

Schlussbericht (öffentliche Version)

Zuwendungsempfänger: Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V. mit den beteiligten Instituten Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME und seit 01.01.2021 das Fraunhofer-Institut für Translationale Medizin und Pharmakologie ITMP für den Standort Hamburg (nachfolgend ITMP)

Förderkennzeichen: 01DQ20007

Vorhabenbezeichnung: Verbundprojekt „Neue Effluxpumpen-Inhibitoren zur Wiederherstellung der Empfindlichkeit von *E. coli* gegenüber Antibiotika“

Teilvorhaben am Fraunhofer IME: „Experimentelle Validierung und Charakterisierung“

Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2020 – 31.03.2023

Berichtszeitraum: 01.04.2020 – 31.03.2023

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Infektionen mit Gram-negativen Bakterien wie *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, oder *K. pneumoniae* sind sowohl in Industrie-, als auch in Entwicklungsländern ein Problem, vor allem wegen der zunehmenden Resistenz gegen Antibiotika (Ferri 2017). Alle vier Bakterien gehören zu der *Critical*-, bzw. *High*-Kategorie der WHO-Liste von Antibiotika-resistenten *Priority Pathogens*, für die neue Antibiotika dringend benötigt werden (Tacconelli 2018). Antimikrobielle Resistenzen basieren auf verschiedenen Mechanismen, z.B. die Ausschleusung von Antibiotika aus dem Bakterium (Alav 2021). Die daraus resultierende Verringerung der Wirkstoff-Konzentration reduziert die Effektivität des Antibiotikums signifikant. Die Ausschleusung von Antibiotika erfolgt durch sogenannte Effluxpumpen, die Antibiotika und andere Stoffe aktiv aus der Zelle transportieren. Eine der wichtigsten Effluxpumpen in *E. coli* ist der AcrAB-TolC-Komplex, bestehend aus der Effluxpumpe AcrB, dem periplasmatischen Adapterprotein AcrA und dem äußeren Membranfaktor TolC (Du 2014). Für AcrA und AcrB wurden bereits Effluxpumpen-Inhibitoren beschrieben, welche die Wirkung von Antibiotika verbessern, indem sie die Ausschleusung dieser Arzneistoffe verhindern (Ple 2022, Compagne 2023). Für AcrA konnte die Bindestelle dieser Substanzen mittels molekularer Modellierung und verschiedenen experimentellen Techniken identifiziert werden (Darzynkiewicz 2019). Dies ermöglicht die gezielte Identifizierung neuer an AcrA-

bindender Substanzen, die zu möglichen Antibiotika-Adjuvantien weiterentwickelt werden können.

Das Konsortium strebte daher folgende wissenschaftliche Ziele an:

1. Identifizierung möglicher AcrA-bindender Substanzen mittels struktur- und ligand-basierter virtueller Screening-techniken
2. Experimentelle Validierung der *in silico* identifizierten Substanzen hinsichtlich der AcrA-Bindung und einem synergistischen Effekt mit Antibiotika
3. ADOMETox-Untersuchungen zur Abklärung möglicher unerwünschter Wirkungen von aktiven Substanzen

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde,

In diesem Projekt wurde ein interdisziplinärer Ansatz gewählt, um für das periplasmatische Adapterprotein AcrA der *E. coli* AcrAB-TolC-Effluxpumpe Substanzen zu identifizieren, die den Transport von Antibiotika aus dem Bakterium verhindern und so deren Wirksamkeit verbessern:

- Mittels virtueller Screening-Verfahren sollten neue AcrA-bindende Substanzen identifiziert werden
- Die *in silico* identifizierten virtuellen Hits sollten experimentell hinsichtlich einer möglichen Bindung an AcrA mittels einer biophysikalischen Methode validiert werden. Dafür sollten entsprechende Mengen an AcrA-Protein exprimiert und aufgereinigt werden.
- Verbindungen mit nachgewiesener AcrA-Blockierung sollten auf eine mögliche synergistische Aktivität in Kombination mit Antibiotika getestet werden und Substanzen mit einer entsprechenden synergistischen Wirkung mittels verschiedener Toxizitäts-Assays untersucht werden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens,

Die Projektdauer war ursprünglich auf 36 Monate veranschlagt. Die Laufzeit begann am 01.04.2020 und endete am 31.03.2023. Die Bearbeitung der wissenschaftlichen Arbeitspakete war auf die beiden Projektpartner (CSIR-IITR & IME) aufgeteilt. Das Arbeitspaket 1 (Computerchemie) wurde durch den indischen Projektpartner bearbeitet, im Arbeitspaket 3 waren beide Partner gleichberechtigt involviert.

Liste der Meilensteine:

Arbeitspaket 2 (Hit-Validierung & Charakterisierung)

M2.1: Protein-Produktion (Monat 3)

M2.2: Validierung der AcrA-Bindung – Runde 1 (M 10)

- M2.3: Checkerboard Synergie-Assays – Runde 1 (M 14)
- M2.4: Toxizitätsprofil – Runde 1 (M 16)
- M2.5: Validierung der AcrA-Bindung – Runde 2 (M 20)
- M2.6: Checkerboard Synergie-Assays – Runde 2 (M 24)
- M2.7: Toxizitätsprofil – Runde 2 (M 26)
- M2.8: Validierung der AcrA-Bindung – Runde 3 (M 30)
- M2.9: Checkerboard Synergie-Assays – Runde 3 (M 34)
- M2.10: Toxizitätsprofil – Runde 3 (M 36)

Arbeitspaket 3 (Projektmanagement & Training)

- M3.1: Konsortialvertrag (M 1)
- M3.2: Organisation von zweimonatlichen TCs (M 1)
- M3.3: Aufsetzen einer Web-basierten Plattform für Datenaustausch (M 1)
- M3.4: Implementierung eines Datenmanagement-Planes (M 2)
- M3.5: Halbzeit-Meeting in Indien (M 18)
- M3.6: Abschlussbericht (M 36)

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

- Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden,**
- Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste,**

Bislang wurden mehrere Substanzen beschrieben, die an AcrA binden. Dazu gehört NSC 60339, das mittels eines Screening-verfahren identifiziert wurde. Für diese Substanz liegen sowohl biophysikalische Bindungs-Studien vor, als auch mikrobiologische Tests in Kombination mit Antibiotika. Ausgehend von NSC 60339 wurden weitzere Substanzen mit verbesserten Wirkeigenschaften in Kombination mit Erythromycin und Novobiocin entwickelt (Haynes 2017). Desweiteren wurden mehrere 4(3-aminocyclobutyl)pyrimidin-2-amine als AcrA-bindend beschrieben, allerdings zeigten diese Substanzen auch (Green 2020). Von all diesen Substanzen sind lediglich einige der an AcrA bindenden 4(3-aminocyclobutyl)pyrimidin-2-amine kommerziell verfügbar. Zudem standen Informationen hinsichtlich möglicher Substanz-Bindestellen zur Verfügung (Darzynkiewicz 2019). Die in mehreren dieser Studien beschriebene Expression und Aufreinigung von AcrA-Protein diente als initiales Protokoll für die Produktion ausreichender mengen von AcrA für die biophysikalischen MEssungen

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Bei dem Projekt handelte es sich um ein Verbundprojekt mit dem **CSIR-Indian Institute of Toxicology Research** (CSIR-IITR). Seit dem 1. Januar 2021 ist der Standort Hamburg gemeinsam mit dem Standort Frankfurt des Fraunhofer IME, unter Gründung des Fraunhofer-Instituts für Translationale Medizin und Pharmakologie ITMP (nachfolgend Fraunhofer ITMP

genannt), in die Selbstständigkeit gegangen. Dies hatte keinerlei Auswirkung auf die Bearbeitung des Projekts.

Aufgrund der Ausmusterung des ursprünglich für die Bindungsstudien vorgesehenen Instrumentes und der hochqualitativen Produktion ausreichender Mengen an AcrA, wurden die beiden Core Facilities „Protein Production“ und „Sample Preparation & Characterization“ des Centre for Structural Systems Biology (CSSB) in Hamburg durch Fraunhofer-Mitarbeiter genutzt.

II. Eingehende Darstellung

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

Arbeitspaket 1: Computerchemie

Dieses Arbeitspaket wurde durch den indischen Kooperationspartner bearbeitet. Durch den Einsatz verschiedener *in silico*-Methoden wurden Substanzen mit einer möglichen AcrA-Bindung identifiziert.

Arbeitspaket 2: Hit-Validierung und Charakterisierung

Die durch den indischen Projektpartner in Arbeitspaket 1 identifizierten virtuellen Hits wurden am Fraunhofer ITMP experimentell validiert. Hierfür wurden zwei Verfahren eingesetzt. Zum einen wurden die Substanzen hinsichtlich ihrer Bindung an AcrA mittels einer biophysikalischen Methode untersucht. Ursprünglich war dafür die Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR) vorgesehen. Da das entsprechende Gerät am Institut ausgemustert wurde, musste auf eine andere Methode (*Microscale Thermophoresis*, MST) zurückgegriffen werden. Mit dieser können ebenfalls Bindungskonstanten von kleinen Molekülen an Proteine bestimmt werden. Aufgrund des deutlichen geringeren Durchsatzes des MST-Instrumentes gegenüber dem ursprünglich eingeplanten SPR-Gerät, wurde der geplante Arbeitsablauf umgestellt und zuerst die Synergie-Tests mit dem Antibiotikum Erythromycin durchgeführt. Insgesamt wurden 65 Substanzen hinsichtlich einer synergistischen Wirkung mit Erythromycin getestet.

Mikrobiologische Untersuchungen & Toxizitätstests

Für die Testung hinsichtlich der synergistischen Wirkung mit dem Antibiotikum Erythromycin wurden der *E. coli*-Stamm BW25113 eingesetzt. Mittels eines Checkerboard-Assays wurden 8 Konzentrationen Erythromycin (2 bis 256 µg/mL) in Kombination mit sechs Konzentrationen Testsubstanz (12,5 bis 400 µM) geprüft und die Minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt. Als Positiv-Kontrolle wurde eine bereits in der Literatur beschriebene AcrA-bindende Substanz verwendet (24123034).

Als synergistisch wirkend wurden Testsubstanzen eingestuft, wenn diese die MHK von Erythromycin mindestens um den Faktor 4 reduzierte. Zur besseren Vergleichbarkeit der Substanzen wurde der Faktor der MHK-Reduktion bei einer Substanzkonzentration von 25 µM betrachtet (Abbildung 1), bzw. die MPC₄ (*minimum potentiating concentration*) bestimmt, bei der die MHK um den Faktor vier reduziert wird. Insgesamt konnten mehrere Substanzen mit einem MPC₄-Wert von 12,5 bis 400 µM identifiziert werden (Tabelle 1).

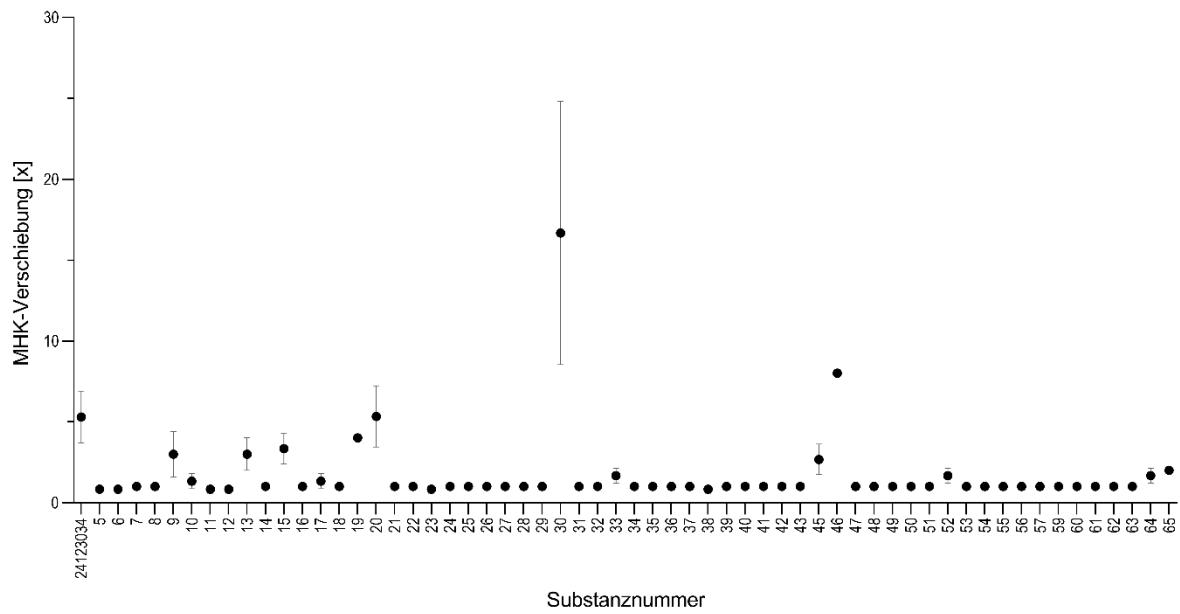


Abb. 1: Überblick über den MHC-Verschiebung aller getesteter Substanzen bei 25 μM Konzentration.

Tabelle 1. MPC₄- und MHC-Werte der getesteten Substanzen

Substanznummer	ZINC-ID	MPC ₄	MHC
2	ZINC219504577	20,83	400
5	ZINC826564398	> 400	> 400
6	ZINC826559648	> 400	> 400
7	ZINC827668910	> 400	> 400
8	ZINC827922005	> 400	> 400
9	ZINC222515564	33,33	400
10	ZINC219631103	100,00	> 400
11	ZINC222341884	> 400	> 400
12	ZINC222464558	333,33	> 400
13	ZINC223468171	33,33	> 400
14	ZINC244748684	> 400	> 400
15	ZINC219775754	33,33	400
16	ZINC219840002	200,00	> 400
17	ZINC220452487	100,00	> 400
18	ZINC222671499	200,00	> 400
19	ZINC223560778	25,00	> 400
20	ZINC220725928	25,00	300
21	ZINC223042748	> 400	> 400
22	ZINC230500399	> 400	> 400

23	ZINC244701087	> 400	> 400
24	ZINC222629790	333,33	> 400
25	ZINC252532820	> 400	> 400
26	ZINC219324929	> 400	> 400
27	ZINC220281636	133,33	> 400
28	ZINC220406341	> 400	> 400
29	ZINC243893614	> 400	> 400
30	ZINC222756831	12,50	200
31	ZINC244626820	> 400	> 400
32	ZINC219069384	> 400	> 400
33	ZINC230577768	100,00	> 400
34	ZINC219494441	266,67	> 400
35	ZINC220335098	> 100	>100
36	ZINC244584420	> 400	> 400
37	ZINC218574293	> 400	> 400
38	ZINC219759577	>100	>100
39	ZINC219269170	>100	>100
40	ZINC244874850	> 400	> 400
41	ZINC219943378	> 400	> 400
42	ZINC218978303	>100	>100
43	ZINC220452487	133,33	>400
45	ZINC244678507	41,67	>100
46	ZINC219129286	25,00	100
47	ZINC244874850	> 400	>400
48	ZINC219759577	>100	>100
49	ZINC220335098	>100	>100
50	ZINC252571511	> 400	> 400
51	ZINC252527874	> 400	> 400
52	ZINC223468171	50,00	>100
53	ZINC219012496	>100	>100
54	ZINC331749004/ZINC331749003	> 400	> 400
55	ZINC218759569	> 400	> 400
56	ZINC219090164	> 400	> 400
57	ZINC219950661	> 400	> 400
59	ZINC252536113	> 400	> 400
60	ZINC223040828	> 400	> 400
61	ZINC223379040	> 400	> 400
62	ZINC219156322/ZINC222624063	333,33	> 400
63	ZINC223866171	400,00	> 400
64	ZINC223785291	83,33	> 400
65	ZINC220725928	50,00	400

Tabelle 2. Substanzen mit nachgewiesener synergistischer Wirkung mit Erythromycin und deren CC₅₀-Wert.

Substanz	MPC ₄ (µM)	CC ₅₀ -Wert (µM)		
		HepG2	A549	HEK293
15	33,3	10,3 ± 3,0	12,9 ± 1,7	7,3 ± 0,5
19	25,0	27, ± 4,2	30,5 ± 6,8	26,3 ± 5,7
20	25,0	28,5 ± 4,8	26,9 ± 5,3	20,3 ± 5,6
30	12,5	13,1 ± 4,3	15,2 ± 1,4	13,3 ± 4,4

Die Substanzen mit den niedrigsten MPC₄-Werten wurden zudem hinsichtlich deren zytotoxischen Potenzials untersucht. Hierbei wurde ein kommerzielles Testsystem (CellTiter-Glo®) verwendet, mit dem die Anzahl der lebenden Zellen bestimmen kann. Es basiert auf der Quantifizierung des in der Zelle vorhandenen ATP, welches ein Indikator für metabolisch aktive Zellen ist. Insgesamt wurden drei humane Zell-Linien mit diesen Testsystem untersucht, Lunge (A549), Leber (HepG2), sowie Niere (HEK293).

Nach 48 Stunden Inkubation wurde die Anzahl lebender Zellen bestimmt und der CC₅₀-Wert ermittelt, der die Konzentration angibt, bei der die Hälfte der ursprünglich ausgesäten Zellen nach Zugabe der Testsubstanz noch leben. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die CC₅₀-Werte der vier Substanzen mit dem niedrigsten MPC₄-Wert. Die Untersuchungen ergaben, dass alle Substanzen schon bei relativ geringer Konzentration signifikante toxische Effekte aufweisen.

Biophysikalische Bindungsstudien

i) Proteinaufreinigung

Für die biophysikalischen Messungen musste zunächst AcrA-Protein in ausreichenden Mengen produziert werden. Neben AcrA wurden mehrere Kontrollproteine exprimiert, um sowohl eine Bindung an ein anderes Effluxpumpenprotein (AcrB), als auch eine unspezifische Protein-Bindung auszuschließen. Hierfür wurde die Histidin-markierte Protease des Tabakätzvirus (*Tobacco Etch Virus*, TEVp_{His}) ausgewählt. Das Protein weist nur eine geringe Sequenzidentität mit AcrA_{His} (15,2 %) und AcrB_{His} (21,4 %) auf.

Als Positivkontrolle für die Bindungsstudien wurden zwei in der Literatur beschriebene Substanzen verwendet, welche die gleiche Grundstruktur wie die in dieser Studie identifizierten synergistischen Substanzen aufwiesen (24123034, 36287038). Von den in dieser Studie identifizierten Substanzen mit synergistischer Wirkung wurde die potente (30), sowie 24123034 und 3628703 für Bindungsstudien ausgewählt. Zunächst wurde die Dissoziationskonstante für die drei Substanz an AcrA und TEVp gemessen. Die Bindungsaffinität von 24123034 und 36287038 an TEVp ist ähnlich zu an AcrA (Tabelle 3),

Die Substanz 30 zeigte wie 36287038 eine stärkere Bindungsaffinität zu TEVp als zu AcrA, während

Anschließend untersuchten wir die Bindung von Substanz 30 an Histidin-markiertem AcrB. Unsere Messungen ergaben, dass Substanz 30 analog zu den Kontrollsubstanzen auch an AcrB ($K_D = 301 \mu M$) bindet. 24123034 zeigte eine ähnliche Bindungsaffinität ($601 \mu M$) an AcrB wie die bereits publizierten Daten. Die MST-Messungen ergaben jedoch eine viermal stärkere Interaktion von 36287038 mit AcrB ($402 \mu M$) als zuvor berichtet.

Tabelle 3. Bindungsaffinität (Dissoziationskonstante, K_D) der Testsubstanzen für His-markierte Effluxpumpenproteine AcrA und AcrB, bestimmt mit MST und Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (SPR, siehe Green et al. 2020), sowie für das Kontrollprotein TEVp.

Substanz	AcrA (MST)	AcrB (IF)	AcrA (SPR)	AcrB (SPR)	TEVp (MST)
30	485	301	N/A	N/A	174
24123034	164	601	420	440	623
36287038	183	402	230	1610	88.6

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die drei Substanzen mit dem His-Tag der Proteine interagieren, wurden diese hinsichtlich einer möglichen Bindung an ein GST-getaggttes Protein (Protease 3C) untersucht. Alle drei Substanzen wiesen eine Bindung an 3C auf. Allerdings sind die Dissoziationskonstanten im Vergleich zu His-getaggetem AcrA und AcrB um das 1,5- bis 3,5-fache höher (Tabelle 4). 24123034 zeigte eine leicht höhere Affinität zu 3C als zu AcrB. Dies erlaubt die Interpretation, dass die Proteinbindung teilweise durch das His-Tag verstärkt werden könnte. Jedoch kann dies nicht der einzige unspezifische Effekt sein. Eine Bindung an gemeinsame Strukturmerkmale, die in allen getesteten Proteinen vorhanden sind, kann nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 4. Bindungsaffinität (Dissoziationskonstante (K_D) und 95 % Konfidenzintervall) der Testsubstanzen an ein GST-getaggttes Protein (Protease 3C) mittels MST.

Substanz	$K_D (\mu M)$	CI (95 %)
30	903	582; 1420
24123034	334	111; 1070
36287038	619	231; 1700

Die Bindung der Substanzen 24123034, 36287038 und 30 an mehrere Proteine und wenig bis gar keiner Interaktion mit dem Histidin-, bzw. GST-Tag, veranlasste uns zu untersuchen, ob dies auf dem unspezifischen Bindungseffekt „kolloidaler Aggregation“ beruhen könnte.

Ein Webserver (https://admet.scbdd.com/ChemAGG/calc_cf_single_mol/) zur Identifizierung gemeinsamer Strukturelemente von kolloidalen Aggregatoren ermittelte lediglich die Substanz 30 mit einer Wahrscheinlichkeit von 52 % als kolloidale Aggregatoren. Im Gegensatz dazu wurden weder 24123034 noch 36287038 als kolloidale Aggregatoren vorhergesagt.

Mittels DLS (*Dynamic Light Scattering*) wurde ermittelt, ob die Substanzen Aggregate bilden. Substanzen, die Aggregate mit hydrodynamischen Radien von 50 bis 1.000 nm bilden, wurden in der Literatur als kolloidale Aggregatoren identifiziert. Die Autokorrelationskurven in Gegenwart von AcrA zeigten, dass die Substanz 30 (Abbildung 2a) und 36287038 (Abbildung 2e) Aggregate mit einer Größe von 100 nm bildeten, während die Substanz 24123034 (Abbildung 2c) bei der höchsten Konzentration (890 µM) größere Aggregate mit einer Größe von etwa 1.000 nm bildete. Die Menge der gebildeten Aggregate mit einer Größe von 100 nm und 1.000 nm korrelierte mit der Konzentration der getesteten Substanz, was eine Dosisabhängigkeit anzeigt. Interessanterweise lagen die Konzentrationen der Verbindungen, bei denen Aggregate gebildet wurden, im Bereich der gemessenen K_D -Werte oder darüber. Beispielsweise bildete Substanz 30 keine 100 nm großen Aggregate bei einer Konzentration unterhalb der entsprechenden K_D der Bindung an AcrA_{His} (hier 33 µM; Abbildung 2a, b). Im Gegensatz dazu bildete die Verbindung 36287038 bereits bei einer Konzentration von 33 µM 100 nm große Aggregate (Abbildung 2e, f) und wies anhand von MST-Messungen eine höhere Affinität zu AcrA auf als die Substanz 30. Die Substanz 24123034 bildete eine signifikante Menge größerer Aggregate bei einer Konzentration von 890 µM (Abbildung 2c, d).

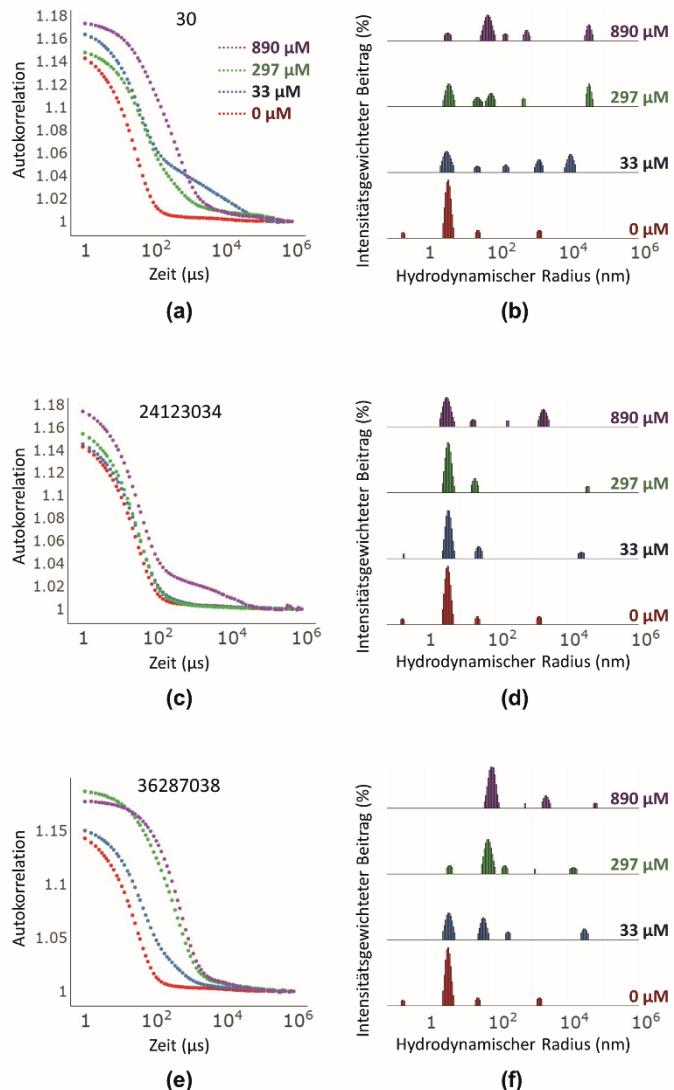


Abbildung 2: (a), (c), (e) Durchschnittliche Autokorrelationskurven ($n=3$), gemessen mithilfe von DLS. Gemessen wurde AcrA in Gegenwart von Substanzen 30 (a), 24123034 (c), und 36287038 (e) bei Konzentrationen von 0 μM (rot), 33 μM (blau), 297 μM (grün), und 890 μM (violett). (b), (d), (f) Abgeleitete Histogramme der Substanzen 30 (b), 24123034 (d), und 36287038 (f) unter Verwendung des Webtools Raynals (<https://spc.embl-hamburg.de/>).

Eine weitere gängige Methode zur Identifizierung von kolloidalen Aggregatoren ist die Zugabe von nichtionischen Detergenzien zu den Messungen. Obwohl bereits 0,05 % des nichtionischen Detergents Tween® 20 verwendet wurden, um Wechselwirkungen von Proteinen mit den MST-Kapillaren zu verhindern, kam es dennoch zur unspezifischen Bindung an die aggregatbildenden Substanzen. Zuvor war schon beobachtet worden, dass Tween® 20 (0,005 %) die Bindung von Proteinen an kolloidale Aggregatoren, die mittels SPR gemessen wurden, in einigen Fällen nicht verhindern konnte. Daher haben wir die Messungen

in Gegenwart von Pluronic® F-127, einem nichtionischen Triblock-Kopolymer, wiederholt. Dieses Kopolymer interagiert mit exponierten hydrophoben Teilen entfalteter Proteinen, nicht aber mit nativen Proteinen. Kolloidale Aggregatoren binden Proteine, indem sie teilweise entfaltete Teile der Proteine an ihre Oberfläche adsorbieren. Pluronic® F-127 sollte mit kolloidalen Aggregatoren um die Proteinbindung konkurrieren, indem es an die teilweise entfalteten Proteine bindet. Spezifische Wechselwirkungen zwischen Verbindungen und Proteinen sollten nicht beeinträchtigt werden, da diese bei nativen Proteinen auftreten, die nicht von nichtionischen Triblock-Kopolymeren gebunden werden. Die Abnahme der Affinität sowie der vollständige Verlust der Bindung nach Zugabe von Pluronic® F-127 ist ein Indikator für eine unspezifische Bindung. Bei Substanz 30 führte die Zugabe von Pluronic® F-127 (0,08 %) zu einer Verschiebung der Bindungskurve an AcrA (Abbildung 3a). Für die Referenzsubstanzen 24123034 und 36287038 konnte nach Zugabe von Pluronic® F-127 keine Bindung an AcrA festgestellt werden (Abb. 3b und 3c). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung an AcrA unspezifisch ist. In Verbindung mit den DLS-Ergebnissen beweist dies, dass alle synergistisch wirkenden Verbindungen, die ein 4(3-Aminocyclobutyl)pyrimidin-2-amin-Gerüst besitzen, kolloidale Aggregatoren sind. Daher sollten alle gemessenen K_D -Werte als scheinbare K_D -Werte betrachtet werden.

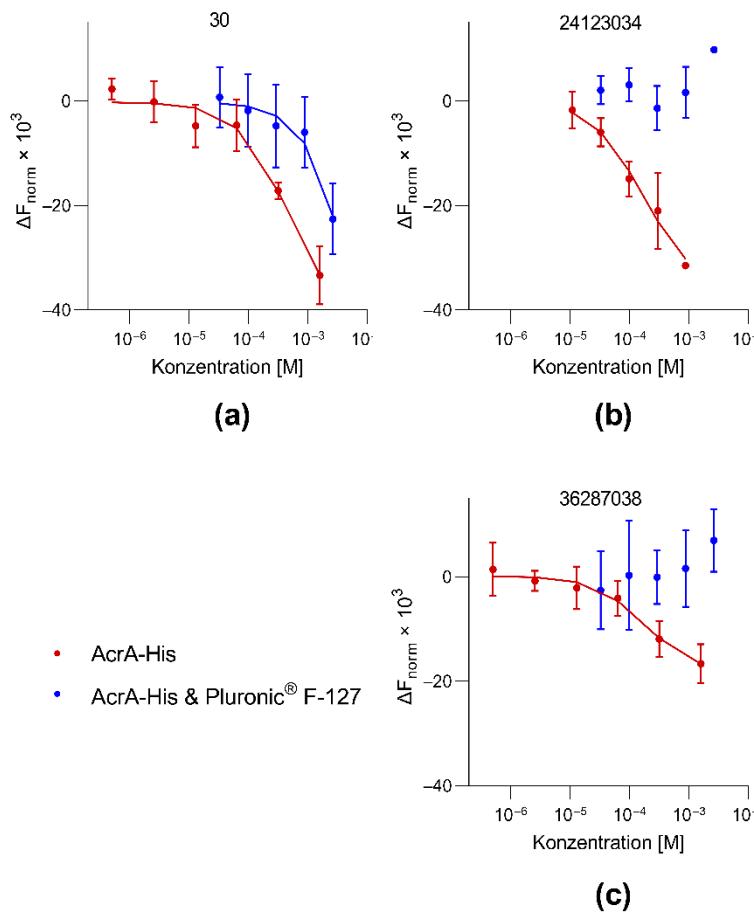


Abbildung 3. Bindungskurven gemessen mit MST, unter Verwendung His-getaggtem AcrA ohne (rot) und mit 0,08 % Pluronic® F-127 (blau) in Gegenwart der Substanzen 30 (a), 24123034 (b), oder

36287038 (c). Zur Erleichterung des Vergleichs aller Bindungskurven, wurde die Grundlinie von den Kurven abgezogen und bei (a), (b) und (c) mit 1000 multipliziert. Alle Datenpunkte stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung dar ($n=3$). Die Analyse wurde durchgeführt unter der Verwendung des Webtools ThermoAffinity (<https://spc.embl-hamburg.de/>).

Dadurch, dass die Bindung von Aggregatoren eine teilweise Entfaltung der Proteine stabilisiert und sollte dadurch theoretisch zu einer niedrigeren Schmelztemperatur (T_M) führen. Daher wurde die T_M von AcrA mittels nDSF in Gegenwart und Abwesenheit der Substanzen 30, 24123034 und 36287038 bestimmt. Die T_M von AcrA in Abwesenheit jeder Verbindung betrug 50,4 °C. Die Zugabe einer der drei Verbindungen in einer Konzentration von 2 mM führte zu einer negativen T_M -Verschiebung von AcrA (Tabelle 5).

Tabelle 5. Schmelztemperatur von AcrA in Gegenwart der Testsubstanzen, gemessen mit „nano-Differential Scanning Fluorimetry“ (nDSF; $n=3$). Die Analyse wurde durchgeführt unter der Verwendung des Webtools MoltenProt (<https://spc.embl-hamburg.de/>).

Substanz	$T_M \pm SD$ [°C] ^a	C [μM] ^b
Protein allein	50,4 \pm 0,0	-
30	49,5 \pm 0,1	2000
24123034	50,0 \pm 0,2	2000
36287038	49,8 \pm 0,2	2000

^a T_M : Schmelztemperatur

^b C: Substanzkonzentration, die zu 5 μM AcrA hinzugegeben wurde.

Um zu untersuchen, ob die synergistische Aktivität der getesteten 4(3-Aminocyclobutyl)pyrimidin-2-amine mit Erythromycin im mikrobiologischen Checkerboard-Assay mit der Bildung von Aggregaten zusammenhängt, wurden drei Substanzen (11, 31 und 57) mit strukturellen Merkmalen, die als inaktiv identifiziert wurden (siehe 3.1 und Abbildung S1), mittels DLS getestet. Die Autokorrelationskurven zeigten, dass die Substanzen 2 und 26 bei 890 μM ebenfalls Aggregate bildeten, die hydrodynamische Radien von etwa 1.000 bis 10.000 nm aufwiesen, und damit größer waren als die von den aktiven Substanzen gebildeten Aggregate (Abbildung 2). Interessanterweise bildete Substanz 25, die ein siebgengliedriges Diazacycloheptan anstelle eines Piperidins enthält, keine Aggregate und wies eine ähnliche Autokorrelationskurve auf wie AcrA_{His} allein. Darüberhinaus wurden die oben erwähnten nDSF-Messungen mit den inaktiven Verbindungen wiederholt (Tabelle 6). Wie erwartet, verringerte keine der Verbindungen die T_M , was auf eine fehlende Stabilisierung der partiellen Entfaltung hinweist.

Tabelle 6. Schmelztemperatur von AcrA in Gegenwart der mikrobiologisch inaktiven Testsubstanzen, gemessen mit nDSF ($n=3$). Die Analyse wurde durchgeführt unter der Verwendung des Webtools MoltenProt (<https://spc.embl-hamburg.de/>).

Substanz	$T_M \pm SD$ [°C] ^a	C [μM] ^b
Protein allein	50,2 \pm 0,1	-
11	50,1 \pm 0,1	1000 ^c

31	50,1 ±0,0	2000
57	50,1 ±0,0	2000

^a T_M: Schmelztemperatur

^b C: Substanzkonzentration, die zu 5 µM AcrA hinzugegeben wurde.

^c Höchstmögliche Konzentration aufgrund schlechter Löslichkeit.

Arbeitspaket 3: Projektmanagement & Training

Während der Projektlaufzeit wurden regelmäßige Video-Konferenzen durchgeführt, um den Projektfortschritt zu besprechen, Ergebnisse auszutauschen und weiterführende Entscheidungen zu treffen. Aufgrund der Corona-Pandemie und der damit einhergehenden Beschränkungen konnte lediglich der Besuch der indischen Doktorandin am Fraunhofer ITMP realisiert werden.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigste Position des zahlenmäßigen Nachweises bestand in Personalkosten.

3. Der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

NEPIRESA als ein gemeinschaftliches Target-Validierungsprojekt steht als Vorbild für die interdisziplinäre Zusammenarbeit von zwei Forschungseinrichtungen aus verschiedenen Ländern. Die Kooperation der beiden Forschungseinrichtungen sollte das gemeinsame Forschungsprojekt voranbringen und gemeinsam zwei Doktoranden ausbilden.

Aus diesem Grund waren die geleisteten Arbeiten notwendig und angemessen.

4. Des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die Entwicklung von Antibiotika-Adjuvantien mit neuartigen Wirkmechanismen, die zur Behandlung bakterieller Infektionen eingesetzt werden können, birgt ein enormes wissenschaftliches, medizinisches, sowie gesellschaftliches Potenzial. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde die weltweite Zahl an Todesfällen, die auf Infektionen mit resistenten Bakterien zurückzuführen sind, für das Jahr 2019 auf 1,27 Millionen geschätzt (Antimicrobial Resistance Collaborators 2022). Bei den Todesfällen, die auf Antimikrobielle Resistenz zurückzuführen sind, war *E. coli* im Jahr 2019 für die meisten Todesfälle verantwortlich.

Das ursprüngliche Ziel, AcrA-bindende Substanzen zu identifizieren, die die Wirksamkeit von Antibiotika durch einen verringerten Antibiotika-Efflux verbessern, konnte nicht erreicht

werden. Bis auf die 4(3-aminocyclobutyl)pyrimidin-2-amine waren alle durch den indischen Projektpartner vorgeschlagenen Substanzen entweder nicht bei Chemikalienhändlern verfügbar, oder zeigten keine synergistische Wirkung mit einem Antibiotikum.

Für einige 4(3-aminocyclobutyl)pyrimidin-2-amine konnte eine synergistische Wirkung in Kombination mit Erythromycin gezeigt werden, allerdings erwiesen sich diese Substanzen als Aggregatoren, die unspezifisch an Proteine binden. Trotzdem sind diese Daten nicht nutzlos, da basierend auf den Ergebnissen ein Workflow erarbeitet werden konnte, der die Identifizierung von falsch-positiven Substanzen bei Verwendung von MST-Messungen ermöglicht.

Die von uns entwickelten Messprotokolle zur Bestimmung der Affinität von zu testenden Molekülen an die beiden Effluxpumpen-Proteine AcrA und AcrB, sowie die Kontrollproteine TEVp und GST kann in Zukunft für die Identifizierung, bzw. Optimierung von Effluxpumpen-Inhibitoren genutzt werden.

5. Des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet bei anderen Vorhaben

Unseres Wissens nach sind keine weiteren Moleküle identifiziert worden, die das in diesem Projekt adressierte periplasmatische Adapterprotein AcrA von *E. coli* adressieren.

6. Der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6

Die in Zusammenarbeit mit dem indischen Projektpartner erzielten Ergebnisse wurden in einer Fachzeitschrift publiziert:

Szal T, Chauhan SS, Lewe P, Rachad FZ, Madre M, Paunina L, Witt S, Parthasarathi R, Windshügel B, Efflux Pump-Binding 4(3-Aminocyclobutyl)Pyrimidin-2-Amines Are Colloidal Aggregators (2023) Biomolecules 13(6):1000. doi:10.3390/biom13061000

Literaturverzeichnis

Abdali N, Parks JM, Haynes KM, et al (2017) Reviving Antibiotics: Efflux Pump Inhibitors That Interact with AcrA, a Membrane Fusion Protein of the AcrAB-TolC Multidrug Efflux Pump. ACS Infect Dis 3(1):89-98. doi:10.1021/acsinfecdis.6b00167

Alav I, Kobylka J, Kuth MS, et al (2021) Structure, Assembly, and Function of Tripartite Efflux and Type 1 Secretion Systems in Gram-Negative Bacteria. Chem Rev 121(9):5479-5596. doi:10.1021/acs.chemrev.1c00055

Antimicrobial Resistance Collaborators (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet 399:629

Compagne N, Vieira Da Cruz A, Müller RT, Hartkoorn RC, Flipo M, Pos KM. Update on the Discovery of Efflux Pump Inhibitors against Critical Priority Gram-Negative Bacteria (2023) *Antibiotics* (Basel) 12(1):180. doi:10.3390/antibiotics12010180

Darzynkiewicz ZM, Green AT, Abdali N et al (2019) Identification of Binding Sites for Efflux Pump Inhibitors of the AcrAB-TolC Component AcrA. *Biophys J* 116:648. doi:10.1016/j.bpj.2019.01.010

Du D, Wang Z, James NR, et al (2014) Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature* 509(7501):512-515. doi:10.1038/nature13205

Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V (2017) Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57(13):2857-2876. doi:10.1080/10408398.2015.1077192

Gilardi A, Bhamidimarri SP, Brönstrup M, et al (2017) Biophysical characterization of *E. coli* TolC interaction with the known blocker hexaamminecobalt. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1861(11 Pt A):2702-2709. doi:10.1016/j.bbagen.2017.07.014

Green AT, Moniruzzaman M, Cooper CJ, et al (2020) Discovery of multidrug efflux pump inhibitors with a novel chemical scaffold. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1864(6):129546. doi:10.1016/j.bbagen.2020.129546

Haynes KM, Abdali N, Jhawar V, et al (2017) Identification and Structure-Activity Relationships of Novel Compounds that Potentiate the Activities of Antibiotics in *Escherichia coli*. *J Med Chem* 60(14):6205-6219. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00453

Plé C, Tam HK, Vieira Da Cruz A, et al (2022) Pyridylpiperazine-based allosteric inhibitors of RND-type multidrug efflux pumps. *Nat Commun* 2022;13(1):115. doi:10.1038/s41467-021-27726-2

Pushpakom S, Iorio F, Evers PA, et al (2019) Drug repurposing: progress, challenges and recommendations (2019) *Nat Rev Drug Discov* 18(1):41-58. doi:10.1038/nrd.2018.168

Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis (2018) *Lancet Infect Dis* 18(3):318-327. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3

Hamburg, den _____

(Prof. Dr. Björn Windshügel)

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN geplant	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Verbundprojekt „Neue Effluxpumpen-Inhibitoren zur Wiederherstellung der Empfindlichkeit von <i>E. coli</i> gegenüber Antibiotika“ Teilvorhaben „Experimentelle Validierung und Charakterisierung“	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Windshügel, Björn	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.03.2023
	6. Veröffentlichungsdatum 29.09.2023
	7. Form der Publikation Fachzeitschrift
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Fraunhofer IME (seit 01.01.2021 Fraunhofer ITMP) Schnackenburgallee 114 22525 Hamburg	9. Ber. Nr. Durchführende Institution Nicht zutreffend
	10. Förderkennzeichen 01DQ20007
	11. Seitenzahl 15
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 11
	14. Tabellen 6
	15. Abbildungen 3
16. Zusätzliche Angaben Nicht zutreffend	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Nicht zutreffend	
18. Kurzfassung Aufgrund der zunehmenden Antibiotika-Resistenz von Gram-negativen Bakterien wie <i>E. coli</i> , <i>A. baumannii</i> , oder <i>P. aeruginosa</i> , stehen die Gesundheitssysteme vor enormen Herausforderungen. Ein wesentlicher Resistenzmechanismen von Gram-negativen Bakterien ist die schnelle Ausschleusung von Antibiotika aus der Zelle mittels Effluxpumpen, wie zum Beispiel dem AcrAB-TolC-Komplex in <i>E. coli</i> . Die Hemmung der Effluxpumpen-Funktion durch neuartige Wirkstoffe stellt daher eine Möglichkeit dar, die Wirkung von Antibiotika zu verbessern. Verschiedene Effluxpumpen-Inhibitoren wurden bereits beschrieben, allerdings hat kein Wirkstoff bislang die klinische Phase erreicht. In diesem Projekt sollten niedermolekulare Verbindungen identifiziert werden, welche an die Effluxpumpen-Komponenten AcrA von <i>E. coli</i> binden, dadurch die Bildung einer funktionsfähigen Effluxpumpe stören und somit die Ausschleusung von Antibiotika verringern, bzw. verhindern. Verschiedene durch <i>in silico</i> -Verfahren ausgewählte Substanzen wurden in mikrobiologischen Tests hinsichtlich deren synergistischer Wirkung mit dem Antibiotikum Erythromycin getestet. Es konnten mehrere Substanzen mit einer entsprechenden Wirkung identifiziert werden, die in weiteren Schritten toxikologisch untersucht wurden und deren Interaktion mit AcrA und anderen Proteinen mittels einer biophysikalischen Methode gemessen wurde. Sämtliche Substanzen waren bereits bei niedrigen Konzentrationen zytotoxisch und wiesen eine unspezifische Protein-Bindung auf. Durch weitere biophysikalische Messungen wurden die Substanzen als aggregierend identifiziert, was die unspezifische Protein-Bindung erklärt.	
19. Schlagwörter Effluxpumpen, Gram-Negative Bakterien, Antimikrobielle Resistenz, <i>E. coli</i> , AcrA	
20. Verlag Nicht zutreffend	21. Preis Nicht zutreffend

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN planned	2. type of document (e.g. report, publication) Final Report	
3. title Project "Novel Efflux Pump Inhibitors for Restoring <i>E. coli</i> Sensitivity for Antibiotics" Subproject "Hit Validation and Characterisation"		
4. author(s) (family name, first name(s)) Windshügel, Björn	5. end of project 31.03.2023	
	6. publication date 29.09.2023	
	7. form of publication Journal	
8. performing organization(s) (name, address) Fraunhofer IME (since January 1 2021 Fraunhofer ITMP) Schnackenburgallee 114 22525 Hamburg	9. originator's report no. Not applicable	
	10. reference no. 01DQ20007	
	11. no. of pages 15	
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 11	
	14. no. of tables 6	
	15. no. of figures 3	
16. supplementary notes Not applicable		
17. presented at (title, place, date) Not applicable		
18. abstract Due to the increasing antibiotics resistance of Gram-negative bacteria such as <i>E. coli</i> , <i>A. baumannii</i> , or <i>P. aeruginosa</i> , health care systems are facing enormous challenges. An important resistance mechanism of Gram-negative bacteria is the fast extrusion of antibiotics from the bacterial cell via efflux pumps, such as the AcrAB-TolC complex in <i>E. coli</i> . Inhibition of efflux pumps by novel types of drugs represents an approach for improving the efficacy of antibiotics. Various efflux pump inhibitors have been reported so far, however no compound has reached clinical trials. In this project we aimed to identify low molecular weight compounds that bind to the efflux pump component AcrA of <i>E. coli</i> , thereby prevent formation of a functioning efflux pump and eventually reduce or prevent antibiotics efflux. Various compounds identified by in silico approaches were tested in a microbiological assay with respect to synergistic action in combination with the antibiotic erythromycin. Several compounds demonstrating such an effect were identified and further investigated with respect to the toxicological potential as well as interaction with AcrA and other proteins using a biophysical method. All compounds revealed to be cytotoxic at low concentrations and showed unspecific protein binding. Further biophysical investigations identified the compounds as aggregating which explains the unspecific protein binding.		
19. keywords Efflux Pumps, Gram-Negative Bacteria, Antimicrobial Resistance, <i>E. coli</i> , AcrA		
20. publisher Not applicable	21. price Not applicable	