



Natürliche Fimbroide inhibieren Autoinduktorbiosynthese und Luziferaseaktivität und unterdrücken damit die Biolumineszenz in *Vibrio*

Weining Zhao, Nicola Lorenz, Kirsten Jung und Stephan A. Sieber*

Abstract: *Vibrio* ist ein Modellorganismus zur molekularen Analyse des Quorum Sensings (QS) und zur Identifikation QS-interferierender Wirkstoffe. Die natürlichen Fimbroide sind für die QS-inhibierenden Wirkungen in verschiedenen Organismen bekannt, allerdings waren die zellulären Angriffspunkte bisher verborgen. Nun ist es gelungen, die irreversiblen Zielstrukturen der Fimbroide im Proteom von *V. harveyi* und *V. campbellii* mithilfe quantitativer Massenspektrometrie und chemisch modifizierter Fimbroide aufzudecken. Hauptangriffspunkte sind zwei Proteine, die eine essenzielle Rolle für QS und Biolumineszenz in *Vibrio* spielen. LuxS, das für die Autoinduktor-2-Biosynthese verantwortlich ist, und LuxE, eine Untereinheit des Luziferasekomplexes, wurden beide kovalent an Cysteinresten im jeweiligen aktiven Zentrum modifiziert und dadurch inhibiert. Die Identifizierung von LuxE ist in Einklang mit früheren Studien, die die Inhibierung der Biolumineszenz ebenfalls downstream der Signalkaskade vermuteten.

Quorum sensing (QS) ist eine wichtige Kommunikationsstrategie bei Bakterien, um eine Zelldichte-abhängige Genexpression zu koordinieren.^[1] QS wurde zunächst bei den lumineszierenden, Gram-negativen, marinen Bakterien *Vibrio fischeri* und *Vibrio harveyi* beschrieben, die sich zu Modellorganismen für die Erforschung dieses bakteriellen Signaltransduktionsprozesses entwickelten.^[2] *V. harveyi* synthetisiert drei verschiedene Autoinduktormoleküle (AIs): das Spezies-spezifische HAI-1, das von der Synthase LuxM produziert wird, das von LuxS produzierte interspezifische Molekül AI-2 und das Genus-spezifische CAI-1, das von CqsA synthetisiert wird.^[3] Die sekretierten Moleküle werden von den AI-spezifischen Membranrezeptoren LuxN, LuxQ (im Zusammenspiel mit LuxP) und CqsS wahrgenommen. Sobald eine bestimmte Schwellenkonzentration der AIs erreicht ist, wird diese Information über eine Signaltransduktionskaskade unter Einbeziehung der Proteine LuxU und LuxO in der Zelle weitergeleitet und dadurch die Synthese von LuxR,

einem wichtigen Transkriptionsaktivator für das Lumineszenzoperon *luxCDABE*, reguliert (Abbildung 1 A).^[4]

Vibrio-Spezies sind wichtige Modellorganismen für QS, da sie drei verschiedene Klassen an Signalmolekülen nutzen, deren Wirkung relativ einfach über die Detektion der Lumineszenz quantifiziert werden kann.^[1b] Ein wichtiges Hilfsmittel für diese Studien sind Fimbroide, Naturstoffe und wirksame QS-Quencher, die aus der marinen Alge *Delisea pulchra* gewonnen werden können.^[5] Diese halogenierten Furanone inhibieren nicht nur das QS in *Vibrio*, sondern sind ebenfalls gegen verschiedene, auch klinisch relevante pathogene Bakterien wirksam (Abbildung 1 B).^[6] Obwohl Fimbroide und andere bromierte Furanone bereits vielfach in verschiedenen Studien verwendet wurden, fehlt bislang eine umfassende Proteomanalyse potenzieller bakterieller Angriffsziele. Stattdessen wurden einzelne, mit QS im Zusammenhang stehende Proteine auf die Bindung und Inhibierung durch bromierte Fimbroide getestet.^[7]

Fimbroide haben ein exozyklisches Vinylbromid, das nukleophile Reste einfangen kann. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinantes LuxS kovalent an einem nichtkatalytischen Cysteinrest durch die Substanz **F1** modifiziert wird, was zu einer Inhibierung der enzymatischen Aktivität führt.^[7a] Dennoch implizierten die Studien, dass LuxS nicht das alleinige Ziel von **F1** sein kann, da die Biolumineszenz auch in *V. harveyi*-Mutanten mit nur einem aktiven QS-System oder mit einem konstitutiv lumineszierenden Phänotyp abnahm.^[4a,7b] Aus diesem Grund wurde ein Angriffsziel, das alle Signalwege vereinigt und kollektiv die Biolumineszenz aktiviert, downstream der verschiedenen Rezeptoren postuliert. Ein solches Ziel wäre der Masterregulator LuxR (Abbildung 1 A).^[1b,7c] Allerdings sind die Befunde dazu kontrovers. Während einige Studien auf die Bindung von halogenierten Furanonen und eine kompetitive Verdrängung der natürlichen QS-Liganden schließen lassen,^[7c,8] wurde in anderen Studien keine spezifische Bindung beobachtet, und man erhielt eher Hinweise auf einen Abbau von LuxR nach Substanzzugabe.^[7b,9] Da Fimbroide bei der Aufklärung dieser Mechanismen Verwendung finden, ist ein vollständiges Verständnis ihrer Wirkweise und der zellulären Angriffsziele nötig und liefert Erkenntnisse für verwandte Systeme.^[1b]

Hier identifizierten wir die zellulären Bindepartner der Fimbroide in *V. harveyi* NBRC 15634 und *V. campbellii* ATCC BAA-1116 (zuvor als *V. harveyi* ATCC BAA-1116 bezeichnet).^[10] Mittels aktivitätsbasiertem Protein-Profilings (ABPP)^[11] in Kombination mit quantitativer Massenspektrometrie (MS) konnten wir LuxS als Angriffsziel bestätigen. Zusätzlich konnten wir bisher unbekannte Proteine als spezifische Bindepartner identifizieren.

[*] W. Zhao, Prof. Dr. S. A. Sieber

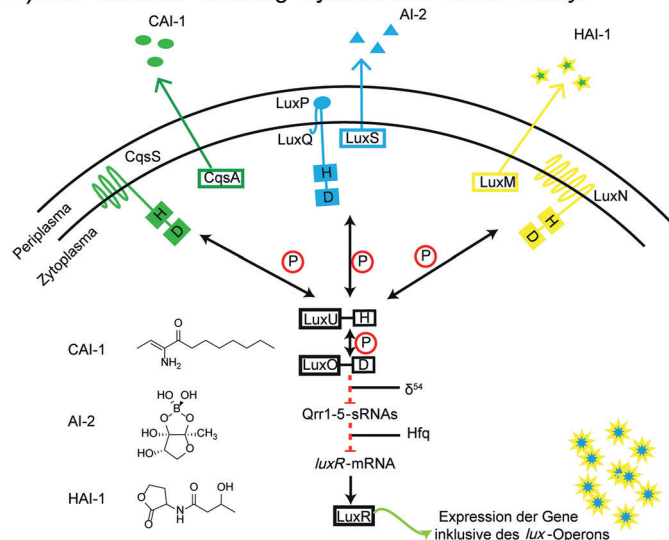
Center for integrated Protein Science Munich (CiPSM) am
Department für Chemie, Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85748 Garching (Deutschland)
E-Mail: stephan.sieber@tum.de

N. Lorenz, Prof. Dr. K. Jung

Center for integrated Protein Science Munich (CiPSM) am Depart-
ment für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
Großhaderner Straße 2–4, 82152 Martinsried (Deutschland)

Hintergrundinformationen und ORCIDs der Autoren zu diesem

Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201508052> zu finden.

A) Das-Quorum-Sensing-System von *Vibrio harveyi*

B) Halogenierte Furanone (Fimbrolide)

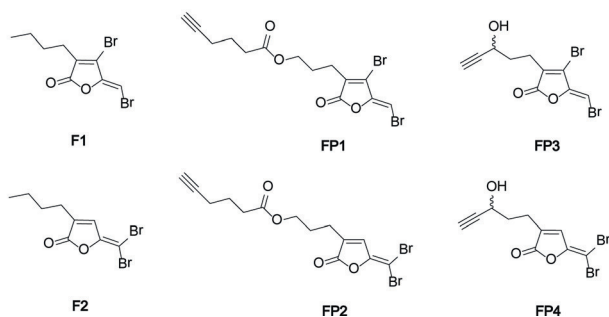


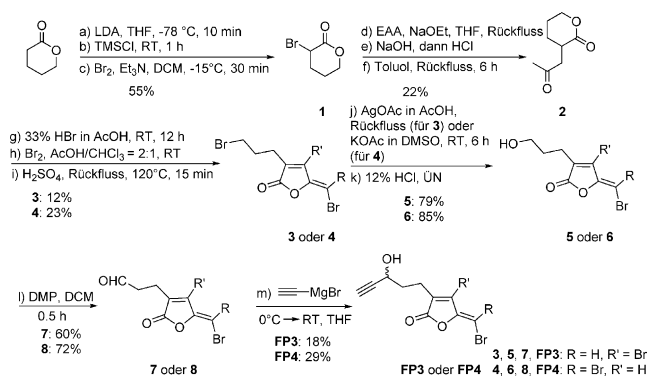
Abbildung 1. A) Drei Autoinduktoren werden von LuxM (HAI-1), LuxS (AI-2) und CqsA (CAI-1) synthetisiert und von den Rezeptoren LuxN (HAI-1), LuxP/LuxQ (AI-2) und CqsS (CAI-1) wahrgenommen. Bei niedrigen Autoinduktorkonzentrationen autophosphorylieren die Rezeptoren und übertragen ihre Phosphorylgruppe auf LuxU, das wiederum LuxO phosphoryliert. LuxO~P aktiviert die Expression von Qrr1-5-sRNAs, die zusammen mit dem Chaperon Hfq die mRNA von luxR destabilisieren. Bei hohen Autoinduktorkonzentrationen wird die Autophosphorylierung der Rezeptoren inhibiert. Der Kaskade werden die Phosphatgruppen entzogen, was zur Expression des Transkriptionsregulators LuxR und somit zur Aktivierung des lux-Operons und der Biolumineszenz führt. P in einem roten Kreis steht für Phosphotransfer; H (Histidin) und D (Aspartat) markieren die Phosphorylierungsstellen. B) Strukturen der halogenierten Furanone (Fimbrolide), die in dieser Studie verwendet wurden.

Zwei natürlich vorkommende bromierte Furanone, Fimbrolid **F1** und Fimbrolid **F2**, die häufig für die Aufklärung von QS-Signalwegen genutzt werden, wurden entsprechend der bereits publizierten Vorgehensweise hergestellt.^[12] Für die In-situ-Target-Markierung wurden die Grundstrukturen mit einem Alkinrest an der Butylseitenkette ausgestattet (Schema 1; siehe auch Schema S1 der Hintergrundinformationen). Der Alkinrest ermöglicht eine bioorthogonale Ligation über eine Klickreaktion mit funktionalisierten Azidgruppen, die einen Fluoreszenzmarker oder ein Biotin für die Affinitätsanreicherung tragen. Die mit Bromid substituierten Ausgangsstoffe für beide Reaktionen, **3** und **4**, wurden mittels Ringöffnung von 3-(2-Oxopropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-on

(**2**) mit HBr zu 5-Brom-2-(2-oxopropyl)pentansäure, anschließender Bromierung und Cyclisierung hergestellt. Der nukleophile Austausch der aliphatischen Bromidseitenkette mit 5-Hexinsäure führte zu den Estern **FP1** und **FP2** (Schema S1). Zusätzlich ermöglichte die Umwandlung des Bromsubstituenten zu einem Acetoxyrest mit KOAc oder AgOAc, gefolgt von einer Hydrolyse zu einer Hydroxygruppe, die Oxidation zu den Aldehyden **7** und **8** mithilfe des Dess-Martin-Reagens. **7** und **8** reagierten mit Ethylmagnesiumbromid und ergaben die Produkte **FP3** und **FP4** (Schema 1).

Um die Studien ausschließlich auf die Inhibierung des QS und nicht des Wachstums von *Vibrio* zu richten, wurden alle Moleküle zunächst auf antibakterielle Aktivität geprüft. In Übereinstimmung mit vorherigen Studien beeinflussten die Naturstoffe **F1** und **F2** sowie **FP1–FP3** das Wachstum von *V. harveyi* NBRC 16534 und *V. campbellii* ATCC BAA-1116 kaum (Test bis zu 200 µM; Tabelle S1).^[8] Lediglich **FP4** zeigte einen Effekt mit einer minimalen Hemmkonzentration (MIC) von 100 µM, weshalb diese Substanz von den weiteren Studien ausgeschlossen wurde. Anschließend wurde der Einfluss aller Substanzen auf die Biolumineszenz beider *Vibrio*-Stämme getestet. **F1** und die zugehörige Sonde **FP3** zeigten die besten IC₅₀-Werte (4–13 µM), was mit vorherigen Studien des Naturstoffes übereinstimmte (Abbildung S1).^[12] Eine geringere Aktivität wurde für **F2** und den entsprechenden Ester **FP2** festgestellt. Aus diesem Grund fokussierten wir die folgenden Studien zur Identifikation der Angriffsziele im Proteom auf den Naturstoff **F1** und auf **FP3**.

Die Inkubation von intakten *V. harveyi*-NBRC-16534- und *V. campbellii*-ATCC-BAA-1116-Zellen mit **FP3**, gefolgt von Zellyse, Klick-Ligation an Rhodaminazid,^[13] Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese und Detektion der Fluoreszenz, ergab mehrere eindeutige Banden in der löslichen Fraktion und weniger klare Banden in der unlöslichen Fraktion (Abbildungen 2A und S2). Aus diesem Grund konzentrierten wir uns auf das lösliche Proteom und nutzten eine Konzentration von 50 µM, die für eine eindeutige Markierung ausreichend war. In einem Kontroll-experiment wurden die Zellen zuvor mit einem 10-fachen Überschuss an **F1** inkubiert. Die Fluoreszenzintensität der Proteine nahm deutlich ab, was vermuten lässt, dass diese Proteine ein Ziel des Naturstoffes sind. Um einen umfassenden Überblick aller irreversiblen Angriffsziele von **FP3** und dem Naturstoff **F1** zu bekommen, wurden drei verschiedene Proben für die Gel-freie MS vorbereitet: 1) Anreicherung von **FP3** über DMSO, 2) ein Konkurrenzexperiment unter Zugabe eines 20-fachen Überschusses an **F1** vor der Zugabe von **FP3**, 3) DMSO als Kontrolle. Die angereicherten Proteine dieser Proben wurden nach einem Trypsin-verdau mithilfe leichter, mittlerer und schwerer Isotope von Dimethylformaldehyd markiert.^[14] Die statistische Analyse der markierten Proteine (im Vergleich zur DMSO-Kontrolle) ergab mehrere Treffer in *V. harveyi* (Volcano Plot; Abbildung S3A). Unter diesen Treffern waren die Proteine LuxS, PhaB und ein Cystathion-β-Synthase(CBS)-Domänenprotein (Inosinmonophosphat-Dehydrogenase (IMPD)). Die Analyse des Konkurrenzexperiments bestätigte diese Proteine als



Schema 1. a) LDA, THF, -78°C , 10 min; b) TMSCl, RT, 1 h; c) Br_2 , Et_3N , DCM, -15°C , 30 min, 55% über 3 Stufen; d) EAA, NaOEt, THF, Rückfluss; e) wässr. NaOH, über Nacht (ÜN), dann HCl; f) Toluol, Rückfluss, 6 h, 22% über 3 Stufen; g) 33% HBr in AcOH, RT, 12 h; h) Br_2 , AcOH/ $\text{CHCl}_3 = 2:1$, RT; i) H_2SO_4 , Rückfluss, 120°C , 15 min, 12% für 3 und 23% für 4 über 3 Stufen; j) AgOAc in AcOH, Rückfluss, 6 h (für 3) oder KOAc in DMSO, RT, 6 h (für 4); k) 12% HCl, ÜN, 79% für 5 und 85% für 6 über 2 Stufen; l) DMP, DCM, 0.5 h, 60% für 7 und 72% für 8; m) Ethynylmagnesiumbromid in THF, $0^{\circ}\text{C} \rightarrow \text{RT}$, 18% für FP3 und 29% für FP4. LDA = Lithiumdiisopropylamid, THF = Tetrahydrofuran, TMSCl = Trimethylsilylchlorid, EAA = Ethylacetoacetat, DMSO = Dimethylsulfoxid, DMP = Dess-Martin-Periodinan, DCM = Dichlormethan.

Angriffsziele des unmodifizierten Naturstoffes **F1** (Abbildung 2B).

Anschließend verglichen wir diese Ergebnisse mit *V. campbellii* ATCC BAA-1116, einem Stamm mit intrinsisch stärkerer Biolumineszenz. In diesem Fall identifizierten wir mit der Anreicherungs- und Konkurrenzstrategie neben einigen anderen Treffern, inklusive IMPD und LuxS, die Fettsäure-Synthetase LuxE als ein weiteres Zielprotein (Abbildungen 2C und S3B).^[15] LuxE konnte in den Anreicherungsexperimenten in *V. harveyi* NBRC 16534 nicht detektiert werden (die Sequenzidentität von LuxE aus beiden Stämmen beträgt 98%), was für eine signifikant herabgesetzte Expression des Proteins, die unterhalb des Detektionslimits liegt, spricht. Tatsächlich ergab die vergleichende Proteomanalyse beider Stämme eine 10-fach höhere LuxC-DABE-Expression in *V. campbellii* ATCC BAA-1116 gegenüber der in *V. harveyi* NBRC 16534, wodurch höchstwahrscheinlich auch die beobachteten Unterschiede der Biolumineszenzaktivitäten zu erklären sind (Abbildung S4). Im Unterschied dazu waren die Expressionsniveaus von IMPD und LuxS vergleichbar. Unsere experimentelle Vorgehensweise führte nicht zur Detektion von LuxR, einem vor kurzem postulierten Target von **F1**, obwohl es in beiden Stämmen produziert wurde. Dies ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass **F1** zumindest nicht irreversibel an LuxR bindet.

Die identifizierten Targets wurden auf Grundlage vorhandener Funktionsdaten in drei Gruppen eingeteilt. Kategorie 1 umfasst Proteine mit unbekannter Funktion, wie das 15.6-kDa-CBS-Domänenprotein IMPD. Proteine mit einer mutmaßlichen Rolle beim QS, wie das Enzym PhaB, das in die Polyhydroxybutyrat (PHB)-Biosynthese involviert ist, wurden als Kategorie 2 klassifiziert. Kategorie 3 enthält

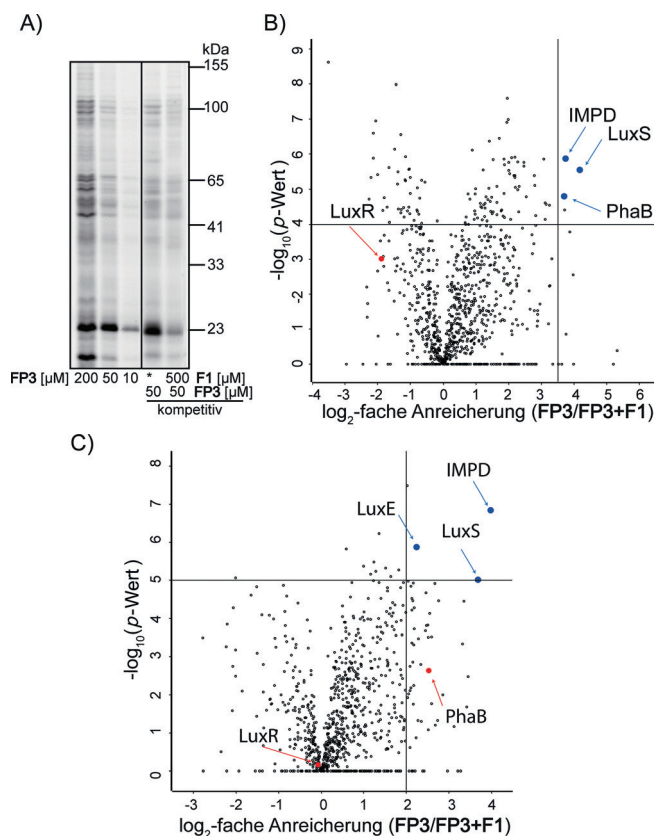


Abbildung 2. A) Fluoreszenz-SDS-Gel der in situ markierten *V. harveyi*-Zellen mit FP3 (verschiedene Konzentrationen) und Konkurrenzexperiment mit 50 μM FP3 und einem 10-fachen Überschuss an **F1** (lösliche Fraktion). *Zugabe von DMSO. B) Volcano Plot des Gel-freien ABPP-Experiments in *V. harveyi* nach Behandlung mit 50 μM FP3 und einem 20-fachen Überschuss an **F1** (FP3 + **F1**). Die blauen Punkte zeigen die Targets, die von **F1** verdrängt werden (Kriterien: \log_2 -fache Anreicherung ≥ 3.5 und $-\log_{10}(p\text{-Wert}) \geq 4$) und von FP3 gegenüber DMSO angereichert werden (vgl. Abbildung S3A). C) Volcano Plot des Gel-freien ABPP-Konkurrenzexperimentes in *V. campbellii*, behandelt mit 50 μM FP3 und einem 20-fachen Überschuss an **F1** (FP3 + **F1**). Die blauen Punkte zeigen die Targets, die von **F1** verdrängt werden (Kriterien: \log_2 -fache Anreicherung ≥ 2 und $-\log_{10}(p\text{-Wert}) \geq 5$) und von FP3 gegenüber DMSO angereichert werden (vgl. Abbildung S3B). Die Ergebnisse in (B) und (C) entsprechen drei biologischen Replikaten mit technischen Duplikaten. Die $-\log_{10}(p\text{-Werte})$ wurden mittels two sided one sample Student's t-test berechnet. Die im Text diskutierten Proteine sind rot dargestellt. Eine Liste aller Angriffsziele befindet sich in Tabelle S2.

Proteine, wie LuxS und LuxE, die eine bestätigte Rolle bei den QS-/Biolumineszenz-Signalwegen spielen. Alle Target-Proteine wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert, und Bindung von FP3 wurde mithilfe der fluoreszierenden SDS-PAGE gezeigt (Abbildung 3A). Da der Fokus dieser Studie auf dem Wirkmechanismus der Fimbrilide in Bezug auf die Signalwege des QS und der Biolumineszenz lag, konzentrierten wir alle nachfolgenden Validierungen auf Proteine der Kategorien 2 und 3.

PhaB katalysiert die Reduktion von Acetoacetyl-CoA zu Hydroxybutyryl-CoA, die durch **F1** inhibiert wird (Abbildung S5). Ein Bezug zwischen PhaB und QS war bereits bekannt, wobei PhaB eine Funktion als potenzieller Energie-

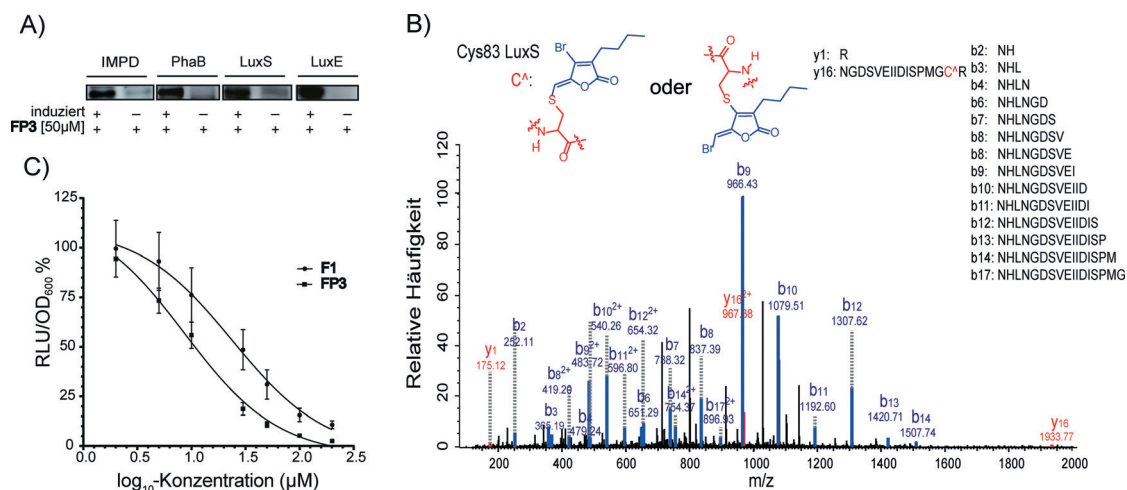


Abbildung 3. A) Analytische In-situ-Markierung von rekombinant produzierten IMPD, PhaB, LuxS, LuxE in *E. coli* mit 50 μM **FP3**. Induziert bedeutet Induktion der Proteinüberproduktion. B) MS/MS-Analyse deckt die Bindung von **F1** an Cys83 in LuxS auf. C) Die Biolumineszenz von *E. coli*-DH5α-Zellen, die das *luxCDABE*-Operon unter der Kontrolle des *lacZ*-Promotors exprimieren, wurde durch **F1** und **FP3** inhibiert. RLUs (Relative Luminescence Units) wurden zunächst auf die optische Dichte (OD₆₀₀) und dann auf die DMSO-Kontrolle (%) normiert. Die Daten basieren auf drei biologischen Replikaten mit technischen Duplikaten, und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte.

speicher zukommt.^[16] Um die Rolle von PhaB näher zu untersuchen, erstellten wir einen *phaB*-Deletionsstamm. Allerdings waren Wachstum und Intensität der Biolumineszenz in diesem Stamm vergleichbar mit denen des Wildtypstamms (Abbildung S5B,C). Aus diesem Grund wurde das Kategorie-2-Protein PhaB als QS/Biolumineszenz-assoziiertes Fimbrolid-Target ausgeschlossen.

Die Validierung der Kategorie-3-Proteine konzentrierte sich zunächst auf LuxS, das wegen der AI-2-Biosynthese eine essenzielle Rolle beim QS spielt. Fimbrolid **F1** inhibierte die Aktivität von LuxS, was mit einer früheren Publikation übereinstimmt (Abbildung S5D).^[7a] Allerdings ergab unsere MS/MS-Sequenzierung, dass das katalytische Cys83, und nicht wie bisher angenommen Cys128, als Ligandbindestelle fungiert (Abbildungen 3B und S6).^[17]

Obwohl LuxS essenziell für QS ist, kann die Inhibition von LuxS durch die Fimbrolide nicht der alleinige Grund für die beobachtete Verringerung der Biolumineszenz sein, besonders aufgrund der Befunde für die *luxS*- und *luxO*-Deletionsmutanten (Abbildung S1).^[7b] Aus diesem Grund sind Proteine wie LuxR oder der LuxCDABE-Luziferase-Komplex, die downstream von LuxO liegen, potenzielle Angriffsziele. LuxE, das als ein Haupttreffer in unseren MS-Experimenten identifiziert wurde, stellt eine Untereinheit des Luziferase-Komplexes dar. LuxE aktiviert Myristinsäure zu einem Fettsäure-AMP-Intermediat, das anschließend auf LuxC zur weiteren Prozessierung übertragen wird. Cys362 wurde als Bindestelle der Fimbrolide über MS/MS-Sequenzierung bestimmt (Abbildung S7). Da dieser Cysteinrest essenziell für den katalytischen Mechanismus ist, kann man für die Fimbrolide nicht nur eine Bindung an LuxE, sondern ähnlich wie für LuxS eine Inhibition der LuxE-Aktivität vermuten.^[15] Die nachfolgenden Experimente sollten diese Hypothese bestätigen. Da die Proteine im LuxCDABE-Komplex direkt zusammenarbeiten, ist es schwierig, die Funktion der isolierten Enzyme zu untersuchen. Aus diesem

Grund haben wir *E. coli* mit einem Plasmid transformiert, das das *luxCDABE*-Operon von *Photobacterium luminescens* trägt (LuxE-Sequenzidentität 62%). Der Vorteil des Lumineszenzsystems dieses Stammes ist, dass keine QS-Signaltransduktionskaskade benötigt wird, um Biolumineszenz zu produzieren.^[18] Rekombinantes LuxE von *P. luminescens* wurde von den Fimbroliden gebunden (Abbildung S8), und darüber hinaus reduzierte die Zugabe von **F1** und **FP3** konzentrationsabhängig die Biolumineszenz mit IC₅₀ = 24 bzw. 9 μM, was die Annahme stützt, dass LuxE, als Bestandteil des Luziferase-Komplexes, ein weiteres Angriffsziel der Fimbrolide darstellt (Abbildung 3C).

Unsere Untersuchungen bestätigen die Proteine LuxS, LuxE, PhaB und das uncharakterisierte IMPD als Angriffsziele für Fimbrolide. Die katalytischen Cysteine von LuxS und LuxE konnten zudem als Bindestellen identifiziert werden. Das Fehlen von LuxR in unseren Proteomexperimenten spricht dafür, dass der Transkriptionsregulator zumindest kein irreversibles Ziel der Fimbrolide darstellt. LuxR kam als mögliches Fimbrolid-Angriffsziel in den Fokus, weil die Daten auf eine Inhibition der Biolumineszenz downstream von LuxO hinwiesen. Die hier gezeigte Bindung der Fimbrolide an LuxE liefert eine neue, alternative Erklärung. Insgesamt ist es erstaunlich, dass ein einzelner Naturstoff verschiedene Proteine auf unterschiedlichen Stufen inhibiert, um einen Phänotyp zu erzielen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde gefördert durch die DFG, FOR1406 und den ERC Starting Grant (250924-antibacterials) (S.A.S.) sowie Exc114/2 und JU270/13-1 (K.J.). W.Z. bedankt sich beim China Scholarship Council. Wir danken Prof. Tom Coenye (Ghent University) für den lumineszierenden *E. coli*-Stamm (DH5 alpha mit pBluelux), Priv.-Doz. Dr. Ralf Herr-

mann für den *Photorhabdus*-Stamm, Elena Kunold für ihre Hilfe mit der MS-Analyse sowie Vadim Korotkov und Megan Wright für das kritische Lesen des Manuskripts.

Stichwörter: Biolumineszenz · Fimbrilide · Proteomik · Quorum Sensing

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1187–1191
Angew. Chem. **2016**, *128*, 1203–1207

-
- [1] a) C. M. Waters, B. L. Bassler, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, *21*, 319–346; b) W. R. Galloway, J. T. Hodgkinson, S. D. Bowden, M. Welch, D. R. Spring, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 28–67.
- [2] K. H. Nealson, T. Platt, J. W. Hastings, *J. Bacteriol.* **1970**, *104*, 313–322.
- [3] a) J. G. Cao, E. A. Meighen, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21670–21676; b) X. Chen, S. Schauder, N. Potier, A. Van Dorsselaer, I. Pelczar, B. L. Bassler, F. M. Hughson, *Nature* **2002**, *415*, 545–549; c) J. A. Freeman, B. N. Lilley, B. L. Bassler, *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 139–149; d) J. M. Henke, B. L. Bassler, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 6902–6914; e) M. B. Neiditch, M. J. Federle, S. T. Miller, B. L. Bassler, F. M. Hughson, *Mol. Cell* **2005**, *18*, 507–518.
- [4] a) J. A. Freeman, B. L. Bassler, *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 665–677; b) A. J. Pompeani, J. J. Irgon, M. F. Berger, M. L. Bulyk, N. S. Wingreen, B. L. Bassler, *Mol. Microbiol.* **2008**, *70*, 76–88; c) B. L. Bassler, M. Wright, M. R. Silverman, *Mol. Microbiol.* **1994**, *13*, 273–286.
- [5] R. de Nys, A. D. Wright, G. M. König, O. Sticher, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 11213–11220.
- [6] a) M. Hentzer, K. Riedel, T. B. Rasmussen, A. Heydorn, J. B. Andersen, M. R. Parsek, S. A. Rice, L. Eberl, S. Molin, N. Hoiby, S. Kjelleberg, M. Givskov, *Microbiology* **2002**, *148*, 87–102; b) S. K. Kutty, N. Barraud, A. Pham, G. Iskander, S. A. Rice, D. S. Black, N. Kumar, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9517–9529.
- [7] a) T. Zang, B. W. Lee, L. M. Cannon, K. A. Ritter, S. Dai, D. Ren, T. K. Wood, Z. S. Zhou, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6200–6204; b) T. Defoirdt, C. M. Miyamoto, T. K. Wood, E. A. Meighen, P. Sorgeloos, W. Verstraete, P. Bossier, *Environ. Microbiol.* **2007**, *9*, 2486–2495; c) M. Manefield, R. de Nys, N. Kumar, R. Read, M. Givskov, P. Steinberg, S. Kjelleberg, *Microbiology* **1999**, *145*, 283–291; d) M. Hentzer, M. Givskov, *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1300–1307.
- [8] M. Givskov, R. de Nys, M. Manefield, L. Gram, R. Maximilien, L. Eberl, S. Molin, P. D. Steinberg, S. Kjelleberg, *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 6618–6622.
- [9] a) M. Manefield, T. B. Rasmussen, M. Hentzer, J. B. Andersen, P. Steinberg, S. Kjelleberg, M. Givskov, *Microbiology* **2002**, *148*, 1119–1127; b) B. Koch, T. Liljefors, T. Persson, J. Nielsen, S. Kjelleberg, M. Givskov, *Microbiology* **2005**, *151*, 3589–3602.
- [10] B. Lin, Z. Wang, A. P. Malanoski, E. A. O'Grady, C. F. Wimpee, V. Vuddhakul, N. Alves, Jr., F. L. Thompson, B. Gomez-Gil, G. J. Vora, *Environ. Microbiol. Rep.* **2010**, *2*, 81–89.
- [11] a) M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279–3301; b) T. Böttcher, M. Pitscheider, S. A. Sieber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2680–2698; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2740–2759; c) M. Fonović, M. Bogoy, *Expert Rev. Proteomics* **2008**, *5*, 721–730.
- [12] a) C. A. Lowery, T. Abe, J. Park, L. M. Eubanks, D. Sawada, G. F. Kaufmann, K. D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15584–15585; b) A. J. Manny, S. Kjelleberg, N. Kumar, R. Nys, R. W. Read, P. Steinberg, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 15813–15826.
- [13] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686–4687.
- [14] P. J. Boersema, R. Raijmakers, S. Lemeer, S. Mohammed, A. J. Heck, *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 484–494.
- [15] R. R. Soly, E. A. Meighen, *J. Mol. Biol.* **1991**, *219*, 69–77.
- [16] a) C. M. Miyamoto, W. Sun, E. A. Meighen, *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, *1384*, 356–364; b) W. Sun, J. G. Cao, K. Teng, E. A. Meighen, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 20785–20790.
- [17] M. T. Hilgers, M. L. Ludwig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 11169–11174.
- [18] a) G. Brackman, T. Defoirdt, C. Miyamoto, P. Bossier, S. Van Calenbergh, H. Nelis, T. Coenye, *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 149; b) I. Kurvet, A. Ivask, O. Bondarenko, M. Sihtmae, A. Kahru, *Sensors* **2011**, *11*, 7865–7878.

Eingegangen am 27. August 2015

Online veröffentlicht am 26. November 2015