



## Abschlussbericht

**NanoComBac**  
**Natural product – gold nanocarrier conjugates,**  
**a novel dual-mode strategy to combat resistant bacteria**

Förderkennzeichen: 16GW0224  
Laufzeit des Vorhabens: 01.04.2019- bis 31.03.2023

## **Inhalt**

### **I. Kurzbericht (max 2 Seiten)**

1. Aufgabenstellung
2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde
3. Ablauf des Vorhabens
4. Wesentliche Ergebnisse
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

### **II. Eingehende Darstellung (ausführlich)**

1. Erzielte Ergebnisse (mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele, Abgleich Meilensteinplan)
2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises
3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit
4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans
5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen
6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr.11

### **III. Erfolgskontrollbericht (kurz)**

1. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens
2. Fortschreibung des Verwertungsplans
3. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben
4. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

## I. Kurzbericht

Trotz erheblicher Anstrengungen neue antibakterielle Wirkstoffe zu entwickeln, wurden in den vergangenen sechs Jahrzehnten aus verschiedenen Gründen nur vereinzelt Fortschritte erzielt. Eine Folge der Komplexität der Antibiotika-Forschung und -Entwicklung, die wesentlich der Anpassungsfähigkeit der Mikroorganismen geschuldet ist, ist ein dramatischer Mangel an neuen Leitstrukturen. Der überwiegende Teil der besonders problematischen, resistenten Keime gehört zu den Gram-negativen Bakterien. Ein weiterer Erreger mit deutlich zunehmenden Resistenzproblemen ist *Mycobacterium tuberculosis*.

### 1. Aufgabenstellung

Innovative zukunftsweisende Strategien zur Bekämpfung bakterieller Krankheitserreger müssen in erster Linie bei Gram-negativen Erregern ansetzen und grundlegend neue, von kommerziellen Antibiotika noch nicht genutzte Wirkmechanismen adressieren. Targets im Bereich der bakteriellen Proteinreifung und des Stoffwechsels stellen hierbei besonders interessante Ansatzpunkte dar. Unser Forschungsprojekt unterscheidet sich grundlegend von verschiedenen bisherigen Ansätzen in der Antibiotikaforschung, da wir eine Doppel-Strategie verfolgt haben, die auf der Kombination von antibakteriellen Naturstoffen oder Analoga mit einem antibakteriellen Gold-Nanocarrier beruhte. Das Ziel war es, die problematische Zellhülle von Gram-negativen Bakterien zu überwinden und damit insbesondere den dringenden medizinischen Bedarf an resistenzbrechenden Antibiotika zu decken. Die Naturstoffe Actinonin und Moiramid, auf die wir uns konzentriert haben, weisen innovative Wirkmechanismen auf, die von kommerziellen Antibiotika noch nicht angesprochen werden. Unser Forschungsprojekt legt den Grundstein für die Entwicklung neuartiger, resistenzbrechender Antibiotika mit einem geringeren Risiko einer vorzeitigen Resistenzentwicklung.

### 2. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Der im Rahmen des Projektes bearbeitete peptidische Naturstoff Actinonin greift in die bakterielle Proteinreifung ein, indem er die bakterielle Metalloprotease PDF inhibiert und so die Abspaltung des formylierten N-Terminus bakterieller Proteine blockiert. Actinonin wurde bereits breit variiert und Analoga gelangten bis in die frühe Phase der klinischen Entwicklung. Toxische Nebenwirkungen, die durch eine unzureichende Selektivität gegenüber mitochondrialen humanen PDF-Orthologen führten indes zur Beendigung der klinischen Studien. Durch die Verwendung von efflux-deletierten Stämmen oder Membranpermeabilisatoren wurde darüber hinaus gezeigt, dass für die meisten PDF-Inhibitoren die Penetration durch die Membran von Gram-negativen Bakterien ein wichtiger limitierender Schritt von Actinonin ist.

Bakterielle Acetyl-CoA-Carboxylasen (ACCs) sind biotinabhängige Enzymkomplexe, die den ersten Schritt der Fettsäurebiosynthese katalysieren. ACC ist auch ein essentielles Enzym in *M. tuberculosis*. Bislang wurde nur der peptidische Naturstoff Moiramid als selektiver Inhibitor der bakteriellen ACC-Carboxyltransferase beschrieben. Moiramid zeigt eine ausgezeichnete Aktivität sowohl gegen Wildtyp als auch gegen resistente *Staphylococcus aureus*, aber auch intermediäre Aktivitäten gegen bestimmte Gram-negative Erreger. Trotz seines antibakteriellen Potenzials ist die Zahl der Optimierungsstudien sehr begrenzt.

Nanomaterialien und molekulare Transportvermittler erfreuen sich in jüngster Zeit wachsender Beliebtheit in der Antibiotika-Forschung. Sie können dabei helfen, die zweifache Membranbarriere der Gram-negativen Zellhülle zu überwinden. Gold-Nanocarrier geeigneter Größe und Zusammensetzung zeigen bereits selbst antibakterielle Aktivitäten. Sie sind daher ideale Trojaner, um einen zweiten antibakteriellen Wirkstoff in die Zelle zu transportieren. Gold-Nanoträger wurden bereits mit Ampicillin und AMPs (antimikrobiellen Peptiden) beladen. In beiden Fällen konnte eine deutlich verbesserte Wirksamkeit, insbesondere gegen resistente Gram-negative Bakterien nachgewiesen werden. Die Synthese und biologische Evaluation von Konjugaten bestehend aus Gold-Nanocarrieren und den Naturstoffen Actinonin bzw. Moiramide wurde bisher nicht untersucht und war Hauptgegenstand des Projektes NanoComBac.

### 3. Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen des Verbundvorhabens NanoComBac war die Arbeitsgruppe Stoll an der Ruhr-Universität Bochum für strukturelle Charakterisierung der an Nanopartikel gebundenen Naturstoffe, insbesondere des Actinonin, verantwortlich (WP3). Die umfangreichen Molecular-Modeling Arbeiten wurden ebenfalls in der AG Scherkenbeck mit der im Rahmen des Projektes angeschafften Modeling-Suite der Firma Schrödinger durchgeführt. Für die Planung von Naturstoffderivaten einer zweiten und dritten Generation wurden die NMR-Untersuchungen und biologischen Daten der Projektpartner (WP 3-5) genutzt. Die NMR-spektroskopischen Arbeiten (WP 3) wurden im Zeitraum vom 01.04.2019-31.03.2023 durchgeführt. Der Projektablauf folgte im Wesentlichen dem Projektplan.

## 4. Wesentliche Ergebnisse

### 4.1. Moiramide

Im Gegensatz zu vorhergehenden Publikationen konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Sorbinsäureeinheit sowohl für die Bindung an die ACCase wie auf für die antibakterielle Wirkung essentiell ist. Mittels umfangreicher Molecular-Modeling Arbeiten konnte ein valides Bindungsmodell entwickelt werden, das die Wirksamkeit bekannter Inhibitoren sehr gut erklären kann. Eine bisher nicht beschriebene Bindetasche ermöglichte die zielgerichtete Synthese neuer Moiramide-Derivate. Diese Arbeiten wurden im Journal „ChemMedChem“ unter dem Titel „A Reinvestigation of the Role of the Sorbic Acid Tail on the Antibacterial and Anti-Tuberculosis Properties of Moiramide B“ im Juni 2023 publiziert (<https://doi.org/10.1002/cmdc.202200631>)

### 4.2 Actinonin

Im Falle des PDF-Inhibitors Actinonin wurden alle wesentlichen Ziele erreicht. Es wurde ein Thiol-modifiziertes Derivat identifiziert, das die bakterielle PDF selektiv und mit vergleichbarer Stärke wie der Naturstoff inhibiert. Das Thiol-Actinonin ließ sich auf Gold-Nanocarrier (Ag Metzler-Nolte, WP 2) laden, die ebenfalls antibakteriell wirksam waren (WP 3-5). In biomolekularen NMR-Untersuchungen (AG Stoll, WP 3) konnte gezeigt werden, dass PDF an das Gold-Actinonin Konjugat bindet und dass das Thiol-Actinonin unter leicht reduzierenden, physiologischen Bedingungen wieder abgespalten werden kann. Hierbei bleibt die antibakterielle Aktivität des Actinonin-Derivats erhalten. Das im Projekt NanoComBac zu etablierende Dual-Mode Wirkprinzip wurde damit nachdrücklich demonstriert: *Thiol-Analoga*

von Actinonin wurden erfolgreich auf Gold Nanocarrier, die einen Durchmesser von 2-4 nm aufwiesen, immobilisiert und mittels NMR-Spektroskopie auf deren Interaktion mit Peptid-Deformylase (*E. coli*) (EcPDF) erfolgreich charakterisiert. In diesem Projekt konnte somit ein vollständiger NMR-basierter Nachweis erbracht werden, dass der mit ZHO-205 beschichtete Nanopartikel an EcPDF binden und dass ZHO-205 durch DTT-Zugabe intakt vom Nanopartikel abgespalten werden kann. Aus den Protein-Nanopartikel-Komplexspektren lässt sich daher schlussfolgern, dass der mit ZHO-205 beladene Nanopartikel das Protein EcPDF in der Tat bindet. Damit konnte ein wichtiger Meilenstein dieses Teilprojektes erfüllt werden. Im Berichtszeitraum vom 01.04.2019 bis zum 31.03.2023 wurden in der AG Stoll nahezu alle beantragten Projektarbeiten in den Bereichen der Biochemie, NMR-Spektroskopie und Kristallographie vollständig durchgeführt. Die genehmigte sechsmonatige Verlängerung des Projektes NanoComBac bis zum 31.03.2023 erlaubte erfreulicherweise, die durch die Corona-bedingten Schwierigkeiten verursachten Verzögerungen weitestgehend nachzuarbeiten. Dadurch konnten insgesamt fast alle Projektziele erreicht werden. Eine diesbezügliche Publikation befindet sich gerade in der Begutachtungsphase bei einem internationalen Fachjournal. Nicht ganz geklärt ist bisher allerdings die Frage, ob die Gold-Actinonin Konjugate tatsächlich in das Innere der Bakterienzelle eindringen können, oder nur an der Oberfläche liegen bleiben und hier den Wirkstoff freisetzen. Entsprechende Kryo-TEM Aufnahmen sollen bis Ende des Jahres vorliegen. Die Ergebnisse zu den Gold-Actinonin Konjugaten sollen in einer weiteren Publikation zusammengefasst werden.

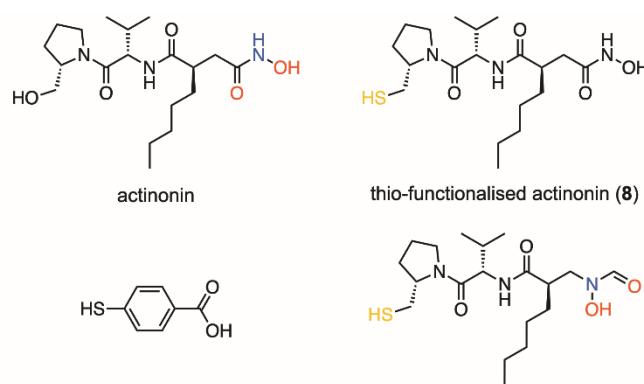
## 5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Rahmen des Projektes NanoComBac wurde eine Zusammenarbeit mit PD Dr. Rybniker, Uni Klinikum Köln etabliert. Herr Rybniker hat die Naturstoffderivate auf Wirkung gegen die Erreger (auch resistente) der Tuberkulose (*M. tuberculosis*) getestet.

## II. Eingehende Darstellung

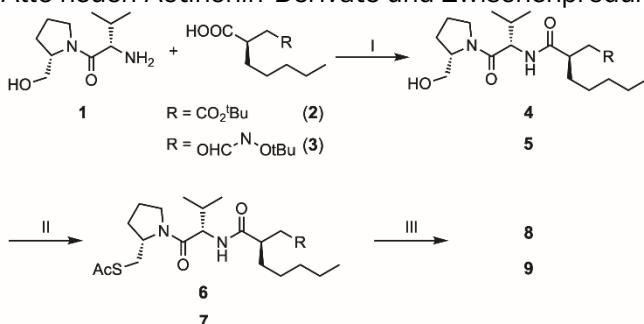
### 1. Erzielte Ergebnisse

Thio-funktionalisiertes Actinonin wurde durch Bildung von Schwefel-Gold-Bindungen auf AuNP immobilisiert. Die Kokristallstruktur (PDB: 1G2A) des Komplexes aus *E. coli* Peptid-Deformylase (ecPDF) und Actinonin zeigt deutlich, dass die Hydroxymethylgruppe von Prolinol (S3'-Tasche) dem Lösungsmittel ausgesetzt ist und somit eine ideale Position für die Einführung eines Thiol-Ankers bietet. Neben dem Actinonin-Thioprolinol-Analogon **8** wurde ein zweites Derivat **9** hergestellt, bei dem das Hydroxamat durch eine hydrolytisch stabilere, bio-isostere N-Hydroxyformamidgruppe ersetzt wurde (Abbildung 1). Die Bausteine 2 und 3 wurden durch diastereoselektive Evans-Alkylierungen gemäß den veröffentlichten Totalsynthesen von Actinonin hergestellt (Schema 1).



**Abb. 1.** Chemische Strukturen von Actinonin und seinen Derivaten sowie von pMBA. Die verschiedenen Liganden wurden an die Goldnanopartikel (AuNP) gebunden und als Stabilisatoren verwendet.

Alle neuen Actinonin-Derivate und Zwischenprodukte wurden umfassend charakterisiert.



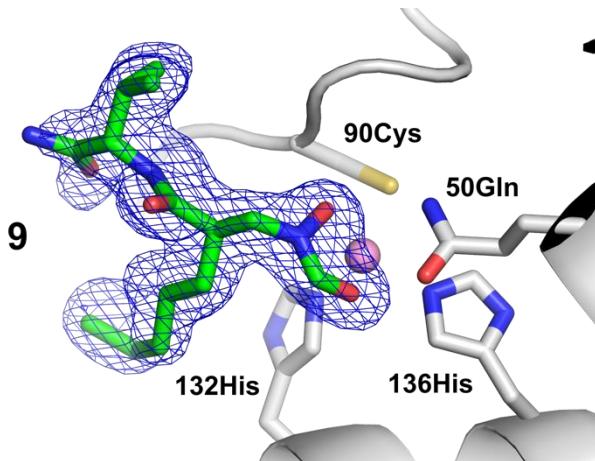
**8:** (i) HATU, DIPEA, 52%; (ii) a) MsCl, 56%; b) KSAc, 71%;  
(iii) a) TFA, 73%; b) CDI, NH<sub>2</sub>OH·HCl (16%).

**9:** (i) HATU, DIPEA, 59%; (ii) a) MsCl, 53%; b) KSAc, 80%;  
(iii) a) TFA, iPr<sub>3</sub>SiH, 72%; b) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH, 44%.

**Schema 1.** Chemische Synthesewege für die Nutzlasten **8** und **9**.

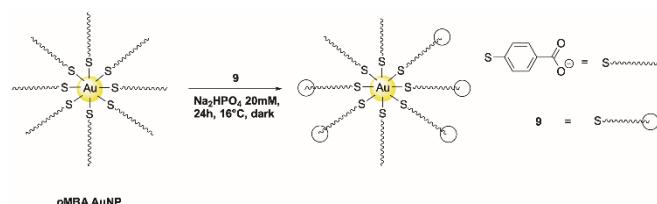
Um den Bindungsmodus von **9** an sein Zielprotein zu bestätigen, wurde eine Kristallkomplexstruktur für ecPDF in voller Länge (fl) und **9** bestimmt (Abb. 2). Die Struktur zeigte

eine ähnliche Orientierung von **9**, gebunden an ecPDF, wie in der bereits veröffentlichten Komplexstruktur für unsere Leitverbindung Actinonin. Die N-Hydroxyformamid-Kopfgruppe kann das komplexierte Metallion der Metalloprotease koordinieren, während die Alkylkette von **9** in die hydrophobe Tasche von ecPDF fl eingebettet ist. Dennoch ist die Elektronendichte für den lösungsmittellexponierte (S)-Pyrrolidin-2-ylmethanthiol unklar und erlaubte keine zuverlässige Platzierung dieses Teils des Liganden (Abb. 2).



**Abb. 2.** Polder-Omit-Karte für ecPDF fl im Komplex mit Verbindung **9** (dargestellt als Stäbchen und ohne (S)-Pyrrolidin-2-ylmethanthiol), die die komplexierte Struktur definiert.

Die Synthese der mit pMBA beschichteten Vorläufer-AuNPs wurde an ein bereits veröffentlichtes Verfahren angepasst und modifiziert. Nach vollständiger Charakterisierung wurden kleine pMBA-beschichtete AuNPs für Ligandenaustauschreaktionen mit dem oben erwähnten Thio-funktionalisierten Actinonin **8** oder dessen Derivat **9** verwendet (Abb. 1 und Schema 2).



**Schema 2.** Ligandenaustauschreaktion von pMBA-beschichteten AuNP, beispielhaft dargestellt mit thiofunktionalisierter Verbindung **9**. Das Schema stellt nicht die tatsächlichen Verhältnisse dar.

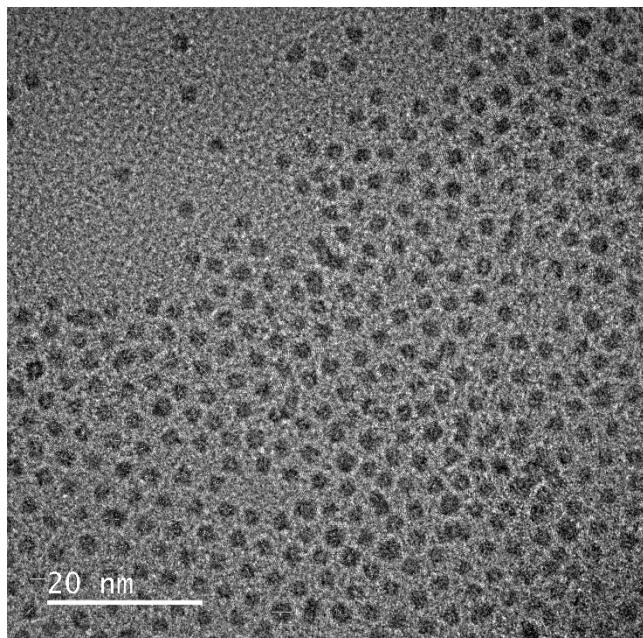
Kleine AuNP (Tabelle 1) wurden mittels UV-Vis-Spektroskopie, dynamischer Lichtstreuung, TEM, ssNMR sowie in DTT-Ligandenfreisetzungstests analysiert. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen dieser kleinen AuNP zeigen gut getrennte kugelförmige Nanopartikel in einer geordneten Anordnung mit einer relativ einheitlichen Größenverteilung von ca. 2,5 nm (Abb. 3).

**Tabelle 1.** Liste der in NMR-Studien und biologischen Tests verwendeten Gold-Nanopartikel-Konjugate sowie deren mittlerer Durchmesser in nm.

AuNP-ID	Ligand	DLS <sup>[a]</sup> [nm]	TEM <sup>[b]</sup> [nm]
sNP-pMBA	pMBA	2.1	2.9 ± 0.5
sNP-8	pMBA, <b>8</b>	2.6	2.4 ± 0.3
sNP-9	pMBA, <b>9</b>	2.6	2.3 ± 0.3

[a] Dynamic light scattering [b] Transmission electron microscopy

In einem ersten Schritt wurde die antibakterielle Aktivität von Actinonin und den Thiol-modifizierten Liganden in einem Standardtest mit minimaler Hemmkonzentration (MIC) getestet, wie zuvor beschrieben. Actinonin hat eine schwache antibiotische Aktivität gegen *Bacillus subtilis* und *E. coli*. Die Thiol-modifizierten Derivate hatten eine stark verbesserte Aktivität gegen *B. subtilis*, aber nicht gegen *E. coli* (Tabelle 2). sNP-9 zeigte bakterizide Aktivität gegen *B. subtilis* bei 64 µM (Tabelle 2). Keine der niedrigeren Konzentrationen von sNP-9 und keines der anderen Konjugate zeigte bakterizide oder bakteriostatische Aktivität.



**Abb. 3.** Analyse von kleinen AuNP, die mit Verbindung 9 (sNP-9) beschichtet sind, mittels TEM. Die TEM-Aufnahme zeigt eine geordnete Anordnung von kugelförmigen Nanopartikeln und eine durchschnittliche Größe von 2,3 nm.

Es wurden NMR-Studien durchgeführt, um die Bindung der Actinonin-Derivate und beschichteten AuNPs zu überprüfen. Die Analyse der Beschichtung und der Bindungsfähigkeit der AuNPs erfolgte mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie und <sup>15</sup>N-isotopisch angereichertem His-ecPDF. Es wurden dazu zweidimensionale <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HSQC-NMR-Spektren aufgenommen, um die Signalintensitäten auf der Grundlage der Amidprotonensignale des Proteinrückgrats analysieren zu können.

**Tabelle 2.** Antibakterielle Aktivität (MIC) der freien Liganden und Lebensfähigkeit (MBC) nach Behandlung mit Konjugaten.

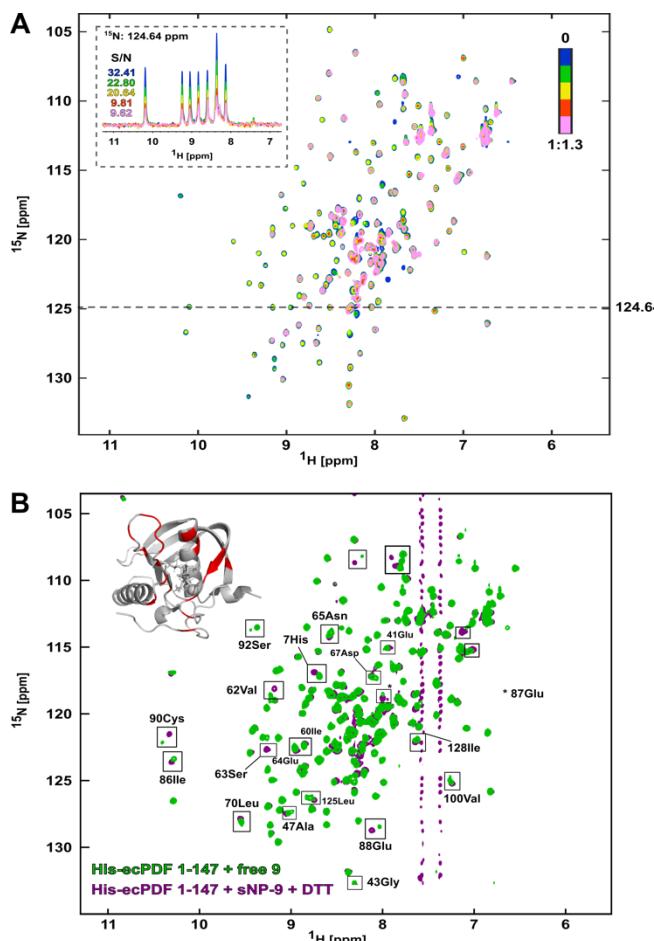
<b>MIC</b>			
Compound [ $\mu$ g/ml]	<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> 168	<i>Escherichia</i> <i>coli</i> <i>BW25113</i>	
Actinonin	128	256	
8	2	256	
9	16	>256	
<i>p</i> MBA	>256	>256	

<b>MBC</b>			
Conjugate [ $\mu$ M]	<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> 168	<i>Escherichia</i> <i>coli</i> <i>BW25113</i>	
sNP-8	>64	n.d.	
sNP-9	64	>64	
sNP- <i>p</i> MBA	>64	>64	

n.d. not determined

Für die Zuordnung der NMR-Resonanzen des Proteinrückgrats wurden Dreifachresonanzspektren aufgenommen, die die Zuordnungen aus den BMRB-Einträgen bestätigen. Bei Zugabe von sNP-9 zu His-ecPDF wurde eine Abnahme der Signalintensität für die Resonanzen beobachtet (Abb. 4A). Bei einem Verhältnis von 1:1,3 wurde der Verlust der Signalintensität durch Vergleich der Signalintensitäten mit dem Referenzspektrum in Abwesenheit von sNP-9 quantifiziert. Der durchschnittliche Verlust an Signalintensität bei einem Verhältnis von 1:1,3 betrug 65 % (Abb. 5B). Als Negativkontrolle wurde das gleiche Volumen an Puffer zum Protein hinzugefügt, was zu einem Signalverlust von nur 23 % führte (Abb. 5B). Um den Signalverlust durch Verdünnungseffekte zu verringern und ein vergleichbares Probenvolumen zu gewährleisten, wurde eine maximale Probengröße von 660  $\mu$ l für NMR-Proben (5 mm) verwendet, was zum größten Verhältnis von 1:1,3 für sNP-9 führte. Die Signalabnahme deutet auf eine direkte Bindung von AuNP an His-ecPDF hin. AuNPs mit einem Durchmesser von ca. 2 nm, wie sie hier für NMR-Studien verwendet wurden, haben ein wesentlich höheres Molekulargewicht als His-ecPDF. Daher weist ein Protein-AuNP-Komplex schnellere Relaxationszeiten auf. Letztendlich führt dies zu der in den HSQC-basierten NMR-Spektren beobachteten Signalabnahme (Abb. 4). Dies deutet darauf hin, dass sNP-9 tatsächlich direkt an His-ecPDF binden kann und demnach ein Linker zwischen dem AuNP und einer Nutzlastverbindung nicht erforderlich ist.

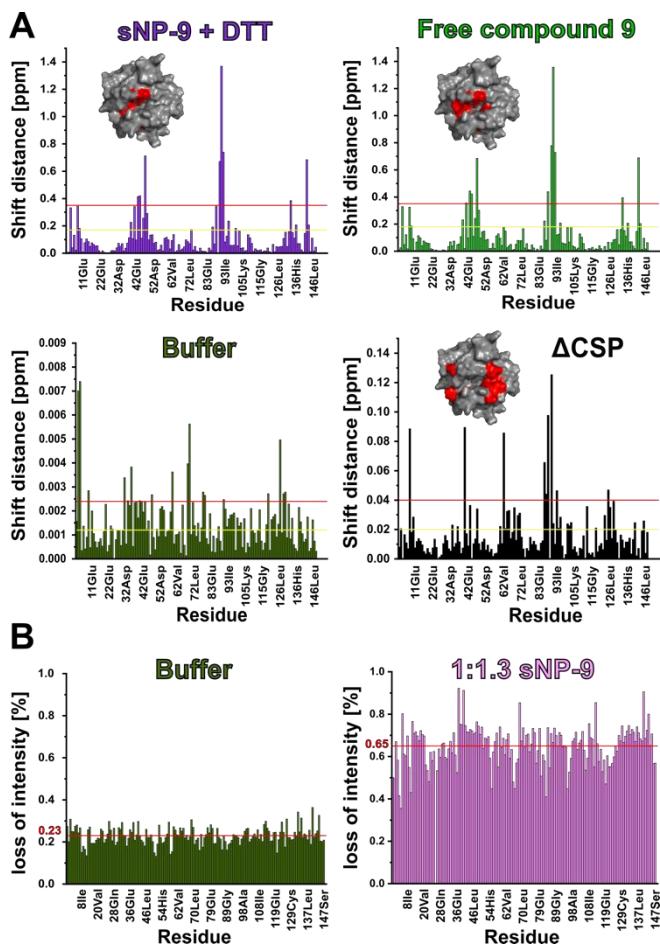


**Abb. 4.** 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren von His-ecPDF bei 298 K in Gegenwart von sNP-9. **A** Überlagerung von 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren des Proteins in Abwesenheit von AuNP (blau) und in Gegenwart zunehmender Mengen von sNP-9 im Verhältnis 1:0,3 (grün), 1:0,6 (gelb), 1:1 (rot) und im endgültigen Verhältnis von 1:1,3 (rosa). Ein  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum bei  $^{15}\text{N}=124,64$  ppm ist oben links mit den entsprechenden Signal-Rausch-Werten (S/N) für die verschiedenen Protein-zu-sNP-Verhältnisse der Titrationsreihe hervorgehoben. **B** Überlagerung von 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren von Protein in Gegenwart von 1:10 freier Verbindung 9 (ohne AuNP) (grün) und in Gegenwart von sNP-9 mit 30 mM DTT in einem Verhältnis von 1:1,3 Protein zu sNP-9 (lila). Unterschiede in den CSPs der beiden Spektren sind durch Kästchen hervorgehoben und die entsprechenden Reste sind auf die Proteinstruktur oben links projiziert (rot).

Interessanterweise wurden die Signale beim Erreichen eines Verhältnisses von 1:1,3 nicht vollständig ausgelöscht, was vermutlich auf eine geringere Affinität der veränderten Kopfgruppe zurückzuführen ist. Ein weiterer Grund könnte eine

sterische Hinderung bei der Bindung oder ein geringeres AuNP:Protein-Verhältnis als berechnet sein. Um die Unterschiede in der Bindungsaffinität und -kinetik zu untersuchen, haben wir zusätzlich eine Titrationsreihe für die freie Verbindung 9 (Abb. 6) durchgeführt und eine auf der Linienform basierende Analyse mittels NMR TITAN vorgenommen (Abb. 6 und Tabelle 3). Die ermittelten  $K_D$  und  $k_{off}$  sind in Tabelle 3 aufgeführt.

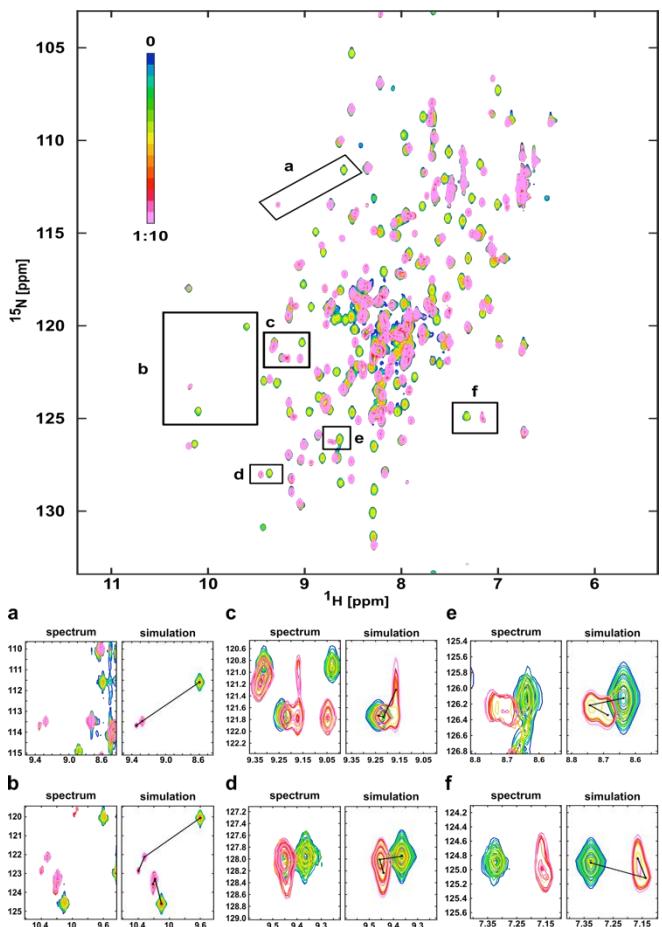
Darüber hinaus untersuchten wir die Dynamik von ecPDF in Abwesenheit (Apo) und in Anwesenheit von freiem 9 (Komplex) mittels NMR-Experimente, um hierbei zu untersuchen, ob die Ligandenbindung die dynamischen Eigenschaften des Proteins oder den Oligomerisierungszustand verändert.  $R_1$ -,  $R_2$ - und heterokernige (hetNOE) Analysen ergaben, dass es keine derartigen dramatischen Veränderungen auf der Piko- bis Nanosekunden-Zeitskala gibt. Um zu untersuchen, ob 9 auch von sNP-9 abgelöst werden kann, wurde der Probe Dithiothreitol (DTT) in großem Überschuss zugesetzt. Dabei wurde ein weiterer Ligandenaustausch durchgeführt, um das funktionalisierte 9 in die Lösung freizusetzen.



**Abb. 5.** Überblick über die Darstellung der chemischen Verschiebung (CSP) und die Analyse der Signalintensitäten für jedes Signal, das aus den 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-NMR-Spektren von His-ecPDF extrahiert wurde. **A** CSP-Plots für die vorgenannten Spektren. Zugabe von ca. 1:10 von freiem **9** (ohne AuNP), aufgrund von Ligandenausfällung in wässriger Lösung. Die gelben Linien geben den Wert der Standardabweichung (SD) an, die roten Linien die zweifache SD (2SD). **B** Vergleich des Verlusts der Signalintensität bei Zugabe des entsprechenden Volumens an Puffer (links) und 1:1,3 sNP-9 (rechts). Die roten Linien in den Intensitätsdiagrammen stellen den durchschnittlichen Verlust der Signalintensität dar.

Nach Zugabe des 300-fachen molaren Überschusses an DTT zu diesen sNP-9 nahmen die Signalintensitäten wieder zu (Abb. 4B). DTT wurde als *in vitro*-Referenzsubstanz verwendet, während Glutathion diese Funktion *in vivo* erfüllen könnte. Darüber hinaus wurden chemische Verschiebungsstörungen (CSPs) für zahlreiche Signale induziert. Diese 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-Spektren sind praktisch

identisch mit einem Spektrum des Proteins in Gegenwart von freiem **9** und zeigen ähnliche induzierte CSPs (Abb. 4B). Dies deutet eindeutig auf eine Freisetzung von intaktem **9** und eine Bindung an His-ecPDF hin.



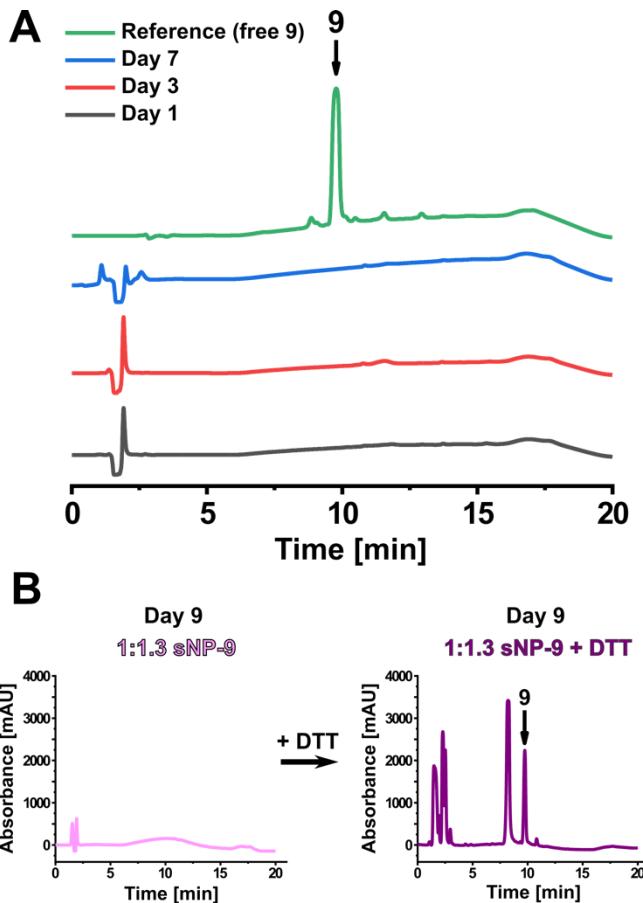
**Abb. 6.** Titrationsreihe der freien Verbindung **9**. Überlagerung von 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NMR-Spektren von His-ecPDF mit zunehmender Ligandenkonzentration (1:0 bis 1:10 Protein/Ligand-Verhältnis). Die hervorgehobenen Kästchen **a-f** zeigen Signale mit einem sekundär auftretenden Signal desselben Restes. Die vergrößerten Bereiche des tatsächlichen Spektrums sind unten links neben dem jeweils entsprechenden simulierten Spektrum von NMR TITAN dargestellt, das auf der Grundlage eines parallelen Drei-Zustands-Bindungsmodells berechnet wurde.

Zusätzlich wurde eine CSP-Analyse für die Zugabe von Puffer und freiem **9** durchgeführt (Abb. 5A). Die CSP-Analyse ergab, dass die verschobenen Resonanzsignale dem "klassischen" aktiven Zentrum von ecPDF entsprechen (Abb. 5A). Vor allem aber beweist dieses Ergebnis das Prinzip - die erfolgreiche Freisetzung der intakten Nutzlast unter reduzierenden Bedingungen, wie sie typischerweise im bakteriellen Zytoplasma anzutreffen sind.

**Tabelle 3.** Ermittelte Werte mit Standardfehler für  $K_{\text{D}}$  und  $k_{\text{off}}$ , berechnet aus Titrationsreihen und Analysen mit der NMR TITAN Software, basierend entweder auf einem Zwei-Zustands- oder Drei-Zustands-Parallel-Bindungsmodell.

Parameter	sNP-9 (2 state)	(2 states)	9 (only 2 states)	9 (only 3 states)	3
$K_{\text{d}1}$ [ $\mu\text{M}$ ]	109.396 ± 6.712	13.948 ± 1.066	41.337 ± 4.535		
$K_{\text{off}1}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	12.902 ± 1.777	0.004 ± 0.030	1.300 ± 1.545		
$K_{\text{d}2}$ [ $\mu\text{M}$ ]	-	-	894.044 ± 61.360		
$K_{\text{off}2}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	-	-	2.84 ± 1.228		

Um hierbei sicherzustellen, dass CSPs durch freigesetztes **9** und nicht durch freies, noch in der Lösung verbliebenes **9** induziert wurden, sind die sNP-9-Stammlösung und die NMR-Proben der sNP-9-Titrationsserie vor und nach Zugabe von DTT mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert worden (Abb. 7A und 7B). NMR-Proben der Lösung von sNP-9 wurden vor und nach der Zugabe von DTT gemessen.



**Abb. 7.** **A** HPLC-Chromatogramm, erhalten durch LC-MS-Analyse einer sNP-9-Stammlösung zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Synthese. **B** HPLC-Chromatogramm, erhalten durch LC-MS-Analyse entsprechender NMR-Proben von sNP-9 in Proteinpuffer und in Gegenwart von Protein (1:1,3 Protein-zu-sNP-9) sowie nach Zugabe von Dithiothreitol (DTT) zu derselben Probe. Entsprechende Liganden signale sind hervorgehoben und wurden mittels ESI-MS nachgewiesen. Der Farbcode für Abb. 7B entspricht dem entsprechenden Spektrum in Abb. 4A und 4B. Diese Experimente bestätigen, dass keine freien Liganden/Moleküle in ausreichender Menge in der AuNP-Stammlösung vorhanden waren. Vielmehr wurden sie erst durch die Zugabe von DTT aus den AuNPs freigesetzt.

### Schlußfolgerung

Zusammenfassend beschreiben wir hier die erfolgreiche Synthese und strukturelle Darstellung einer direkten und spezifischen Bindung von AuNP, die mit einem Actinonin-Derivat konjugiert sind, an His-ecPDF. Außerdem zeigen wir die generelle Möglichkeit einer intakten Ligandenfreisetzung aus AuNPs auf. Der 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC NMR-basierte Ansatz in Kombination mit dem gut geeigneten Zielprotein PDF stellt somit eine effektive Plattform zur Charakterisierung dieser AuNP-Protein-Wechselwirkungen dar. Unsere Ergebnisse ebnen daher den zukünftigen Weg für kleine AuNP-basierte antimikrobielle Wirkstoffabgabe und tragen zum Verständnis und Entwicklung geeigneter Derivate für die Ausscheidung und/oder den biologischen Abbau kleiner AuNP in Organismen bei.

## **2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

(siehe rechnerische Verwendungsnachweise)

## **3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit**

Die durchgeführten Arbeiten waren im Sinne des Projektziels notwendig und angemessen.

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

Die Ergebnisse des Gesamtprojektes zeigen, dass das Dual-Mode Prinzip – die Kombination von Antibiotika mit bisher nicht kommerzialisierten Wirkmechanismen und Gold-Nanocarrier– mit dem Naturstoff Actinonin als Beispiel grundsätzlich funktioniert: Das im Projekt NanoComBac zu etablierende Dual-Mode Wirkprinzip wurde damit nachdrücklich demonstriert: *Thiol-Analoga von Actinonin wurden erfolgreich auf Gold Nanocarrier, die einen Durchmesser von 2-4 nm aufwiesen, immobilisiert und mittels NMR-Spektroskopie auf deren Interaktion mit Peptid-Deformylase (*E. coli*) (EcPDF) erfolgreich charakterisiert.* In diesem Projekt konnte somit ein vollständiger NMR-basierter Nachweis erbracht werden, dass der mit ZHO-205 beschichtete Nanopartikel an EcPDF binden und dass ZHO-205 durch DTT-Zugabe intakt vom Nanopartikel abgespalten werden kann. Aus den Protein-Nanopartikel-Komplexspektren lässt sich daher schlussfolgern, dass der mit ZHO-205 beladene Nanopartikel das Protein EcPDF in der Tat bindet. Damit konnte ein wichtiger Meilenstein dieses Teilprojektes erfüllt werden. Bisher sind keine Schutzrechtsanmeldungen erfolgt, dafür aber wissenschaftliche Arbeiten sowohl eingereicht als auch veröffentlicht.

## **5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen**

Nichtzutreffend.

## **6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses**

Während der Projektlaufzeit konnte bereits ein Manuskript mit dem Titel „A Reinvestigation of the Role of the Sorbic Acid Tail on the Antibacterial and Anti-Tuberculosis Properties of Moiramide B“ im Juni 2023 in der Fachzeitschrift „ChemMedChem“ publiziert werden (<https://doi.org/10.1002/cmdc.202200631>).

Ein weiteres Manuskript beschreibt vor Allem die NMR-spektroskopischen Arbeiten. Dieses trägt den Titel „Structural Insights into Antibacterial Payload Release from GoldNanoparticles Bound to *E. coli* Peptide Deformylase“ wurde bei einem internationalen Fachjournal eingereicht. Darüber hinaus befindet sich ein weiteres Manuskript mit dem Arbeitstitel „New Bromoindol-derived molecular scaffolds targeting *E. coli* Peptide Deformylase“ zurzeit in Vorbereitung und soll noch dieses Jahr bei einer internationalen Fachzeitschrift eingereicht werden. Alle Arbeiten wurden bzw. werden im open access-Modus veröffentlicht.