von **3** auf eine geringfügige Kontamination mit hochpotenten Hexapeptiden zurückzuführen ist. Derzeitige Forschungsschwerpunkte zielen in Richtung der Produktionsoptimierung und Charakterisierung neuer natürlicher Derivate, der molekularen Definition der Bindestelle, der Totalsynthese und dem biosynthetischen Engineering des derzeit aktivsten Hexapeptids **2** sowie dessen Medizinalche-

mie, um die Struktur-Aktivitäts-Beziehung der Cystobactamide klar zu definieren. Zusätzlich fokussieren wir auf die Entwicklung von Cystobactamiden der zweiten Generation mit verbesserter Gram-negativer Aktivität, vor allem in der Gruppe der ESKAPE-Pathogene. In Anbetracht ihrer neuartigen molekularen Struktur und der limitierten Kreuzresistenz hoffen wir, dass die Cystobactamide als Startpunkt für die Entwicklung einer neuen Klasse von Antibiotika mit antibakterieller Breitbandwirkung dienen können.

Experimentelles

Alle hier beschriebenen Gyrase- und Topoisomerase-IV-Assays wurden auf Basis kommerzieller Kits von Inspiralis, Norwich, durchgeführt.

Eingegangen am 10. Oktober 2014,
veränderte Fassung am 17. Oktober 2014

Stichwörter: Antibiotika · Myxobakterien · Naturstoffe · NRPS · Topoisomeraseinhibitoren

- [1] WHO (2014), Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance, ISBN 9789241564748. Available online from: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
- [2] a) D. J. Payne, M. N. Gwynn, D. J. Holmes, D. L. Pompiano, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 29–40; b) H. W. Boucher, G. H. Talbot, J. S. Bradley, J. E. Edwards, D. Gilbert, L. B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, J. Bartlett, *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 1–12.
- [3] C. G. Giske, D. L. Monnet, O. Cars, Y. Carmeli, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 813–821.
- [4] R. E. Hancock, H.-G. Sahl, *Curr. Opin. Microbiol.* **2013**, *16*, 519–521.
- [5] a) S. J. Pidot, S. Coyne, F. Kloss, C. Hertweck, *Int. J. Med. Microbiol.* **2014**, *304*, 14–22; b) M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Science* **2009**, *325*, 1089–1093.
- [6] a) K. J. Weissman, R. Müller, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 1276–1295; b) S. C. Wenzel, R. Müller, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2009**, *12*, 220–230.
- [7] F. Surup, K. Viehrig, K. I. Mohr, J. Herrmann, R. Jansen, R. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, DOI: 10.1002/anie.201406973; *Angew. Chem.* **2014**, DOI: 10.1002/ange.201406973.
- [8] A. M. Emmerson, A. M. Jones, *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51*, 13–20.
- [9] M. Stricker, A. Tanovic, M. A. Marahiel, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, *20*, 234–240.
- [10] C. T. Walsh, S. T. Haynes, B. D. Ames, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 37–59.
- [11] a) J. H. Tran, G. A. Jacoby, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5638–5642; b) C. Montero, G. Mateu, R. Rodriguez, H. Takiff, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 3387–3392; c) M. C. Garrido, M. Herrero, R. Kolter, *EMBO J.* **1988**, *7*, 1853–1862; d) S. M. Hashimi, M. K. Wall, A. B. Smith, A. Maxwell, R. G. Birch, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 181–187.
- [12] S. M. Vos, E. M. Tretter, B. H. Schmidt, J. M. Berger, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 827–841.
- [13] L. M. Fisher, X.-S. Pan in *Methods in Molecular Medicine*, Vol. 142 (Hrsg.: W. Scott Champney), Humana Press, New Jersey, **2008**, S. 11–24.
- [14] T. Gruber, J. L. Nitiss, A. Maxwell, E. L. Zechiedrich, P. Heisig, S. Seeber, Y. Pommier, D. Strumberg, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 4495–4504.
- [15] S. Bagel, V. Hüllen, B. Wiedemann, P. Heisig, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 868–875.