

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

Verwendungsnachweis 01.10.2021- 31.12.2022

**des Vorhabens „GBi2S: BamA-Inhibitoren als innovative
Antibiotika gegen multiresistente gramnegative Erreger
(BamA-Inhibitor)“**

Förderbeginn: 01.10.2021

Ausführende Stelle:

Justus-Liebig-Universität Gießen



Projektleitung:

Professor Dr. Till F. Schäberle

ZE: Justus-Liebig-Universität Gießen	Förderkennzeichen: 16LW0034
Vorhabenbezeichnung: BamA-Inhibitoren als innovative Antibiotika gegen multiresistente gramnegative Erreger (BamA-Inhibitor)	
Laufzeit des Vorhabens: 01.10.2021 bis 31.12.2022	
Berichtszeitraum: 01.10.2021 bis 31.12.2022	

I. 1. Aufgabenstellung

In der Sondierungsphase von BamA-Inhibitor sollte aufbauend auf den bisher erzielten Forschungsergebnissen die Verwertungsidee ausgearbeitet werden. Dazu sollte die Schutzrechtssituation geprüft und eine Freedom to Operate (FtO) Analyse erstellt werden, um basierend darauf eine Schutzrechtsstrategie zu entwickeln.

Ein strategischer Fahrplan, der sowohl die Entwicklung eines neuen Antibiotikums, als auch parallel die Implementierung einer Screeningplattform für weitere neue BamA-Inhibitoren berücksichtigt, soll erstellt werden. Um die unterschiedlichen Verwertungsoptionen zu konzipieren und zu beurteilen sollen in der Sondierungsphase auch orientierende Voruntersuchungen zur technischen Absicherung des Verwertungsplans durchgeführt werden (z.B. durch die Generierung und Identifikation von neuen aktiven BamA Inhibitoren).

Langfristig ist das Ziel ein innovatives Antibiotikum bis zur Marktreife zu entwickeln.

I. 2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Darobactine sind neuartige Moleküle mit antibiotischer Wirkung spezifisch gegen Gramnegative Erreger. Der namensgebende Vertreter dieser Wirkstoffklasse, Darobactin A wurde 2019 unter unserer Mitwirkung publiziert und charakterisiert (Imai et al., 2019). Durch einen bis dato nicht entdeckten Wirkmechanismus, der Inhibition des essentiellen *outer-membrane* Chaperons BamA besitzen Darobactine eine stark bakterizide Aktivität gegen ein breites Spektrum Gramnegativer Erreger ohne Kreuzresistenzen gegen marktverfügbare Antibiotika.

Die bakterizide Wirkung äußert sich dabei in-vitro in geringen minimalen inhibitorischen Konzentrationen (MICs) gegen ESKAPE Pathogene sowie vielversprechende in-vivo Wirkung gegen intraabdominale Infektion mit *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* im Maus Tiermodell. Dabei wurde keine (Cyto)Toxizität in-vitro (HepG2) oder in-vivo (Maus) beobachtet.

Die beteiligten Wissenschaftler*innen, die das Projekt bereits in ihrer Dissertation behandelt haben konnten gehalten werden, um das Projekt zu bearbeiten. Somit war die wissenschaftliche Expertise gegeben. Dazuhin sind die Voraussetzungen am Standort durch die enge Kollaboration der JLU Gießen und des Fraunhofer IME Bioressourcen (IME-BR) in Gießen in der Naturstoffforschung optimal.

I. 3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Es war geplant die einzelnen Sondierungsfragen anhand von 6 Arbeitspaketen zu bearbeiten. Um einen Fahrplan für die Entwicklung eines BamA Inhibitors zu einem neuartigen Antibiotikum zu erstellen sollte das Target Product Profile (TPP), z.B. durch Gramnegative Erreger hervorgerufene

Blutstrominfektion oder Sepsis, auf das die Entwicklung des Antibiotikums abzielen soll, definiert werden. Ein entsprechender Kriterienkatalog sollte erstellt werden, um eine zukünftige Lead-Nomination, anschließende Optimierung, Profilierung der Kandidatenstruktur und präklinische Entwicklung zielgerichtet voranzutreiben. Im Einklang damit sollte auch ein Fahrplan aufgestellt werden, welche Fördermöglichkeiten zum jeweiligen Entwicklungsstand in Betracht gezogen werden können. Dies schließt auch synergistische Effekte mit ein, die z.B. durch Grundlagenforschung-orientierte DFG Projektanträge erzielt werden können.

Dazuhin war geplant, wenn nötig weitere Kontakte zu etablieren, oder bereits bestehende zu intensivieren, um zum einen die Produktentwicklung durch eine industrielle Mentorenschaft zu begleiten und zum anderen alle nötigen Schritte, wie z.B. die Produktion im größeren Maßstab für eventuelle prä- und klinische Studien vorrausschauend zu planen.

Im Einklang mit der Planung wurde nach sorgfältiger Analyse der bisher gewonnenen Daten ein minimales TPP für die Behandlung von Gramnegativen, insbesondere pseudomonadalen Lungen- sowie Bauchfell- und systemischen Infektionen bei intravenöser Gabe erarbeitet. Das optimale TPP erweitert dies um die Therapie von akuter Sepsis sowie die Erweiterung der Applikationsformen um inhalativ und oral. Einem Darobactin Derivat mit FTO konnte dabei verbesserte Aktivität gegen multiresistente *P. aeruginosa* und *A. baumannii* gegenüber Darobactin A nachgewiesen werden, so dass bereits grundlegende Optimierungsansätze zur Deckung des TPPs bestehen.

Im Rahmen von GoBio initial wurde der Anschluss an die Machbarkeitsphase erreicht, so dass sich hier folgend der Sondierungsphase eine weitere Finanzierung ergeben hat. Weiterhin wurde mit der Aufnahme in INCATE ein weiterer Fördertopf sowie relevante Kontakte zu Mentoren, die die Entwicklung begleiten können, erschlossen. Darauf aufbauend finden in 2023 auch Gespräche über die Aufnahme in ENABLE2 statt.

I. 4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Mit der Entdeckung der Darobactine geriet auch deren Zielstruktur in den Fokus internationaler Forschung. Durch seine Lage auf der Zelloberfläche ist BamA ein attraktives Target für die Antibiotikaentwicklung. Während Gramnegative Erreger durch die äußere Membran (*outer membrane*, OM) den Zugang von Antibiotika zu deren Zielstrukturen im Zellinneren einschränken können, gelingt dies bei BamA nicht. Darobactine binden die seitliche Pforte der β-Barrel Struktur des Chaperon-ähnlichen Proteins BamA, welche die Freisetzung fertig gefalteter OM Proteine in die OM übernimmt und arretiert diese. Dadurch wird die Aufrechterhaltung der OM gestört, was zur Zelltlyse führt. Durch PELDOR Messungen unter unserer Mitwirkung konnte dieser Arresteffekt in-vivo beobachtet werden und der MoA damit sehr präzise charakterisiert werden.

Durch diesen neu entdeckten Wirkmechanismus wird ein zentrales Problem antimikrobieller Resistenz bei Gramnegativen Erregern die restriktive äußere Membran faktisch umschifft. Dadurch ist auch eine Kreuzresistenz zu bereits marktverfügbaren Antibiotika ausgeschlossen.

Im Rahmen von Vorarbeiten wurde mit Darobactin B ein Darobactin Derivat mit FTO generiert, welches potenter gegen die Erreger im Fokus, insbesondere *P. aeruginosa* und *A. baumanii* wirkt. Hierzu wurden > 50 multiresistente klinische Isolate von *P. aeruginosa* auf ihre Suszeptibilität gegen Darobactin B und B9 getestet. Der MIC₈₀ liegt dabei bei 8 µg/mL, was ein gutes Signal für die Entwicklung im Rahmen des postulierten TPP darstellt.

I. 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Projekts wurden weitere Partner involviert. So wurde neben der bestehenden engen Kollaboration mit dem Fraunhofer IME-BR eine Zusammenarbeit mit (i) Myria Biosciences (Dr. Steven Schmitt) und der Kinderklinik des Dr. von Hauner Kinder Hospitals, Universitäts Hospital, LMU München (Dr. Ulrich von Both) initiiert.

II. 1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Anhand der im Projektplan niedergeschriebenen Meilensteine (MS) werden im Folgenden die Ergebnisse des Projekts dargestellt.

MS 1: Kriterienkatalog

Zunächst wurde ein Kriterienkatalog erstellt, welcher genutzt wurde um die Anforderung an eine proprietäre Struktur für weitere Entwicklung zu erfassen. Basierend darauf wurden minimale und optimale TPPs erarbeitet für welche wir mit unserer proprietären Struktur eine optimale Ausgangslage für weitere Entwicklung sehen.

MS 2: FtO-Analyse

In Zusammenarbeit mit unseren Patentanwälten wurde eine FtO-Analyse erstellt, die basierend auf unserem Patent freedom to operate für Darobactin B einräumt. Dieser Einschätzung haben sich darüber hinaus unabhängige Patentanwälte angeschlossen. (Vor der Aufnahme zu INCATE wurde dafür eine unabhängige Analyse der wissenschaftlichen Publikationen und Patentanmeldungen durchgeführt.)

MS 3: Gantt Chart präklinische Entwicklung

Um die weitere Entwicklung zunächst bis Eintritt in die präklinische Entwicklung zu planen, insbesondere um den resultierenden Finanzbedarf zu erfassen, wurden die relevanten Schritte ausformuliert, welches das benötigte weitere Fördervolumen definieren. Dies floss dabei in die Folgeantragstellung für die GoBio initial Machbarkeitsphase ein und wurde in diesem Rahmen positiv evaluiert.

MS 4: Reporterstämme

Zur Identifikation von aller aktiver Darobactin Derivate wurde ein Reporterstamm mit sehr hoher Susceptibilität gegen BamA Inhibitoren entwickelt. Dieser ermöglichte durch seine extreme Anfälligkeit für BamA inhibierende Wirkung die Abmessung des für BamA inhibierende Aktivität zur Verfügung stehenden chemischen Raums und diente daher als Voraussetzung für die Kartierung aktiver Darobactin Typ BamA Inhibitoren in MS5. Weiterhin ist dieser Reporterstamm im Gegenscreen mit dem Ausgangsstamm geeignet für weitere high throughput Screenings zur Identifikation strukturell neuer niedermolekularer „*small molecule*“ BamA Inhibitoren.

MS 5: Aktive Moleküle

Zunächst wurden versucht alle Einzelaminosäuren des Darobactin Grundgerüsts gegen alle anderen proteinogenen Aminosäuren auszutauschen. So konnte kartiert werden welche Änderungen am Grundgerüst durch die Biosynthesemaschinerie toleriert werden. Auf Basis des in MS4 erstellten Reporterstamms konnten alle biosynthetisch hergestellten Derivate auf ihre Aktivität hin getestet werden. In einem zweiten Schritt wurden dann eine Sequenzbibliothek erstellt und in einem *high throughput screen* gegen den zuvor erstellten Reporterstamm getestet. Dies resultierte in der Identifikation der aktivsten Aminosäurekombinationen im Darobactin Grundgerüst und bildete damit die Grundlage für die Abschätzung welche Moleküle geeignet sind für die weitere Entwicklung.

II. 2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Position 0812: Der wesentliche Teil der Projektkosten entstand durch Personalausgaben. Über das Projekt wurden – wie geplant – 2 PostDoc-Stellen finanziert. (siehe zahlenmäßigen Verwendungsnachweis vom 05.05.2023 nebst Belegliste)

Position 0843: Verbrauchsmaterialien die während des Projekts angefallen sind. (siehe zahlenmäßigen Verwendungsnachweis vom 05.05.2023 nebst Belegliste)

Position 0846: Reisemittel wurden für den GoBio Workshop (September 2022 in Berlin) verwendet (2 Teilnehmende).

II. 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die im Projekt durchgeführten Forschungsarbeiten, sowie die dafür aufgewandten Ressourcen waren notwendig und angemessen. Sie entsprechen der im Arbeitsplan formulierten Planung und alle wesentlichen im Arbeitsplan formulierten Aufgaben wurden erfolgreich bearbeitet.

II. 4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die erzielten Ergebnisse ermöglichten eine erfolgreiche Folgebewerbung für die Machbarkeitsphase von GoBio initial. Durch den erarbeiteten klaren Fahrplan sowie die vielversprechende optimierte Struktur zur Bekämpfung von *P. aeruginosa* konnte das Projekt in die engere Auswahl zur weiteren Förderung durch GoBio initial aufrücken, welches schließlich die Akquise von 1,2 Mio Euro für die Jahre 2023 und 2024 ermöglichte. Diese Förderung wird genutzt, um die beteiligten Wissenschaftler zu halten, weiter zu qualifizieren und Experimente für die weitere Entwicklung im Unterauftrag bearbeiten zu können. Das Ziel ist weiterhin die Entwicklung eines innovativen Antibiotikums gegen multiresistente Erreger.

II. 5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Wegen der Neuartigkeit der Zielstruktur ergibt sich bei diesem Projekt eine international sehr kompetitive Atmosphäre. Für Darobactin Typ BamA Inhibitoren sind dabei zwei Arbeitsgruppen als direkte Konkurrenz zu betrachten:

Prof. Kim Lewis, Northeastern University, Boston, in dessen Labor Darobactin A zunächst entdeckt wurde hat einen ersten Patentantrag für die Behandlung Gram-negativer Infektionen mit Darobactin A eingereicht. Dieser deckt auch weitere Strukturen ab, Darobactin B fällt hier jedoch aus der geschützten Struktur heraus.

Als weitere Arbeitsgruppe wurde die AG Müller, HiPS, Saarbrücken bei der Erforschung der Darobactine aktiv und reichte ebenfalls einen weiteren Patentantrag ein. Dieser Patentantrag fällt zwar sehr umfangreich aus, stellt jedoch (nach der Einschätzung unabhängiger Patentanwälte, s.o. von INCATE beauftragt) keine Innovation oder Neuartigkeit dar. Der hier beschriebene Frontrunner entspricht dabei bis auf eine Aminosäure im Detail einer von uns zuvor geclaimten Struktur, jedoch besitzt unser Antrag durch das frühere Einreichungsdatum Priorität über den späteren Antrag der AG Müller.

II. 6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6.

Die Ergebnisse wurden in mehreren erfolgten und geplanten Manuscript-Veröffentlichungen dargestellt:

Böhringer N, Kramer JC, de la Mora E, Padva L, Wuisan ZG, Liu Y, Kurz M, Marner M, Nguyen H, Amara P, Yokoyama K, Nicolet Y, Mettal U*, **Schäberle TF***

Genome- and Metabolome-Guided Discovery of Marine BamA Inhibitors Revealed a Dedicated Darobactin Halogenase Involved in their Biosynthesis

Accepted *Cell Chem Biol* **2023**,

Haysom SF, Machin J, Horne JE, Fenn K, Ma Y, El Mkami H, Böhringer N, **Schäberle TF**, Ranson NA, Radford SE*, Pliotas C*

Darobactin B stabilises a lateral-closed conformation of the BAM complex in intact *E. coli* cells
Angewandte Chemie **2023**, <https://doi.org/10.1002/anie.202218783>

Marner M, Kolberg L, Horst J, Böhringer N, Hübner J, Kresna ID, Liu Y, Mettal U, Wang L, Meyer-Bühn M, Mihajlovic S, Kappler M, **Schäberle TF***, von Both U*

Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam, cefiderocol and novel darobactin analogs against multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from pediatric and adolescent cystic fibrosis patients

Microbiol Spectr, **2023**, e0443722. doi: 10.1128/spectrum.04437-22.

Nguyen H, Kresna ID, Böhringer N, Ruel J, de la Mora E, Kramer JC, Lewis K, Nicolet Y*, **Schäberle TF***, Yokoyama K*

Characterization of DarE as a Radical SAM Oxygenase for the Ether Crosslinking in Darobactin Biosynthesis

J Am Chem Soc, **2022**, 144, 41, 18876–18886. DOI: 10.1021/jacs.2c05565

Böhringer N#, Green R#, Liu Y, Mettal U, Marner M, Modaresi SM, Jakob RP, Wuisan ZG, Maier T, Ilinishi A, Hiller S, Lewis K, * **Schäberle TF***

Mutasynthetic production and antimicrobial characterisation of Darobactin analogs

Microbiol Spectr, **2021**, 9, Issue 3, e01535-21. doi.org/10.1128/spectrum.01535-21

Wuisan ZG, Kresna ID, Böhringer N, Lewis K, **Schäberle TF***

Identification of the Minimal Darobactin A Biosynthetic Gene Cluster and Optimization of its
Heterologous Expression

Metab Eng, **2021**, 66, 123-136. doi.org/10.1016/j.ymben.2021.04.007

Poster

Es konnten durch die Darstellung des Projekts zwei Posterpreise gewonnen werden. Einmal beim internationalen VAAM Workshop der Fachgruppe „Biologie bakterieller Naturstoffproduzenten“ 2022 in Dortmund und zum anderen bei der AMR Konferenz in Basel Anfang 2023.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN https://doi.org/10.1021/jacs.2c05565	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Characterization of DarE as a Radical SAM Oxygenase for the Ether Crosslinking in Darobactin Biosynthesis	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Nguyen H, Kresna ID, Böhringer N, Ruel J, de la Mora E, Kramer JC, Lewis K, Nicolet Y*, Schäferle TF*, Yokoyama K*	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.12.2022
	6. Veröffentlichungsdatum 04.10.2022
	7. Form der Publikation Artikel
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) ¹ Department of Biochemistry, Duke University School of Medicine, Durham, North Carolina 27710, United States ² Institute for Insect Biotechnology, Justus-Liebig-University of Giessen, Ohlebergsweg 12, 35392 Giessen, Germany ³ German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Giessen-Marburg-Langen, 35392 Giessen, Germany ⁴ University of Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IBS, Metalloproteins Unit, F-38000 Grenoble, France ⁵ Antimicrobial Discovery Center, Department of Biology, Northeastern University, Boston, Massachusetts 02115, United States ⁶ Department of Bioresources, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Ohlebergsweg 12, 35392 Giessen, Germany ⁷ Department of Chemistry, Duke University, Durham, North Carolina 27710, United States	9. Ber. Nr. Durchführende Institution 10. Förderkennzeichen 16LW0034 11. Seitenzahl 10
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 17 14. Tabellen 2 15. Abbildungen 6
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	

18. Kurzfassung

Darobactin A is a ribosomally synthesized, post-translationally modified peptide (RiPP) with potent and broad-spectrum anti-Gram-negative antibiotic activity. The structure of darobactin A is characterized by an ether and C–C crosslinking. However, the specific mechanism of the crosslink formation, especially the ether crosslink, remains elusive. Here, using *in vitro* enzyme assays, we demonstrate that both crosslinks are formed by the DarE radical S-adenosylmethionine (SAM) enzyme in an O₂-dependent manner. The relevance of the observed activity to darobactin A biosynthesis was demonstrated by proteolytic transformation of the DarE product into darobactin A. Furthermore, DarE assays in the presence of ¹⁸O₂ or [¹⁸O]water demonstrated that the oxygen of the ether crosslink originates from O₂ and not from water. These results demonstrate that DarE is a radical SAM enzyme that uses oxygen as a co-substrate in its physiologically relevant function. Since radical SAM enzymes are generally considered to function under anaerobic environments, the discovery of a radical SAM oxygenase represents a significant change in the paradigm and suggests that these radical SAM enzymes function in aerobic cells. Also, the study revealed that DarE catalyzes the formation of three distinct modifications on DarA; ether and C–C crosslinks and α,β-desaturation. Based on these observations, possible mechanisms of the DarE-catalyzed reactions are discussed

19. Schlagwörter

radical SAM enzymes, oxygenases, antibiotic, natural product, biosynthesis, RiPPs

20. Verlag

American Chemical Society

21. Preis

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN DOI: https://doi.org/10.1128/spectrum.04437-22	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam, cefiderocol and novel darobactin analogs against multi-drug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates from pediatric and adolescent cystic fibrosis patients	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Marner M, Kolberg L, Horst J, Böhringer N, Hübner J, Kresna ID, Liu Y, Mettal U, Wang L, Meyer-Bühn M, Mihajlovic S, Kappler M, Schäberle TF* , von Both U*	
5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.12.2022	
6. Veröffentlichungsdatum 24.01.2023	
7. Form der Publikation Artikel	
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse)	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
¹ Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology (IME), Branch for Bioresources, Giessen, Germany	10. Förderkennzeichen 16LW0034
² Justus-Liebig-University of Giessen, Giessen, German	11. Seitenzahl 12
³ Department of Pediatrics, Dr. von Hauner Children's Hospital, University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany	
⁴ Institute for Medical Information Processing, Biometry, and Epidemiology - IBE, LMU Munich, Munich, Germany	
⁵ Pettenkofer School of Public Health, Munich, Germany	
⁶ German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Giessen-Marburg-Langen, Giessen, Germany	
⁷ German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Munich, Munich, Germany	
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 45
	14. Tabellen 3
	15. Abbildungen 4
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	

18. Kurzfassung

The emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) in Gram-negative pathogens, such as carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, pose an increasing threat to health care. Patients with immunodeficiencies or chronic pulmonary disease, like cystic fibrosis (CF), are particularly vulnerable to *Pseudomonas* infections and depend heavily on antibiotic therapy. To broaden limited treatment options, this study evaluated the potency of the recently licensed drugs ceftazidime-avibactam (CZA), ceftolozane-tazobactam (C/T), and cefiderocol (FDC) as well as two novel preclinical antibiotics, darobactins B (DAR B) and B9 (DAR B9), against clinical *P. aeruginosa* isolates derived from respiratory samples of CF patients. We observed high levels of resistance to all three newly licensed drugs, with cefiderocol exhibiting the best activity. From the 66 investigated *P. aeruginosa* isolates, a total of 53% were resistant to CZA, 49% to C/T, and 30% to FDC. Strikingly, 52 of the evaluated isolates were obtained from CF patients prior to market introduction of the drugs. Thus, our results suggest that resistance to CZA, C/T, and FDC may be due to preexisting resistance mechanisms. On the other hand, our two novel preclinical compounds performed better than (CZA and C/T) or close to (FDC) the licensed drugs - most likely due to the novel mode of action. Thus, our results highlight the necessity of global consistency in the area of antibiotic stewardship to prevent AMR from further impairing the potency of antibiotics in clinical practice. Ultimately, this study demonstrates the urgency to support the development of novel antimicrobials, preferably with a new mode of action such as darobactins B and B9, two very promising antimicrobial compounds for the treatment of critically ill patients suffering from multidrug-resistant Gram-negative (MRGN) infections

19. Schlagwörter

AMR; BamA; Gram-negative antibiotics; *Pseudomonas*; *Pseudomonas aeruginosa*; antibiotics; cystic fibrosis; natural antimicrobial products

20. Verlag

Microbiol Spectr

21. Preis

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN https://doi.org/10.1021/jacs.2c05565	2. type of document (e.g. report, publication) report
3. title Characterization of DarE as a Radical SAM Oxygenase for the Ether Crosslinking in Darobactin Biosynthesis	
4. author(s) (family name, first name(s)) Nguyen H, Kresna ID, Böhringer N, Ruel J, de la Mora E, Kramer JC, Lewis K, Nicolet Y*, Schäberle TF*, Yokoyama K*	
5. end of project 31.12.2022	
6. publication date 04.10.2022	
7. form of publication article	
8. performing organization(s) (name, address)	
¹ Department of Biochemistry, Duke University School of Medicine, Durham, North Carolina 27710, United States	
² Institute for Insect Biotechnology, Justus-Liebig-University of Giessen, Ohlebergsweg 12, 35392 Giessen, Germany	
³ German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Giessen-Marburg-Langen, 35392 Giessen, Germany	
⁴ University of Grenoble Alpes, CEA, CNRS, IBS, Metalloproteins Unit, F-38000 Grenoble, France	
⁵ Antimicrobial Discovery Center, Department of Biology, Northeastern University, Boston, Massachusetts 02115, United States	
⁶ Department of Bioresources, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Ohlebergsweg 12, 35392 Giessen, Germany	
⁷ Department of Chemistry, Duke University, Durham, North Carolina 27710, United States	
12. sponsoring agency (name, address)	
Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	
13. no. of references 17	
14. no. of tables 2	
15. no. of figures 6	
16. supplementary notes	
17. presented at (title, place, date)	

18. abstract

Darobactin A is a ribosomally synthesized, post-translationally modified peptide (RiPP) with potent and broad-spectrum anti-Gram-negative antibiotic activity. The structure of darobactin A is characterized by an ether and C–C crosslinking. However, the specific mechanism of the crosslink formation, especially the ether crosslink, remains elusive. Here, using *in vitro* enzyme assays, we demonstrate that both crosslinks are formed by the DarE radical S-adenosylmethionine (SAM) enzyme in an O₂-dependent manner. The relevance of the observed activity to darobactin A biosynthesis was demonstrated by proteolytic transformation of the DarE product into darobactin A. Furthermore, DarE assays in the presence of ¹⁸O₂ or [¹⁸O]water demonstrated that the oxygen of the ether crosslink originates from O₂ and not from water. These results demonstrate that DarE is a radical SAM enzyme that uses oxygen as a co-substrate in its physiologically relevant function. Since radical SAM enzymes are generally considered to function under anaerobic environments, the discovery of a radical SAM oxygenase represents a significant change in the paradigm and suggests that these radical SAM enzymes function in aerobic cells. Also, the study revealed that DarE catalyzes the formation of three distinct modifications on DarA; ether and C–C crosslinks and α,β-desaturation. Based on these observations, possible mechanisms of the DarE-catalyzed reactions are discussed

19. keywords

radical SAM enzymes, oxygenases, antibiotic, natural product, biosynthesis, RiPPs

20. publisher

American Chemical Society

21. price

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN DOI: https://doi.org/10.1128/spectrum.04437-22	2. type of document (e.g. report, publication) report
3. title Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam, ceftralozane-tazobactam, cefiderocol and novel darobactin analogs against multi-drug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates from pediatric and adolescent cystic fibrosis patients	
4. author(s) (family name, first name(s)) Marner M, Kolberg L, Horst J, Böhringer N, Hübner J, Kresna ID, Liu Y, Mettal U, Wang L, Meyer-Bühn M, Mihajlovic S, Kappler M, Schäberle TF* , von Both U*	
5. end of project 31.12.2022	
6. publication date 24.01.2023	
7. form of publication article	
8. performing organization(s) (name, address)	
¹ Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology (IME), Branch for Bioresources, Giessen, Germany	
² Justus-Liebig-University of Giessen, Giessen, German	
³ Department of Pediatrics, Dr. von Hauner Children's Hospital, University Hospital, LMU Munich, Munich, Germany	
⁴ Institute for Medical Information Processing, Biometry, and Epidemiology - IBE, LMU Munich, Munich, Germany	
⁵ Pettenkofer School of Public Health, Munich, Germany	
⁶ German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Giessen-Marburg-Langen, Giessen, Germany	
⁷ German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Munich, Munich, Germany	
9. originator's report no.	
10. reference no. 16LW0034	
11. no. of pages 12	
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	
13. no. of references 45	
14. no. of tables 3	
15. no. of figures 4	
16. supplementary notes	
17. presented at (title, place, date)	

18. abstract

The emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) in Gram-negative pathogens, such as carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, pose an increasing threat to health care. Patients with immunodeficiencies or chronic pulmonary disease, like cystic fibrosis (CF), are particularly vulnerable to *Pseudomonas* infections and depend heavily on antibiotic therapy. To broaden limited treatment options, this study evaluated the potency of the recently licensed drugs ceftazidime-avibactam (CZA), ceftolozane-tazobactam (C/T), and cefiderocol (FDC) as well as two novel preclinical antibiotics, darobactins B (DAR B) and B9 (DAR B9), against clinical *P. aeruginosa* isolates derived from respiratory samples of CF patients. We observed high levels of resistance to all three newly licensed drugs, with cefiderocol exhibiting the best activity. From the 66 investigated *P. aeruginosa* isolates, a total of 53% were resistant to CZA, 49% to C/T, and 30% to FDC. Strikingly, 52 of the evaluated isolates were obtained from CF patients prior to market introduction of the drugs. Thus, our results suggest that resistance to CZA, C/T, and FDC may be due to preexisting resistance mechanisms. On the other hand, our two novel preclinical compounds performed better than (CZA and C/T) or close to (FDC) the licensed drugs - most likely due to the novel mode of action. Thus, our results highlight the necessity of global consistency in the area of antibiotic stewardship to prevent AMR from further impairing the potency of antibiotics in clinical practice. Ultimately, this study demonstrates the urgency to support the development of novel antimicrobials, preferably with a new mode of action such as darobactins B and B9, two very promising antimicrobial compounds for the treatment of critically ill patients suffering from multidrug-resistant Gram-negative (MRGN) infections

19. keywords

AMR; BamA; Gram-negative antibiotics; *Pseudomonas*; *Pseudomonas aeruginosa*; antibiotics; cystic fibrosis; natural antimicrobial products

20. publisher

Microbiol Spectr

21. price