

Antibiotikaforschung

Antibakterielle Strategien und bakterielle Abwehrmechanismen

SINA LANGKLOTZ, JULIA E. BANDOW
ANGEWANDTE MIKROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT BOCHUM

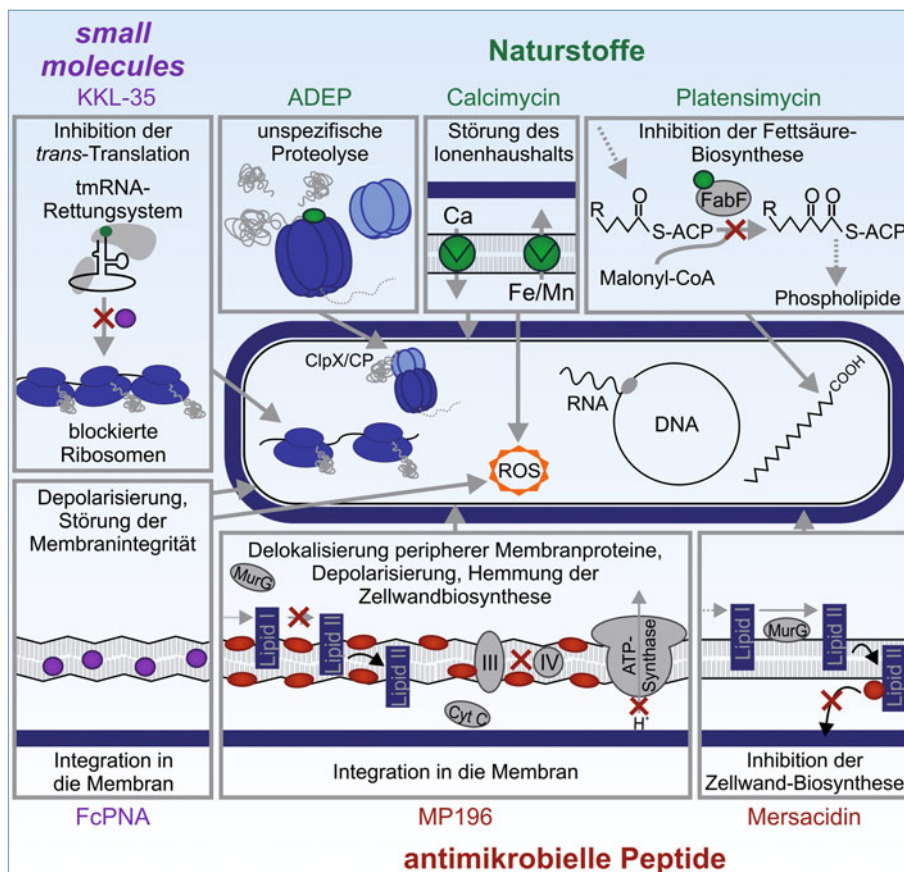
VAAM-Forschungspreis 2014

In the face of multi-resistant pathogens it is time to find new antibacterial strategies. A system-based approach to studying antibiotic action of natural compounds, antimicrobial peptides, and small molecules allows investigation of clinically unexploited antibiotic classes and targets as well as intrinsic bacterial defence mechanisms. We also investigate the antibacterial activity and mechanisms of action of technical plasmas (ionized gases). They are promising wound disinfectants, which are in clinical development to complement established antibiotic approaches.

DOI: 10.1007/s12268-014-0512-4
© Springer-Verlag 2014

Die industrielle Produktion von Antibiotika im Tonnenmaßstab hat bis heute viele Menschenleben gerettet, führte aber gleichzeitig zu einer massiven Freisetzung von Antibiotika in die Umwelt. Nachdem Bakterien seit Jahrtausenden mit Antibiotika konfrontiert sind, die von anderen Mikroorganismen produziert werden, ist eine schnelle Anpassung an die vom Menschen genutzten Antibiotika wenig verwunderlich – mit weitreichenden Konsequenzen für die Gesellschaft. Die Entstehung und Ausbreitung multiresistenter Krankheitserreger stellt eine der großen Herausforderungen unserer Zeit dar. Eine Entwicklung neuer effektiver antibakterieller Strategien ist daher dringend erforderlich.

Unter den antibakteriellen Strategien, die in unserer Arbeitsgruppe untersucht werden, sind Naturstoffe, antimikrobielle Peptide und kleine Moleküle (Abb. 1). Die Substanzen selbst stammen häufig von akademischen Kooperationspartnern oder Firmen. Wir untersuchen, wie diese Substanzen wirken. Dabei sind wir auf der Suche nach Zielstrukturen (Targets), die klinisch bisher noch nicht genutzt werden, und nach Substanzen, die klinisch bewährte Targets angreifen, aber



◀ **Abb. 1:** Wirkmechanismen ausgewählter Naturstoffe, antimikrobieller Peptide und kleiner Moleküle (*small molecules*). Acyldepsipeptid (ADEP) bindet ClpP und bewirkt dadurch, dass ATP-unabhängig intakte Proteine von der Protease abgebaut werden. Calcimycin stört die Metallhomöostase, indem es Metallkationen über Membranen transportiert. Platensimycin inhibiert die Fettsäurebiosynthese durch Bindung an FabF. Das Lantibiotikum Mersacidin bindet Lipid II und hemmt so die Zellwandbiosynthese. Das kleine kationische Peptid MP196 integriert in die bakterielle Membran, was zur Depolarisierung und Delokalisierung peripherer Membranproteine der Atmungskette (Cytochrom c) und der Zellwandbiosynthese (MurG) führt. Auch das hetero-tri-organometallische FcPNA integriert in die Membran und führt zur Depolarisierung. KKL-35 hemmt die *trans*-Translation, einen Prozess, durch den Ribosomen von defekten mRNAs (z. B. mRNAs ohne Stoppcodon) abgelöst werden können.

bereits verbreitete Resistenzen umgehen. Auch interessieren wir uns für die intrinsischen bakteriellen Abwehrmechanismen, die einer klinischen Anwendung neuer Antibiotika im Wege stehen könnten. Neben der etablierten Strategie, Antibiotika zu entwickeln, untersuchen wir das Potenzial von technischen Plasmen, die aus ionisierten Gasen bestehen und stark antibakteriell wirken.

Wirkmechanismen und intrinsische Resistenzmechanismen

Wir nutzen einen systembasierten Ansatz, um die Reaktion von Bakterien auf eine akute Konfrontation mit Antibiotika zu untersuchen. Dabei liegt der Fokus auf der Untersuchung des bakteriellen Proteoms. Dieses verrät uns, welche kompensatorischen Mechanismen auf Proteinebene in Gang gesetzt werden, die den Zellen ein Überleben des Antibiotikum-Stresses ermöglichen. Gleichzeitig werden direkte Auswirkungen der Antibiotikabehandlung auf die Proteinbiosynthese und spezifische Proteinmodifikationen sichtbar [1]. Ergänzend dazu untersuchen wir bakterielle Metaboliten sowie die Zusammensetzung der Membran und der Metallionen [2].

Naturstoffe – eine vielversprechende Quelle für neue Antibiotikaklassen

Die meisten Antibiotikaklassen, die heute systemisch angewendet werden, leiten sich von Naturstoffen ab, und diese sind nach wie vor eine sehr vielversprechende Quelle für neue Substanzklassen. Gerade mithilfe von natürlichen Substanzen ist es möglich, neue Targets zu identifizieren. Ein Beispiel sind die Acyldepsipeptide, die die Protease ClpP angreifen und sie dazu bringen, intakte zelluläre Proteine abzubauen [3].

Auch der strikt regulierte bakterielle Ionenhaushalt könnte ein lohnendes Target darstellen, sofern eine Selektivität für bakterielle Zellen gewährleistet ist. Insbesondere Eisen ist in der Wirt-Mikroben-Interaktion oft stark umkämpft. Da uns derzeit noch keine Ionophore zur Verfügung stehen, die selektiv für Bakterien sind, untersuchten wir die Effekte des Ionophors Calcimycin, das sehr effizient divalente Kationen über Membranen transportiert. Insbesondere unter Eisen- und Mangan-Mangelbedingungen zeigt es eine starke antibakterielle Aktivität. Der Modellorganismus *Bacillus subtilis* reagiert umgehend durch die Produktion von hochaffinen Siderophoren [4]. An diesem Beispiel wird deutlich, welche wertvollen Hinweise die Proteom-

antwort für eine Abschätzung des mit einem neuen Target verbundenen Risikos geben kann. Siderophore sind wichtige Virulenzfaktoren vieler Krankheitserreger und eine verstärkte Synthese ist sicher kontraproduktiv.

Des Weiteren sind mögliche intrinsische Toleranzmechanismen, die mit neuen Targets verbunden sind, von Interesse. Die Fettsäurebiosynthese ist ein Target, das aktuell klinisch validiert wird. Wir beobachteten, dass in Antwort auf die Fettsäurebiosynthese-Hemmer Platencin, Platensimycin und Cerulenin in *B. subtilis* der gesamte Biosyntheseweg stark induziert wird [5]. Es sind bereits Punktmutationen in Zielgenen beschrieben, die zu einer erhöhten Toleranz gegenüber Fettsäurebiosynthese-Hemmern führen. Auch die Überproduktion des molekularen Targets kann hier schnell zu erhöhter Toleranz führen.

Antimikrobielle Peptide – jeder nutzt sie

Antimikrobielle Peptide werden sowohl von Mikroorganismen als auch von Pflanzen und Tieren produziert. Sie stellen eine strukturell recht diverse Gruppe von Antibiotika dar. Die Lantibiotika, natürlich vorkommende Lanthionin-haltige Peptide, sind in der Lage, die Zellwandbiosynthese-Vorstufe Lipid II zu binden und so die Zellwandbiosynthese zu blockieren. Markerproteine für Zellmembranstress zeigen, wie sich die verschiedenen Lantibiotika in der Fähigkeit, zusätzlich mit der Lipiddoppelschicht der Membran zu interagieren, unterscheiden [6, 7].

Kleine kationische Peptide interagieren häufig direkt mit der Phospholipiddoppelschicht der bakteriellen Membran. So kann ein Hexapeptid aus alternierenden Arginin- und Tryptophanresten effektiv das Wachstum von grampositiven Bakterien hemmen. Anhand dieses Peptids untersuchen wir die Wirkung dieser Peptidklasse auf lebende Zellen [2]. Das Peptid integriert direkt in die Lipiddoppelschicht. Durch die Interaktion mit der Membran werden proteinvermittelte Prozesse, die an der Membran ablaufen, wie die Zellwandbiosynthese und die Atmungskette, durch das Ablösen peripherer Membranproteine gehemmt. Eines der betroffenen Enzyme der Zellwandbiosynthese, MurG, wurde parallel als Antibiotikum-Target des synthetischen kleinen Moleküls Murgocil identifiziert [8]. Eine Abwehrstrategie von *B. subtilis* gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Peptiden besteht darin, den osmotischen

Druck der Zelle durch das Ausschleusen von Aminosäuren herabzusetzen und so ein Platzen der Zelle zu verhindern [2].

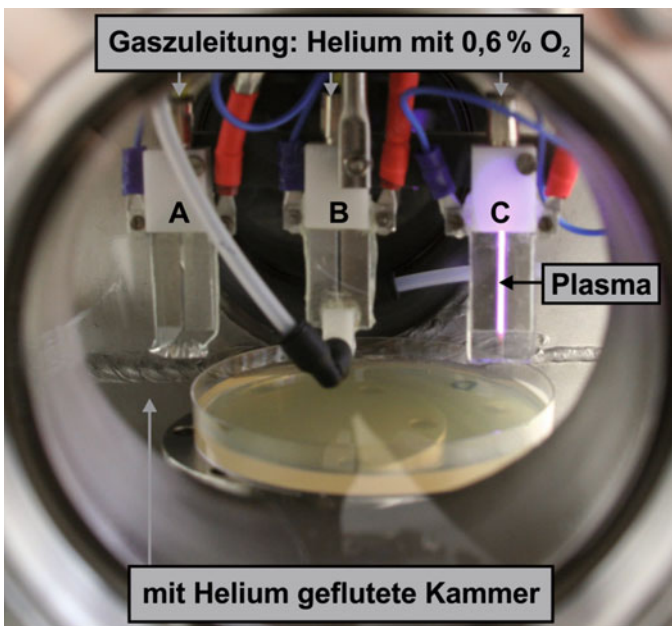
Small molecules – das Potenzial naturfremder Moleküle

Vollsynthetische Substanzen, insbesondere solche mit Strukturelementen, die in der Natur nicht vorkommen, haben das Potenzial, eine Resistenzbildung dadurch zu verzögern, dass die im Genpool vorhandenen Resistenzmechanismen nicht greifen. Eine solche Strukturklasse sind die hetero-tri-organometallischen PNAs (Peptidnukleinsäuren), die drei verschiedene organometallische Reste tragen. Als Targetstruktur dieser Substanzen konnten wir die Zellmembran identifizieren. Durch den Austausch eines Ruthenocens gegen ein Redox-aktives Ferrocen konnte in der Zelle zusätzlich oxidativer Stress ausgelöst werden [9]. Da oxidativer Stress das Überleben von Bakterienzellen unter Antibiotikastress erheblich erschwert, könnte es sich als interessante Strategie erweisen, oxidativen Stress in bewährte Antibiotikaklassen quasi hineinzudesignen.

Kürzlich wurde eine neue Klasse von kleinen Molekülen beschrieben, die die *trans*-Translation inhibieren [10]. Dieser Prozess sorgt dafür, dass Ribosomen von mRNAs abgelöst werden können, die z. B. durch einen Strangbruch kein Stoppcodon besitzen. Die *trans*-Translation kommt nur in Bakterien vor und stellt möglicherweise ein attraktives neues Target dar. Derzeit untersuchen wir die Reaktion von *B. subtilis* auf eine Hemmung der *trans*-Translation, um Erkenntnisse über mögliche intrinsische Resistenzmechanismen und die molekulare Zielstruktur am Ribosom zu gewinnen.

Ionisierte Gase im Kampf gegen bakterielle Krankheitserreger?

Ein gezielter und begrenzter Einsatz von Antibiotika wird als sehr wichtig erachtet, wenn es darum geht, die Wirksamkeit dieser wertvollen Ressourcen möglichst lange zu erhalten. In bestimmten Bereichen wären alternative antibakterielle Strategien denkbar. Plasmen sind ionisierte Gase. Zur Erzeugung technischer Plasmen verwendet man häufig Luft oder Edelgase, denen Sauerstoff oder Stickstoff beigemischt sein kann. Die beachtliche antibakterielle Aktivität von Niederdruckplasmen, die bei vakuumnahen Drücken gezündet werden, wird in industriellen Sterilisationsprozessen bereits ausgenutzt. Seit etwa zehn Jahren können „kalte“ Plasmen



◀ **Abb. 2:** Der Forschungsreaktor erzeugt Plasmen mit verschiedenen Gasmischungen. In der Heliumkammer werden Sekundärreaktionen minimiert. Kanal A ist so gebogen, dass nur die vom Plasma emittierten Teilchen die Probe erreichen. In Kanal B werden die Teilchen durch einen seitlichen Heliumstrom abgelenkt, und nur die UV-Strahlung gelangt auf die Probe. Bei Kanal C trifft der gesamte Effluent auf die Probe. (Bild: J.-W. Lackmann, Universität Bochum)

mit Gastemperaturen um 37°C auch bei Atmosphärendruck erzeugt werden. Erste klinische Versuche zeigen einen positiven Einfluss dieser Plasmen auf die Heilung von chronischen Wunden, der sowohl auf eine desinfizierende als auch eine Wundheilung-stimulierende Wirkung zurückgeführt wird [11]. Uns interessiert, welche molekularen Mechanismen der desinfizierenden Wirkung von Plasmen zugrunde liegen [12] und wie sich diese bei verschiedenen Plasmaquellen und Gasmischungen unterscheiden (**Abb. 2**). Es bleibt abzuwarten, inwiefern sich kalte Atmosphärendruckplasmen für einen breiten Einsatz zur Behandlung von Hauterkrankungen eignen und ob sie beispielsweise auch für eine präoperative und intraoperative Desinfektion geeignet sind.

Danksagung

Wir danken dem Land Nordrhein-Westfalen, dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung der Europäischen Union „Investitionen in unsere Zukunft“ und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung unserer Forschungsprojekte. ■

Literatur

- [1] Wenzel M, Bandow JE (2011) Proteomic signatures in antibiotic research. *Proteomics* 11:3256–3268
- [2] Wenzel M, Chiriac AI, Otto A et al. (2014) Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E1409–E1418
- [3] Brötz-Oesterhelt H, Beyer D, Kroll HP et al. (2005) Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nat Med* 11:1082–1087
- [4] Raatschen N, Wenzel M, Leichert LIO et al. (2013) Extracting iron and manganese from bacteria with ionophores – a mechanism against competitors characterized by increased potency in environments low in micronutrients. *Proteomics* 13:1358–1370

- [5] Wenzel M, Patra M, Albrecht D et al. (2011) Proteomic signature of fatty acid biosynthesis inhibition available for *in vivo* mechanism-of-action studies. *Antimicrob Agents Chemother* 55:2590–2596
- [6] Wenzel M, Kohl B, Münch D et al. (2012) Proteomic response of *Bacillus subtilis* to lantibiotics reflects differences in interaction with the cytoplasmic membrane. *Antimicrob Agents Chemother* 56:5749–5757
- [7] Münch D, Müller A, Schneider T et al. (2014) The mechanism of action of the lantibiotic NAI-107. *J Biol Chem* 289:12063–12076
- [8] Mann PA, Müller A, Xiao L et al. (2013) Murgocil is a highly bioactive staphylococcal-specific inhibitor of the peptidoglycan glycosyltransferase enzyme MurG. *ACS Chem Biol* 8:2442–2451
- [9] Wenzel M, Patra M, Senges CHR et al. (2013) Target identification of potent antibacterial hetero-triorganometallic compounds – a structurally new class of antibiotics. *ACS Chem Biol* 8:1442–1450
- [10] Ramadoss NS, Alumasa JN, Cheng L et al. (2013) Small molecule inhibitors of *trans*-translation have broad-spectrum antibiotic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:10282–10287
- [11] Lackmann JW, Bandow JE (2014) Inactivation of microbes and macromolecules by atmospheric-pressure plasma jets. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:6205–6213
- [12] Lackmann JW, Schneider S, Edengeiser E et al. (2013) Photons and particles from atmospheric-pressure plasma inactivate bacteria and biomolecules independently and synergistically. *J R Soc Interface* 10:20130591

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Julia E. Bandow
Dr. Sina Langklotz
Ruhr-Universität Bochum
Angewandte Mikrobiologie
Universitätsstraße 150
D-44801 Bochum
Tel.: 0234-3223102
julia.bandow@ruhr-uni-bochum.de
sina.langklotz@ruhr-uni-bochum.de
www.ruhr-uni-bochum.de/ngbandow

AUTORINNEN



Julia Bandow

Jahrgang 1975. Biologiestudium an der Universität Greifswald. 2002 Promotion. 2002–2008 Wissenschaftlerin bei Pfizer Global Research and Development, Ann Arbor, MI, USA. 2008–2014 Juniorprofessorin für Mikrobielle Antibiotikaforschung an der Universität Bochum. Seit 2014 Leiterin der AG Angewandte Mikrobiologie an der Universität Bochum. Im Rahmen der VAAM-Jahresstagung in Dresden mit dem VAAM-Forschungspreis 2014 ausgezeichnet.



Sina Langklotz

Jahrgang 1982. Biologiestudium an der Universität Bochum. 2011 Promotion. Seit 2012 Postdoc in der AG Angewandte Mikrobiologie an der Universität Bochum.