

# Entwicklung Orthogonaler Screening-Systeme für Metallo- $\beta$ -Lactamasen und die sEH-Phosphatase

---

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich 14,  
Biochemie, Chemie und Pharmazie  
der Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Franca-Maria Klingler**  
aus Wiesbaden

Frankfurt am Main (2015)  
(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der  
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Michael Karas

Gutachter: Jun.-Prof. Dr. Ewgenij Proschak  
Prof. Dr. Manfred Schubert- Zsilavec

Datum der Disputation: 05.11.2015

*Meiner Familie*



---

„An expert is a person who has made all the mistakes which can be made in a very narrow field.“

*Niels Bohr (1885-1962)*

---



## Inhalt

1	Einleitung .....	1
1.1	Enzyme als Zielmoleküle für neue Medikamente.....	1
1.2	Metallo- $\beta$ -Lactamasen – die Resistenzenzyme Gram-negativer Bakterien	3
1.3	Die Phosphatase-Domäne der löslichen Epoxid Hydrolase .....	7
2	Material und Methoden .....	11
2.1	Verwendete Materialien.....	11
2.2	Proteinexpression.....	14
2.2.1	Expression in LB Medium .....	14
2.2.2	Expression in Minimalmedium .....	14
2.3	Aufreinigung.....	15
2.3.1	Lyse und Nickel-NTA-Säulenchromatographie.....	15
2.3.2	Gelfiltration.....	16
2.3.3	Proteinanalyse: SDS-PAGE und Färbung .....	16
2.3.4	Massenspektrometrische Analyse.....	17
2.3.5	Aufkonzentrieren, Konzentrationsbestimmung und Lagerung.....	17
2.4	Assays .....	18
2.4.1	Generelles Prinzip funktionaler Assays.....	18
2.4.2	Assays für Metallo- $\beta$ -Lactamasen.....	20
2.4.3	Assays für sEH-Phosphatase .....	23
2.4.4	Biophysikalische Assays.....	26
2.4.5	Microbroth Dilution Assay .....	30
3	Ergebnisse und Diskussion .....	33
3.1	Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen.....	33
3.1.1	Allgemeine Methoden .....	33
3.1.2	Consensus Docking Projekt.....	41
3.1.3	Zugelassene Thiole als Inhibitoren für MBLs .....	47
3.1.4	Abschließende Bewertung MBLs.....	54

3.2	Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH .....	55
3.2.1	Entwicklung eines Aktivitätsassays.....	55
3.2.2	Inhibitorensuche mittels Docking .....	61
3.2.3	Inhibitorensuche mittels High Throughput Screening .....	64
3.2.4	Abschließende Bewertung zur sEH-Phosphatase.....	69
4	Schlussfolgerung .....	71
5	Zusammenfassung.....	75
6	Abkürzungsverzeichnis .....	77
7	Referenzen .....	79
8	Eidesstattliche Erklärung.....	87
9	Lebenslauf .....	89
10	Publikationen.....	91
11	Danksagung .....	93
12	Anhang.....	95
13	Publikation .....	99



# 1 Einleitung

## 1.1 Enzyme als Zielmoleküle für neue Medikamente

Enzyme sind Biomoleküle, die vielfältige Reaktionen katalysieren und daher eine essentielle Rolle in der Zellfunktion aller Lebewesen spielen. Man begegnet enzymatischen Reaktionen in vielen physiologischen Prozessen, vom Nahrungsstoffwechsel, über die Replikation, die Reaktion auf Fremdstoffe bis hin zu Pathogenese. Sie übernehmen die Regulation und Kontrolle der Stoffwechselwege und leisten einen wichtigen Beitrag zur Signaltransduktion. Die mit Krankheiten einhergehende Dysregulation von Enzymen kann entscheidende Veränderungen im Organismus hervorrufen. Daher sind sie attraktive Zielmoleküle (engl. Targets) für die Suche nach neuen Medikamenten. Eine Studie aus dem Jahr 2002 (Abbildung 1)<sup>1</sup> zeigt, dass fast die Hälfte aller Targets für zugelassene Arzneistoffe Enzyme sind.

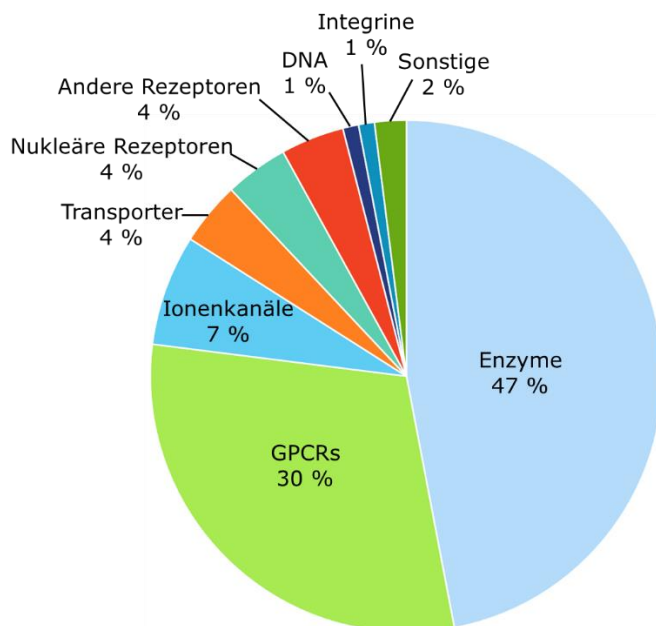


Abbildung 1: Verteilung der Targetklassen von zugelassenen Wirkstoffen

Ist ein Enzym als krankheitsrelevantes Target identifiziert, gilt es, ein Testsystem (engl. Assay) zu finden, in dem die enzymatische Reaktion beobachtet werden kann. Dies ist der erste Schritt, um potentielle Wirkstoffe testen und hinsichtlich einer Aktivierung oder Hemmung (Inhibition) charakterisieren zu können. Dabei spielen spektrometrische Methoden eine große Rolle, da mit Hilfe dieser die

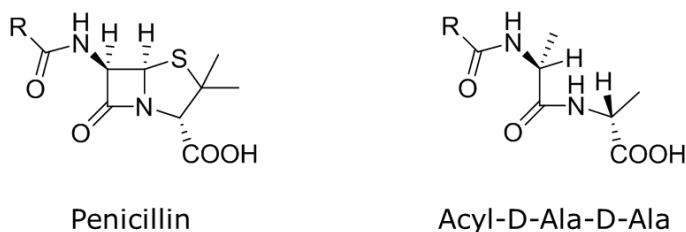
*Einleitung*  
*Enzyme als Zielmoleküle für neue Medikamente*

Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion beobachtet und quantifiziert werden kann.<sup>2</sup> Besonders praktikabel ist es, wenn das Enzym rekombinant vorliegt, da dann die Affinität eines Liganden zum Protein exakt bestimmt werden kann ohne eventuelle, zelluläre Störfaktoren. Assays an rekombinanten Enzymen bieten also die Grundlage der Suche nach neuen Wirkstoffen, da sie eine quantitative Aussage über die Inhibitionsleistung eines Liganden liefern. Egal welcher Ansatz für die Suche nach einem neuen Wirkstoff gewählt wird – ob Hochdurchsatz- (engl. High-Throughput Screening, HTS) oder *in silico* Testung – es wird immer ein biochemisches Validierungssystem benötigt. Assays an rekombinanten Proteinen sind häufig das Mittel der Wahl, da sie einfach und schnell durchzuführen sind und die Möglichkeit zur Automatisierung bieten.<sup>3</sup>

Die vorliegende Arbeit behandelt die Entwicklung enzymatischer Assays für einerseits ein humanes Enzym, die Phosphatase-Domäne der löslichen Epoxid Hydrolase (sEH-P), andererseits für mehrere bakterielle Enzyme, sogenannte Metallo- $\beta$ -Lactamasen (MBLs). Dazu werden biochemische und biophysikalische Methoden angewendet, die zu einem allgemeinen Protokoll zur Entwicklung von Assays führen.

## 1.2 Metallo-β-Lactamasen – die Resistenzenzyme Gram-negativer Bakterien

Nachdem Alexander Fleming 1928 das Penicillin entdeckte, wurde, noch vor der Zulassung des Penicillins, 1940 das erste Resistenzenzym – die Penicillinase – entdeckt.<sup>4</sup> Dieses natürliche Phänomen der Resistenzbildung wird durch den heute vorherrschenden Missbrauch und Fehleinsatz von Antibiotika stark vorangetrieben. Speziell β-Lactam-Antibiotika werden aufgrund ihrer guten Verträglichkeit für den Menschen viel zu oft eingesetzt. Sie hemmen die Zellwandsynthese von Bakterien und haben daher keinen Einfluss auf menschliche Zellen. Im letzten Schritt der bakteriellen Zellwandbiosynthese erstellt die Glycopeptid-Transpeptidase eine Quervernetzung von Peptidoglycansträngen. Dabei greift die endständige Aminogruppe einer Pentaglycinkette die Peptidbindung zwischen zwei D-Alaninresten eines anderen Strangs an. Nach der Spaltung des D-Ala-D-Ala-Motivs entsteht durch die Glycopeptid-Transpeptidase eine neue Bindung zwischen dem Glycin des ersten Strangs und D-Ala des zweiten Strangs. β-Lactam-Antibiotika werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum D-Ala-D-Ala (Abbildung 2) von der Transpeptidase umgesetzt. Dabei wird das Amid nucleophil angegriffen und unter Ringöffnung eine kovalente Bindung zwischen Transpeptidase und geöffnetem Lactam geknüpft. So bleibt die Quervernetzung der Peptidoglycanstränge aus und es kommt zu einer instabilen Zellwand, was im weiteren zum Absterben der Zelle führt. Da β-Lactam-Antibiotika keinen Effekt auf menschliche Zellen haben und hoch effizient gegen Bakterien sind, werden sie gegen eine Vielzahl von Infektionen eingesetzt.<sup>5</sup>



*Abbildung 2: Struktur von Penicillin und dem strukturell ähnlichen D-Ala-D-Ala*

Vermeehrt werden inzwischen auch β-Lactamasen entdeckt (EC 3.5.2.6), Enzyme, die den β-Lactam-Ring spalten und so das Antibiotikum inaktivieren können. Sie stammen von den Transpeptidasen, sind aber so mutiert, dass sie die kovalente

*Einleitung*  
*Metallo-β-Lactamasen – die Resistenzenzyme Gram-negativer Bakterien*

Bindung zum geöffneten β-Lactam hydrolysieren können.<sup>6</sup> Auch wenn Bakterien verschiedene Möglichkeiten für Resistenzen besitzen, werden β-Lactamasen als Hauptproblem angesehen.<sup>7</sup> Sie werden hauptsächlich in zwei Gruppen unterteilt. Serin-β-Lactamasen spalten mit Hilfe eines Serin-Rests in der Bindetasche. Sie werden weiter – nach Ambler<sup>8</sup> – anhand ihres Substratspektrums in die Klassen A, C und D unterteilt. Die meisten Serin-β-Lactamasen werden von Wirkstoffen wie Clavulansäure, Tazobactam, Sulbactam oder den neueren Substanzen Avibactam und MK-7655 inhibiert,<sup>9</sup> deren kovalente Bindung zur β-Lactamase nicht mehr gespalten werden kann. Metallo-β-Lactamasen (MBLs; Ambler Klasse B) enthalten Zink-Ionen in ihrer Bindetasche, mit deren Hilfe sie, über ein polarisiertes Wassermolekül, den β-Lactam-Ring nucleophil angreifen können.

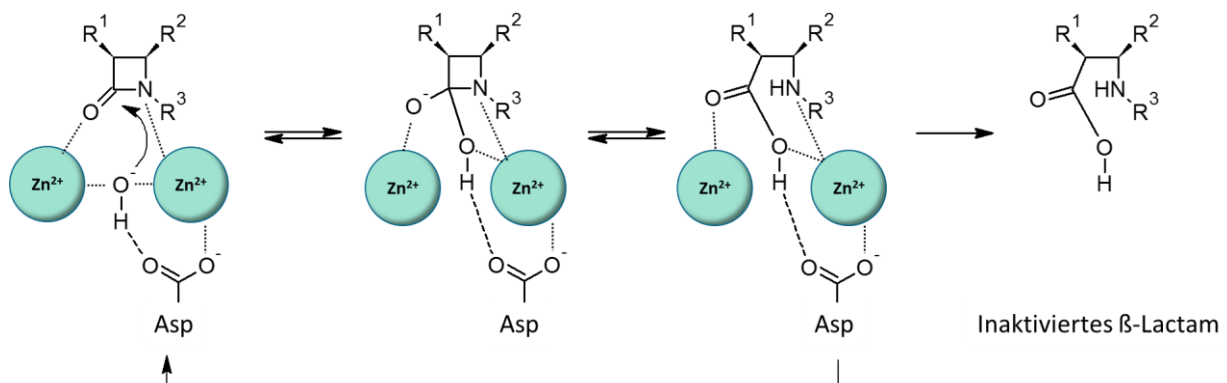


Abbildung 3: Mechanismus der Spaltung eines β-Lactams durch eine MBL<sup>10</sup>

MBLs funktionieren also wie ein Metall-Katalysator und können immer neue β-Lactame spalten (Abbildung 3). Sie hydrolysieren alle bekannten β-Lactam-Antibiotika, mit Ausnahme von Monobactamen, und sind nicht empfindlich für Inhibitoren der Serin-β-Lactamasen. Die weitere Einteilung in die Ambler Klassen B1, B2 und B3 geschieht nach Sequenz-Ähnlichkeit und der Anzahl gebundener Zink-Ionen.

Das vermehrte Auftreten auf MBLs basierender Resistenzen und daraus resultierender multi-resistenter Bakterien ist momentan eines der größten Probleme für die Gesundheit der Menschen. Laut dem WHO-Bericht zur globalen Situation der Antibiotika Resistenzen<sup>11</sup> steuert man auf eine post-antibiotische Ära zu. Von besonderer Gefährlichkeit sind dabei die Gram-negativen Bakterien, die heutzutage nur noch selten ohne eine Resistenz gegen gängige Antibiotika auftreten. Von besonderer Schwere sind hierbei die sogenannten ESKAPE

## Einleitung

### Metallo- $\beta$ -Lactamasen – die Resistenzenzyme Gram-negativer Bakterien

Pathogene<sup>12</sup> (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter Species*) zu nennen. Diese Bakterien tragen häufig sogar mehr als ein Resistenz-Plasmid und geben diese über horizontalen Gentransfer weiter. Aufgrund der Gefahr, die von ihnen ausgeht, werden sie auch „Superbugs“ genannt.<sup>13</sup> Trotz des großen Bedarfs an neuen Antibiotika wurden zwischen 2000 und 2013 lediglich 22 neue Antibiotika zugelassen, wovon nur fünf Vertreter neuer Klassen von Antibiotika sind: Linezolid, Retamulin, Fidaxomicin, Daptomycin und Bedaquilin.<sup>14</sup> Keins davon ist jedoch zur Behandlung bakterieller Infektionen mit Gram-negativen Bakterien zugelassen.

Die Suche nach neuen Antibiotika oder Wirkstoffen, die die Aktivität der  $\beta$ -Lactame wieder herstellen, ist unumgänglich. In der vorliegenden Arbeit sollte eine Assay-Plattform entwickelt werden, mit Hilfe derer neue Wirkstoffe für MBLs getestet werden können. Als Resistenz-Enzyme wurden die New-Delhi-Metallo- $\beta$ -Lactamase 1 (NDM-1), Imipenemase 7 (IMP-7) sowie Verona-Integron-Encoded-Metallo- $\beta$ -Lactamase 1 (VIM-1) gewählt. Die entsprechenden Gene *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* und *bla<sub>VIM</sub>* stammen alle aus Isolaten von Patienten, die am Klinikum der Goethe-Universität behandelt wurden.

Während IMP<sup>15</sup> und VIM<sup>16</sup> schon seit den 1990ern bekannt sind, wurde von NDM-1<sup>17</sup> das erste Mal 2009 berichtet. Diverse Isoformen aller drei MBLs haben sich in Keimen in kürzester Zeit über die ganze Welt verbreitet und forderten bereits Todesopfer. Trotz der Unterschiede in der Aminosäuresequenz haben die meisten Isoformen ein stark konserviertes aktives Zentrum. Die typische Struktur des aktiven Zentrums besteht üblicherweise aus den zwei Zn<sup>2+</sup>-Ionen, von denen das eine durch drei Histidine koordiniert wird, das zweite durch Histidin, Cystein und Aspartat (Abbildung 4).

*Einleitung*  
*Metallo-β-Lactamasen – die Resistenzenzyme Gram-negativer Bakterien*

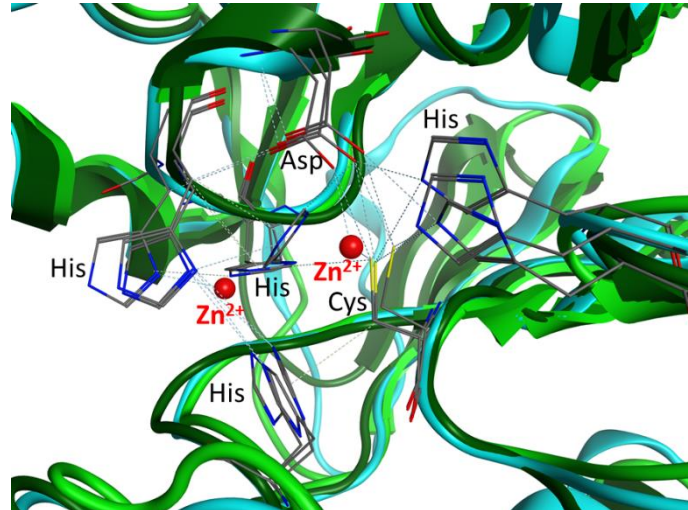
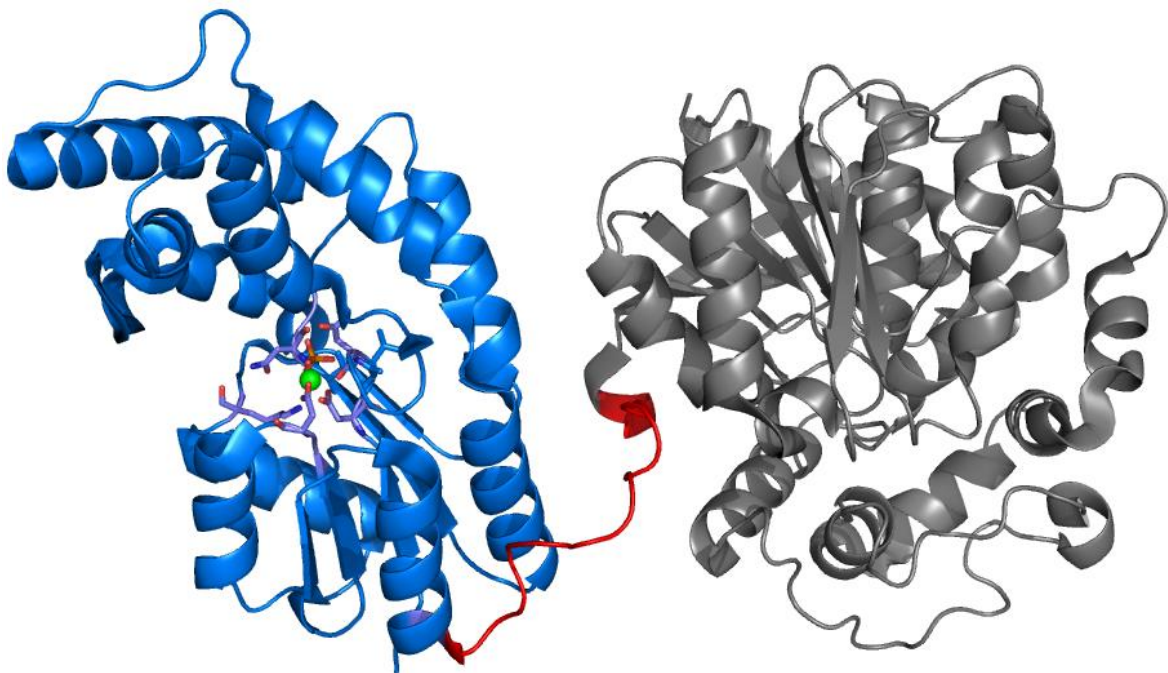


Abbildung 4: Überlagerung der Strukturen von NDM-1 (cyan Kristallstruktur 3Q6X<sup>18</sup>), VIM-1 (hellgrün, Homologiemodell basierend auf 4C1D<sup>19</sup>) und IMP-7 (dunkelgrün, Homologiemodell basierend auf 4C1F<sup>20</sup>) Homologie-Modelle wurden mit der MOE Software 2014.09 erstellt<sup>21</sup>

Bisher bekannte Inhibitoren beschränken sich lediglich auf Substanzen, die Zink-Komplexe bilden bzw. die beiden Zinks der Bindetasche chelieren, z.B. EDTA oder Thiol-haltige Substanzen.<sup>22</sup> King et al.<sup>23</sup> veröffentlichten kürzlich, dass der Naturstoff Aspergillomarasmine A Wirksamkeit in einem murinen Infektionsmodell zeigt. Allerdings gibt es bisher keine Wirkstoffe, die als MBL-Inhibitor zugelassen sind und die Wirksamkeit der β-Lactam-Antibiotika wieder herstellen. Die Suche nach neuen Wirkstoffen gegen MBLs ist Ziel eines Teils dieser Arbeit. Dazu werden ein robuster Fluoreszenz-Intensitäts-Assay und passende orthogonale, biophysikalische Assays erstellt.

### 1.3 Die Phosphatase-Domäne der löslichen Epoxid Hydrolase

Die lösliche Epoxid Hydrolase (engl. soluble Epoxide Hydrolase, sEH) wird beinahe ubiquitär exprimiert, vor allem jedoch in Leber und Nieren.<sup>24</sup> Sie wird vom Gen *EPHX2* kodiert und ist aus 555 Aminosäuren aufgebaut. Diese verteilen sich auf zwei Domänen, die namensgebende Hydrolase-Domäne (EC 3.3.2.10) am C-Terminus und die Phosphatase-Domäne (EC 3.1.3.76) am N-Terminus (Abbildung 5). Beide Domänen sind über einen Prolin-reichen Linker in einem Abstand von ca. 4 Å miteinander verbunden. Normalerweise liegt die sEH als Homodimer vor, in dem zwei der ca. 62 kDa großen Monomere antiparallel gegenüber liegen.



*Abbildung 5: Röntgen-Kristallstruktur des Monomers der menschlichen sEH, PDB-Code 1VJ5<sup>25</sup>. In grau ist die Epoxid-Hydrolase-Domäne zu sehen, in rot der Linker, in blau die Phosphatase-Domäne. Das Mg<sup>2+</sup>-Ion ist grün in abgebildet.*

Mit der Hydrolase-Seite ist die sEH ein wichtiger Teil der Arachidonsäure-Kaskade (Abbildung 6) und setzt dort die durch Cytochrom P450 (CYP450) generierten Epoxyeicosatriensäuren (EETs) zu den korrespondierenden Diolen um. Diese Domäne ist bereits gut erforscht und bekannte Inhibitoren sind Harnstoffe und Amide wie beispielsweise N-Cyclohexyl-N'-iodophenyl-harnstoff (CIU) und N-(4-chlorophenyl)-2-cyclohexylacetamid.<sup>26</sup> Durch einen sEH-Inhibitor erhöht sich der Spiegel an EETs. Diese vermitteln einen entzündungshemmenden Effekt, welcher bereits für eine Reihe von Krankheitsbildern als vorteilhaft beschrieben wurde.<sup>27</sup> Insbesondere im kardiovaskulären Bereich<sup>28</sup> besitzen sie viele positive Effekte, da sie gefäßerweiternd und blutdrucksenkend wirken.

*Einleitung*  
*Die Phosphatase-Domäne der löslichen Epoxid Hydrolase*

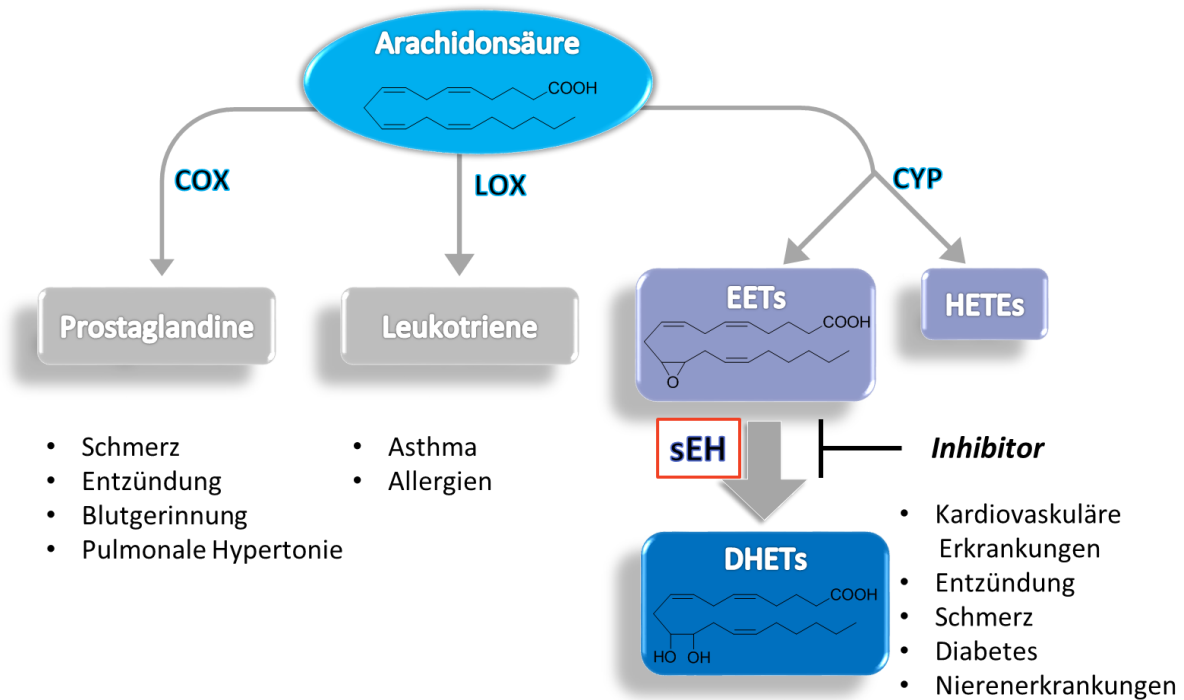


Abbildung 6: Die Arachidonsäurekaskade und ihre assoziierten Krankheitsbilder

Der Phosphatase-Domäne wurde zunächst lediglich eine regulative Eigenschaft zugeschrieben. Ihre Funktionalität als Lipid-Phosphatase wurde erst 2003 entdeckt.<sup>29</sup> Die Bindetasche befindet sich am Ende eines 15 Å langen Tunnels und besteht aus einem Mg<sup>2+</sup>-Ion, das von vier Asparten koordiniert ist. Dies entspricht dem typischen Motiv der Phosphatase der Klasse IV. Diese Aspartat-basierten Phosphatasen gehören zur Familie der Halogensäure-Dehalogenasen und verwenden Aspartat als Nukleophil (Abbildung 7), um unter sauren Bedingungen Phosphatester zu spalten.

Trotz genauer Kenntnisse von Struktur und Mechanismus ist die physiologische Rolle der sEH-P unklar. Die Diskrepanz zwischen dem Phänotyp einer sEH<sup>-/-</sup> Maus und einer Maus, die mit einem sEH-Hydrolase-Inhibitor behandelt wurde, läßt auf eine Rolle bei der Lipid-Signaltransduktion schließen.<sup>30</sup> Von anderen Forscher-Gruppen wurde untersucht, welche natürlichen Phosphate umgesetzt werden, um die endogenen Substrate zu finden.<sup>31</sup> Dabei wurden Lipidphosphate wie Lysophosphatidylsäure oder Geranylgeranylpyrophosphat (Abbildung 8) als endogene Substrate gefunden. Daraus folgernd wird eine Rolle in Hypercholesterinämie-bezogenen Erkrankungen, Hypoxie-verursachter pulmonaler Hypertonie sowie ein Einfluss auf die Regulation der eNOS und NO-vermittelten endothelialen Zellfunktionen angenommen.<sup>32</sup>



## Einleitung Die Phosphatase-Domäne der löslichen Epoxid Hydrolase

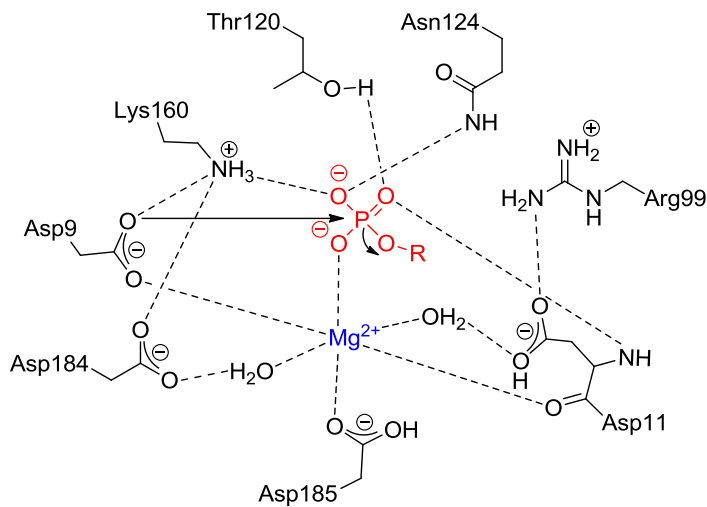
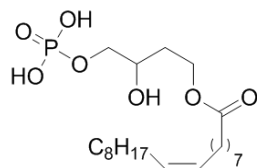


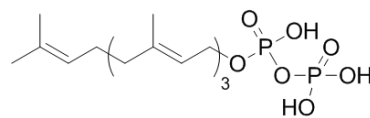
Abbildung 7: Schematische Darstellung der sEH-P Bindetasche mit den Interaktionen zur Koordination von Magnesium-Kation und Substrat. Asp9 als entscheidendes Nukleophil kann die Spaltung des Phosphatesters initiieren.<sup>33</sup>

Isoprenoidphosphate<sup>34</sup> sind weiterhin metabolische Precursor der Cholesterol Biosynthese und spielen eine Rolle für die post-translationale Lipid-Modifikation von Proteinen, einem Prozess der mit Entzündungen in Verbindung gebracht wird.<sup>35</sup>

Die Substanz SMTP-7 zeigte im Tiermodell gute Ergebnisse bei der Behandlung des ischämischen Schlaganfalls aufgrund ihrer thrombolytischen und zusätzlich anti-entzündliche Eigenschaften.<sup>36</sup> Diese Substanz wurde als Inhibitor der sEH identifiziert. SMTP-7 inhibiert sowohl die Hydrolase-Funktionalität kompetitiv, als auch die sEH-P pseudo-nichtkompetitiv. Der genaue Mechanismus kann aufgrund des Fehlens eines selektiven sEH-P Inhibitors nicht weiter aufgeklärt werden.



Lysophosphatidylsäure



Geranylgeranylpyrophosphat

Abbildung 8: : Strukturen von endogenen Substraten der sEH-P

Zur weiteren Untersuchung der physiologischen Rolle der sEH-P bedarf es potenter Inhibitoren, die als pharmakologische Werkzeuge dienen können. Bekannte Inhibitoren anderer Phosphatasen hatten keinen Einfluss auf die sEH-P. Leider sind

*Einleitung*  
*Die Phosphatase-Domäne der löslichen Epoxid Hydrolase*

bisher nur Lipidsulfate wie SDS, die Mimetika der Lipidphosphate sind, oder Moleküle, die kovalent an Cysteine binden, wie z.B. Ebselen,<sup>37</sup> als Inhibitoren bekannt. Inhibitoren, die man *in vivo* anwenden könnte um die biologische Funktion der sEH-P weiter aufzuklären, sind jedoch unbekannt. Einen potenten und selektiven Inhibitor zu finden, der auch *in vivo* angewendet werden könnte, ist Ziel des zweiten Teils der Arbeit.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

<b>Chemikalien</b>	Händler	Katalognummer
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich	M6250
Acrylamid 4K - Lösung (30 %)	AppliChem	A1672
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth	9592
Biotin	Apollo Scientific	BIB0603
Bradford Reagenz	Bio-Rad	500-0001
Calciumchlorid	Sigma Aldrich	C5670
cOmplete, EDTA-free	Roche	05056489001
Coomassie Brilliant Blue G-250	AppliChem	A3480
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	137036
DNase I	AppliChem	A3778
Ethylendiamintetraacetat	Merck	324503
Glukose	AppliChem	A1349
Glycerol	AppliChem	A3552
HEPES	AppliChem	A1069
Imidazol	Carl Roth	X998
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (ITPG)	AppliChem	A4773
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	137039
Kanamycin	AppliChem	A1493
Lysogeny Broth Base	Invitrogen	12795-084
Magnesiumsulfat	AppliChem	A1879
MES	AppliChem	A1074
Natriumacetat	Carl Roth	X891
Natriumazid	AppliChem	A1430
Natriumchlorid	Carl Roth	3957
Niacin	Apollo Scientific	BIN0611
Precision Plus Protein Unstained Standards	Bio-Rad	161-0363
Salzsäure, konz.	Carl Roth	4625
SDS	AppliChem	A1502
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem	A1148
Thiamin T1	Apollo Scientific	BIT0614
Tris	AppliChem	A2264
Triton X-100	USB	22686
Vitamin B12	Apollo Scientific	BIV6236
Zinkchlorid	AppliChem	A2076

*Material und Methoden*  
*Verwendete Materialien*

<b>Spezielle Materialien</b>	Händler	Katalognummer
Centriprep YM-3, 3 kDa NMGG	Merck	4302
Amicon Ultra-15, PLGC Ultracel-PL Membran, 10 kDa	Merck	UFC901024
Spectra/Por® 7, Dialysemembranen - MWCO 3500	Carl Roth	E859.1
FluoroNunc™ F96 MicroWell™ Platte, schwarz	VWR	732-2701P
Schwarze Polystyrolplatten 384 well flacher Boden „low binding“	Corning	3820
MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 mL)	Invitrogen	4346907
HiLoad 16/60 Superdex 200 pg	GE Healthcare	28-9893-35
HisTrap HP 5mL	GE Healthcare	17-5248-02

<b>Assay Substrate</b>	Hersteller	Katalognummer
Biomol Green Reagent	Enzo Life Sciences	BML-AK111
Ceftazidim	TCI	C2225
CENTA	Merck	219475
DiFMUP	Invitrogen	D6567
Fluorescein Diphosphosphat	Invitrogen	F2999
Fluorocillin	Invitrogen	F33952
Imipenem	Molekula	34437833
Lysophosphatidylsäure	Enzo Life Sciences	BML-LP100
Nitrocefin	Calbiochem	484400

**Plasmide und Bakterienstämme**

Sequenz	Plasmid	Zelllinie	Erhalten von
IMP-7	pET-24a	BL21(DE3)	Denia Frank, AK Wichelhaus
NDM-1	pET-24a	BL21(DE3)	Denia Frank, AK Wichelhaus
VIM-1	pET-24a	BL21(DE3)	Denia Frank, AK Wichelhaus
sEH-P	pET-24a(+)	BL21(DE3)	Sandra Wittmann, AK Proschak

*Material und Methoden*  
*Verwendete Materialien*

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Äkta Purifier	GE Healthcare
Cell Disrupter	Constant Systems Ltd
Echo 550	Labcyte
EnVision	Perkin Elmer
iCycler iQ™ Single-Color Real Time PCR Detection System	Bio-Rad
Infinite® F200Pro Microplate Reader	Tecan
Inkubationsschüttler MaxQ 4000 SHKA4000	Thermo Scientific
Multidrop	Thermo Fischer
NanoDrop™ Photometer	Implen
Odyssey® Imager	Li-Cor
Optima LE-80K Ultrazentrifuge	Beckmann
PureLab Ultra MilliQ-Wasser Anlage	Elga
Zentrifuge RC-5B Plus	Sorvall

### **Inhibitoren**

Die Inhibitoren des Consensus Projekts (s. Kapitel 3.1.2) stammen von Specs. Am ESP verwendete Substanzbibliotheken wurden von Enzo Life Sciences (BML-2843-0100) bezogen oder der ChemBioNet Sammlung entnommen.

<b>Thiole</b>	<b>Händler</b>	<b>Katalognummer</b>
Thiomandelsäure (MBL30)	TimTec	ST078378
Captopril (MBL42)	Acros Organics	343700010
Thiorphan (MBL93)	Enzo Life Sciences	BML-PI113
N-Acetylcystein (MBL96)	Sigma Aldrich	A7250
meso-2,3-Dimercapto-succinsäure (MBL97)	Alfa Aesar	A17909
Dimercaprol (MBL98)	Alfa Aesar	L03953
D-(-)-Penicillamin (MBL99)	Alfa Aesar	A11446
Glutathion (MBL102)	Sigma Aldrich	G4251
L-Cystein (MBL103)	Sigma Aldrich	30089
Zofenoprilat (MBL113)	Santa Cruz Biotech	sc-220411
Tiopronin (MBL114)	Sigma Aldrich	M6635

## 2.2 Proteinexpression

### 2.2.1 Expression in LB Medium

25 mL LB Medium (engl. lysogeny broth) wurden mit 1 mL Glukose-Lösung (20 %) und 25  $\mu$ L Kanamycin (1000 x) versetzt und mit der gewünschten Bakterienkolonie von einer Agar-Platte beimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln (180 rpm) inkubiert. 5 mL dieser Übernachtskultur wurden verwendet um 500 mL LB-Medium, das mit Kanamycin (50 mg/mL) supplementiert war, zu beimpfen. Das Wachstum des Ansatzes bei 37 °C wurde über die Bestimmung der optischen Dichte des Mediums bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) beobachtet. Beim Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,8 – 1 wurde mit 400  $\mu$ M IPTG induziert und die Kultur über Nacht bei 22 °C unter Schütteln weiter inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten  $OD_{600}$  wurde für 10 Minuten bei 5500 rpm zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und die erhaltenen Pellets bei -20 °C eingelagert.

### 2.2.2 Expression in Minimalmedium

Um die NDM-1 für NMR-Studien mit  $^{15}\text{N}$  zu markieren, wurde M9 Medium nach folgendem Protokoll angesetzt.

10 x M9-Salzlösung für 1 L (davon 100 mL pro L)

84 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

30 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

5g NaCl

5000 x Spurenelementlösung (50 mL Ansatz) (davon 200  $\mu$ L pro L)

50 mM  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

20 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

10 mM  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

10 mM  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

2 mM  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

1000 x Vitamin Mix (1 mL pro L)

100 mM Thiamin T1

100 mM Niacin

100 mM Biotin

10 mM Vitamin B12

1M  $\text{CaCl}_2$  (davon 100  $\mu$ L pro 1 L)

## Material und Methoden Aufreinigung

1M MgSO<sub>4</sub> (davon 2 mL pro 1L)

Glucose: 10 g/L (einfach fest zugeben)

<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl: 1 g /L

Kanamycin (1000 x): 1 mL /L

Für die Expression wurde eine Übernacht-Kultur, wie im vorherigen Kapitel beschrieben, angesetzt, die 10 Minuten bei 3000 rpm pelletiert und zweimal mit M9-Salzlösung gewaschen wurde. Nach Re-suspendieren in 25 mL M9-Salzlösung wurde die Lösung komplett zur Beimpfung der 500 mL Minimalmediumskultur verwendet. Auch hier wurde wieder bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 – 1 bei 37 °C inkubiert, mit 400 µM ITPG induziert und weiter über Nacht bei 22 °C wachsen gelassen. Geerntet wurde bei OD<sub>600</sub> = 7-9, bei 5500 rpm zentrifugiert 15 Minuten und die Pellets bei -20 °C gelagert.

## 2.3 Aufreinigung

### 2.3.1 Lyse und Nickel-NTA-Säulenchromatographie

Pellets aus 500 mL Medium wurden in 40 mL Resuspensionspuffer (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8) mit Zusatz einer cOmplete Tablette sowie einer Spatelspitze DNase I gelöst. Die Suspension wurde zweimal durch einen Cell Disruptor geleitet (14500 psi) und anschließend für 60 Minuten bei 20000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um feste Zellbestandteile abzutrennen.

Der Überstand wurde auf eine 5 mL HisTrap HP Säule geladen und mithilfe eines Imidazol-Gradienten eluiert. Der Standard-Gradient bestand zunächst aus einer Equilibrierung über 5 Säulenvolumen (Laufpuffer: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 4 mM Imidazol, pH 8), gefolgt von einem Waschschrift über 15 Säulenvolumen (mit 30 mM Imidazol), einer Elution über 25 Säulenvolumen von 30 mM bis 160 mM Imidazol und einem finalen Elutionsschritt bei 400 mM Imidazol für 10 Säulenvolumen. Der Auftrag erfolgte mit einer Flussrate von 1 mL/min, alle nachfolgenden Schritte mit einer Geschwindigkeit von 4 mL/min. Der gesamte Lauf wurde mittels eines UV Detektors (254 nm und 280 nm) beobachtet und in 12 mL Fraktionen gesammelt.

## Material und Methoden Aufreinigung

Um Imidazol zu entfernen, wurden die Fraktionen von Interesse in einen Dialyseschlauch (Membran mit 3,5 kDa cutoff) überführt und gegen einen 100fachen Überschuss des Imidazol-freien Puffers (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8) für mindestens 4 Stunden dialysiert. Dieser Vorgang wurde bei 4 °C durchgeführt und mindestens zweimal wiederholt.

### 2.3.2 Gelfiltration

Für die NMR-Studien musste eine höhere Proteinreinheit erreicht werden als für die Durchführung der Assay notwendig war. Daher wurde das Protein nach der HisTrap weiter mittels Gelfiltration aufgereinigt. Auf eine zuvor mit Laufpuffer (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8) äquilibrierte Superdex200-Säule wurde 1 mL Proteinlösung geladen und mit einer Flussrate von 1,6 mL/min isokratisch eluiert. Das Protein wurde in Fraktionen von 2 mL gesammelt.

### 2.3.3 Proteinanalyse: SDS-PAGE und Färbung

Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Je 60 µL einer Fraktion wurden mit 20 µL β-Mercaptoethanol und 20 µL 5x Ladepuffer (250 mM Tris, 5 mM EDTA, 10 % SDS, 50 % Glycerol, 0,1 % Bromphenolblau, pH 6,8) 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Von dieser Mischung wurden 10 µL pro Tasche auf 14 % Acrylamid-enthaltende Gele aufgetragen. Als Kontrolle wurden 3,5 µL *Precision Plus Proteins Standard* Unstained Marker verwendet. Die Proben wurden bei 150 Volt für 45 Minuten aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde dabei ein Tris-Glycin-SDS-Puffer (25mM Tris, 190 mM Glycin, 3,5 mM SDS) genutzt. Zur Fixierung wurde das Gel in MilliQ-Wasser überführt und 1-2 Minuten unter Mikrowellenstrahlung aufgeköcht. Nach Entfernen des Wassers wurde das Gel in eine ausreichende Menge Coomassie-Färbelösung (0,8 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 3 mL konz. HCl auf 1 L MilliQ-Wasser) überführt und erneut aufgeköcht. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde sie entfernt und mehrfach durch MilliQ-Wasser ersetzt, bis sich die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund abhoben. Die eingefärbten Gele wurden mit einem Odyssey-Imager bei einer Wellenlänge von 700 nm gescannt.



### 2.3.4 Massenspektrometrische Analyse

Proteinbanden von Interesse wurden aus den SDS-Gelen ausgeschnitten und mit 100 µL MilliQ-Wasser in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Banden wurden einem In-Gel-Verdau mit Trypsin unterzogen und die erhaltenen Proteinfragmente mit MALDI-MS (Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisations-Massenspektrometrie) analysiert und durch anschließende Mascot<sup>38</sup> Suche identifiziert. Die Fingerprint-Analysen wurden im Arbeitskreis von Prof. Karras durchgeführt.

### 2.3.5 Aufkonzentrieren, Konzentrationsbestimmung und Lagerung

Das aufgereinigte Protein wurde mit Hilfe von Amicon Centripreps (Membran mit cutoff von 3,5 kDa) in einer Zentrifuge bei 4 °C für 45 min bei 3500 rpm aufkonzentriert. Die Endkonzentration wurde mittels NanoDrop oder Bradford-Assay bestimmt. Zur Vorbereitung des Assays wurde eine BSA-Standardreihe in Konzentrationen von 0,1 bis 0,6 µg/ml erstellt. In eine transparente 96 well Platte wurden je 20 µL der Standard Reihe in Duplikaten sowie die Proteinprobe in unterschiedlichen Verdünnungen in Triplikaten pipettiert. Anschließend wurde in jedes Well je 200 µL Bradford-Reagenz gegeben, und die Absorption der Proben mit einem Tecan Reader bei 595 nm vermessen. Die Konzentration wurde durch den Vergleich zur linearen Regression der Standardreihe in Excel bestimmt.

Dank der guten Stabilität der bearbeiteten Proteine konnten die fertig aufgereinigten Proben mit 20 % Glycerol versetzt werden und in flüssigem Stickstoff eingefroren und langfristig (ca. 1 Jahr) bei -80 °C gelagert werden.

## 2.4 Assays

### 2.4.1 Generelles Prinzip funktionaler Assays

Um die Funktionalität eines Proteins zu beobachten, inkubiert man es mit und ohne Inhibitor und gibt anschließend ein Substrat zu, das vom Protein umgesetzt wird. Dabei sollte ein Produkt frei gesetzt werden, welches bei einer bestimmten Wellenlänge spektroskopisch beobachtet werden kann (Abbildung 9). Das Produkt kann entweder farbige oder fluoreszierend sein, wobei die Detektion von Fluoreszenz sensitiver und daher der Absorption vorzuziehen ist.

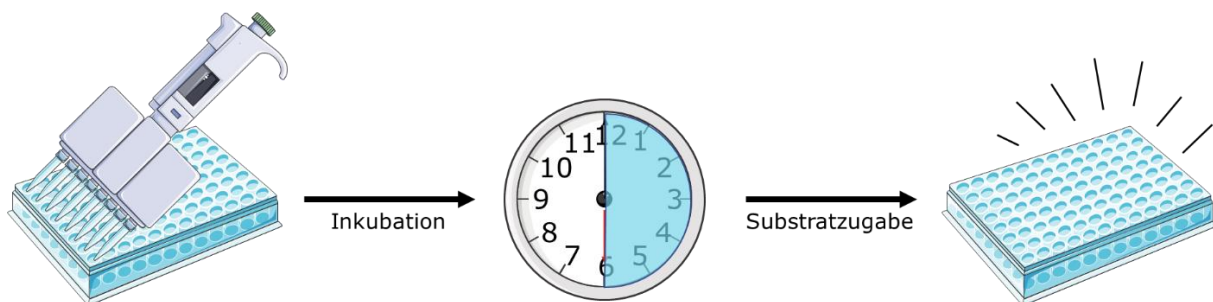


Abbildung 9: Generelles Durchführungsprinzip von Assays

Im Allgemeinen läuft die Testung so ab, dass in einer Platte mit 96 Vertiefungen (engl. well, sogenannte 96well Platte) potentielle Inhibitoren vorlegt werden, Protein zugeben und eine halbe Stunde inkubiert wird, so dass sich ein Bindungs-Gleichgewicht zwischen Enzym und Ligand einstellen kann. In allen Assay wird 0,01 % Triton X-100 zugegeben um eventuelle falsch-positive Ergebnisse durch Mizellenbildung der Inhibitoren zu vermeiden.<sup>39</sup> Nach der Substratzugabe beobachtet man direkt die zeitabhängige Bildung des fluoreszierenden oder farbigen Produkts. Meist wurde 30 Zyklen à einer Minute aufgenommen. Die Inhibition berechnet sich aus der dem Vergleich der Kurvensteigungen nach folgender Formel:

$$\text{Inhibition [\%]} = \frac{\text{Steigung(Positivkontrolle)} - \text{Steigung(Inhibitor)}}{\text{Steigung(Positivkontrolle)} - \text{Steigung(Blank)}} * 100$$

Formel 1: Berechnung der Inhibition. „Blank“ (ohne Protein, ohne Inhibitor, nur Substrat), Positivkontrolle (Substrat und Protein, kein Inhibitor) und Inhibitor (Substrat, Protein und Inhibitor)

Die Berechnung der Inhibition wurde mit dem Programm Excel durchgeführt. Zur Kontrolle des Experiments wurde stets der Z'-Faktor berechnet. Dieser

## Material und Methoden Assays

quantifiziert anhand des Verhältnisses von Signal zu Rauschen die Güte des Assays<sup>40</sup> und wird nach folgender Formel berechnet:

$$Z' = 1 - \frac{3 * (s_{Pos} + s_{Blank})}{m_{Pos} - m_{Blank}}$$

Formel 2: Berechnung von Z'. s = Standardabweichung, m = Mittelwert, Pos und Blank wie oben

Errechnet sich ein Z' von über 0,5 kann der Assay als aussagekräftig eingestuft werden. Liegt Z' zwischen 0 und 0,5 sind die Rohdaten genauestens zu überprüfen aber dennoch auswertbar. Bei negativen Z' ist das Experiment zu verwerfen.

Um die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) zu bestimmen, wurde die Inhibition von mindestens sechs verschiedenen Konzentrationen eines Inhibitors untersucht. Der IC<sub>50</sub> gibt die Konzentration an, bei der eine 50%ige Inhibition der Enzymaktivität stattfindet. Er wird bestimmt, indem der dekadische Logarithmus der Konzentration gegen die Inhibitionsleitung aufgetragen und eine sigmoidale Annäherungskurve angelegt wird.

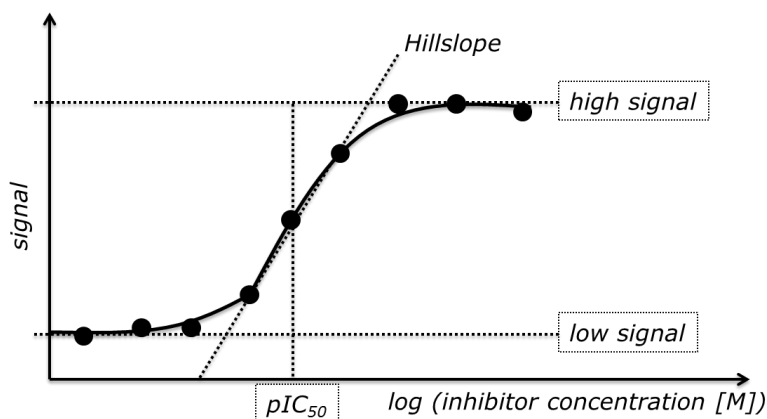


Abbildung 10: Graphische Darstellung einer sigmoidalen Kurve. Aufgetragen ist die logarithmische Konzentration gegen das Signal

Aus dieser Kurve lässt sich nach folgender Formel der IC<sub>50</sub>-Wert berechnen:

$$y = low + \frac{high - low}{1 + 10^{(\log(IC_{50}) - x) * Hillslope}}$$

Formel 3: Berechnung des IC<sub>50</sub>

Bildlich gesehen entspricht der IC<sub>50</sub>-Wert der Konzentration am Wendepunkt der Kurve. Die Auswertung findet mit dem Programm Graph Pad Prism 5 statt.

## 2.4.2 Assays für Metallo- $\beta$ -Lactamasen

### 2.4.2.1 Imipenem Assay

Imipenem ist ein zugelassenes  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum, das eine blassgelbe Färbung aufweist. Bei der Spaltung durch eine MBL verliert Imipenem seine Farbe. Diesen Prozess kann man beobachten, indem man das abnehmende Absorptionssignal bei 300 nm misst.<sup>41</sup>

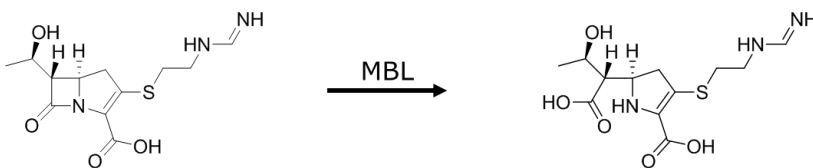


Abbildung 11: Struktur von Imipenem und dem Produkt der Spaltung

Gesamtvolumen	200 $\mu$ L
Puffer	50 mM HEPES (pH 7,3)
Proteinkonzentration	50 nM (NDM-1)
Substratkonzentration	100 $\mu$ M
Temperatur	30 $^{\circ}$ C
Messgröße	Absorption bei 300 nm
Kinetische Zyklen	60 Zyklen alle 20 s

### 2.4.2.2 Nitrocefin Assay

Nitrocefin ist ein Cephalosporin, das bei Spaltung durch MBLs seine Farbe von gelb nach rot verändert und dabei sein Absorptionsmaximum von 390 nm zu 485 nm verschiebt. Es wird seit den 1990er Jahren als Schnelltest für  $\beta$ -Lactamasen verwendet, da die Veränderung auch für das Auge gut sichtbar ist.<sup>42</sup>

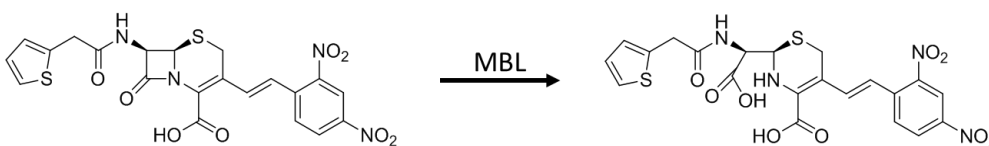


Abbildung 12: Struktur von Nitrocefin und dem Produkt der Spaltung

## Material und Methoden Assays

Gesamtvolumen	200 $\mu$ L
Puffer	50 mM HEPES (pH 7,3)
Proteinkonzentration	10 nM (NDM-1)
Substratkonzentration	2,5 $\mu$ M
Temperatur	RT
Messgröße	Absorption bei 485 nm
Kinetische Zyklen	30 Zyklen alle 60 s

### 2.4.2.3 CENTA Assay

CENTA ist ein weiteres chromogenes Substrat, das nach der Spaltung durch  $\beta$ -Lactamasen seine Absorptionsmaximum verschiebt von hellgelb-farblos (340 nm) zu einer intensiv, chrom-gelben Fabe (405 nm).<sup>43</sup>

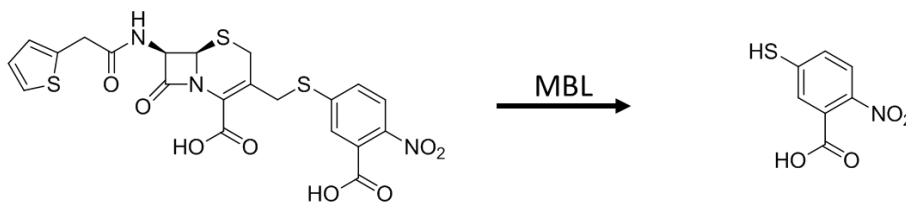


Abbildung 13: Struktur von CENTA und dem Produkt der Spaltung

Gesamtvolumen	200 $\mu$ L
Puffer	50 mM HEPES (pH 7,3)
Proteinkonzentration	5 nM (NDM-1)
Substratkonzentration	10 $\mu$ M
Temperatur	RT
Messgröße	Absorption bei 405 nm
Kinetische Zyklen	30 Zyklen alle 60 s

### 2.4.2.4 Fluorocillin Assay

Fluorocillin Green ist ursprünglich Teil eines ELISA Kits (Invitrogen) zur Untersuchung der  $\beta$ -Lactamase TEM-1. Es besteht aus einem Di-Fluoro-Fluorescein-Kern, der an beiden Seiten je einen Cefalotin-Rest trägt. Nach Spaltung der  $\beta$ -Lactame der Cefalotin-Gruppen wird Di-Fluoro-Fluorescein frei, dessen Fluoreszenz bei 495 nm angeregt und bei 525 nm ausgelesen werden kann.<sup>44</sup>

## Material und Methoden Assays

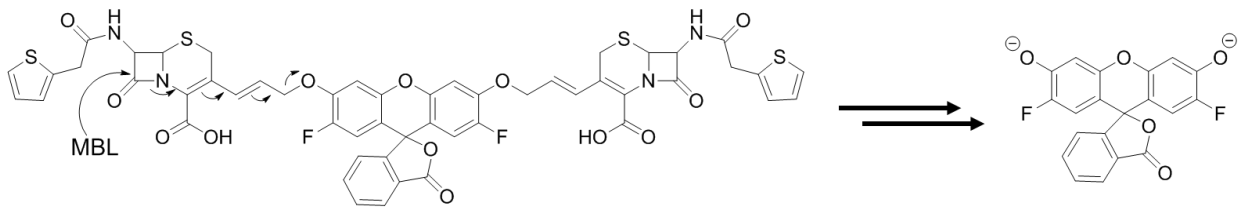


Abbildung 14: Struktur von Fluorocillin und Mechanismus der Spaltung

Gesamtvolumen	100 $\mu$ L
Puffer	50 mM HEPES (pH 7,8)
Proteinkonzentration	5 pM (NDM-1), 4nM (VIM-1), 0,1 nM (IMP-7)
Substratkonzentration	0,1 $\mu$ g/well = 888 nM
Temperatur	RT
Messgröße	Fluoreszenz-Intensität, Excitation: 495 nm, Emission: 525 nm
Kinetische Zyklen	30 Zyklen alle 45 s

### 2.4.3 Assays für sEH-Phosphatase

#### 2.4.3.1 DiFMUP-Assay

6,8-Difluoro-4-methylumbelliferyl-phosphat ist ein Substrat für Phosphatasen, die unter sauren pH Bedingungen ( $pK_s$  des Substrats 4,7)<sup>45</sup> aktiv sind. Nach Abspaltung des Phosphatrestes ist die Fluoreszenz von 6,8-Difluoro-4-methylumbelliferon zu beobachten mit einer Anregungswellenlänge von 358 nm und Emission bei 455 nm.<sup>46</sup>

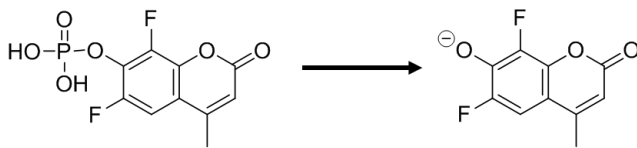


Abbildung 15: DiFMUP und das fluoreszente Produkt

Gesamtvolumen	120 $\mu$ L
Puffer	50 mM Acetat, 10 mM $MgCl_2$ , pH 5,75
Proteinkonzentration	600 nM
Substratkonzentration	300 $\mu$ M
Temperatur	37 $^{\circ}$ C
Messgröße	Fluoreszenz-Intensität, Excitation: 358 nm, Emission: 455 nm
Kinetische Zyklen	45 Zyklen alle 60 s

#### 2.4.3.2 Malachitgrün Assay

Eine kolorimetrische Methode, um freie Phosphate zu detektieren, ist das Malachitgrün. Seine gelbe Leukobase wird in Anwesenheit von Oxidationsmitteln zu einem grünen Komplex, dessen Absorption bei 650 nm beobachtet werden kann. Dieser Assay unterscheidet sich in seiner Durchführung stark von allen anderen, die hier beschrieben wurden. Zunächst wurde die sEH-P (80  $\mu$ L) mit potentiellen Inhibitoren (10  $\mu$ L) 30 Minuten, wie üblich, inkubiert. Anschließend wurde eines der endogenen Substrate, Lysophosphatidylsäure (LPA 10  $\mu$ L), zugegeben und 45 Minuten bei 37  $^{\circ}$ C mit der Phosphatase reagieren lassen.<sup>31</sup> Der Assay wurde mit 100  $\mu$ L Biomol Green Solution gestoppt, die Komplexbildung für eine Stunde abgewartet, und die Absorption des Komplexes ausgelesen.

## Material und Methoden Assays

Gesamtvolumen	100 $\mu$ L + 100 $\mu$ L Green Solution
Puffer	50 mM Acetat, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 5,75
Proteinkonzentration	600 nM
Substratkonzentration	5 $\mu$ M LPA
Temperatur	37 °C und RT
Messgröße	Absorption 650 nM
Kinetische Zyklen	Keine, Endpunktassay

### 2.4.3.3 FDP Assay

Das farblose, nicht-fluoreszierende Fluoresceindiphosphat ist aufgrund seiner amphoteren Löslichkeit ein für viele Phosphatasen geeignetes Substrat. Es wird in mehreren Schritten zum stark gelben Fluorescein umgesetzt, das sehr leicht zu detektieren ist.<sup>47</sup>

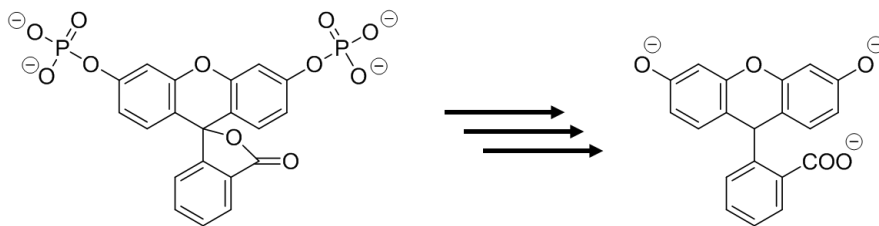


Abbildung 16: FDP und das fluoreszente Produkt

Dieser Assay wurde als optimaler sEH-P Assay am häufigsten verwendet und in verschiedenen Formaten durchgeführt.

96 Well-Format:

Gesamtvolumen	120 $\mu$ L
Puffer	50 mM Acetat, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 5,75
Proteinkonzentration	600 nM
Substratkonzentration	10 $\mu$ M
Temperatur	37 °C
Messgröße	Fluoreszenz-Intensität, Excitation: 495 nm, Emission: 525 nm
Kinetische Zyklen	45 Zyklen alle 60 s



*Material und Methoden*  
*Assays*

384 Well-Format:

Gesamtvolumen	20 µL
Puffer	50 mM Acetat, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 5,75
Proteinkonzentration	80 nM
Substratkonzentration	10 µM
Temperatur	37 °C
Messgröße	Fluoreszenz-Intensität, Excitation: 495 nm, Emission: 525 nm
Kinetische Zyklen	30 Zyklen alle 90 s

Aufgrund der Größe der zu screenenden Bibliotheken am European ScreeningPort wurde der Assay in ein Endpunktformat überführt und Natronlauge als Stopreagenz gewählt. Wegen der höheren Empfindlichkeit des EnVision Plattenlesegeräts wurde die Substratkonzentration erniedrigt und daraus folgend ebenfalls die Proteinkonzentration.

Insgesamt ergab sich daraus nachfolgendes Assay Protokoll: Zunächst wurde das Protein 15 Minuten mit den Testsubstanzen inkubiert, bevor FDP zugegeben wurde. Anschließend wurde eine Stunde gewartet, bis sich genügend Fluoreszenz-Produkt gebildet hatte. Die Reaktion wurde mit Natronlauge abgestoppt und die Fluoreszenz-Intensität einmal ausgelesen.

384 Well-Format als Endpunkt Assay am ESP:

Gesamtvolumen	20 µL + 5 µL Stopreagenz
Puffer	50 mM Acetat, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 5,75
Proteinkonzentration	30 nM
Substratkonzentration	5 µM
Temperatur	RT
Messgröße	Fluoreszenz-Intensität, Excitation: 495 nm, Emission: 525 nm
Stopreagenz	5 µL NaOH (5 M)

## 2.4.4 Biophysikalische Assays

### 2.4.4.1 Thermal Shift Assay

Der Thermal Shift Assay (TSA) ist eine Methode, bei der die Schmelztemperatur des Proteins gemessen wird, indem die Fluoreszenzintensität eines Fluoreszenzfarbstoffs beobachtet wird. In einer wässrigen Lösung mit gefaltetem Protein wird das Fluoreszenzsignal vom Wasser gequenchet. Erhöht sich die Temperatur, beginnt die Entfaltung des Proteins, und die hydrophoben Regionen der Innenseite werden freigelegt, an die der Farbstoff binden kann (Abbildung 17). Daraus resultiert ein Anstieg der Fluoreszenz. Sollte sich ein stabiler Ligand-Protein-Komplex gebildet haben, liegt die Schmelztemperatur des Komplexes höher als die des apo-Proteins.

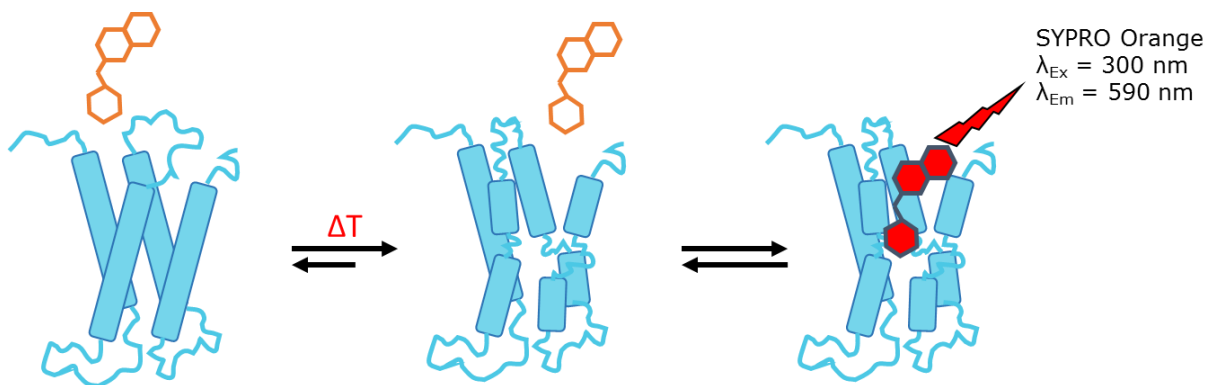


Abbildung 17: Darstellung des Schmelzprozesses beim TSA

Der TSA wurde in 96well MicroAmp Platten durchgeführt und SYPRO Orange als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Zu 4  $\mu\text{L}$  der Testsubstanz (500  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) verdünnt in Assaypuffer wurden 32  $\mu\text{L}$  des entsprechenden Enzyms sowie 4  $\mu\text{L}$  SYPRO Orange gegeben, und die Platte mit einer Folie verschlossen. Der temperaturabhängige Anstieg der Fluoreszenzintensität wurde in Triplikaten mit einem ICycler gemessen. Von 20  $^{\circ}\text{C}$  bis 90  $^{\circ}\text{C}$  wurde in Schritten von 0,2  $^{\circ}\text{C}$  pro Minute bei 490 nm Anregungswellenlänge und 570 nm Emissionswellenlänge die Fluoreszenz aufgezeichnet. Um den Schmelzpunkt des Proteins besser zu erkennen, wurde die erste Ableitung der Schmelzkurve in Graph Pad Prism 5 berechnet.

*Material und Methoden*  
*Assays*

Gesamtvolumen	40 $\mu$ L
Puffer	50 mM HEPES, pH 7,5, 0,01 % Triton X-100 für NDM-1 und IMP-7; 50 mM MES, pH 6,0, 50 mM NaCl, 0,01 % Triton X-100 für VIM-1
Proteinkonzentration	5 $\mu$ M
SYPRO Orange	2,5 x
Temperatur	20 °C - 90 °C
Messgröße	Fluoreszenz-Intensität, Excitation: 300 nm, Emission: 570 nm
Kinetische Zyklen	350 Zyklen a 1 Minute und 0,2 °C

#### 2.4.4.2 *STD-NMR*

STD-NMR<sup>48</sup> ist eine kernresonanzspektroskopische Methode, um die Bindung eines Liganden an ein Protein zu untersuchen. Normalerweise ist die Untersuchung eines Proteins mit NMR schwierig, da durch Spin-Diffusion innerhalb des Moleküls die Relaxationszeiten mit steigender Molekülgröße immer länger werden. Exakt dieser Effekt wird sich bei der STD-NMR zu Nutze gemacht. Durch intramolekulare Spin-Diffusion wird Magnetisierung sowohl entlang des Protein-Rückgrats, aber auch durch den Raum übertragen und zwar umso schneller, je größer das Protein ist. Außerdem wird der breite Absorptionsbereich des Proteins ausgenutzt. Durch hochfrequente Radiopulse in den Bereichen von über 10 ppm und unter 0 ppm werden die Signale des Proteins durch Sättigung der Magnetisierung ausgelöscht. Es ist also möglich, das NMR-Spektrum eines Liganden zu aufnehmen, ohne Protein-Signale zu sehen. Die hochfrequenten Pulse beeinflussen dabei nicht den Absorptionsbereich der Liganden, vorausgesetzt, diese absorbieren innerhalb des üblichen Bereichs zwischen 0 und 10 ppm. Die Spin-Diffusion durch den Raum kann allerdings nicht nur intramolekular, sondern auch über kleine Abstände, ähnlich wie bei NOESY-Experimenten, durch den Raum vom Protein zum Ligand geschehen. Bindet also ein Ligand an das Protein, wird Magnetisierung vom gesättigten Protein auf den Ligand übertragen, daher der Begriff Sättigungstransfer. In Konsequenz löschen sich also die Signale der stark wechselwirkenden Protonen aus.

## Material und Methoden Assays

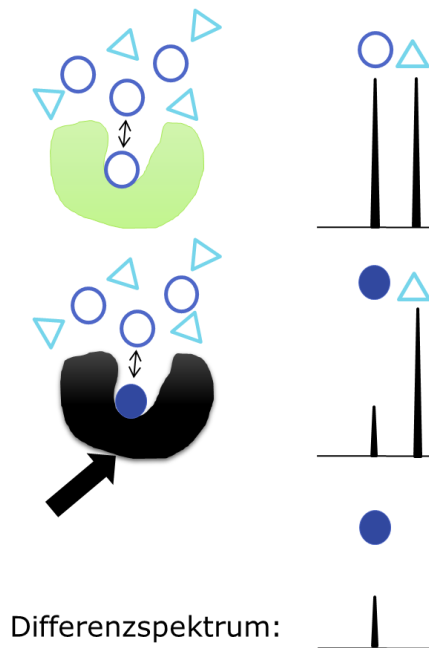


Abbildung 18: Darstellung der Auswirkung von Magnetisierungstransfer auf das NMR-Signal. Links ist die Bindetasche in grün zu sehen mit den Liganden schematisch als blauen Kreisen und türkisen Dreiecken. Der Farbsättigung soll der Magnetisierungssättigung entsprechen, je dunkler, desto stärker.<sup>49</sup>

Bildet man nun die Differenz zwischen einem vorher gemessenen Referenzspektrum von reinem Inhibitor im Puffer und subtrahiert davon das Sättigungstransfer-Spektrum, erhält man das STD-Spektrum, in dem lediglich nur noch die Signale der Protonen zu sehen sind, die mit dem Protein interagieren (Abbildung 18). Mit der STD-NMR lassen sich auch mehrere Inhibitoren gleichzeitig untersuchen, vorausgesetzt die Signale der Liganden-Protonen überlagern sich nicht gegenseitig.<sup>50</sup>

Für STD-Experimente wurden die Proteine nach der HisTrap-Chromatographie durch Dialyse in Phosphat-Puffer (25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , pH 7,8, 50  $\mu\text{M}$  DSS als Standard) überführt und auf die gewünschte Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  aufkonzentriert. Da sie ohne Aktivitätsverlust zu lyophilisieren waren (durchgeführt von Susanne Beyer, AK Prof. Wacker), wurde ihnen so das Wasser entzogen. Nach Resuspension in  $\text{D}_2\text{O}$  wurden die Inhibitoren (400  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) zugegeben und die Probe an einem 600 MHz Bruker AvIII Spektrometer mit  $^1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$  Kryo-Probenkopf vermessen (von Dr. Frank Löhr, AK Prof. Dötsch). Verbleibende Wasser-Signale wurden mit der „Excitation Sculpting“ Methode unterdrückt. Sättigungspulse wurden bei 0,2 und 21,4 ppm eingestrahlt durch 25 ms Gauß-Pulse (1 % Truncation, 135 ° Flip Winkel).

## Material und Methoden Assays

Gesamtvolumen	500 µL
Puffer	50 mM Phosphat
Proteinkonzentration	30 µM
Spektrometerfrequenz	600 MHz
Pulsfrequenzen	0,2 und 21,4 ppm
Anzahl Scans	2-8 k

### 2.4.4.3 NMR-Titrationsexperiment

Um die NDM-1 mit  $^{15}\text{N}$  zu markieren, wurde die Expression in 500 mL M9 Minimalmedium mit 0,5 g  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  durchgeführt (im 2 L Schikanekolben). Nach der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Säule wurde eine Gelfiltration durchgeführt (s. Kapitel 2.3.2). Das auf 100 µM aufkonzentrierte Protein wurde in einen geeigneten Puffer überführt (25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 100 µM  $\text{Zn}(\text{OAc})_2$ , pH 7,5) und ein BEST- $^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}$ -TROSY Spektrum aufgenommen (von Dr. Frank Löhr, AK Prof. Dötsch). In 16 Spektren wurde die Peak-Verschiebung durch unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen beobachtet. Mit dem Programm SPARKY wurden die Spektren überlagert und vier Spuren identifiziert, anhand derer sich die Konformationsänderung durch den Inhibitor gut verfolgen ließ. Die Peaks der Spuren wurden gepickt und eine Peakliste erstellt. Die Chemical Shift Perturbation<sup>51</sup> wurde für die geshifteten Peaks nach folgender Formel berechnet.

$$\text{CSP} = \sqrt{\left(\frac{N(0) - N(i)}{5}\right)^2 + (H(0) - H(i))^2}$$

Formel 4:  $N(0)$  chemische Verschiebung (in ppm) des N-Atoms ohne Inhibitor,  $N(i)$  chemische Verschiebung des N-Atoms in Anwesenheit von Inhibitor. Analog H-Atome mit und ohne Inhibitor.

Mit dem Programm Graphpad Prism 5 wurde das Molare Verhältnis zwischen Inhibitor- und Proteinkonzentration gegen die Chemical Shift Perturbation regressiert (Saturation Binding – One Site – Specific Binding).

## Material und Methoden Assays

Gesamtvolumen	500 µL
Puffer	25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 100 µM Zn(OAc) <sub>2</sub> , pH 7,5
Proteinkonzentration	100 µM
Spektrometerfrequenz	600 MHz
Inhibitor	0,1 – 5 mM in 21 Schritten
Anzahl Scans	32

### 2.4.5 Microbroth Dilution Assay

Die zu untersuchenden klinischen Isolate bzw. *E.coli* Transformanten wurden bei 37 °C für zwei Stunden in CAMHB-Medium (cation adjusted Mueller Hinton Broth) inkubiert und anschließend bei 4400 rpm für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in so viel 0,9 % Natriumchlorid-Lösung re-suspendiert, dass eine optische Dichte entsprechend eines 0,5 McFarland Standard<sup>52</sup> erreicht wurde und weiter 1:10 in Kochsalzlösung verdünnt, um eine Konzentration von ca.  $1 \times 10^7$  KBE/ml (Kolonie-bildende Einheit pro Milliliter) zu erlangen. Der McFarland Standard ist eine Methode, um die Anzahl an Zellen anhand ihrer Trübung zu quantifizieren. Eine 0,5 McFarland Standard-Lösung wird aus 0,05 mL einer 1,175 % Bariumchlorid-Dihydrat Lösung ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) und 9,95 mL eine 1 % Schwefelsäurelösung hergestellt. Die Trübung des ausgefallenen Bariumsulfats entspricht ungefähr einer Anzahl von  $1 \times 10^8$  kolonie-bildenden Einheiten.

Imipenem wurde in MilliQ mit einer Konzentration von 12,8 mg/mL angesetzt und in CAMHB 1:100 verdünnt, um die höchste Testkonzentration von 128 µg/mL zu erreichen. Diese wurde in 1:2 Schritten weiter verdünnt, um die Verdünnungsreihe zu komplettieren (128 µg/mL → 64 µg/mL → 32 µg/mL usw. bis 0,25 µg/mL). Die Testsubstanz (Endkonzentration 128 µg/mL) wurde vorher ebenfalls in CAMHB gelöst und vorgelegt. In jedes Well wurden 100 µL der entsprechenden Imipenemkonzentration in CAMHB - gemischt mit der Testsubstanz - gegeben und 5 µL der Bakterienlösung (50.000 KBE pro Well) hinzu gefügt. Zusätzlich wurden Sterilitätskontrollen (von der kleinsten Antibiotikumskonzentration) sowie Wachstumskontrollen (nur Bakterien in CAMHB) durchgeführt. Die Platte wurde für

*Material und Methoden*  
*Assays*

20 h bei 37 °C inkubiert und anschließend visuell ausgewertet. Wenn es zu Bakterienwachstum kam, sanken diese über die Zeit ab und bildeten ein Präzipitat auf dem Boden der Platte. Beim wirkenden Antibiotikum bildete sich kein Niederschlag auf dem Boden. Dieser Assay wurde von Denia Frank aus dem AK Prof. Wichelhaus durchgeführt.

Gesamtvolumen	105 µL
Medium	CAMHB
Bakterienmenge	50.000 KBE
Substratkonzentration	128 µg/mL bis 0,25 µg/mL in 1:2 Schritten
Inhibitorkonzentration	128 µg/mL
Temperatur	37 °C
Messgröße	Knopfbildung am Plattenboden

*Material und Methoden*  
*Assays*



## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen

#### 3.1.1 Allgemeine Methoden

##### 3.1.1.1 Protein-Expression und Aufreinigung

Um genügend Protein für die Entwicklung verschiedener Assays zu haben, wurden zunächst Expression und Aufreinigung der MBLs etabliert. Dabei zeigte sich, dass die Ausbeute durch Zusatz von Zink-Ionen um das doppelte gesteigert werden konnte. Bei der Expression in einfachem LB-Medium wurden aus einer 500 mL Kultur nach der HisTrap Aufreinigung ca. 6-8 mg Protein in guter Reinheit erhalten (Abbildung 19, Gele von VIM-1 und IMP-7 siehe Anhang Abbildung 46 und 47). Wurde die Expression in Minimalmedium mit einer Spurenelement-Lösung mit zehnfacher Zinkkonzentration (s. Kapitel 2.2.2) durchgeführt, konnte die Ausbeute auf bis zu 12 mg erhöht werden.

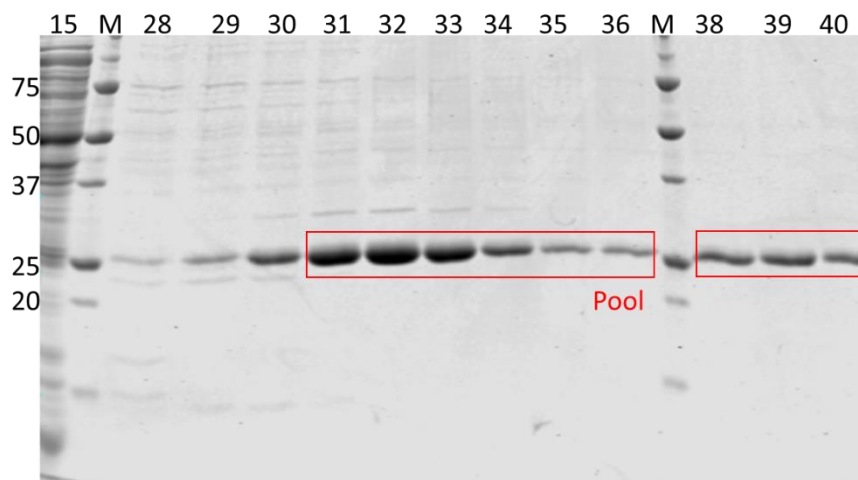


Abbildung 19: Beispiel-Gel von NDM-1 nach Aufreinigung via Ni-NTA

Die Konservierung der Proteine erwies sich als problemlos. Nach Zugabe von 0,03 % Natriumazid waren die MBLs ohne nennenswerten Aktivitätsverlust über ca. drei Monate bei 4 °C haltbar. Für eine längere Aufbewahrung wurden die Proben mit 20 % Glycerol versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Auch die Lyophilisierung (durchgeführt im AK Prof. Wacker) wurde mit nur minimalem Aktivitätsverlust toleriert.

### 3.1.1.2 Entwicklung eines funktionalen Assays

Die Assayentwicklung wurde nur mit NDM-1 als Testprotein durchgeführt, da es von den vorhandenen MBLs einerseits als erstes vorlag, andererseits auch am „aktivsten“ war und die Substrate am schnellsten umsetzte. Die exakten Volumina und Konzentrationen sind im Kapitel Material und Methoden (2.4.2) aufgelistet. Als erstes Substrat wurde Imipenem ausgewählt (s. Kap.2.4.2.1). Dieser Assay wurde von der Gruppe um Guo<sup>41</sup> veröffentlicht und in Küvetten durchgeführt. Da dieses Format äußerst zeit- und materialintensiv war, wurden Anpassungen bezüglich Substrat- und Proteinmenge vorgenommen und der Assay in transparente 96well Platten überführt. Als problematisch wurde hierbei nicht nur das schlechte Verhältnis von Signal zu Rauschen beobachtet, sondern auch die Wellenlänge von 300 nm, bei der gemessen wurde.

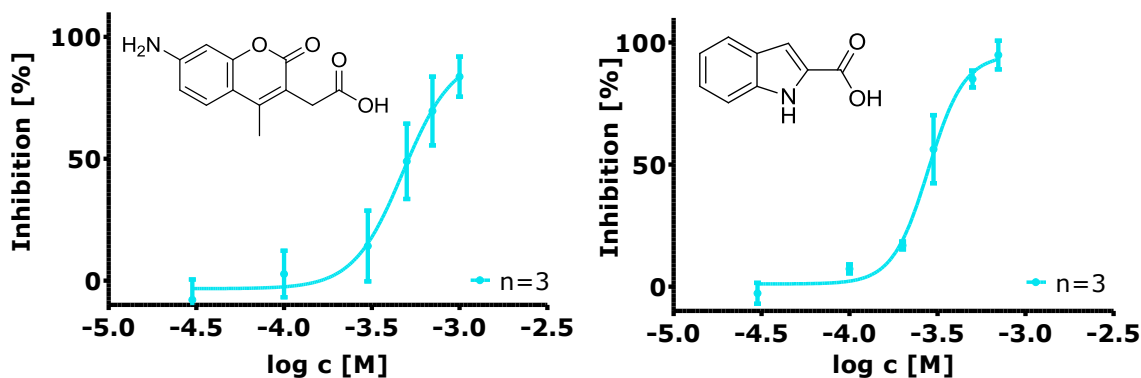


Abbildung 20: Links MBL28 IC<sub>50</sub> = 495 ± 82 µM, rechts MBL26 IC<sub>50</sub> = 259 ± 56 µM beide auf NDM-1

Zwar konnten aus einer vorhandenen Substanzbibliothek erste Inhibitoren identifiziert werden, allerdings mussten viele Testsubstanzen verworfen werden, da sie ebenfalls bei 300 nm absorbierten. Auch der Versuch Derivate der gefundenen Inhibitoren zu testen scheiterte, da diese eine Interferenz mit der Messwellenlänge zeigten. Daraus folgte der Verwurf des Assays.

Ein übliches Substrat zur Untersuchung von MBLs ist Nitrocefin.<sup>42</sup> Der Farbumschlag von gelb zu rot, der durch die Spaltung des  $\beta$ -Lactams hervorgerufen wird, lässt sich leicht spektrometrisch beobachten. Außerdem liegt die zu messende Wellenlänge mit 485 nm weit weg vom Absorptionsspektrum der meisten Testsubstanzen. Entsprechend des mitgelieferten Substanzdatenblatts wurde zunächst eine Substratkonzentration von 100 µM getestet, woraufhin für

*Ergebnisse und Diskussion  
Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen*

keinen der beiden bisher identifizierten Inhibitoren eine Aktivität festgestellt werden konnte. Daher wurde die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  von Nitrocefin zu NDM-1 bestimmt.

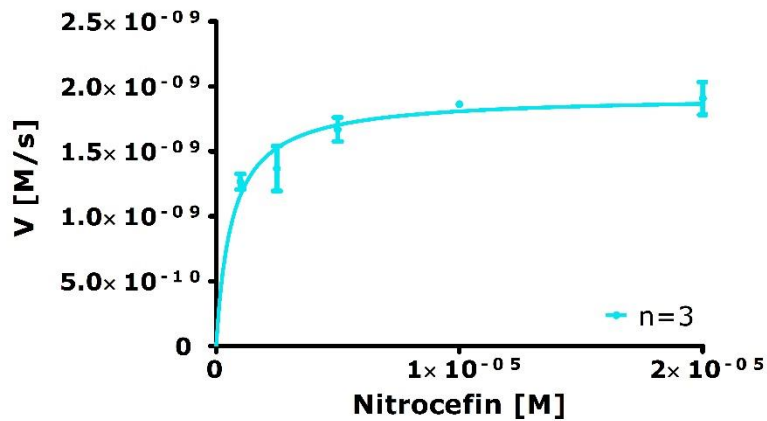


Abbildung 21: Michaelis-Menten Blot von Nitrocefin an NDM-1.  $K_m = 2,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$

Da der  $K_m$  mit  $2,3 \mu\text{M}$  nur ein vierzigstel der vorgeschlagenen Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  ist, wurde der Assay mit  $2,5 \mu\text{M}$  Nitrocefin wiederholt. Bei diesem Versuch konnten zwar die beiden Inhibitoren wiedergefunden werden, die aus dem Imipenem Assay bekannt waren, aber es war nicht möglich  $\text{IC}_{50}$  Werte zu bestimmen, da niemals eine Inhibition über 50 % erreicht wurde.

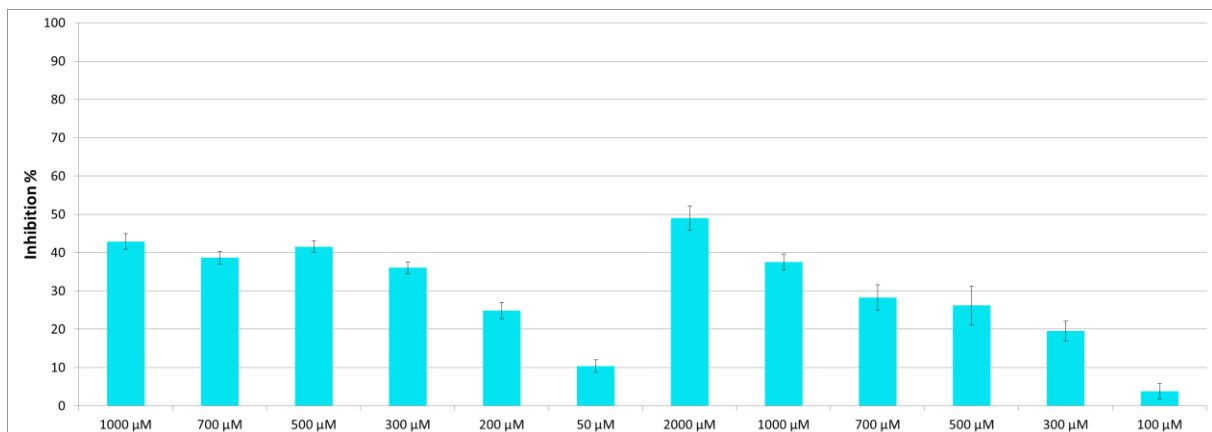


Abbildung 22: Inhibition [%] der beiden Inhibitoren MBL26 (links) und MBL28 (rechts) bei unterschiedlichen Konzentrationen im Nitrocefin-Assay

Da die Affinität von Nitrocefin zur NDM-1 sehr stark war, lag bei  $2,5 \mu\text{M}$  das Bindungsgleichgewicht immer noch auf der Seite des Substrats und nicht bei den Inhibitoren. Um höhere Inhibitionen sehen zu können, müsste man die Substratkonzentration weiter senken, was allerdings nicht möglich war, da die Auflösungsgrenze des Tecan Readers erreicht wurde. Daher wurde auch dieses Substrat verworfen.

*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen*

Als letztes kolorimetrisches Substrat wurde CENTA<sup>53</sup> gewählt, welches eine hohe chemische Ähnlichkeit zu Nitrocefin aufweist. Für dieses Substrat wurde direkt versucht,  $K_m$  zu bestimmen, allerdings war kaum eine mathematische Regression möglich, da der  $K_m$  bei ca. 3  $\mu\text{M}$  liegt und die Auflösungsgrenze des Tecan Readers für dieses Substrat bei 8  $\mu\text{M}$ . Also erwies sich auch dieses Substrat als ungeeignet. Statt dessen wurde vermehrt nach fluorogenen Substraten gesucht, da diese wesentlich sensitiver detektiert werden können.

Fluorocillin<sup>44</sup> besteht aus einem Di-Fluoro-Fluorescein-Kern, der an beiden Seiten je einen Cefalotin-Rest trägt (s. Kapitel 2.4.2.4). Nach Spaltung eines  $\beta$ -Lactams wird das Zwischenprodukt frei, das aus einer Cefalotin-Gruppe am Fluorescein Kern besteht, bei 435 nm angeregt werden kann und bei 525 nm emittiert. Nach der Spaltung des zweiten Cefalotin-Rests wird Di-Fluoro-Fluorescein frei, dessen Fluoreszenz bei 495 nm angeregt und bei 525 nm ausgelesen werden kann.

Da über diesen Assay nichts bekannt war, wurde zunächst eine Checkerboard-Assay mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.

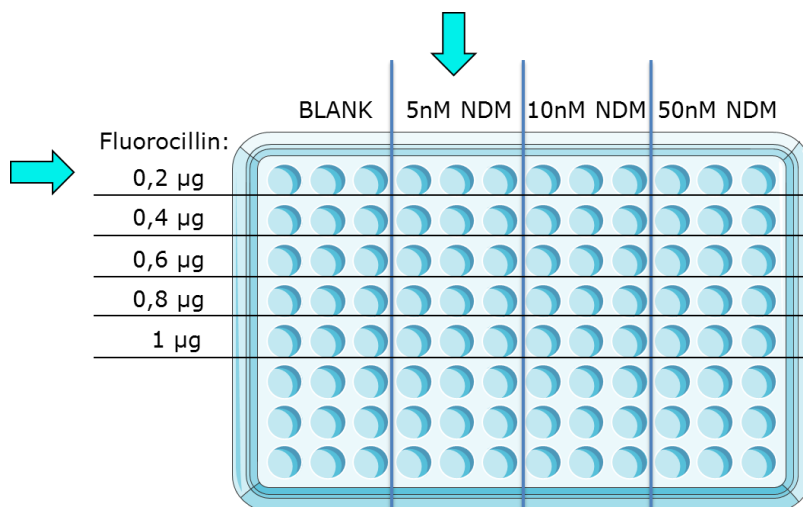


Abbildung 23: Checkerboard-Matrix zur Untersuchung verschiedener Assay Setups. Da das Molekulargewicht von Fluorocillin anfangs nicht bekannt war, wurden  $\mu\text{g}$  verwendet.

Für alle Kombinationen wurde der  $Z'$ -Faktor berechnet, der bei niedrigen Fluorocillin- und Proteinkonzentration die höchsten Werte ergab. Daher wurde bei einer Proteinkonzentration von zunächst 5 nM die weitere Optimierung durchgeführt. Es wurde versucht, den  $K_m$  von Fluorocillin zu messen, da es sich allerdings um eine zweistufige Reaktion handelt, konnte nur eine Gerade detektiert werden.

Ergebnisse und Diskussion  
Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen

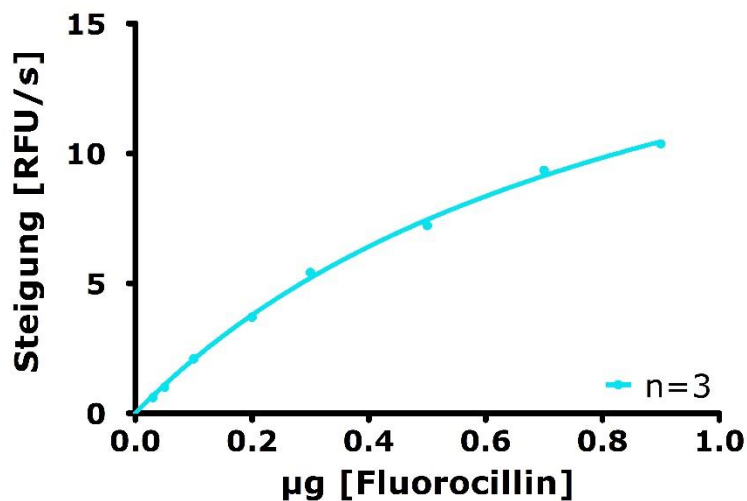


Abbildung 24:  $K_m$  von Fluorocillin bei 5 nM NDM-1

Da bei 0,2 µg pro Well eine sehr hohe Fluoreszenz detektiert wurde, wurde die Masse auf 0,1 µg pro Well reduziert und ein  $IC_{50}$  der Referenzsubstanz L-Captopril<sup>54</sup> (MBL42) aufgenommen. Der gemessene  $IC_{50}$  liegt mit 6,4 µM in der gleichen Größenordnung wie der publizierte  $K_m$  von 39 µM.

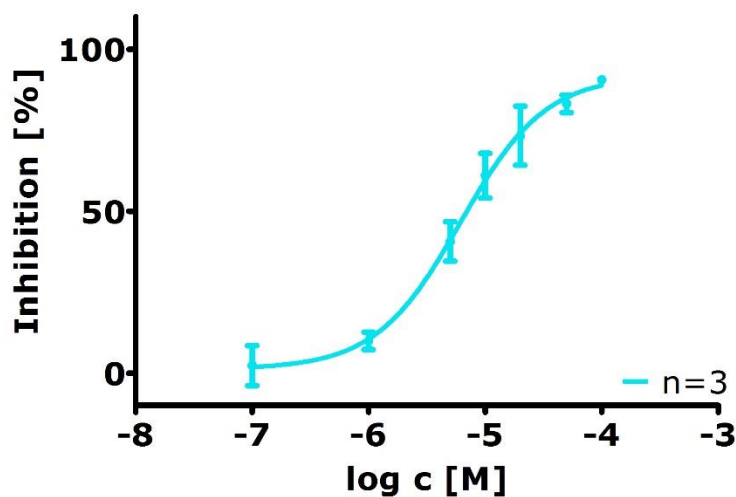


Abbildung 25:  $IC_{50}$  von L-Captopril (MBL42) auf NDM-1 = 6,4 ± 2,1 µM

Captopril erwies sich als besonders guter Referenzligand, da es sowohl in Wasser als auch in DMSO sehr gut löslich war. So konnte gezeigt werden, dass der Assay von bis zu 5 % DMSO nicht beeinflusst wird. Da die Zugabe von DMSO wegen der Wasserunlöslichkeit der meisten Testsubstanzen unausweichlich war, aber kein Unterschied zwischen den einzelnen Wells sein sollte, wurde die DMSO-

Konzentration im Assay konstant bei 1 % gehalten. Weiterhin wurde der Einfluss von Triton X-100 getestet. Bei Testsystemen mit rekombinanten Proteinen in Puffern wird üblicherweise Detergenz zugesetzt, um eine Aggregation von Inhibitoren, die nicht gut wasserlöslich sind, zu vermeiden. Diese könnten ohne Zugabe von Detergenz Mizellen bilden und so ein falsch positives Ergebnis liefern, indem sie den Zugang zur Bindetasche für das Substrat blockieren.<sup>55</sup> Die Standardkonzentration von 0,01 % Triton X-100 zeigte sogar einen positiven Effekt auf den Assay, da sie die Löslichkeit des Substrats vergrößerte und so noch höhere  $Z'$ -Faktoren (von ca. 0,6 auf mind. 0,8) bei der Durchführung des Assays erreicht wurden. Aufgrund der niedrigen Mengen an Substrat und Protein, die man für diesen Assay benötigt, die hohe Sensitivität sowie den hohen  $Z'$ -Faktoren wurde dieser als Standard-Assay für MBLs durchgeführt.

### *3.1.1.3 Entwicklung Thermal Shift Assay*

Für die Funktion von MBLs sind die beiden Zink-Ionen des aktiven Zentrums unabdingbar. Durch Chelatoren wie EDTA kann die Aktivität völlig aufgehoben werden. Da nach Substanzen gesucht wurde, die wirklich an die MBLs binden und nicht nur Zink aus der Bindetasche ziehen, galt es, eine orthogonale Screening Methode zu finden, mit der man den Unterschied zwischen Substanzen, die an das Protein binden, und Zink-Chelatoren zu beobachten. Aufgrund seiner leichten Durchführung fiel die Wahl auf den Thermal Shift Assay (TSA) (siehe Kapitel 2.4.4.1). Das Postulat des TSA ist, dass die Bildung eines Protein-Liganden-Komplexes die Schmelztemperatur des Proteins erhöht.<sup>56,57</sup> Die erweiterte Hypothese war, dass die Destabilisierung des Proteins durch Zink-Entzug die Schmelztemperatur erniedrigen müsste und so die Unterscheidung zwischen Bindern und Chelatoren zu treffen sein müsste. Hierzu wurden zunächst Schmelzkurven der Proteine (5  $\mu$ M) aufgenommen im gleichen Puffer, wie er im Assay verwendet wurde. Allerdings zeigte sich, dass die VIM-1 im HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,5, 0,01 % Triton X-100) nicht stabil war und keine Schmelzkurve gemessen werden konnte. Daher wurden andere Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten getestet und schließlich MES-Puffer (50 mM MES, pH 6,0, 50 mM NaCl, 0,01 % Triton X-100) verwendet. Die aus älteren Publikationen abgeleitete Proteinkonzentration von 5  $\mu$ M und 2,5x SYPRO Orange erwiesen sich als vollkommen ausreichend, um auch nach Bildung der Ableitung noch signifikante

*Ergebnisse und Diskussion  
Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen*

Werte zu messen. Da von schwacher Bindung ausgegangen wurde, wurden die Inhibitoren in einer hohen Konzentration von 500  $\mu$ M eingesetzt. Um die Destabilisierung durch einen Chelator zu überprüfen, wurde EDTA verwendet.

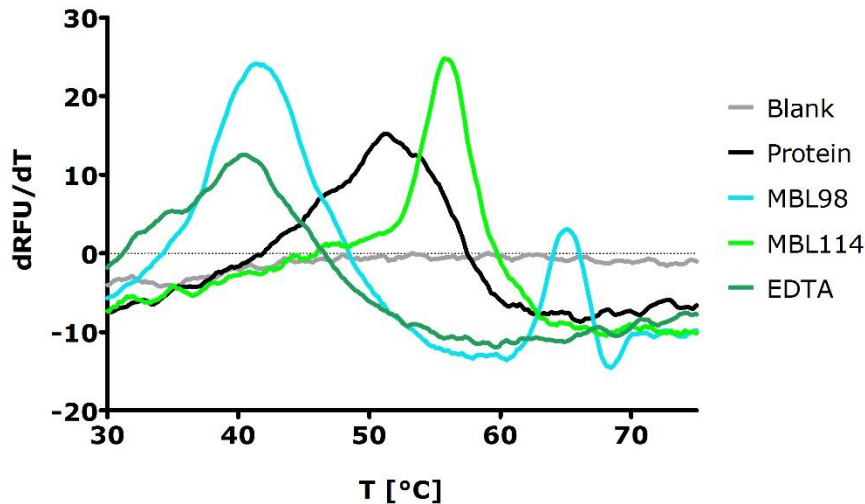


Abbildung 26: Erste Ableitung der Schmelzkurven von NDM-1 mit und ohne Inhibitoren

Der Schmelzpunkt von NDM-1 wurde bei Zugabe von MBL114 (Tiopronin) um 5 °C erhöht, was auf eine Stabilisierung durch Ausbildung eines Protein-Liganden-Komplexes hinwies. Fügte man dem Protein 500  $\mu$ M EDTA zu, erniedrigte sich der Schmelzpunkt um fast 10 °C. Dimercaprol (MBL98) war mit diesem Assay leicht als Chelator zu identifizieren (Abbildung 26), der aber aufgrund seines Doppel-Peaks auch direkt zu binden schien. Diese Methode wurde als sekundäres Screening durchgeführt und eignete sich aufgrund der einfachen Durchführung sehr gut.

### *3.1.1.4 Chemical Shift Perturbation NMR*

Für ein Fragment sollte die Dissoziationskonstante  $K_D$  bestimmt werden, da der  $IC_{50}$  nur eine relative Größe ist. Als Methode wurde dafür ein NMR Titrationsexperiment ausgewählt. Da die chemische Verschiebung sehr stark von der elektronischen Umgebung eines Kerns abhängt, sind Veränderungen der Umgebung, z.B. durch die Bindung eines Liganden, leicht in der Veränderung der chemischen Verschiebung zu beobachten. Gibt man verschiedene Konzentrationen eines Liganden zum Protein und nimmt ein  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC Spektrum auf, können je nach Konzentration unterschiedlich starke Verschiebung der Rückgrat Stickstoffe beobachtet werden und daraus die Chemical Shift Perturbation berechnet werden. Trägt man diese gegen das molare Verhältnis zwischen Ligand und Protein auf, lässt sich der  $K_D$  berechnen.<sup>51</sup>

Zunächst wurde NDM-1 im M9 Minimalmedium exprimiert, das mit  $^{15}NH_4Cl$  versetzt war. Nach Aufreinigung mittels HisTrap und Superdex sowie dem Aufkonzentrieren auf 100  $\mu M$  wurde das Protein in einen NMR-geeigneten Puffer (25 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7,5) überführt und ein Spektrum des Apo-Proteins aufgenommen. Bei Zugabe des Referenzliganden Captopril konnte zunächst kein Shift beobachtet werden, was wahrscheinlich daran lag, dass bei den Aufreinigungs- und Dialyseschritten das Zink aus der Bindetasche gezogen wurde. Nach Zugabe von 200  $\mu M$   $Zn(OAc)_2$  (entspricht zwei Zinkionen pro Bindetasche, also der natürlichen Menge), war nur noch aggregiertes Protein zu beobachten. Da mit steigender Zinkkonzentration auch eine Linienverbreiterung einherging, wurde eine neue Probe aufgearbeitet und die Zinkkonzentration nur sehr langsam erhöht. Schlussendlich wurden 25 mM HEPES, 100 mM NaCl, 100  $\mu M$   $Zn(OAc)_2$ , pH 7,5 als beste Pufferbedingungen gefunden. In 16 Schritten wurden Konzentrationen von 0-5 mM des Inhibitors gemessen. Das Peakpicking wurde in SPARKY<sup>58</sup> durchgeführt, die CSP in Excel berechnet und die Regression in Graphpad vorgenommen.



### 3.1.2 Consensus Docking Projekt

Da Patienten mit Infektionen von Gram-negativen Bakterien, die eine MBL exprimieren, oft in sehr schlechten Zustand sind, besteht der Wunsch, einen Inhibitor zu finden der mehrere MBLs inhibiert. So könnte man Patienten direkt behandeln, ohne erst herausfinden zu müssen, um welche MBL es sich handelt. Aus Patienten, die am Uniklinikum Frankfurt behandelt wurden, stammen die Isolate, welche die MBLs NDM-1, VIM-1 und IMP-7 als Resistenzgene tragen. Die *in silico* Analyse dieser Proteine zeigte, dass sie untereinander mindestens eine Sequenzidentität von 32 % haben und die aktiven Zentren konserviert sind. Um einen Inhibitor zu finden, der alle drei MBLs inhibiert, wurde ein Consensus Docking durchgeführt (von Daniel Moser). Dazu wurde die Specs.net Datenbank auf ihre Fragmente reduziert, indem sie nach den „Astex' Rule of Three“ Parametern<sup>59</sup> gefiltert wurde.

Tabelle 1: Filterparameter zur Reduktion der Specs.net Datenbank

Eigenschaft	Wert
Molekulargewicht	<300 g/mol
log P	$\leq 3$
Wasserstoffbrücken-Donoren	$\leq 3$
Wasserstoffbrücken-Akzeptoren	$\leq 3$

Anschließend wurden die Fragmente mit drei verschiedenen Docking Programmen (MOE<sup>21</sup>, GOLD<sup>60</sup> und PLANTS<sup>61</sup>) in die Kristallstrukturen der MBLs gedockt (NDM-1 PDB-Code 3Q6X<sup>18</sup>). Da keine Kristallstruktur von VIM-1 verfügbar war, wurden stattdessen die Kristallstrukturen von VIM-2 (PDB-Code 2YZ3<sup>62</sup>) und VIM-4 (PDB-Code 2WHG<sup>63</sup>) verwendet. Da auch die Kristallstruktur von IMP-7 nicht gelöst ist, wurde die Struktur von IMP-1 genutzt (PDB-Code 1DD6<sup>64</sup>). Innerhalb eines Rezeptors wurden nur die Fragmente behalten, deren RMSD kleiner als 2 Å war, also nur diese, die von allen drei Programmen an die gleiche Stelle plziert wurden. Im nächsten Schritt wurde der Consensus<sup>65</sup> für die vorhergesagten Bindemodi über alle MBLs gebildet, also wiederum nur die Fragmente behalten, die in allen Rezeptoren an der gleichen Stelle (RMSD kleiner als 2 Å) lagen.

*Ergebnisse und Diskussion  
Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen*

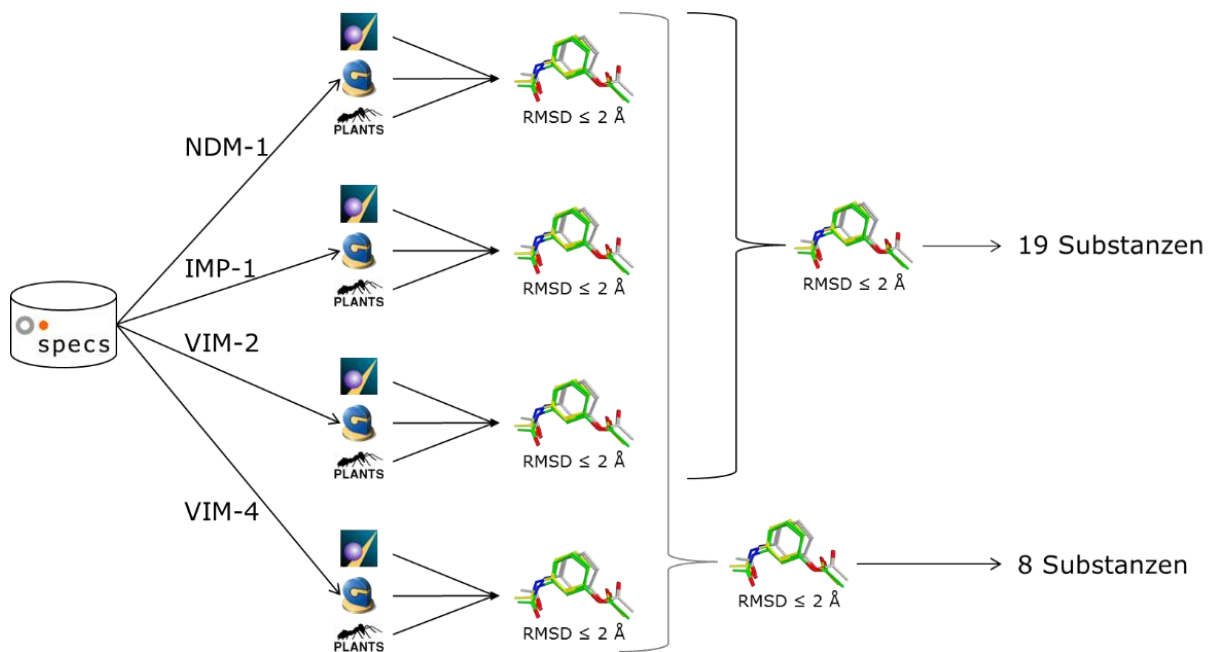
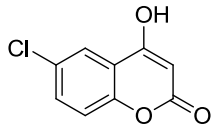


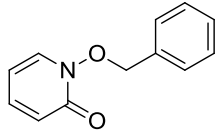
Abbildung 27: Graphische Darstellung des Workflows des virtuellen Screenings mit consensus scoring

Dabei blieben lediglich acht Substanzen übrig. Bei genauerer Betrachtung der Daten fiel auf, dass vor allem durch das Docking in die VIM-4-Struktur viele Fragmente herausfielen. Daher wurde der Rezeptor-Consensus nochmal ohne VIM-4 durchgeführt, so dass weitere 19 Substanzen gefunden wurden. Diese wurden bei SPECS bestellt und im Fluorocillin-Assay mit allen MBLs validiert.

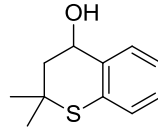
*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen*



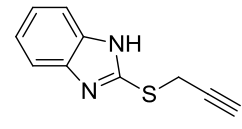
MBL59



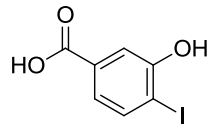
MBL60



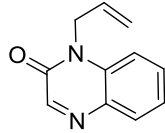
MBL61



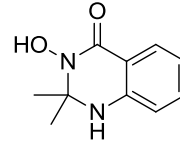
MBL62



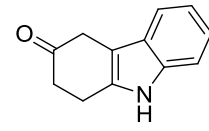
MBL63



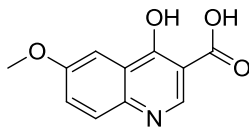
MBL64



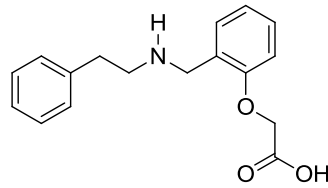
MBL65



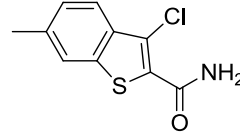
MBL66



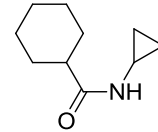
MBL67



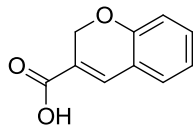
MBL68



MBL69



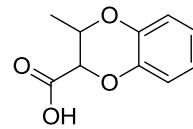
MBL70



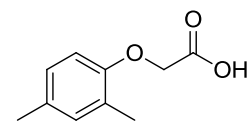
MBL71



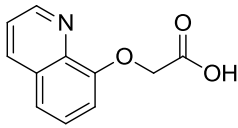
MBL72



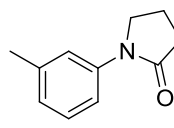
MBL73



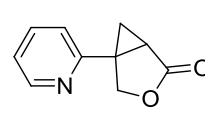
MBL74



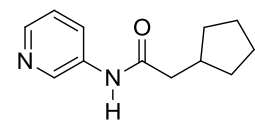
MBL75



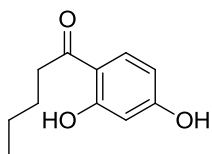
MBL76



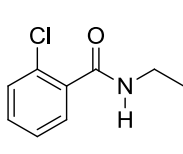
MBL77



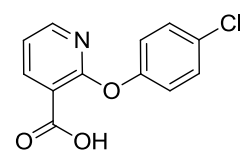
MBL78



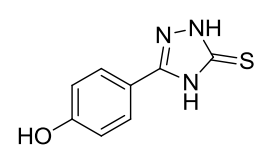
MBL79



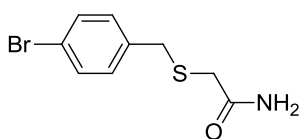
MBL80



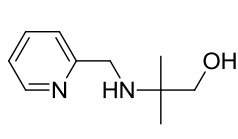
MBL81



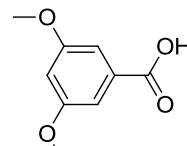
MBL82



MBL83



MBL84



MBL85

Abbildung 28: Substanzen die nach dem Consensus Scoring zur Testung bestellt wurden

## Ergebnisse und Diskussion Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen

Als Konzentration wurde 250  $\mu\text{M}$  gewählt, da es sich um sehr kleine Moleküle handelt und keine starke Inhibition erwartet wurde.

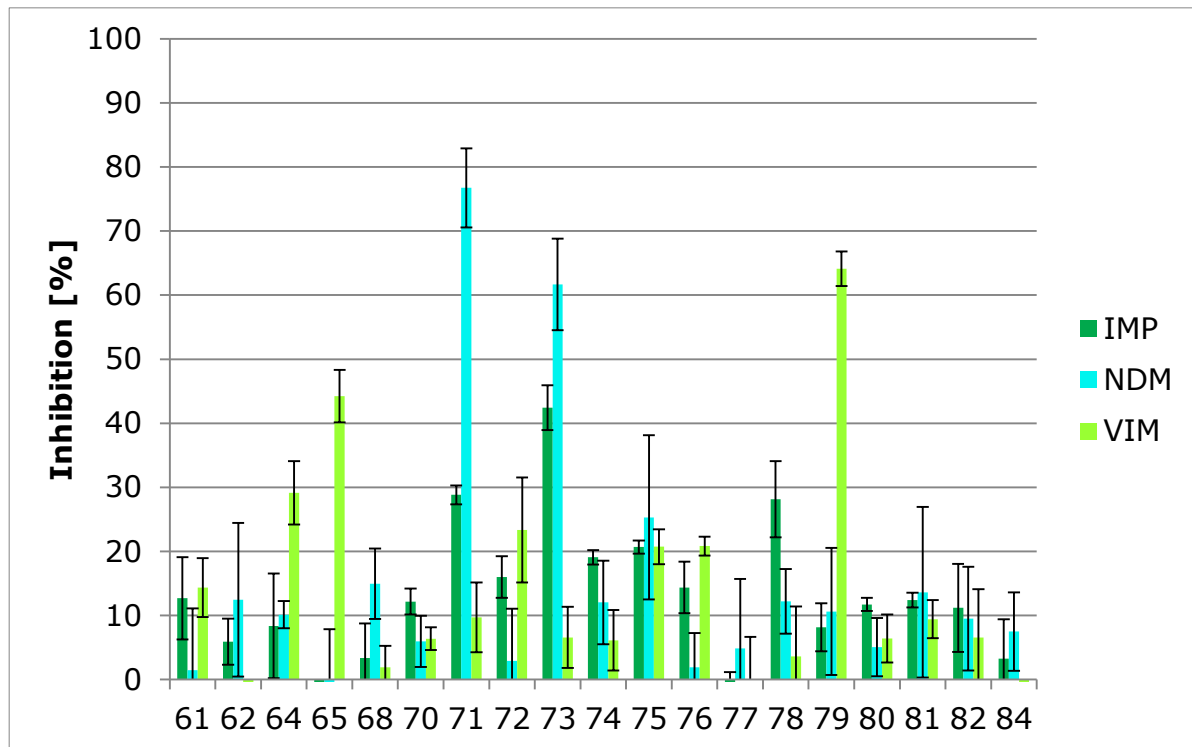


Abbildung 29: Inhibition der ausgewählten MBL-Substanzen (250  $\mu\text{M}$ ) auf den verschiedenen Proteinen (MBL59, MBL60, MBL63, MBL82, MBL83, MBL85 waren unlöslich oder instabil im Assay-Puffer)

Im nächsten Schritt sollten die  $\text{IC}_{50}$ -Werte der Inhibitoren bestimmt werden. An der IMP-7 war hauptsächlich MBL73 aktiv, allerdings konnte keine sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve angeglichen werden, da der  $\text{IC}_{50}$  bei ca. 1 mM lag und die maximal einsetzbare Testkonzentration durch die steigende DMSO-Menge begrenzt war. An der VIM-1 schienen MBL65 aktiv, von der sich jedoch keine Dosis-Wirkungs-Kurve messen ließ und MBL79, deren  $\text{IC}_{50}$  bei ca. 300  $\mu\text{M}$  lag. Bessere Ergebnisse konnten für die NDM-1 erzielt werden, wo MBL73 einen  $\text{IC}_{50}$  von 153  $\mu\text{M}$  und MBL71 einen  $\text{IC}_{50}$  von 50  $\mu\text{M}$  ergaben.

Zur weiteren Validierung wurde eine biophysikalische Methode gewählt und STD-NMR-Spektren aufgenommen. Da die Proteine ohne Aktivitätsverlust lyophilisierbar waren, wurden sie nach der Aufreinigung in Phosphatpuffer überführt, auf 30  $\mu\text{M}$  aufkonzentriert und gefriergetrocknet. So konnte den Proben das Wasser entzogen werden, bevor sie in  $\text{D}_2\text{O}$  re-suspendiert wurden.

## Ergebnisse und Diskussion Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen

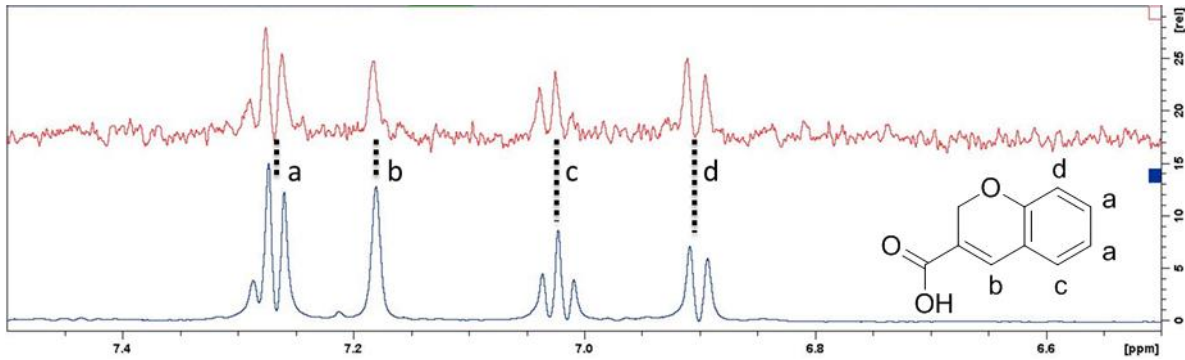


Abbildung 30: in blau das Referenzspektrum von MBL71 (800  $\mu$ M) in Phosphatpuffer. In Rot das STD-Spektrum von MBL71 (800  $\mu$ M) mit NDM-1 (30  $\mu$ M).

In Abbildung 30 ist als Beispiel das STD-Spektrum von MBL71 mit NDM-1 gezeigt. Es lassen sich gut die aromatischen Protonen wiederfinden, so dass von einer Bindung zwischen Ligand und Protein ausgegangen werden kann. Die STD-Spektren der anderen Testsubstanzen sind durch ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis weniger deutlich zu erkennen (s. Anhang Abbildung 51-Abbildung 54), lassen jedoch auch auf eine Bindung schließen.

Von MBL71 sollte weiterhin der  $K_D$  zur NDM-1 bestimmt werden. Da sich das Protein in großen Mengen auch im M9 Minimalmedium exprimieren ließ (bis zu 12 mg Protein aus 500 mL Kulturmedium) und daher Isotopenmarkierung leicht möglich war, wurde die Messung der Chemical Shift Perturbation ausgewählt. Zum Protein (100  $\mu$ M) wurde in 16 Schritten der Inhibitor hinzu titriert bis zu einer Konzentration von 5 mM, allerdings zeigte sich ab ca. 2 mM eine Trübung im NMR-Röhrchen durch die ausfallende Substanz, trotz Zugabe von 3 % DMSO. In den aufgenommenen  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC Spektren ließen sich vier deutliche Spuren erkennen (Bsp. in Abbildung 31, Spuren 2-4 im Anhang Abbildung 48-50). Für Fragment 71 ergab sich aus den vier Spuren ein  $K_D$  von 1,7 mM. Dieser Wert war jedoch durch die schlechte Löslichkeit des Fragments verfälscht und sollte mit weiteren Methoden, z.B. der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) validiert werden. Die Diskrepanz zwischen dem gemessenen  $\text{IC}_{50}$  und dem  $K_D$  war sehr verwunderlich. Es wurde erwartet, dass der  $K_D$  höher liegt, da sich für die Referenzsubstanz Captopril der gleiche Effekt zeigte, allerdings nicht um einen Faktor 40. Vermutlich ist die schlechte Löslichkeit von MBL71 in Puffer ein Problem, und die Substanz fiel während der Messungen wieder aus.

Ergebnisse und Diskussion  
Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen

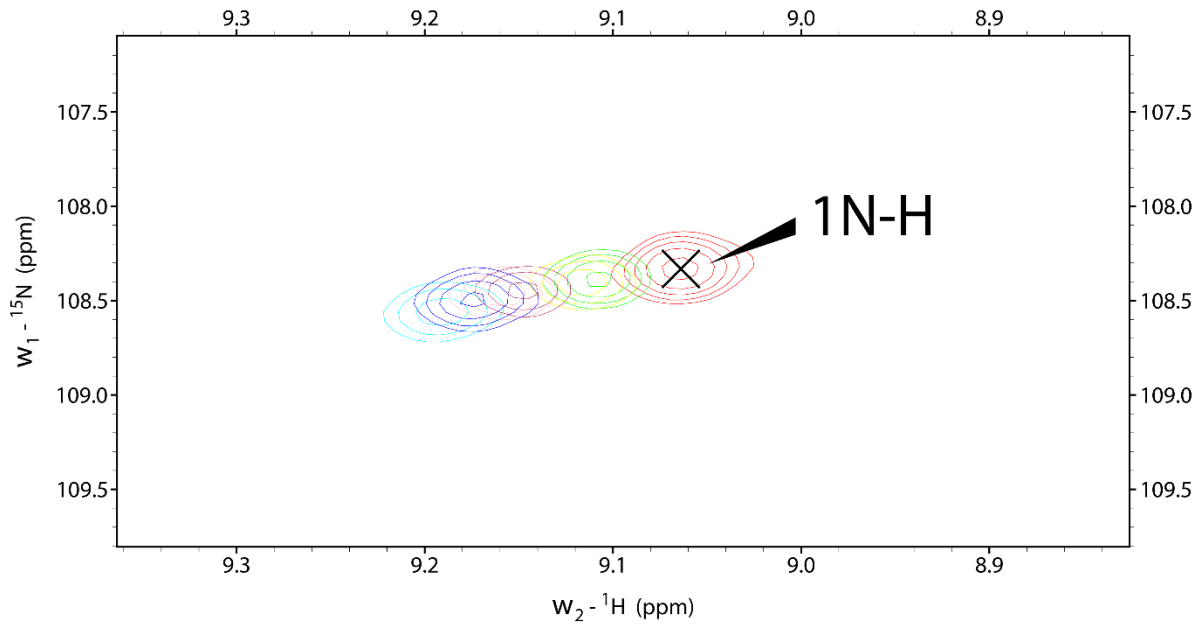


Abbildung 31: eine der vier deutlich erkennbaren Spuren im  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$ -BEST-TROSY. Das Peakpicking wurde in SPARKY durchgeführt

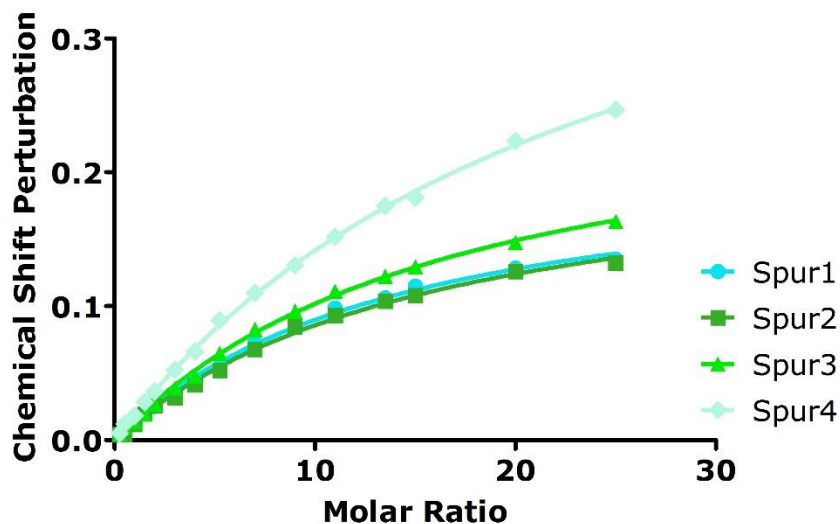


Abbildung 32: Molares Verhältnis von Inhibitor zu Protein aufgetragen gegen die Chemical Shift Perturbation. Aus der Sättigungskurve wurde mit Graph Pad der  $K_D$  berechnet mit  $1,7 \pm 0,4$  mM

Abschließend erwies sich dieser Ansatz als wenig erfolgreich. Trotz der hohen Konservierung der Bindetaschen und der guten Zugänglichkeit konnte durch das Consensus Scoring keinen pan-Inhibitor identifiziert werden. Allerdings ist mit MBL71 ein Fragment mit einer Bindeeffizienz von 1,7 mM zur NDM-1 gefunden worden. Von diesem Grundgerüst werden in folgenden Arbeiten (momentan durchgeführt von Dominik Büttner) Derivate synthetisiert.

### 3.1.3 Zugelassene Thiole als Inhibitoren für MBLs

(Publiziert in Klingler et al., *J Med. Chem.* **2015**)<sup>66</sup>

Da sich im Consensus-Projekt kein pan-Inhibitor finden ließ, wurde ein zweiter Ansatz gewählt. Die Tatsache, dass Moleküle mit freien Thiolen<sup>67,68</sup> an Zink-abhängige Proteine binden können, ist durch viele Target-Klassen bekannt z.B. von Inhibitoren des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE). Da es mehrere Wirkstoffe gibt, die eine oder mehrere Thiol-Gruppen tragen, stellte sich die Frage, ob alle Substanzen die in dieser Arbeit verwendeten MBLs gleichermaßen inhibieren würden. Daher wurde in der Drugbank<sup>69</sup> nach zugelassenen Wirkstoffen mit freien Thiolen gesucht und elf Substanzen (Abbildung 33) bestellt. Keine der Substanzen ist für eine antibakterielle Indikation zugelassen.

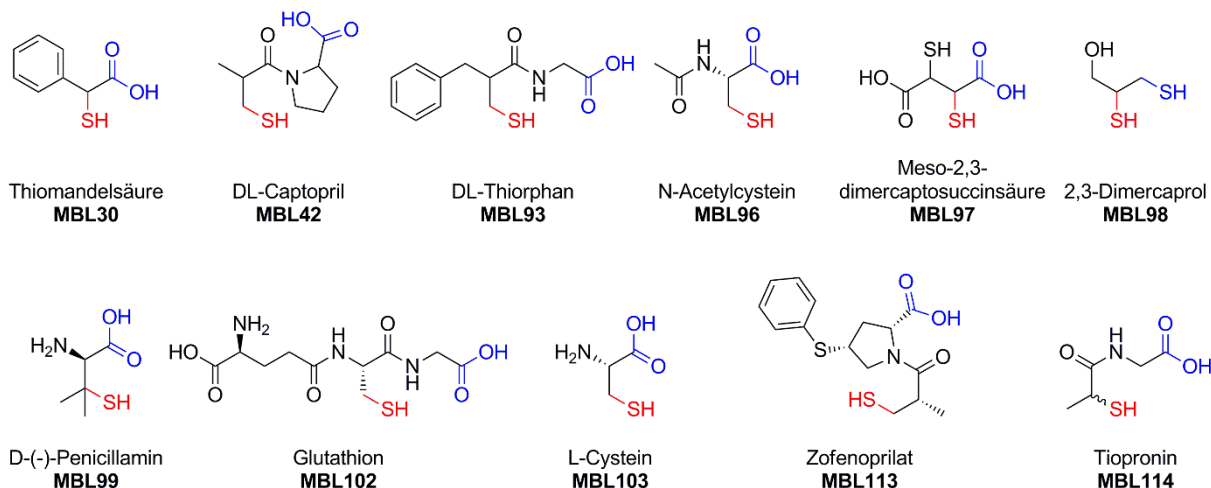


Abbildung 33: Strukturen der Thiol-haltigen Wirkstoffe

Diese wurden zunächst im Fluorocillin-Assay auf ihr inhibitorisches Potential untersucht. Interessanterweise sind unterschiedliche Inhibitionsprofile zu beobachten. Nicht alle Substanzen sind Inhibitoren der MBLs und teilweise sind sie auch selektive Inhibitoren (Abbildung 34). Diese Beobachtung legt nahe, dass die Thiol-Gruppe selbst nicht der einzige Parameter ist, der für eine Inhibition nötig ist. Auch die Tatsache, dass inhibierende Thiole selektiv auf einzelne MBLs wirken, war nicht vorher zu sehen, denn der Effekt sollte in den stark konservierten Bindetaschen der gleiche sein.

*Ergebnisse und Diskussion  
Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen*

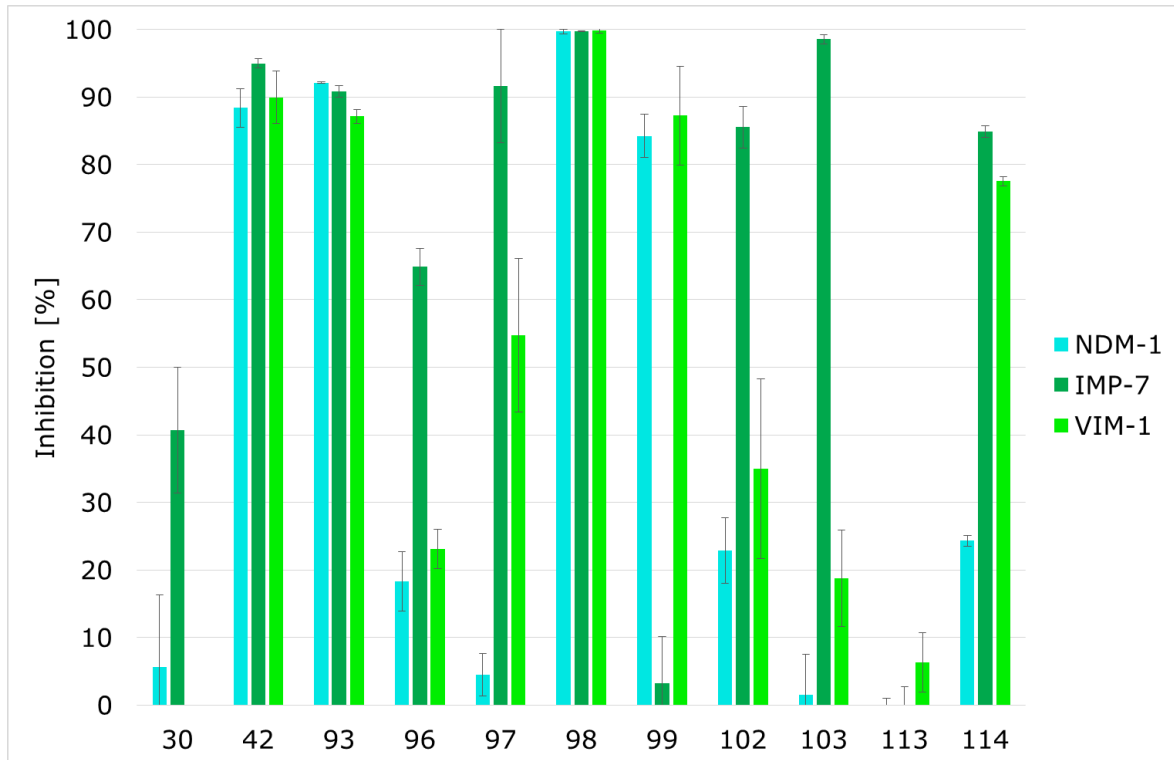


Abbildung 34: Inhibition der drei MBLs durch die verschiedenen Substanzen bei 50  $\mu$ M. Angeben ist die Inhibition in Prozent ( $n=3$ )  $\pm$  STD

Um diesen Effekt zu erklären, wurden die Bindetaschen auf Unterschiede untersucht. Da lediglich von der NDM-1 (PDB-Code 3Q6X<sup>70</sup>) Kristallstrukturen erhältlich waren, wurden für VIM-1 und IMP-7 Homologiemodelle - basierend auf Kristallstrukturen von VIM-2 (PDB-Code 4C1D<sup>19</sup>) und IMP-1 (PDB-Code 4C1F<sup>20</sup>) - erstellt. Dazu wurde das MOE Software Paket verwendet. Trotz der konservierten Aminosäuren im aktiven Zentrum, unterscheiden sich die Oberflächen der verschiedenen MBLs sehr. Vermutlich ist dies der Grund für die Selektivität der Inhibitoren.

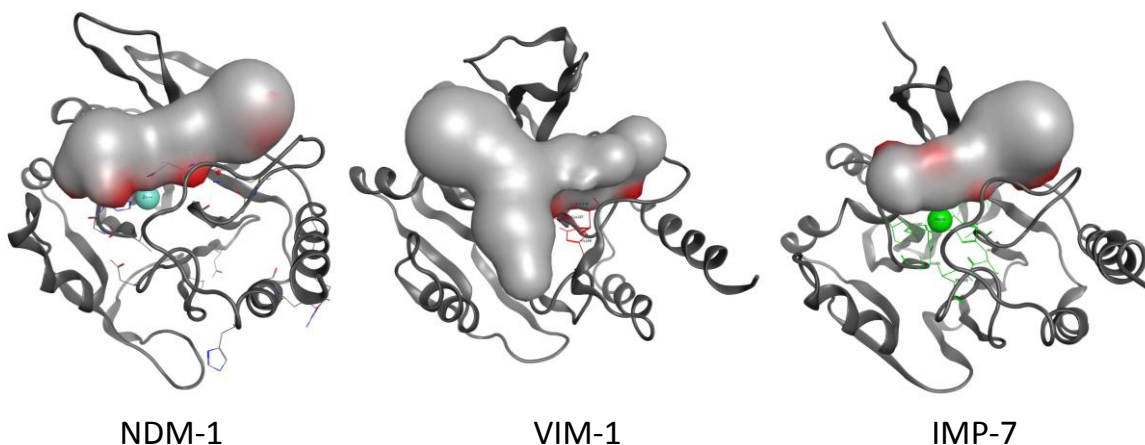


Abbildung 35: Vergleich der Oberflächen der eingesetzten MBLs



*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen*

Für Wirkstoffe, die mehr als 50 % Inhibition an zwei Targets oder mehr zeigten, wurden die IC<sub>50</sub> Werte bestimmt (Tabelle 2). Einige Substanzen waren nicht stabil im Puffer (MBL97, MBL99, MBL102) und wurden daher für weiter Untersuchungen verworfen. Captopril (MBL42) ist ein zugelassener Inhibitor des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) zur Behandlung von Bluthochdruck. Captopril zeigte niedrige IC<sub>50</sub> Werte an alle drei MBLs (NDM-1: 6,4  $\mu$ M; IMP-7: 2,9  $\mu$ M; VIM-1: 6,8  $\mu$ M). Thiorphan (MBL93), der aktive Metabolit von Racecadotril, ist ein Enkephalinase Inhibitor und wird zur symptomatischen Behandlung des Durchfalls eingesetzt. Auch dieser Arzneistoff war an allen drei MBLs aktiv (NDM-1: 1,8  $\mu$ M; IMP-7: 5,3  $\mu$ M; VIM-1: 5,8  $\mu$ M). Dimercaprol (MBL98), auch British Anti-Lewisite genannt, ist ein Di-Thiol das als Gegengift bei Schwermetall-Vergiftungen eingesetzt wird. Es zeigte die niedrigsten IC<sub>50</sub>-Werte an den MBLs (NDM-1: 1,3  $\mu$ M; IMP-7: 3,5  $\mu$ M; VIM-1: 0,6  $\mu$ M). Substanz MBL114, Tiopronin, ist für vielfältige Indikationen vorgesehen, vor allem zur Behandlung von Leberkrankheiten und Morbus Wilson, Cystinurie, aber auch Schwermetallvergiftungen. Tiopronin war an NDM-1 weniger aktiv als an den anderen MBLS (NDM-1: 84  $\mu$ M; IMP-7: 5,9  $\mu$ M; VIM-1: 8,6  $\mu$ M). Bemerkenswert war auch, dass das vielseitig eingesetzte Molekül N-Acetylcystein in der Lage war, IMP-7 zu inhibieren (IC<sub>50</sub> 20,7  $\mu$ M).

*Tabelle 2: IC<sub>50</sub>s der Thiol-Substanzen mit Standardabweichungen in  $\mu$ M*

	NDM-1	IMP-7	VIM-1
MBL42	6,40 $\pm$ 2,5	2,90 $\pm$ 0,90	6,80 $\pm$ 1,20
MBL93	1,80 $\pm$ 1,20	5,30 $\pm$ 1,00	5,80 $\pm$ 3,50
MBL96	---	20,7 $\pm$ 5,2	---
MBL98	1,30 $\pm$ 0,10	3,50 $\pm$ 0,80	0,58 $\pm$ 0,07
MBL114	84,00 $\pm$ 5,30	5,9 $\pm$ 0,6	8,6 $\pm$ 1,2

Zur Unterscheidung, ob es sich um einen Inhibitor oder einen Chelator handelt, der inhibiert, indem er der Bindetasche Zink-Ionen entzieht, wurde ein Thermal Shift Assay als orthogonale Methode durchgeführt (s. Kapitel 2.4.4.1). Dabei zeigten sich für Dimercaprol (MBL98) doppelte Peaks, einer im destabilisierenden Bereich und ein weiter im stabilisierenden Bereich. Vermutlich entzieht es der Bindetasche zunächst das Zink und bindet anschließend an die Proteine. Captopril, Thiorphan und Tiopronin verursachten zum Teil starke positive Shifts (Tabelle 3) von bis zu 7,2 °C und ließen sich so als bindende Liganden der MBLs identifizieren.

*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen*

*Tabelle 3: Thermal Shifts in  $+\Delta T$  in [°C]*

	NDM-1	IMP-7	VIM-1
MBL42	7,0	3,4	2,2
MBL93	7,2	3,6	4,6
MBL96	---	1,1	---
MBL98	8,3	1,7	14,9
MBL114	4,5	1,8	5,1

Thermal Shift Assay ist eine sehr einfach durchzuführende Methode, die besonders gut für globuläre Proteine mit einer großen Dynamik geeignet ist. Die Tatsache, dass man zusätzlich auch den Unterschied zwischen Bindung und Chelatisierung beobachten kann, macht es zu einer eleganten Assay-Methode für MBLs.

Die Bindung von Tiopronin an NDM-1 konnte in Kollaboration mit dem AK Prof. Pos mithilfe einer Röntgenkristallstruktur bestätigt werden. Der Protein-Ligand-Komplex wurde mittels molekularem Austausch ausgehend von einer erhältlichen Kristallstruktur der NDM-1 (PDB Eintrag 3Q6X<sup>18</sup>) bis zu einer Auflösung von 2,6 Å erhalten. Der markante Teil der Elektronendichtemappe (cyan) erlaubte die Identifizierung des Liganden, allerdings nicht die exakte Konformation. Die Sulfhydryl-Gruppe des Tiopronin lagerte sich in der Bindetasche zwischen den beiden Zink-Ionen an und verdrängte ein Wassermolekül, das in der apo-Struktur an dieser Stelle lag. Somit konnte die kompetitive Inhibition durch Tiopronin bestätigt werden.

*Ergebnisse und Diskussion  
Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen*

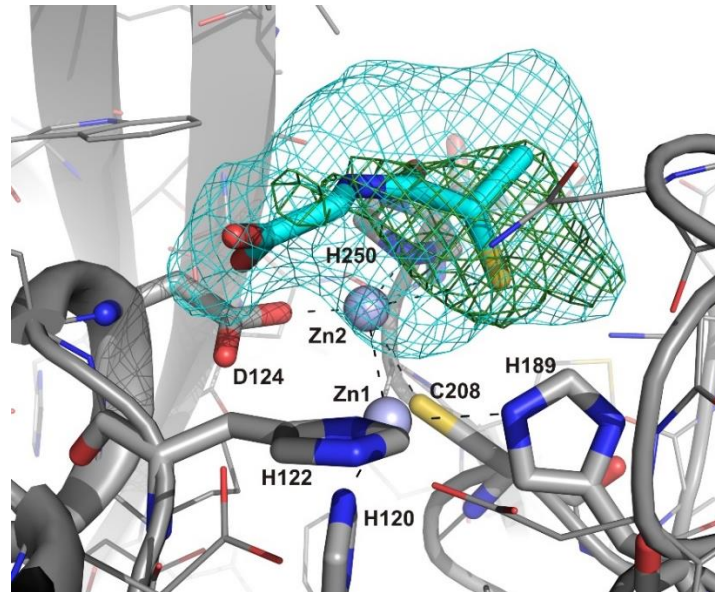


Abbildung 36: Ligand-Protein-Komplex, wie er in der Röntgenkristallstruktur der NDM-1 Bindetasche mit Tiopronin beobachtet werden kann. Das NDM-1 Rückgrat ist als graue Schleife dargestellt, der Ligand in cyan. Die positiven Elektronendichtemappen um den Ligand wurden aus dem Modell berechnet vor der Strukturzuweisung (grünes Netz bei  $2,5 \sigma$  und  $2 \text{ \AA}$ ) sowie danach (cyanes Netz bei  $3 \sigma$  und  $2 \text{ \AA}$  um den Liganden). Die gestrichelten Linien stellen die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Zinkionen (blaue Kugeln) bzw. Aminosäuren dar.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Substanzen in Zellen getestet. Dazu wurden pathogene Stämme aus Patienten sowie mit den Resistenzplasmiden transfizierte Laborstämme einem Test auf Antibiotikaempfindlichkeit unterzogen. Imipenem wird von den MBLs hydrolysiert, jedoch sollte in Kombination mit den Testsubstanzen - vor der Hydrolyse geschützt - seine Wirkung wieder hergestellt werden. In diesem Assay wird die minimale inhibitorische Konzentration (engl. Minimal Inhibitory Concentration, MIC) von Imipenem mit und ohne Testsubstanz bestimmt. Werden die MBLs inhibiert, sinkt die MIC von Imipenem, optimaler Weise auf den Kontrollwert von  $0,125 \text{ mg/L}$  wie er in *E.coli* Zellen ohne Resistenz ist. Die Testsubstanzen allein zeigten keinen antibiotischen Effekt auf die Bakterienstämme bei  $128 \text{ mg/L}$ .

*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 1: Metallo-β-Lactamasen*

Tabelle 4: MIC (in mg/L) von Imipenem in klinischen Isolaten sowie *E. coli* Transformanten mit entsprechender MBL in pET24a. Angegeben ist der Median von drei Experimenten. Imipenem allein (Imi) sowie MBL-Inhibitoren in Kombination mit Imipenem (Imi + Testsubstanz) bei einer Konzentration von 128 mg/L wurden bestimmt. Signifikante Änderungen ( $\geq 4$ ) sind in fett dargestellt.

Isolat	Imi	Imi+42	Imi+93	Imi+96	Imi+98	Imi+114
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) NDM-1	64	32 (2)	1 ( <b>64</b> )	32 (2)	2 ( <b>32</b> )	16 ( <b>4</b> )
<i>K. pneumoniae</i> T2301 NDM-1	32	8 ( <b>4</b> )	8 ( <b>4</b> )	16 (2)	16 (2)	8 ( <b>4</b> )
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) IMP-7	2	0,25 ( <b>8</b> )	0,25 ( <b>8</b> )	2 (1)	0,5 (4)	1 (2)
<i>P. aeruginosa</i> T2226 IMP-7	32	32 (1)	16 (2)	8 ( <b>4</b> )	16 (2)	1 ( <b>32</b> )
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) VIM-1	32	16 (2)	4 ( <b>8</b> )	32 (1)	16 (2)	2 ( <b>16</b> )
<i>K. pneumoniae</i> T2216 VIM-1	16	1 ( <b>16</b> )	4 ( <b>4</b> )	8 (2)	4 ( <b>4</b> )	8 (2)

Von Inhibitor MBL114 wurde weiterhin eine Titration durchgeführt, um zu sehen, ob der inhibitorische Effekt dosisabhängig war. Es konnte eine Korrelation zwischen Konzentration und Wirkung beobachtet werden, allerdings müsste man höhere Dosen einsetzen, um eine exakte Dosis-Wirkungs-Beziehung zu bestimmen.

Tabelle 5: MIC (in mg/L) von Imipenem in *E. coli* Transformanten mit entsprechender MBL in pET24a. Angegeben ist der Median von drei Experimenten. Imipenem allein (Imi) sowie MBL-Inhibitor 114 in unterschiedlichen Konzentrationen in Kombination mit Imipenem (Imi + Testsubstanz).

Isolat	Imi	Imi + 114 (128 mg/L)	Imi + 114 (64 mg/L)	Imi + 114 (32 mg/L)	Imi + 114 (16 mg/L)	Imi + 114 (8 mg/L)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) NDM-1	8	1 ( <b>8</b> )	2 ( <b>4</b> )	2 ( <b>4</b> )	8 (1)	8 (1)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) IMP-7	2	0,5 ( <b>4</b> )	0,5 ( <b>4</b> )	1 (2)	1 (2)	2 (1)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) VIM-1	32	2 ( <b>16</b> )	4 ( <b>8</b> )	8 ( <b>4</b> )	16 (2)	32 (1)

*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 1: Metallo- $\beta$ -Lactamasen*

Die Konzentrationen, die benötigt wurden, um einen mikrobiologischen Effekt zu sehen, weichen weit von den Konzentrationen ab, die im Assay am rekombinanten Enzym bestimmt wurden. Vermutlich ist die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien eine Barriere, die von den Inhibitoren nur schwer durchdrungen werden kann.

Betrachtet man die Konzentrationen, die für die Inhibition im Fluorocillin-Assay benötigt werden, sind diese durch die orale Gabe der Wirkstoffe im Plasma zu erreichen. Die bereits publizierten Daten bezüglich der Pharmakokinetik der Arzneimittel suggerieren Werte für die gemessene Maximalkonzentration im Blutplasma ( $C_{max}$ ), die für eine Inhibition der MBLs ausreichen würden.

*Tabelle 6: übliche, orale Dosis der thiolhaltigen Medikamente und die dadurch erreichte maximale Konzentration im Plasma.*

Wirkstoff	$C_{max}$	Dosis	Referenz
Captopril	1,2 $\mu$ M	30 mg	Li et al. <sup>71</sup>
Thiorphan	0,8 - 1 $\mu$ M	300 mg (Prodrug Racecadotril)	Eberlin et al. <sup>72</sup>
Tiopronin	>10 $\mu$ M	500 mg	Carlsson et al. <sup>73</sup>

Die Kombination aus fluoreszenzbasiertem Aktivitätsassay, Thermal Shift Assay und mikrobiologischer Suszeptibilitätstestung hat vier Substanzen hervorgebracht, die sich als Wirkstoffe zu Behandlung von Infektionen eignen könnten: Captopril (MBL42), Thiorphan (MBL93), Tiopronin (MBL114) und Dimercaprol (MBL98). Interessanterweise zeigen die anderen sieben getesteten Substanzen trotz ihrer Thiol-Gruppe keinen inhibitorischen Effekt. Obwohl die Bindetaschen der MBLs hoch konserviert sind bezüglich der Aminosäuren, unterscheiden sich die erreichbaren Oberflächen stark, was ein Grund für die Selektivität der Inhibitoren sein könnte. Weiterhin ist die große Diskrepanz zwischen der Aktivität am rekombinanten Enzym und der Aktivität in pathogenen Zellen bemerkenswert. Da die Substanzen bereits zugelassene Wirkstoffe sind, sollten sie ausreichende Zellgängigkeit aufweisen, allerdings scheint diese nicht ausreichend um die äußere Membran der Gram-negativen Bakterien zu durchdringen. Für die Passage der äußeren Membran Gram-negativer Zellen spielen andere physiochemische Eigenschaften eine Rolle als bei menschlichen Zellen, in erster Linie sind es der logD (der pH-Wert-abhängige logP) und die totale polare Oberfläche (TPSA). Vergleicht man diese Werte zwischen zugelassenen Wirkstoffen zur Behandlung

von Gram-negativen Bakterien und Medikamenten für menschliche Targets liegen der clogD bei -2,8 bzw. 1,6 und die TPSA bei 165 Å<sup>2</sup> bzw. 70 Å<sup>2</sup>.<sup>74</sup> Leider kann der logD der Testsubstanzen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr bestimmt werden. Die TPSA der Thiol-Substanzen wurde mit MOE berechnet und liegt immer unter 105 Å<sup>2</sup>. Die Optimierung der Wirkstoffe für den Einsatz in Gram-negativen Bakterien wird das nächste Ziel sein. Dabei könnte z.B. die Kopplung an eine Fettsäure helfen, da diese der Lipopolysaccharid-Struktur der Membran ähnelt und daher leicht in die Bakterien eindringen kann.<sup>75</sup>

### 3.1.4 Abschließende Bewertung MBLs

Aufgrund der schnellen enzymatischen Leistung der untersuchten MBLs, gestaltete sich die Suche nach einem geeigneten Substrat für den funktionalen Assay schwierig. Mit dem sehr sensitiv detektierbaren Fluorocillin konnte schlussendlich ein von NDM-1, VIM-1 und IMP-7 toleriertes Substrat gefunden werden und ein robustes Assay-System etabliert werden. Durch die große Stabilität der MBLs, bestanden viele Optionen zu Sekundär-Screeningmethoden. Thermal Shift Assay erwies sich als besonders einfach durchführbar und gleichzeitig besonders aussagekräftig, da mit dieser Methode auch direkt zwischen Zink-bindenden Substanzen und direkt bindenden Inhibitoren unterschieden werden konnte. Weiterhin konnten NMR-Methoden durchgeführt werden, da die NDM-1 sowohl in Minimalmedium mit hohen Ausbeuten <sup>15</sup>N-markiert werden konnte, und alle MBLs sich gefriertrocknen ließen, um sie vollständig in ein deuteriertes Medium zu überführen. Es konnten diverse selektive Inhibitoren gefunden werden, die auch Aktivität in Zellen zeigten, allerdings war es äußerst schwierig, einen pan-Inhibitor zu finden. Lediglich Captopril, Thiorphan, Dimercaprol und Tiopronin inhibierten alle drei rekombinanten MBLs.

Dieses Projekt wird durch Dominik Büttner weitergeführt, der mit Hilfe von synthetischen Modifikationen die Eigenschaften der Moleküle bezüglich der Zellgängigkeit und pan-Inhibition optimieren wird.

## 3.2 Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH

### 3.2.1 Entwicklung eines Aktivitätsassays

Zu Beginn der Arbeit war bereits von Hahn und Achenbach<sup>46</sup> ein Fluoreszenz-Assay mit DiFMUP entwickelt worden, der jedoch einige Nachteile aufwies. Zunächst wurden mit 600 nM sEH und 300  $\mu$ M Substrat in 120  $\mu$ M Wellvolumen sehr hohe Mengen verbraucht, was die Testung vieler Substanzen unmöglich machte. Das Hauptproblem waren jedoch die Anregungswellenlänge von 358 nm und die Emissionswellenlänge von 455 nm des Substrats. Bei diesen Wellenlängen absorbieren sehr viele Substanzen – vor allem alle, die eine gelbe Farbe aufweisen – und führen zu falsch-positiven Ergebnissen, indem sie die Fluoreszenz quenchen.<sup>76</sup> Daher galt es zunächst ein Substrat zu finden, das bei höheren Wellenlängen vermessen werden kann.

Da einige endogene Substrate der sEH-P bekannt sind, die dephosphoryliert werden, wurde ein kolorimetrischer Ansatz gewählt. Eine Methode, freies Phosphat zu detektieren, ist die Umsetzung zu Malachitgrün.<sup>31</sup> Dessen gelbe Leukobase wird in Anwesenheit eines Oxidationsmittels zu einem grünen Komplex umgesetzt, welcher bei 650 nm absorbiert. Zunächst wurde mit anorganischem Phosphat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) eine Kalibriergerade in unterschiedlichen Puffern aufgenommen. Wie in der Beschreibung des Assay-Kits wurden 50  $\mu$ L Testlösung mit 100  $\mu$ L der Green-Solution gemischt und die Absorption gemessen. Die Kalibriergerade ließ sich durch Senken des pH Wertes und durch Zugabe eines Detergenz optimieren, das anscheinend die Löslichkeit des Komplexes verbesserte. Allerdings konnten nur eine sehr niedrige Absorption von maximal 0,3 AU gemessen werden. Daher wurden die Volumina so verändert, dass 100  $\mu$ L Testlösung und 100  $\mu$ L Green-Solution gemischt wurden. Dadurch wurde die Kalibriergerade linear nach oben verschoben. Da die Aufreinigung der sEH-Phosphatase (durch Steffen Hahn) in MES-Puffer durchgeführt wurde, wurde für den Assay ebenfalls MES Puffer (25 mM pH 5,5 + 0,01 % Triton X-100) gewählt

*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH*

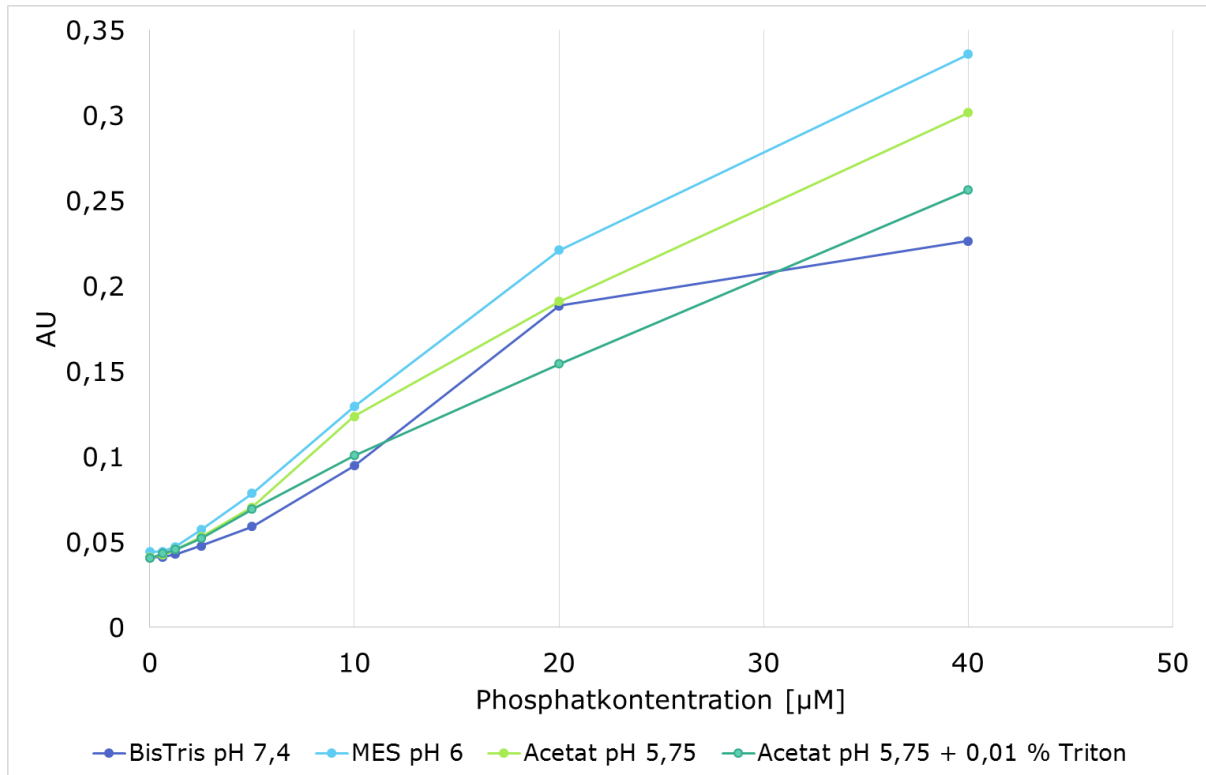


Abbildung 37: Kalbriergerade von freiem Phosphat in BisTris Puffer (25 mM) pH 7,4; MES Puffer (25 mM ) pH 6; Acetat Puffer (50 mM und MgCl<sub>2</sub> 10 mM) pH 5,75 und dem gleichen Acetat Puffer plus 0,01 % Triton X-100

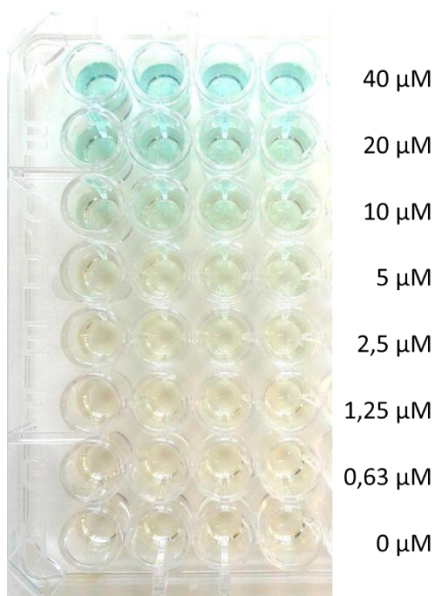


Abbildung 38: Bild einer Assay-Platte. In den Reihen befinden sich unterschiedliche Konzentrationen an freiem Phosphat, aus denen der grüne Komplex gebildet wurde.



*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH*

Da aus der Veröffentlichung von Oguro et al.<sup>31</sup> der  $K_m$  von Lysophosphatidylsäure ( $3 \mu\text{M}$ ), einem der endogenen Substrate, bekannt war, wurden in einem Testansatz  $600 \text{ nM}$  sEH-P (die gleiche Menge wie im DiFMUP Assay) mit  $5 \mu\text{M}$  LPA für bis zu zwei Stunden inkubiert und dann mit der Malachitgrün-Lösung abgestoppt. Da kaum Umsetzung zu beobachten war, wurde dieser Versuch bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  wiederholt.

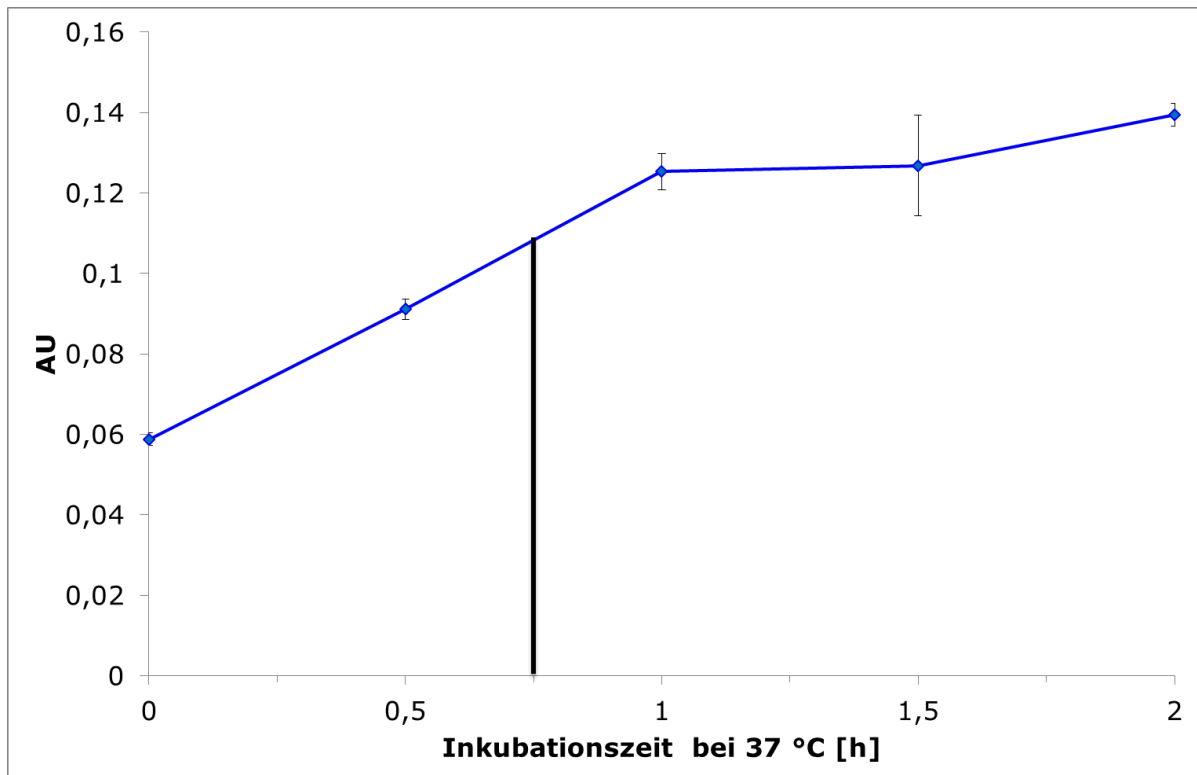


Abbildung 39: Beobachtung der Komplexbildung nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0,5; 1; 1,5 und 2 Stunden) bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$

Um im Bereich der linearen Substratumsetzung zu bleiben, wurden 45 Minuten als Inkubationszeit festgelegt. Daraus ergab sich folgender Gesamttablauf für den Assay: Zunächst wurden Protein und Testsubstanz 30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert, bevor LPA zugegeben wurde und weitere 45 Minuten bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert wurde. Anschließend wurde die Reaktion mit Green-Solution abgestoppt, und eine Stunde die komplette Komplexbildung abgewartet. Zur Validierung wurde versucht, den  $\text{IC}_{50}$  von SDS zu reproduzieren, allerdings war dies aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht möglich. Aufgrund dessen und des hohen Zeitaufwand des Assays von mindestens 2,5 Stunden, wurde das Assay-System verworfen und nach neuen Substraten gesucht.

*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH*

Nachträglich ist jedoch zu sagen, dass die Wahl des Assay-Puffers als schlecht zu werten ist. Aufgrund der Isosterie der Sulfonsäuregruppe zur Phosphatgruppe ist MES ein Inhibitor der sEH-P und daher ungeeignet als Puffer.

Huang et al.<sup>47</sup> publizierten im Journal of Biomolecular Screening Fluoresceindiphosphat als Substrat der Protein Tyrosin Phosphatasen. Dieses Substrat ist aufgrund seiner amphoteren Löslichkeit für viele Phosphatasen geeignet und zudem kommerziell erhältlich. Es besteht aus einem Fluorescein-Kern, an dessen Seiten zwei Phosphat-Gruppen gekoppelt sind. FDP ist farblos und fluoresziert nicht, erst nach der zweistufigen Spaltung zu Fluorescein kann es detektiert werden. Auch bei diesem Ansatz wurde versucht, möglichst viele Parameter aus dem DiFMUP Assay beizubehalten, daher wurde auch dieser im Acetat-Puffer (50 mM, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 5,75) bei ähnlicher Proteinkonzentration (600 nM) durchgeführt.

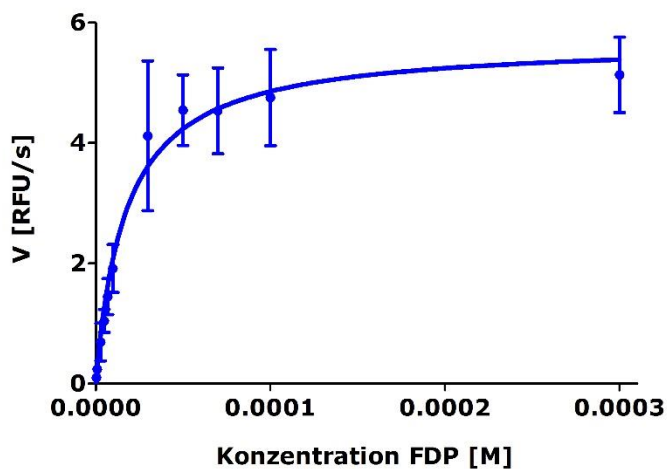


Abbildung 40: Messung des  $K_m$  von FDP zu sEH-P

Um die geeignete Menge an Substrat zu finden, wurde der  $K_m$  gemessen, der sich auf 13  $\mu\text{M}$  beläuft. Für die weitere Durchführung des Assays wurde daher eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  FDP und 600 nM sEH-P im 96well Format gewählt. Die vergleichsweise hohen Mengen sind notwendig, da die sEH-P generell recht langsame Umsatzraten zeigt. Aus diesem Grund wurde auch eine Temperatur von 37 °C für die Durchführung gewählt.

Da für die sEH-P keine klinisch relevanten Inhibitoren bekannt sind, bestand der Wunsch, ein großes Screening durchzuführen. Mit den in diesem Format gewählten

## Ergebnisse und Diskussion Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH

Mengen ist das jedoch völlig unrentabel. Daher wurde der Assay in ein 384well Format mit 20  $\mu\text{L}$  je Well miniaturisiert. Als Anfangspunkt wurde die Substratkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  beibehalten und nach einer geeigneten Proteinkonzentration gesucht. Da sich bei großen Screenings, die von Hand durchgeführt werden, intrinsische Fehler bezüglich der Zeit ergeben, wird allgemein angestrebt, während der üblichen Messzeit (hier 45 Minuten) eine Umsetzung von nur 25 % der Vollumsetzung zu beobachten, um keinesfalls den linearen Bereich zu verlassen. Daher wurde in einem Vorversuch bestimmt, wie viele RFU mit der Vollumsetzung erreicht werden können. In diesem Fall waren es 7500 RFU, das Umsetzungsziel nach 45 Minuten lag also bei ca. 1800 RFU.

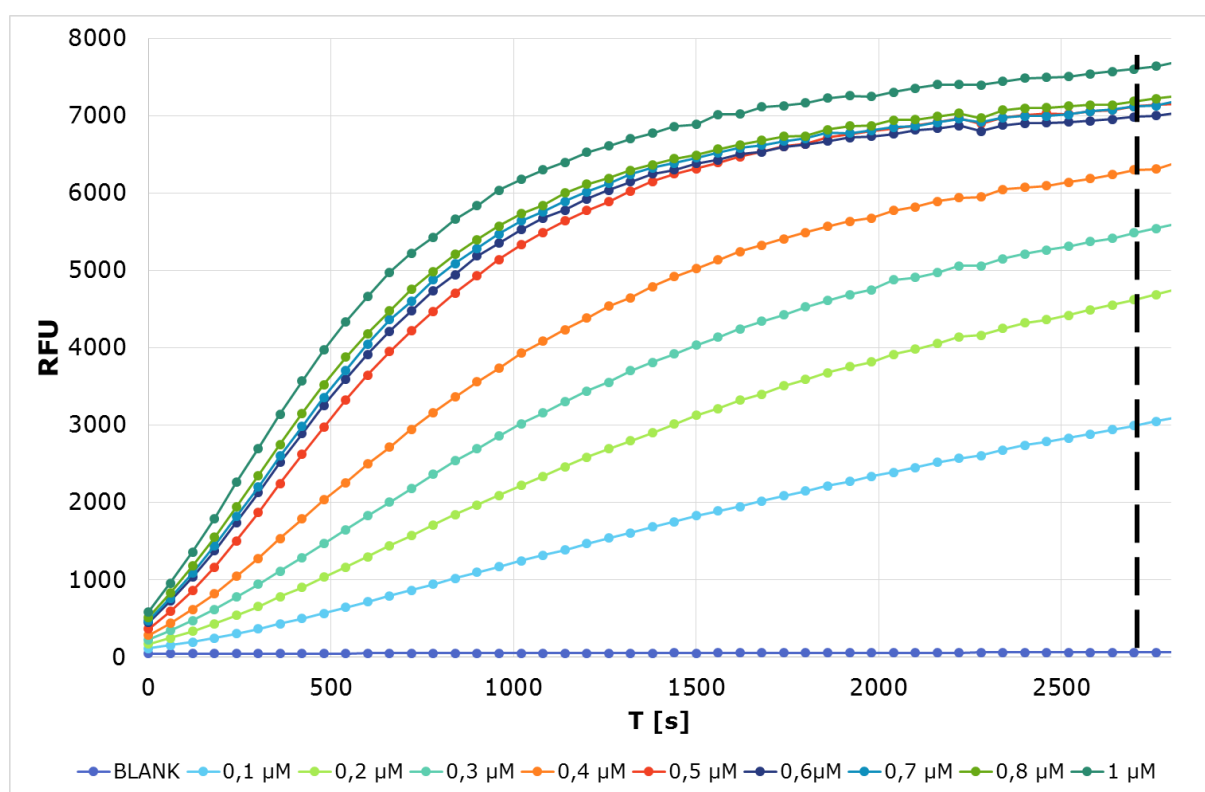


Abbildung 41: Beobachtung der Umsetzung von 10  $\mu\text{M}$  FDP durch verschiedene Proteinkonzentrationen von 0,1 – 1  $\mu\text{M}$  sEH-P

Schon bei der niedrigsten Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  wurden nach 45 Minuten ca. 3000 RFU detektiert, daher wurde mit 0,08  $\mu\text{M}$  sEH-P weitergearbeitet. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von DMSO auf den Assay untersucht, der allerdings bis 5% nicht vorhanden war. Auch die Zugabe von 0,01 % Triton X-100 zeigte keinerlei Einfluss. Als Systemtest wurde der  $\text{IC}_{50}$  von SDS bestimmt, der mit  $3,0 \pm 0,6 \mu\text{M}$  nah am publizierten Wert liegt ( $6,0 \mu\text{M}$ ).<sup>77</sup> Weiterhin wurde der  $Z'$ -Faktor des Systems bestimmt, der stets über 0,7 lag.

*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH*

Aufgrund der hohen Messwellenlängen, mit der nur selten Testsubstanzen interferieren, sowie der Robustheit des Assays und seines geringen Materialverbrauchs, wurde dieser Assay als Standard-Assay für die sEH-Phosphatase verwendet.

Für das High-Throughput-Screening, das am European ScreeningPort in Hamburg durchgeführt wurde, mussten weitere Anpassungen vorgenommen werden. Zunächst wurde die Substratmenge auf 5  $\mu\text{M}$  FDP erniedrigt, da das vorhandene EnVision Plattenlesegerät wesentlich empfindlicher ist, als der Tecan Plattenleser in Frankfurt. Entsprechend dazu wurde ebenfalls die Proteinkonzentration auf 30 nM gesenkt, um die Umsetzung im linearen Bereich über 45 Minuten zu gewährleisten. Aufgrund der Größe der Bibliothek, die getestet werden sollte, wurde der Assay in ein Endpunktformat überführt. Als Stopreagenz bot sich dabei Natronlauge an, da die sEH-P im basischen Milieu keine Aktivität zeigte und auch das entstandene Fluorescein bei hohem pH eine höhere Quantenausbeute hatte. Zudem wurden Zeitreihen mit unterschiedlichen Inkubationszeiten untersucht. Als Optimum wurden 15 Minuten Inkubation von Testsubstanzen und Protein sowie weitere 60 Minuten nach der Substratzugabe bestimmt. So konnte ein achtfaches Signalfenster zwischen Positiv- und Negativkontrolle vor dem Abstoppen erreicht werden.

### 3.2.2 Inhibitorensuche mittels Docking

Im ersten Ansatz wurde von Daniel Moser ein virtuelles Screening durchgeführt. Dazu wurde die Specs.net Datenbank mit MOE in die Phosphatase-Domäne der sEH-Kristallstruktur (PDB Code 1VJ5<sup>25</sup>) gedockt. Entsprechend des Scores und der chemischen Diversität wurden 52 Substanzen ausgesucht und im FDP-Assay getestet.

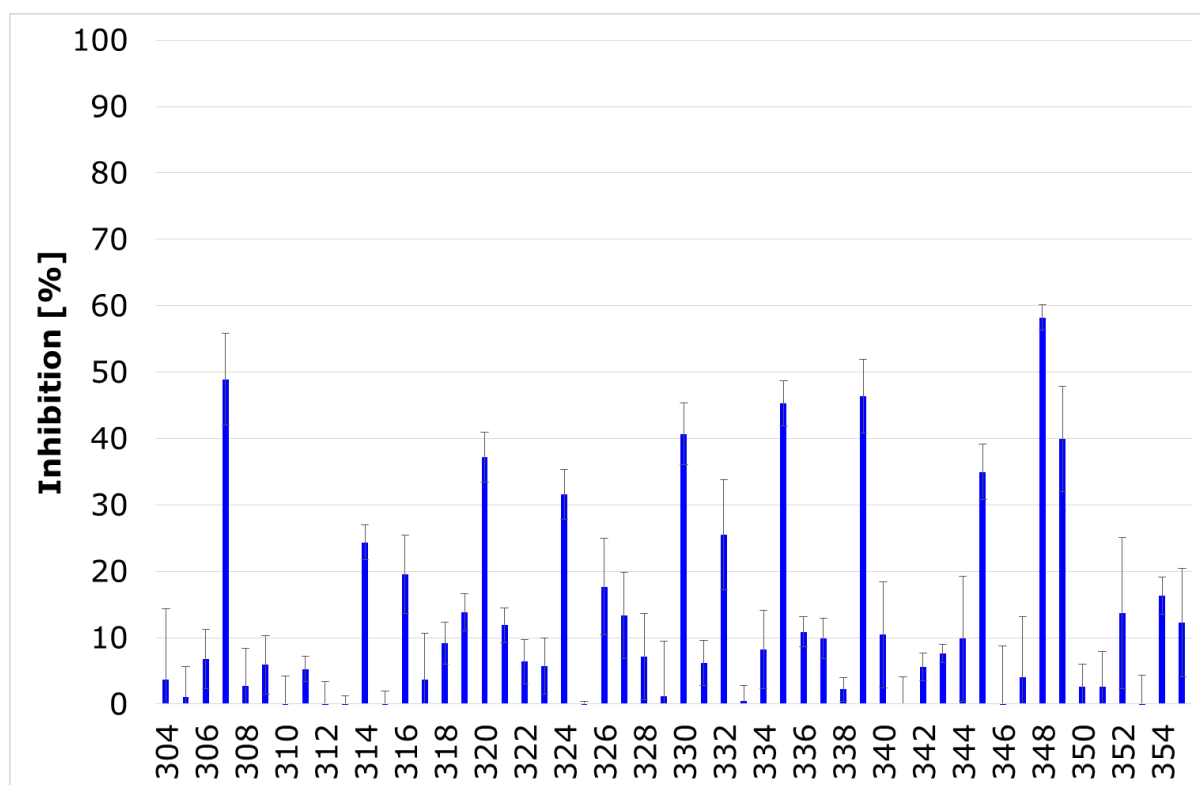
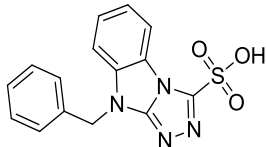
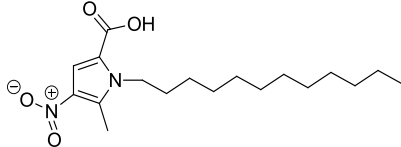
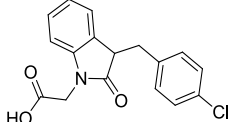


Abbildung 42: Inhibition in Prozent ( $n=3$ ) bei Einsatz der verschiedenen Testsubstanzen bei 100  $\mu\text{M}$ .

Von diesen Substanzen wurden die Nummern sEHP335, sEHP339 und sEHP349 zu Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$  Wertes ausgewählt. sEHP307 und sEHP348 wurden als PAINS verworfen.<sup>78</sup>

*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH*

Tabelle 7: Strukturen und zugehörige  $IC_{50}$ s der getesteten Inhibitoren

Struktur	Identifizier	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]
	sEHP335	$173 \pm 20$
	sEHP339	$108 \pm 7$
	sEHP349	$135 \pm 8$

Da einer der Inhibitoren eine Sulfat-Struktur enthielt, die als Phosphatmimetikum bekannt ist, wurde im nächsten Schritt die Specs.net Datenbank nach enthaltenen Sulfaten durchsucht, die wiederum gedockt und 24 für die Testung ausgewählt wurden. Weiter sechs Derivate wurden einer internen Substanzbibliothek entnommen.

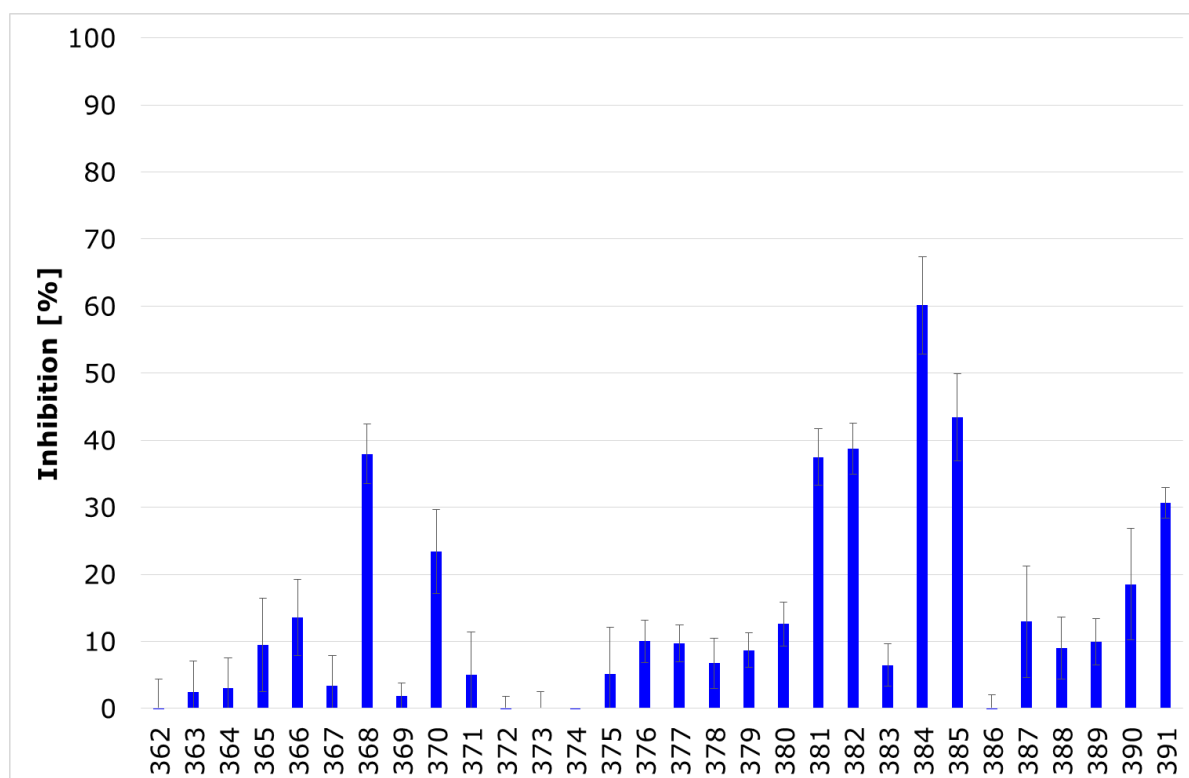
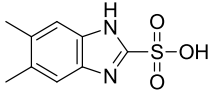
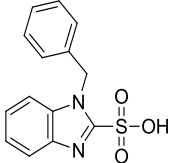
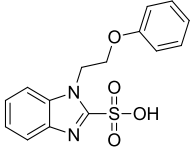
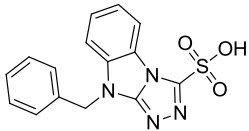
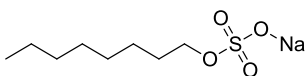


Abbildung 43: Inhibition in Prozent ( $n=3$ ) bei Einsatz der sulfonsäure-haltigen Testsubstanzen bei 100  $\mu$ M

*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH*

sEHP368 wurde aufgrund seiner Eigenfluoreszenz verworfen, von den anderen Substanzen, die bei 100  $\mu\text{M}$  eine Inhibition von über 30 % zeigten, wurden die  $\text{IC}_{50}$ s bestimmt.

*Tabelle 8: Strukturen und zugehörige  $\text{IC}_{50}$ s der sulfonsäure-haltigen Inhibitoren*

Struktur	Identifizier	$\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
	sEHP381	$115 \pm 25$
	sEHP382	$186 \pm 23$
	sEHP384	$76 \pm 2$
	sEHP385/335	$173 \pm 20$
	sEHP391	$330 \pm 19$

An dieser Stelle ergaben sich mehrere Probleme. Erstens wurde kein Inhibitor im niedrigen mikromolaren Bereich gefunden. Zweitens sind Sulfonsäuren keine wirkstoffartigen Strukturen und drittens enthalten die potentesten Verbindungen sEHP381, sEHP382 und sEHP384 Benzimidazol-Strukturen. Benzimidazole sind als Inhibitoren der sEH Hydrolase Domäne bekannt<sup>79</sup> und wären daher höchstwahrscheinlich keine selektiven Inhibitoren der sEH Phosphatase.

### 3.2.3 Inhibitoren-suche mittels High Throughput Screening

Im Januar und Februar 2015 wurde in Kollaboration mit dem European ScreeningPort Hamburg ein High Throughput Screening durchgeführt. Nach Anpassung des FDP Assays auf die Geräte vor Ort wurden zunächst mehrere Validierungsschritte durchgeführt, um die Auswirkung der Anpassungen zu überblicken. Dazu wurden mehrfach  $K_m$  des Substrats und  $IC_{50}$  Werte des Referenzinhibitors Ebselen<sup>37</sup> an verschiedenen Stellen der Platte und in unterschiedlichen Assayformaten (kinetische Messung versus Endpunktmessung) bestimmt (siehe Anhang Abbildung 55). Nachdem klar war, dass eine Umstellung auf eine Endpunktmessung keine Änderungen ergab, wurde entschieden, mit diesem Format weiter zu arbeiten, da es die Messzeit wesentlich verkürzte. Weiterhin wurden in Testassays optimale Inkubationszeiten sowie die Totvolumina der Pipettierroboter bestimmt. Nachdem die Robustheit des Assays hinreichend bewiesen war, konnte mit der Programmierung der Screening-Anlage begonnen werden.

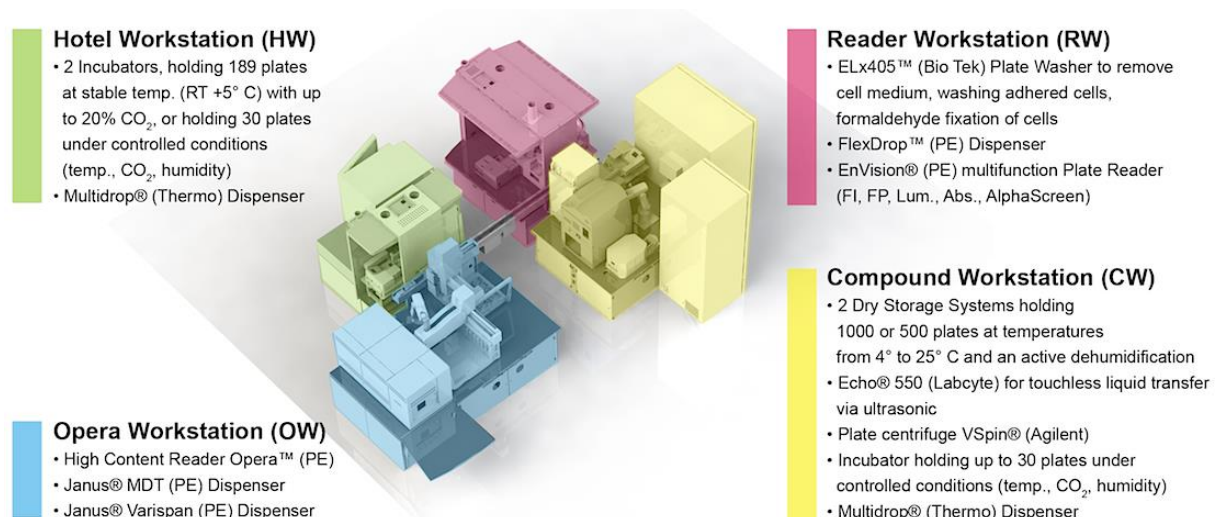


Abbildung 44: Screening Anlage des ESP Hamburg<sup>80</sup>

Zunächst wurden die vorplattierten Testsubstanzen aus Mutterplatten in Assayplatten überführt. Dies geschah an der Compound Workstation (CW) mit einem Echo 550. Anschließend wurden die Assayplatten in einen Inkubationsschrank an der Hotel Workstation (HW) überführt. In dieser Workstation wurde der Assay durch Proteinzugabe mit einem Multidrop Dispenser

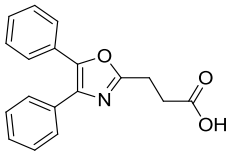
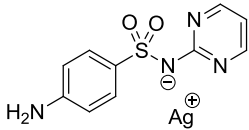
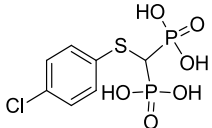


*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH*

begonnen, und die Platte für eine 15 minütige Inkubation bei 25 °C in einen Inkubationsschrank der CW überführt. Anschließend wurde ebenfalls an der CW mit einem zweiten Multidrop Dispenser FDP zugegeben, und die Platte in die Reader Workstation (RW) zu einer Probemessung in das EnVision Plattenlesegerät gebracht, um Quenching oder Eigenfluoreszenz der Testsubstanzen zu überprüfen. Nach der Testmessung wurde die Platte zurück in einen Inkubationsschrank der CW gebracht und dort 60 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die Reaktion wurde an der Opera Workstation (OW) mit einem Janus Dispenser durch Zugabe von Natronlauge abgestoppt, und die Platte in RW gebracht zum Auslesen am EnVision Plattenlesegerät.

Als erstes wurde die Enzo Bibliothek von Wirkstoffen, die durch die amerikanische Zulassungsbehörde (Food and Drug Administration, FDA) zugelassen sind, getestet. Diese Bibliothek (ENZO BML-2843-0100) enthält 640 bereits zugelassene Wirkstoffe und wurde mit einer Konzentration von 10 µM getestet. Neun Substanzen zeigten mehr als 50 % Inhibition bei dieser Konzentration: Auranofin, Entacapone, Tolacapone, Carboplatin, Cefotetan, Cisplatin, Oxaprozin, Silber-Sulfadiazin und Tiludronsäure. Die Chemotherapeutika wurden verworfen sowie Entacapone und Tolacapone, da bei ihrer Struktur von einer Wechselwirkung mit dem Substrat auszugehen ist. Für die übrigen Substanzen wurden die IC<sub>50</sub> Werte gemessen.

*Tabelle 9: Hits der Enzo Bibliothek und entsprechende IC<sub>50</sub> Werte*

Struktur	Name	IC <sub>50</sub> [µM]	Ursprüngliches Target/ Indikation
	Oxaprozin	11,2	Cyclooxygenase-1 / NSAID
	Silber Sufadiazin	Nicht bestimmbar	Dihydropteroat - Synthase / Antibiotikum
	Tiludronsäure	1,9	Osteoclasts ATP / Osteodystrophia deformans

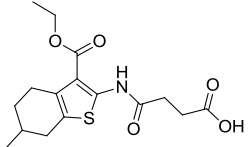
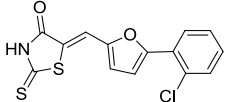
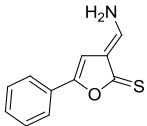
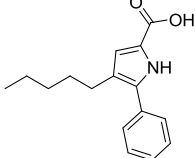
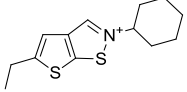
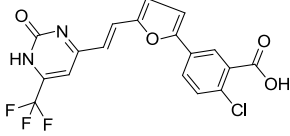
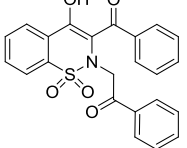
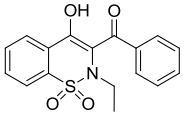
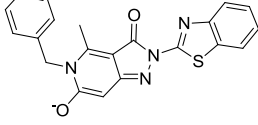
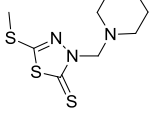
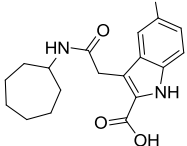
*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH*

Von Silber-Sulfadiazin konnte keine Regression durchgeführt werden, da wahrscheinlich das Silberkation mit dem Assay interferierte. Tiludronsäure war ein ungewöhnlicher Hit, da zu erwarten war, dass die sEH-P die Struktur spalten kann. Oxaprozin war besonders interessant, da es in seiner Struktur stark einem Inhibitor ähnelte, der während meiner Diplomarbeit synthetisiert und als sEH-P-Inhibitor gefunden wurde.<sup>49</sup>

Für das zweite Screening wurde die ChemBioNet Bibliothek gewählt. Die ChemBioNet<sup>81</sup> ist eine akademische Initiative von Chemikern und Biologen, die sich einerseits ein Aktivitätsprofil für ihre Moleküle und andererseits Zugang zu einer Substanzbibliothek wünschen. Jeder Synthesechemiker kann seine Moleküle an die Initiative spenden, und zu akademischen Zwecken darf die Bibliothek kostenfrei zum Screening verwendet werden. Die aktuelle Version der ChemBioNet Bibliothek enthält ca. 16000 Substanzen, die bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  getestet wurden. 400 Substanzen zeigten Inhibitionen dreifach oberhalb der Standardabweichung. Da dies sehr viele Substanzen waren, wurden die Strukturen der potentiellen Inhibitoren visuell inspiziert. Leider befanden sich in der ChemBioNet Library sehr viele Substanzen, die dafür bekannt sind, unspezifisch mit vielen Assays zu interferieren, die so genannten PAINS (engl. Pan Assay Interfering Substances).<sup>82</sup> Außerdem wurden viele  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sowie offensichtliche Inhibitoren der sEH-Hydrolase (Harnstoffe) gefunden. Nachdem diese manuell entfernt wurden, verblieben 59 Substanzen, von denen der  $\text{IC}_{50}$  bestimmt werden sollte. Insgesamt ließen sich elf Substanzen fitten (Tabelle 10). Die Wahl der ChemBioNet Bibliothek ist kritisch zu betrachten, da sie zum Großteil aus Substanzen besteht, die PAINS sind. Die Anzahl manuell deletierter Substanzen nach dem ersten Screening steht in keinem Verhältnis zu denen, die nicht direkt als störend entfernt wurden, wobei trotzdem noch einige übersehen wurden wie z.B. CBN\_8\_N19. Allerdings stand aufgrund der Kosten, die bei Verwendung einer anderen Bibliothek entstanden wären, lediglich diese zur Verfügung.

*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH*

Tabelle 10: Strukturen der ChemBioNet Inhibitoren und entsprechende  $IC_{50}$ s

Struktur	Identifizier	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]
	CBN_7_K3	30
	CBN_7_J6	65
	CBN_8_N19	250
	CBN_9_L21	130
	CBN_10_O17	0,75
	CBN_12_P16	36
	CBN_18_H22	41
	CBN_18_L22	2
	CBN_25_J13	110
	CBN_28_H20	2
	CBN_37_C18	565

*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH*

Aufgrund der Vielzahl von Screeningsubstanzen waren diese am ESP bereits in DMSO gelöst und vorplattiert. Gelagert wurden sie bei -20 °C und wurden bereits für mehrere Assays aufgetaut und wieder eingefroren. Da allerdings nicht alle Substanzen über lange Zeit in DMSO und bei Temperaturschwankungen stabil sind, wurde nach Abschluss der Arbeiten am ESP versucht, alle Substanzen, von denen ein IC<sub>50</sub> gemessen wurde, nachzubestellen, um die Ergebnisse in Frankfurt weiter zu validieren. Nicht alle Substanzen waren kommerziell erhältlich, so dass lediglich die folgenden Substanzen bestellt wurden: Oxaprozin, Sulfadiazin (als Natriumsalz, um Störungen durch Silberkationen zu vermeiden), Natriumtiludronat sowie CBN\_18\_H22 und CBN\_18\_L22. Leider konnte nur der IC<sub>50</sub> von Oxaprozin reproduziert werden, so dass davon auszugehen ist, dass einige der Substanzen durch mehrere Einfrierzyklen degradiert waren.

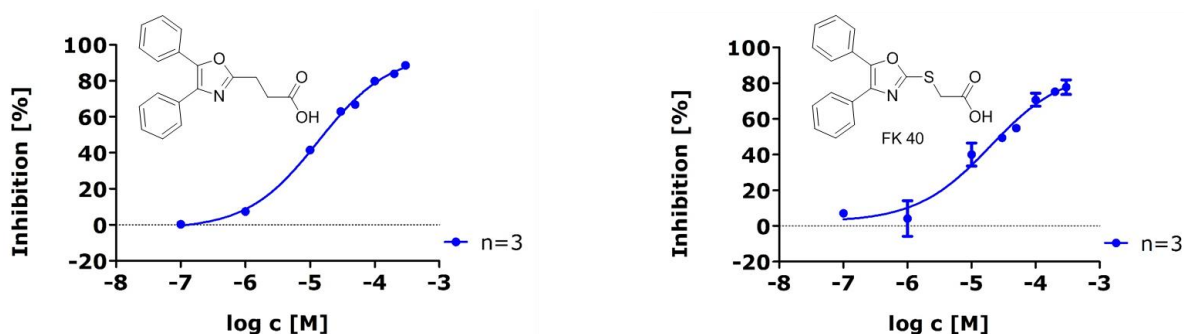


Abbildung 45: IC<sub>50</sub> für Oxaprozin (15 µM) und das strukturell sehr ähnliche FK40 (19 µM)

Die Tatsache, dass FK40 einen ähnlichen IC<sub>50</sub> liefert wie Oxaprozin bestätigt das Strukturmotiv und ist ein erster Schritt in Richtung Leitstruktur für sEH-P Inhibitoren. Leider konnte CBN\_9\_L21 nicht nachbestellt werden, denn aufgrund seiner Ähnlichkeit zur Struktur der beiden Inhibitoren wäre er sehr interessant gewesen wäre. Die weitere biophysikalische Evaluierung von Oxaprozin wird durch Annika Herrmann in ihrer Masterarbeit durchgeführt.

### 3.2.4 Abschließende Bewertung zur sEH-Phosphatase

Für die sEH-P konnte ein praktikables Substrat gefunden werden (FDP), das in diversen Assay-Formaten verwendet und evaluiert wurde. Während meiner Diplomarbeit wurden klassische Phosphatmimetika sowie Phosphatase-Inhibitoren getestet, die keine Inhibition zeigten. Daher wurden neue Ansätze – *in silico* und High-Troughput Screening – gewählt, um einen Inhibitor zu finden. Aufgrund der Vielzahl getesteter Substanzen und der wenigen validierten Hits, kann die sEH-P als schwieriges Target bezeichnet werden. Die Struktur der Domäne lässt vermuten, dass eine Konformationsänderung möglich ist,<sup>33</sup> und eine durch Liganden induzierte Änderung der Tertiärstruktur geschieht, der die Suche nach einem Inhibitor schwierig gestaltet. Lediglich Sulfonsäuren, die in der Literatur schon bekannt waren, konnten als Inhibitoren bestätigt werden, sowie Oxaprozin, eigentlich ein COX-1 Inhibitor, wurde gefunden. Die weitere Evaluierung des Hits steht noch aus und wird durch Frau Annika Herrmann geschehen.

*Ergebnisse und Diskussion*  
*Teil 2: Die Phosphatase Domäne der sEH*

## 4 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Dissertation wurden für unterschiedliche Proteine Fluoreszenz-Intensitäts-Assays und orthogonale biophysikalische Methoden entwickelt. Dabei wurden diverse Schwierigkeiten aufgedeckt, die zu falschen Ergebnissen führen können. Daher folgt ein generelles Protokoll zur Etablierung funktionaler Assays an rekombinanten, löslichen Proteinen.

1) Zunächst ist ein geeigneter Assay-Puffer zu finden. Oft geben schon die Bedingungen, die zur Aufreinigung des Proteins benötigt werden, darüber Aufschluss. Generell ist zu beachten, dass der pH-Wert weit genug vom isoelektrischen Punkt des Proteins weg liegt, da das Protein sonst sehr leicht ausfällt. Die Stabilität des Proteins kann mit Hilfe der Schmelzpunktbestimmung eingeordnet werden, denn Stabilität korreliert oft mit korrekter Faltung und einhergehender Aktivität. Dies bezieht sich auch auf eventuelle Cofaktoren des Proteins oder benötigter Salze. Weiterhin ist auch die Funktionalität des Proteins zu beachten. Die sEH-P zum Beispiel ist eine Phosphatase und wird von Sulfonsäuren inhibiert. Daher sind Sulfonsäurepuffer (z.B. HEPES, MES...) und auch Phosphatpuffer, der ebenfalls eine Affinität zur Besetzung der Bindetasche hat, komplett ungeeignet.

2) Ein geeignetes Substrat ergibt sich über die Funktionalität des Proteins. Oft findet es sich in der Literatur bei der Suche Proteinen mit einer ähnlichen Funktion. Es muss beim gewünschten pH-Wert löslich sein und eine möglichst große Veränderung in einem Parameter durchlaufen, wenn es vom Enzym umgesetzt wird, z.B. starker bathochromer Effekt. Generell gilt, dass fluoreszenz-basierte Assays sensitiver sind als kolorimetrische, da Fluoreszenz besser detektiert werden kann. Weiterhin interagieren die gemessenen Wellenlängen bei fluoreszenz-basierten Assays seltener mit den Testsubstanzen. Der Fluorophor sollte ebenfalls möglichst weit im langwelligen Bereich absorbieren und emittieren.

3) Die Wahl der Assay-Platte ist entscheidend. Soll der Assay von Hand durchgeführt werden, empfiehlt sich das 96well Format, stehen Pipettierroboter zur Verfügung, ist das 384well Format praktikabler. Die Farbe der Platte

## Schlussfolgerung

entscheidet sich entsprechend der Messgröße. So werden für colorimetrische Assays selbstverständlich transparente Platten gewählt, bei Fluoreszenz-Detektion am besten schwarze Platten, um Querstrahlung zu vermeiden. Generell empfehlen sich Platten mit einer besonders wenig bindenden Oberfläche (low binding), da dort weniger Testsubstanzen haften. Die Form des Bodens (flach, konisch oder rund) entscheidet sich nach dem Aufbau des Plattenlesegeräts.

4) Falls sich in der Literatur keinerlei Angaben zu einer brauchbaren Konzentration von Protein oder Substrat finden lassen, empfiehlt sich ein Checkerboard-Assay (s. Kapitel 3.1.1.2). Auf einer Platte werden unterschiedlichste Kombinationen aus Protein und Substrat getestet, so dass gleich das Signal-Rausch-Verhältnis bestimmt werden kann und Z'-Faktoren für die verschiedenen Kombinationen. Dabei darf nicht vergessen werden, dass auch die Verstärkung am Plattenlesegerät sowie die Temperatur optimiert werden können. Für humane Proteine bieten sich 37 °C oft als optimale Assay-Temperatur an. Erfahrungsgemäß lohnt es, sich anfangs Proteinkonzentrationen zwischen 1 nM und 1 µM zu testen. Selbstverständlich ist schlussendlich eine möglichst niedrige Konzentration zu wählen, damit ressourcensparend gearbeitet werden kann. Ist ein vernünftiger Proteinkonzentrationsbereich gefunden, muss der  $K_m$  des Substrats bestimmt werden, denn nur so können später aussagekräftige  $IC_{50}$  Werte gemessen werden. Dabei sind Proteinkonzentration und  $K_m$  immer wieder so aufeinander abzustimmen, dass letztendlich ein robuster Assay entsteht. Bei Substraten mit hoher Quantenausbeute (z.B. Fluorescein) sollten keine sehr hohen Substratkonzentrationen (> 10 µM) eingesetzt werden, da sonst Querstrahlung zu Nachbarwells zu beobachten ist.

5) Da Testsubstanzen selten in reinen wässrigen Puffern löslich sind, muss im nächsten Schritt der Einfluss von organischen Lösemitteln auf den Assay untersucht werden. Aufgrund der Lipophilie vieler bioaktiver Moleküle ist außerdem die Zugabe eines Detergenz zum Assay hilfreich, damit man nicht falsch-positive Ergebnisse durch Mizellenbildung detektiert. Sowohl der Einfluss von Lösemitteln als auch von Detergenzien ist zu untersuchen, so dass der Assay konstant innerhalb der Toleranzgrenzen gehalten werden kann. Da diese Effekte teilweise pH abhängig sind, ist der Einfluss bei Veränderung des Assay-Puffers erneut zu untersuchen.



## Schlussfolgerung

6) Sind keinerlei Referenz-Inhibitoren bekannt, empfiehlt es sich, kinetische Zyklen aufzunehmen, da so die enzymatische Reaktion wesentlich genauer beobachtet werden kann. Ist ein Inhibitor bekannt, sollte zur Testung des Systems ein  $IC_{50}$  gemessen werden, um zu sehen, ob die gewählten Bedingungen geeignet sind, die Literaturwerte zu reproduzieren. Generell empfiehlt es sich immer wieder, nach der Änderung eines Parameters eine  $IC_{50}$  Kurve der Referenz aufzunehmen, um die Auswirkungen abschätzen zu können. Am besten nimmt man zur kompletten Etablierung ein und dieselbe  $IC_{50}$  Kurve an verschiedenen Stellen der Platte und in unterschiedlichen Pipettiermustern auf, um eventuelle Inhomogenitäten auf der Platte zu detektieren. Inhomogenitäten können z.B. durch verwendete Multipipetten aber auch durch Zeitfaktoren beim händigen Pipettieren auftreten.

7) Sobald der Assay gut etabliert ist, kann über die Überführung in ein Endpunkt-Format nachgedacht werden. Als Stopreagenzien eignen sich organische Lösemittel, die zur Fällung des Proteins führen, sowie starke Säuren oder Basen, die den pH Wert in einen Bereich bringen, in dem das Protein keine Aktivität zeigt oder, falls Cofaktoren verwendet werden, chemische Substanzen, die den Cofaktor entziehen (z.B. EDTA bei zinkabhängigen Proteinen).

8) Testsubstanzen sollten auf ihre Absorptionswellenlängen sowie Eigenfluoreszenz untersucht werden, um falsch-positive sowie falsch-negative Ergebnisse auszuschließen. Gibt es eine Interferenz zwischen Testsubstanz und Assay sollte ein anderer Assay oder eine biophysikalische Methode gewählt werden.

9) Auch der beste funktionale Assay alleine reicht nicht aus. Grundsätzlich sollten die Ergebnisse mit einem sekundären, orthogonalen Assay bestätigt werden. Dazu eignen sich biophysikalische Methoden, wie z.B. TSA oder NMR. Generell sollte es eine Methode sein, die die Bindung des Liganden ohne ein Substrat bestätigt. Dabei sind die biochemischen Eigenschaften des untersuchten Enzyms zu beachten. Ist es ein globuläres Protein, das bestenfalls auch noch einen metallischen Cofaktor trägt, eignet sich TSA perfekt. Für solche Proteine können große Shifts beobachtet werden, man benötigt vergleichsweise wenig Protein (ca. 30  $\mu$ L 5 $\mu$ M Proteinlösung

## Schlussfolgerung

pro Well) und muss keine andere Expression oder Aufreinigung betreiben als üblich. Will man einen  $K_D$  bestimmen, ist ITC eine gute Methode. Sie beruht auf einem ähnlichen Prinzip wie TSA, ist genauer, benötigt allerdings auch mehr Protein (ca. 2mL 50  $\mu$ M Proteinlösung pro Kurve) und ist anfälliger für Einflüsse von DMSO, daher also schwierig durchzuführen, wenn der Ligand in hohen Konzentrationen schlecht löslich ist.

Lässt sich das Enzym problemlos lyophilisieren und in  $D_2O$  re-suspendieren, ist STD-NMR eine einfache Methode, die wenig Protein benötigt (ca. 1 mL 30  $\mu$ M Proteinlösung) und eine direkte Aussage gibt, ob der Ligand reversibel bindet oder nicht. Muss das Enzym erst in deuterierten Puffer überführt werden, ist es eine sehr teure Methode. Lässt sich das Protein in Minimalmedium gut exprimieren, eignet sich die Titration im NMR als Methode, um einen  $K_D$  zu bestimmen (ca. 1 mL 100  $\mu$ M Proteinlösung). Dazu misst man ein  $^{15}N$ - $^1H$ -HSQC pro Titrationspunkt und beobachtet die Verschiebung der Peaks.

Selbstverständlich gibt es eine große Zahl weiterer biophysikalischer Methoden, die jedoch entweder nicht zugänglich waren oder aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden konnten.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden drei bakterielle Enzyme, die Metallo- $\beta$ -Lactamasen NDM-1 (New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase 1), VIM-1 (Verona-Integron Encoded Metallo- $\beta$ -Lactamase 1) und IMP-7 (Imipenemase 7), sowie ein humanes Enzym, die sEH-Phosphatase, behandelt.

Das Auftreten multiresistenter Bakterien ist eine alarmierende Entwicklung. Dabei ist das vermehrte Erscheinen von Metallo- $\beta$ -Lactamasen (MBLs) in Gram-negativen Bakterien zu beobachten, die von Inhibitoren anderer  $\beta$ -Lactamasen unbeeinflusst bleiben.<sup>7</sup> MBLs sind Enzyme, die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika hydrolysieren und somit unwirksam machen.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika hemmen die Zellwandsynthese von Bakterien und haben keinen Einfluss auf menschliche Zellen. Daher sind sie für den Menschen sehr gut verträglich und werden oft eingesetzt. Gerade diese häufige Verwendung und der Fehleinsatz führen vermehrt zur Resistenzbildung.<sup>11</sup> Suche nach neuen Wirkstoffen zur Behandlung von Pathogenen mit Resistenz ist von äußerster Dringlichkeit, da die Resistenzen sich in kürzester Zeit über den kompletten Planeten verbreiten.<sup>7</sup>

NDM-1, VIM-1 und IMP-5 wurden in *E.coli* überexprimiert und aufgereinigt, um die rekombinanten Enzyme zu erhalten. Damit wurde zunächst ein Fluoreszenz-Intensitäts-Assay entwickelt, um die Wirksamkeit möglicher Inhibitoren zu quantifizieren. Als Testsubstanzen wurden elf zugelassene Wirkstoffe gewählt, die eine Thiol-Gruppe enthalten, da bekannt ist, dass Thiole Zink-abhängige Proteine inhibieren. Weiterhin wurden Thermal Shift Assays<sup>57</sup> durchgeführt, um zwischen Liganden, die durch Bindung an die MBL inhibieren, und Liganden, die nur dadurch inhibieren, dass sie der Bindetasche das nötige Zink entziehen, unterscheiden zu können. Substanzen, die Inhibition im Assay zeigten und keine Zink-Chelatoren waren, wurden weiterhin auf Aktivität in bakteriellen Zellen untersucht. Dafür wurden pathogene Stämme aus Patienten sowie mit den Resistenzplasmiden transfizierte Laborstämme einem Test auf Antibiotikaempfindlichkeit unterzogen. Die Wirksamkeit von Imipenem sollte in Kombination mit den Testsubstanzen wieder hergestellt werden.

## Zusammenfassung

Insgesamt wurden vier Substanzen mit nicht-antiinfektiösen Indikationen gefunden, die MBLs im niedrig-mikromolaren Bereich inhibieren und die Wirksamkeit von Imipenem in Bakterien partiell wieder herstellen.<sup>66</sup>

In einem zweiten Ansatz wurden Fragmente mittels Docking ausgewählt und ebenfalls im Fluoreszenz-basierten Assay getestet. Die Bestätigung der Bindung erfolgte in diesem Fall mit STD-NMR<sup>48</sup> und die Bestimmung der Dissoziationskonstante des besten Fragments mittels Messung der Chemical Shift Perturbation<sup>51</sup> im NMR. In diesem Projekt wurde leider kein pan-Inhibitor für alle MBLs gefunden, allerdings ein Fragment mit hoher Bindeeffizienz zur NDM-1.

Die lösliche Epoxid-Hydrolase (englisch: soluble Epoxid Hydrolase, sEH) katalysiert die Umsetzung von Epoxyeicosatriensäuren (EETs), Lipidmediatoren mit entzündungshemmenden und kardiovaskulär-protectiven Eigenschaften, zu Dihydroxyeicosatriensäuren (DHETs). Diese Reaktion ist ein Bestandteil der Arachidonsäurekaskade.<sup>28</sup> Das Enzym besteht aus zwei Domänen mit unterschiedlichen katalytischen Funktionen, einerseits der viel erforschten C-terminalen Epoxid-Hydrolase-Domäne, aber auch der N-terminalen Domäne, die eine Phosphatase-Eigenschaft zeigt.<sup>29</sup> Die N-terminale Domäne katalysiert die Hydrolyse von Phosphat-Monoestern, Isoprenoid- sowie Lipid-Phosphaten.<sup>31</sup> Die biologische Funktion dieser Domäne ist nicht aufgeklärt, und die Phosphatase Aktivität wird von typischen Phosphatase-Inhibitoren nicht beeinflusst. Daher ist es von Interesse, einen Inhibitor zu entwickeln.

Zunächst wurde ein Aktivitätsassay mit einem fluorogenen Substrat entwickelt und dieser in verschiedene Formate überführt, um in unterschiedlichen Größen testen zu können. Im 96well Format wurden mögliche Inhibitoren getestet, die mittels Docking ausgesucht wurden. Allerdings wurden nur Inhibitoren mit  $IC_{50}$ s über  $100 \mu\text{M}$  gefunden oder Inhibitoren, die Sulfonsäure-Strukturen aufweisen. Im 384well Format wurde, in Kollaboration mit dem European ScreeningPort Hamburg, ein High-Throughput Screening von ca. 17000 Substanzen durchgeführt. So wurde Oxaprozin gefunden, ein Inhibitor, der strukturelle Ähnlichkeit zu bereits bekannten Inhibitoren zeigt.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Å	Ångström (10 <sup>-10</sup> m)
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
Ala	Alanin
AU	Absorption Units (Absorptionseinheiten)
CAMHB	cation adjusted Mueller Hinton Broth
COX	Cyclooxygenase
CSP	Chemical Shift Perturbation
CYP450	Cytochrom P450
DHET	Dihydroxyeicosatriensäure
DiFMUP	6,8-Difluoro-4-methylumbelliferyl-phosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EET	Epoxyeicosatriensäure
ESP	European ScreeningPort Hamburg
FDA	Food and Drug Administration (Amerikanische Zulassungsbehörde)
FDP	Fluoresceindiphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HETE	Hydroxyicosatetraensäure
IC <sub>50</sub>	Halb-Maximale Inhibitorische Konzentration
IMP-7	Imipenemase 7
KBE	Kolonie-bildende Einheit
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LB	lysogeny broth
LOX	Lipoxygenase
MBL	Metallo-β-Lactamase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MIC	Minimal Inibitory Concentration
NDM-1	New Delhi Metallo-β-Lactamase 1
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm

## Abkürzungsverzeichnis

PAINS	Pan Assay Interfering Substance
ppm	Parts Per Million
RFU	relative Fluorescence Units (relative Fluoreszenzeinheiten)
RMSD	root-mean-square deviation
sEH	Soluble Epoxide Hydrolase (lösliche Epoxid Hydrolase)
sEH-P	sEH-Phosphatase
STD-NMR	Saturation Transfer Difference - NMR
T	Time (Zeit)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Thermal Shift Assay
V	Geschwindigkeit (Velocity)
VIM-1	Verona-Integron-Encoded-Metallo- $\beta$ -Lactamase 1
WHO	World Health Organization

## 7 Referenzen

- (1) Hopkins, A. L.; Groom, C. R. The Druggable Genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 727–730.
- (2) Chen, T. *A Practical Guide to Assay Development and High-Throughput Screening in Drug Discovery*; 1st ed.; 2010.
- (3) Copeland, R. A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*; 2nd ed.; 2013.
- (4) ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An Enzyme from Bacteria Able to Destroy Penicillin. *Nature* **1940**, *146*, 837–837.
- (5) Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*; 4th ed.; 2009.
- (6) Klebe, G. *Wirkstoffdesign*; 2nd ed.; 2009.
- (7) Bush, K.; Fisher, J. F. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New B-Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **2011**, *65*, 455–478.
- (8) Hall, B. G.; Barlow, M. Revised Ambler Classification of {beta}-Lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *55*, 1050–1051.
- (9) Olsen, I. New Promising B-Lactamase Inhibitors for Clinical Use. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**.
- (10) Crowder, M. W.; Spencer, J.; Vila, A. J. Metallo-Beta-Lactamases: Novel Weaponry for Antibiotic Resistance in Bacteria. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 721–728.
- (11) WHO. WHO's global report on antibiotic resistance 2014  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf) (accessed Oct 10, 2014).
- (12) Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 1–12.
- (13) Chen, L. F. The Changing Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus: 50 Years of a Superbug. *Am. J. Infect. Control* **2013**, *41*, 448–451.
- (14) Butler, M. S.; Blaskovich, M. A.; Cooper, M. A. Antibiotics in the Clinical Pipeline in 2013. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2013**, *66*, 571–591.

## Referenzen

- (15) Cornaglia, G.; Riccio, M.; Mazzariol, A.; Lauretti, L.; Fontana, R.; Rossolini, G. Appearance of IMP-1 Metallo-B-Lactamase in Europe. *Lancet* **1999**, *353*, 899–900.
- (16) Henrichfreise, B.; Wiegand, I.; Sherwood, K. J.; Wiedemann, B. Detection of VIM-2 Metallo-Beta-Lactamase in *Pseudomonas Aeruginosa* from Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 1668–1669.
- (17) Yong, D.; Toleman, M. A.; Giske, C. G.; Cho, H. S.; Sundman, K.; Lee, K.; Walsh, T. R. Characterization of a New Metallo-Beta-Lactamase Gene, bla(NDM-1), and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella Pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 5046–5054.
- (18) Zhang, H. . H. Q. Crystal Structure of NDM-1 Reveals a Common Beta-Lactam Hydrolysis Mechanism. *Faseb J.* **2011**, *25*, 2574–2582.
- (19) Brem, J. . V. S. S. . Z. D. . S. C. J. B1 Mbl Inhibitor Structures. *To be Publ.*
- (20) Brem, J. . V. S. S. . Z. D. . S. C. J. B1 Mbl Inhibitor Structures. *To be Publ.*
- (21) CCG, C. C. G. Molecular Operating Environment 2011.10  
[http://www.chemcomp.com/Research-Citing\\_MOE.htm](http://www.chemcomp.com/Research-Citing_MOE.htm) (accessed Feb 25, 2015).
- (22) Fast, W.; Sutton, L. D. Metallo-B-Lactamase: Inhibitors and Reporter Substrates. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834*, 1648–1659.
- (23) King, A. M.; Reid-Yu, S. a; Wang, W.; King, D. T.; De Pascale, G.; Strynadka, N. C.; Walsh, T. R.; Coombes, B. K.; Wright, G. D. Aspergillomarasmine A Overcomes Metallo-B-Lactamase Antibiotic Resistance. *Nature* **2014**, *510*, 503–506.
- (24) Morisseau, C.; Hammock, B. D. Gerry Brooks and Epoxide Hydrolases: Four Decades to a Pharmaceutical. *Pest Manag. Sci.* **2008**, *64*, 594–609.
- (25) Gomez, G. a; Morisseau, C.; Hammock, B. D.; Christianson, D. W. Structure of Human Epoxide Hydrolase Reveals Mechanistic Inferences on Bifunctional Catalysis in Epoxide and Phosphate Ester Hydrolysis. *Biochemistry* **2004**, *43*, 4716–4723.
- (26) Morisseau, C.; Hammock, B. D. EPOXIDE HYDROLASES: Mechanisms, Inhibitor Designs, and Biological Roles. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, *45*, 311–333.
- (27) Spector, A. a.; Fang, X.; Snyder, G. D.; Weintraub, N. L. Epoxyeicosatrienoic Acids (EETs): Metabolism and Biochemical Function. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 55–90.



## Referenzen

- (28) Imig, J. D.; Hammock, B. D. Soluble Epoxide Hydrolase as a Therapeutic Target for Cardiovascular Diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2009**, *8*, 794–805.
- (29) Cronin, A.; Mowbray, S.; Dürk, H.; Homburg, S.; Fleming, I.; Fisslthaler, B.; Oesch, F.; Arand, M. The N-Terminal Domain of Mammalian Soluble Epoxide Hydrolase Is a Phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 1552–1557.
- (30) Keserü, B.; Barbosa-Sicard, E.; Schermuly, R. T.; Tanaka, H.; Hammock, B. D.; Weissmann, N.; Fisslthaler, B.; Fleming, I. Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension: Comparison of Soluble Epoxide Hydrolase Deletion vs. Inhibition. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *85*, 232–240.
- (31) Oguro, a.; Imaoka, S. Lysophosphatidic Acids Are New Substrates for the Phosphatase Domain of Soluble Epoxide Hydrolase. *J. Lipid Res.* **2012**, *53*, 505–512.
- (32) Morisseau, C.; Schebb, N. H.; Dong, H.; Ulu, A.; Aronov, P. a.; Hammock, B. D. Role of Soluble Epoxide Hydrolase Phosphatase Activity in the Metabolism of Lysophosphatidic Acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *419*, 796–800.
- (33) Cronin, A.; Homburg, S.; Dürk, H.; Richter, I.; Adamska, M.; Frère, F.; Arand, M.; Dürk, H.; Frère, F. Insights into the Catalytic Mechanism of Human sEH Phosphatase by Site-Directed Mutagenesis and LC-MS/MS Analysis. *J. Mol. Biol.* **2008**, *383*, 627–640.
- (34) Enayetallah, A. E.; Grant, D. F. Effects of Human Soluble Epoxide Hydrolase Polymorphisms on Isoprenoid Phosphate Hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *341*, 254–260.
- (35) Zhang, W.; Yang, A. L.; Liao, J.; Li, H.; Dong, H.; Chung, Y. T.; Bai, H.; Matkowskyj, K. a.; Hammock, B. D.; Yang, G.-Y. Soluble Epoxide Hydrolase Gene Deficiency or Inhibition Attenuates Chronic Active Inflammatory Bowel Disease in IL-10(–/–) Mice. *Dig. Dis. Sci.* **2012**, *57*, 2580–2591.
- (36) Matsumoto, N.; Suzuki, E.; Ishikawa, M.; Shirafuji, T.; Hasumi, K. Soluble Epoxide Hydrolase as an Anti-Inflammatory Target of the Thrombolytic Stroke Drug SMTP-7. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 35826–35838.
- (37) Morisseau, C.; Sahdeo, S.; Cortopassi, G.; Hammock, B. D. Development of an HTS Assay for EPHX2 Phosphatase Activity and Screening of Nontargeted Libraries. *Anal. Biochem.* **2013**, *434*, 105–111.
- (38) MASCOT Database Search <http://www.matrixscience.com/>.
- (39) Jadhav, A.; Ferreira, R. S.; Klumpp, C.; Mott, B. T.; Austin, C. P.; Inglese, J.; Thomas, C. J.; Maloney, D. J.; Shoichet, B. K.; Simeonov, A. Quantitative Analyses of Aggregation, Autofluorescence, and Reactivity

## Referenzen

- Artifacts in a Screen for Inhibitors of a Thiol Protease. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 37–51.
- (40) Iversen, P. W.; Eastwood, B. J.; Sittampalam, G. S.; Cox, K. L. A Comparison of Assay Performance Measures in Screening Assays: Signal Window, Z' Factor, and Assay Variability Ratio. *J. Biomol. Screen.* **2006**, *11*, 247–252.
- (41) Guo, Y.; Wang, J.; Niu, G.; Shui, W.; Sun, Y.; Zhou, H.; Zhang, Y.; Yang, C.; Lou, Z.; Rao, Z. A Structural View of the Antibiotic Degradation Enzyme NDM-1 from a Superbug. *Protein Cell* **2011**, *2*, 384–394.
- (42) Papanicolaou, G. A.; Medeiros, A. A. Discrimination of Extended-Spectrum Beta-Lactamases by a Novel Nitrocefin Competition Assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 2184–2192.
- (43) Jones, R. N.; Wilson, H. W.; Novick, W. J.; Barry, A. L.; Thornsberry, C. In Vitro Evaluation of CENTA, a New Beta-Lactamase-Susceptible Chromogenic Cephalosporin Reagent. *J. Clin. Microbiol.* **1982**, *15*, 954–958.
- (44) Rukavishnikov, A.; Gee, K. R.; Johnson, I.; Corry, S. Fluorogenic Cephalosporin Substrates for B-Lactamase TEM-1. *Anal. Biochem.* **2011**, *419*, 9–16.
- (45) Sun, W.-C.; Gee, K. R.; Haugland, R. P. Synthesis of Novel Fluorinated Coumarins: Excellent UV-Light Excitable Fluorescent Dyes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3107–3110.
- (46) Hahn, S.; Achenbach, J.; Buscató, E. I.; Klingler, F.-M.; Schroeder, M.; Meirer, K.; Hieke, M.; Heering, J.; Barbosa-Sicard, E.; Loehr, F.; Fleming, I.; Doetsch, V.; Schubert-Zsilavec, M.; Steinhilber, D.; Proschak, E. Complementary Screening Techniques Yielded Fragments That Inhibit the Phosphatase Activity of Soluble Epoxide Hydrolase. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 2146–2149.
- (47) Huang, Z. 3,6-Fluorescein Diphosphate: A Sensitive Fluorogenic and Chromogenic Substrate for Protein Tyrosine Phosphatases. *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*, 327–334.
- (48) Mayer, M.; Meyer, B. Charakterisierung von Ligandenbindung Durch Sättigungstransfer-Differenz-NMR-Spektroskopie. *Angew. Chemie* **1999**, *111*, 1902–1906.
- (49) Klingler, F.-M. Design Und Synthese von Inhibitoren Der Löslichen Epoxid Hydrolase, Goethe Universität Frankfurt, 2011.
- (50) Mayer, M.; Meyer, B. Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR To Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6108–6117.

## Referenzen

- (51) Williamson, M. P. Using Chemical Shift Perturbation to Characterise Ligand Binding. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *73*, 1–16.
- (52) McFARLAND, J. THE NEPHELOMETER: AN INSTRUMENT FOR ESTIMATING THE NUMBER OF BACTERIA IN SUSPENSIONS USED FOR CALCULATING THE OPSONIC INDEX AND FOR VACCINES. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **1907**, *XLIX*, 1176.
- (53) Vella, P.; Hussein, W. M.; Leung, E. W. W.; Clayton, D.; Ollis, D. L.; Mitić, N.; Schenk, G.; McGearry, R. P. The Identification of New Metallo-B-Lactamase Inhibitor Leads from Fragment-Based Screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3282–3285.
- (54) King, D. T.; Worrall, L. J.; Gruninger, R.; Strynadka, N. C. J. New Delhi Metallo-B-Lactamase: Structural Insights into B-Lactam Recognition and Inhibition. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11362–11365.
- (55) Ferreira, R. S.; Bryant, C.; Ang, K. K. H.; McKerrow, J. H.; Shoichet, B. K.; Renslo, A. R. Divergent Modes of Enzyme Inhibition in a Homologous Structure-Activity Series. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5005–5008.
- (56) Pantoliano, M. W.; Petrella, E. C.; Kwasnoski, J. D.; Lobanov, V. S.; Myslik, J.; Graf, E.; Carver, T.; Asel, E.; Springer, B. A.; Lane, P.; Salemme, F. R. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. *J. Biomol. Screen.* **2001**, *6*, 429–440.
- (57) Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The Use of Differential Scanning Fluorimetry to Detect Ligand Interactions That Promote Protein Stability. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2212–2221.
- (58) Goddard, T. D.; and Kneller, D. G. SPARKY3.
- (59) Congreve, M.; Carr, R.; Murray, C.; Jhoti, H. A “Rule of Three” for Fragment-Based Lead Discovery? *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 876–877.
- (60) Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. *Proteins* **2003**, *52*, 609–623.
- (61) Korb, O.; Stützle, T.; Exner, T. PLANTS: Application of Ant Colony Optimization to Structure-Based Drug Design. In *Ant Colony Optimization and Swarm Intelligence*; Dorigo, M.; Gambardella, L.; Birattari, M.; Martinoli, A.; Poli, R.; Stützle, T., Eds.; Lecture Notes in Computer Science; Springer Berlin / Heidelberg, 2006; Vol. 4150, pp. 247–258.
- (62) Yamaguchi, Y. . J. W. . M. K. . I. S. . Y. Y. . W. J. . S. N. . A. Y. . K. H. Crystallographic Investigation of the Inhibition Mode of a VIM-2 Metallo-Beta-Lactamase from *Pseudomonas Aeruginosa* by a Mercaptocarboxylate Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 6647–6653.

## Referenzen

- (63) Lassaux, P. . T. D. A. K. . L. E. . F. A. . D. J. D. . S. J. S. . L. C. . B. C. . F. J. M. . F. J. L. . G. M. Biochemical and Structural Characterization of the Subclass B1 Metallo- $\beta$ -Lactamase Vim-4. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1248.
- (64) Concha, N. O. . J. C. A. . R. P. . P. S. . C. C. A. . C. B. P. . L. C. . G. M. . F. J. M. . P. D. J. . B. J. H. . A.-M. S. S. Crystal Structure of the IMP-1 Metallo  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas Aeruginosa* and Its Complex with a Mercaptocarboxylate Inhibitor: Binding Determinants of a Potent, Broad-Spectrum Inhibitor. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4288–4298.
- (65) Oda, A.; Tsuchida, K.; Takakura, T.; Yamaotsu, N.; Hirono, S. Comparison of Consensus Scoring Strategies for Evaluating Computational Models of Protein-Ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2006**, *46*, 380–391.
- (66) Klingler, F. M.; Wichelhaus, T. a; Frank, D.; Bernal, J. C.; El-Delik, J.; Müller, H. F.; Sjuts, H.; Göttig, S.; Koenigs, A.; Pos, K. M.; Pogoryelov, D.; Proschak, E. Approved Drugs Containing Thiols as Inhibitors of Metallo-B-Lactamases: A Strategy to Combat Multidrug-Resistant Bacteria. *J. Med. Chem.* **2015**, *1*, 150327093616003.
- (67) Bebrone, C. Metallo- $\beta$ -Lactamases (classification, Activity, Genetic Organization, Structure, Zinc Coordination) and Their Superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1686–1701.
- (68) Liénard, B. M. R.; Garau, G.; Horsfall, L.; Karsisiotis, A. I.; Damblon, C.; Lassaux, P.; Papamicael, C.; Roberts, G. C. K.; Galleni, M.; Dideberg, O.; Frère, J.-M.; Schofield, C. J. Structural Basis for the Broad-Spectrum Inhibition of Metallo- $\beta$ -Lactamases by Thiols. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2282–2294.
- (69) Knox, C.; Law, V.; Jewison, T.; Liu, P.; Ly, S.; Frolkis, A.; Pon, A.; Banco, K.; Mak, C.; Neveu, V.; Djoumbou, Y.; Eisner, R.; Guo, A. C.; Wishart, D. S. DrugBank 3.0: A Comprehensive Resource for “Omics” Research on Drugs. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 1035–1041.
- (70) Zhang, H.; Hao, Q. Crystal Structure of NDM-1 Reveals a Common B-Lactam Hydrolysis Mechanism. *FASEB J.* **2011**.
- (71) Li, K.; Tan, L.; Zhou, J. A. HPLC Determination of Captopril in Human Plasma and Its Pharmacokinetic Study. *Biomed. Chromatogr.* **1996**, *10*, 237–239.
- (72) Eberlin, M.; Mück, T.; Michel, M. C. A Comprehensive Review of the Pharmacodynamics, Pharmacokinetics, and Clinical Effects of the Neutral Endopeptidase Inhibitor Racecadotril. *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 93.
- (73) Carlsson, M. S.; Denneberg, T.; Emanuelsson, B.-M.; Kogedal, B.; Lindgren, S. Pharmacokinetics of Oral Tiopronin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1993**, *45*, 79–84.

## Referenzen

- (74) Brown, D. G.; May-Dracka, T. L.; Gagnon, M. M.; Tommasi, R. Trends and Exceptions of Physical Properties on Antibacterial Activity for Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10144–10161.
- (75) Li, C.; Budge, L. P.; Driscoll, C. D.; Willardson, B. M.; Allman, G. W.; Savage, P. B. Incremental Conversion of Outer-Membrane Permeabilizers into Potent Antibiotics for Gram-Negative Bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 931–940.
- (76) Agudelo-Morales, C. E.; Silva, O. F.; Galian, R. E.; Pérez-Prieto, J. Nitroanilines as Quenchers of Pyrene Fluorescence. *Chemphyschem* **2012**, *13*, 4195–4201.
- (77) Tran, K. L.; Aronov, P. A.; Tanaka, H.; Newman, J. W.; Hammock, B. D.; Morisseau, C. Lipid Sulfates and Sulfonates Are Allosteric Competitive Inhibitors of the N-Terminal Phosphatase Activity of the Mammalian Soluble Epoxide Hydrolase†. *Biochemistry* **2005**, *44*, 12179–12187.
- (78) Baell, J.; Walters, M. A. Chemical Con Artists Foil Drug Discovery. *Nature* **2014**, *513*, 481–483.
- (79) Moser, D.; Wisniewska, J. M.; Hahn, S.; Achenbach, J.; Buscató, E.; Klingler, F.; Hofmann, B.; Steinhilber, D.; Proschak, E. Dual-Target Virtual Screening by Pharmacophore Elucidation and Molecular Shape Filtering. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 120123151858001.
- (80) European ScreeningPort Infrastructure  
<http://www.screeningport.com/expertise-services/drug-discovery/infrastructure/european-screeningport-infrastructure/>.
- (81) ChemBioNet <http://www.chembionet.info/>.
- (82) Baell, J. B.; Holloway, G. a. New Substructure Filters for Removal of Pan Assay Interference Compounds (PAINS) from Screening Libraries and for Their Exclusion in Bioassays. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 2719–2740.

## *Referenzen*

## 8 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind. Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form oder auszugsweise im Rahmen einer anderen Prüfung nicht vorgelegt worden.

Frankfurt am Main, den.....

## *Eidesstattliche Erklärung*



## 9 Lebenslauf

## *Lebenslauf*

## 10 Publikationen

Franca-Maria Klingler, Thomas A. Wichelhaus, Denia Frank, Jenifer C. Bernal, Jasmin El-Delik, Florian H. Müller, Hanno Sjuts, Stephan Göttig, Arno Koenigs, Klaas M. Pos, Denys Pogoryelov, Ewgenij Proschak. Approved Drugs containing Thiols as Inhibitors of Metallo- $\beta$ -Lactamases: a Strategy to Combat Multidrug-Resistant Bacteria, *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (8), 3626-3630

Mario Wurglics, Roberto Carrasco-Gomez, Daniel Flesch, Matthias Gabler, Thomas Hanke, Franca-Maria Klingler, Christina Lamers, Daniel Merk, Maren Pellowiska. Pharmatett "Qualitative anorganische Analyse" als Spiel im Govi Verlag erschienen

Janosch Achenbach, Franca-Maria Klingler, René Blöcher, Daniel Moser, Ann-Kathrin Häfner, Carmen B. Rödl, Simon Kretschmer, Björn Krüger, Frank Löhr, Holger Stark, Bettina Hofmann, Dieter Steinhilber, and Ewgenij Proschak. Exploring the Chemical Space of Multitarget Ligands Using Aligned Self-Organizing Maps, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, 4, 1169 - 1172

Karin Meirer, Carmen B Rödl, Joanna M Wisniewska, Sven George, Ann-Kathrin Häfner, Estel la Buscató, Franca-Maria Klingler, Steffen Hahn, Dirk Berressem, Sandra K Wittmann, Dieter Steinhilber, Bettina Hofmann, Ewgenij Proschak. Synthesis and Structure Activity Relationship Studies of Novel Dual Inhibitors of Soluble Epoxide Hydrolase and 5-Lipoxygenase, *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 1777-1781

Estel la Buscató, Dominik Büttner, Astrid Brüggerhoff, Franca-Maria Klingler, Julia Weber, Bastian Scholz, Aleksandra Zivkovic, Rolf Marschalek, Holger Stark, Dieter Steinhilber, Helge B. Bode, Ewgenij Proschak. From a Multipotent Stilbene to Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors with Antiproliferative Properties, *ChemMedChem* **2013**, 8, 6, 919-923

Estel la Buscato, René Blöcher, Christina Lamers, Franca-Maria Klingler, Steffen Hahn, Dieter Steinhilber, Manfred Schubert-Zsilavec, Ewgenij Proschak. Design and Synthesis of Dual Modulators of Soluble Epoxide Hydrolase and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 10771-10775

Daniel Moser, Janosch Achenbach, Franca-Maria Klingler, Estel la Buscató, Steffen Hahn, and Ewgenij Proschak. Evaluation of structure-derived pharmacophore of soluble epoxide hydrolase inhibitors by virtual screening, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 6762-6765.

## Publikationen

Daniel Moser, Joanna M. Wisniewska, Steffen Hahn, Janosch Achenbach, Estel·la Buscató, Franca-Maria Klingler, Bettina Hofmann, Dieter Steinhilber and Ewgenij Proschak. Dual-target virtual screening by pharmacophore elucidation and molecular shape filtering, *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3, 155–158.

Steffen Hahn and Janosch Achenbach, Estel·la Buscató, Franca-Maria Klingler, Mirjam Schroeder, Karin Meirer, Martina Hieke, Jan Heering, Eduardo Barbosa-Sicard, Frank Loehr, Ingrid Fleming, Volker Doetsch, Manfred Schubert-Zsilavec, Dieter Steinhilber, Ewgenij Proschak. Complementary Screening Techniques Yielded Fragments that Inhibit the Phosphatase Activity of Soluble Epoxide Hydrolase, *ChemMedChem* **2011**, 6, 2146–2149.

## 11 Danksagung

## *Danksagung*

12Anhang

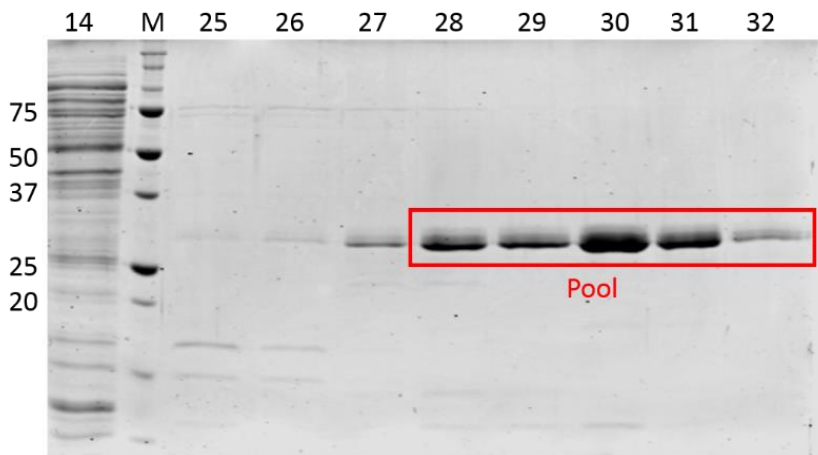


Abbildung 46: SDS-PAGE von VIM-1 nach der HisTrap

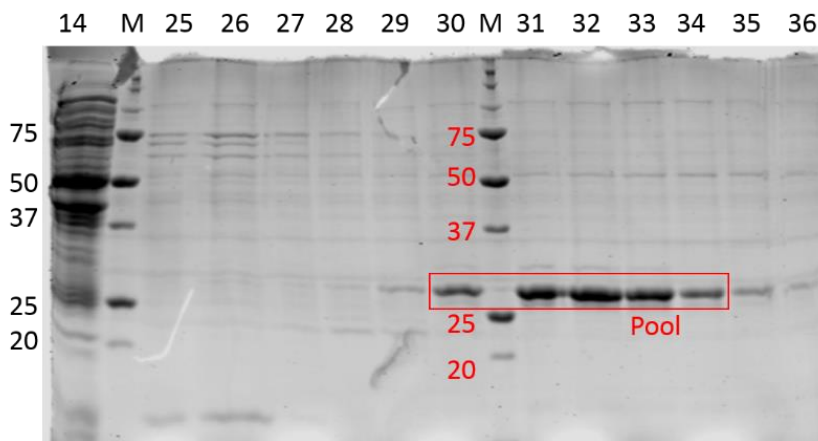


Abbildung 47: SDS-PAGE von IMP-7 nach der HisTrap

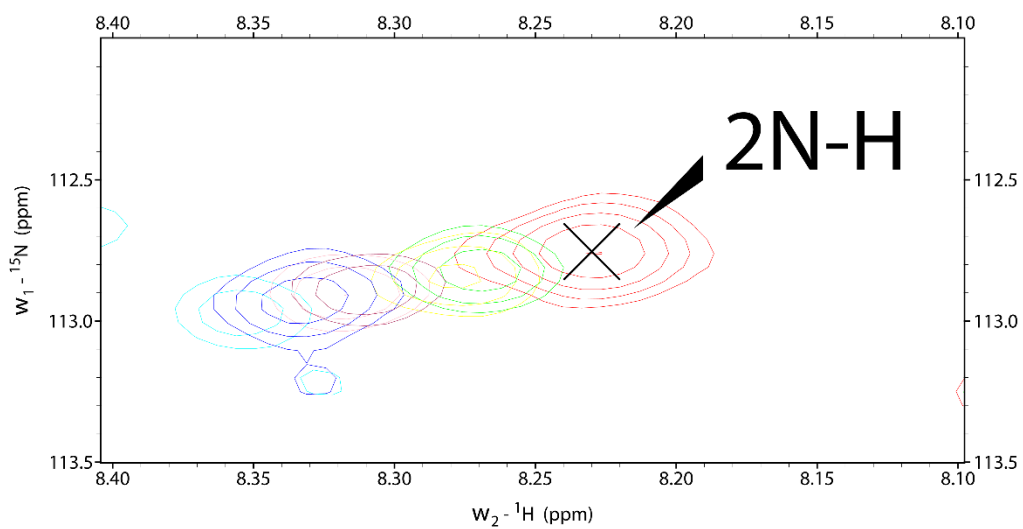


Abbildung 48: Spur 2 der Titration

## Anhang

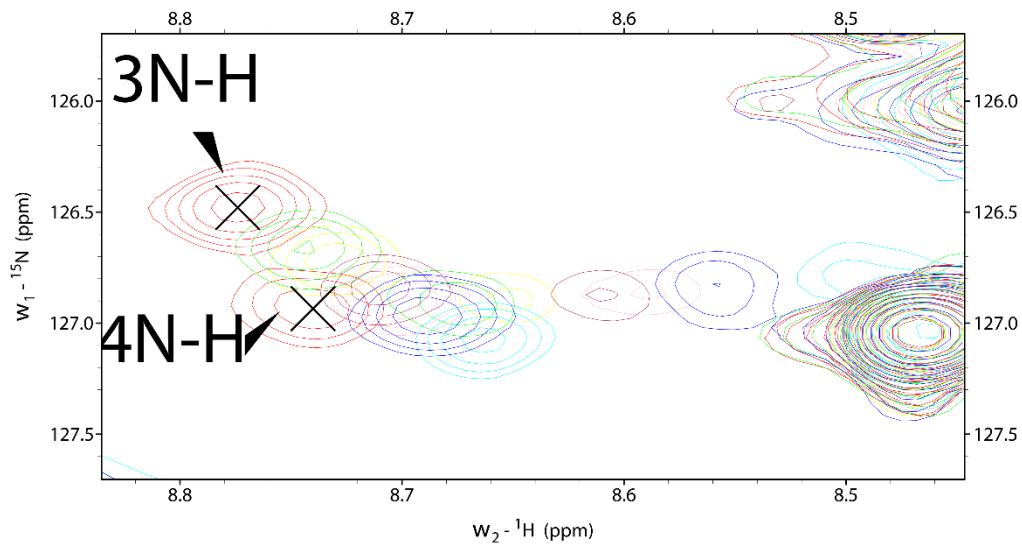


Abbildung 49: Spur 3 und 4 der Titration

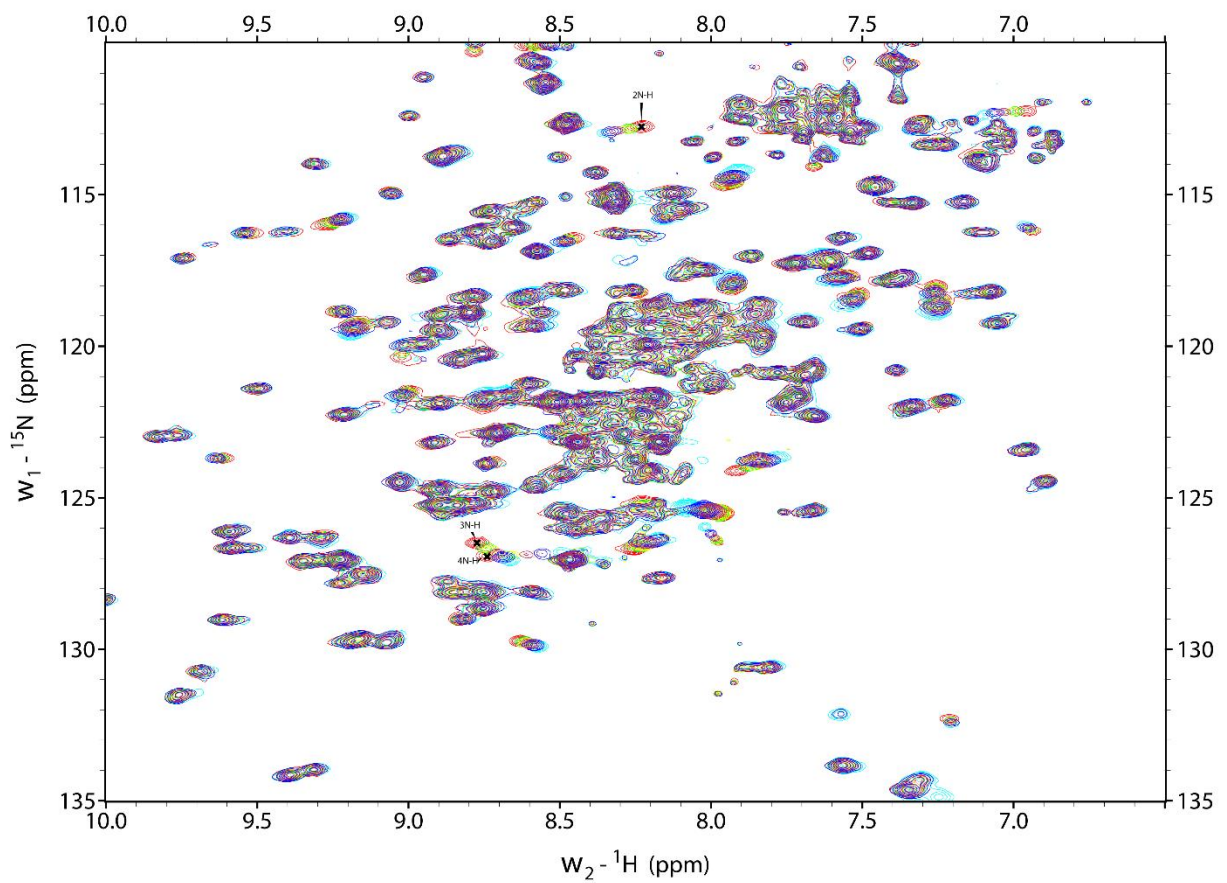


Abbildung 50: Komplettes HSQC-Spektrum der Titration von Fragment 71 zur NDM-1. Unterschiedliche Farben bedeuten verschiedene Inhibitor-Konzentrationen



# Anhang

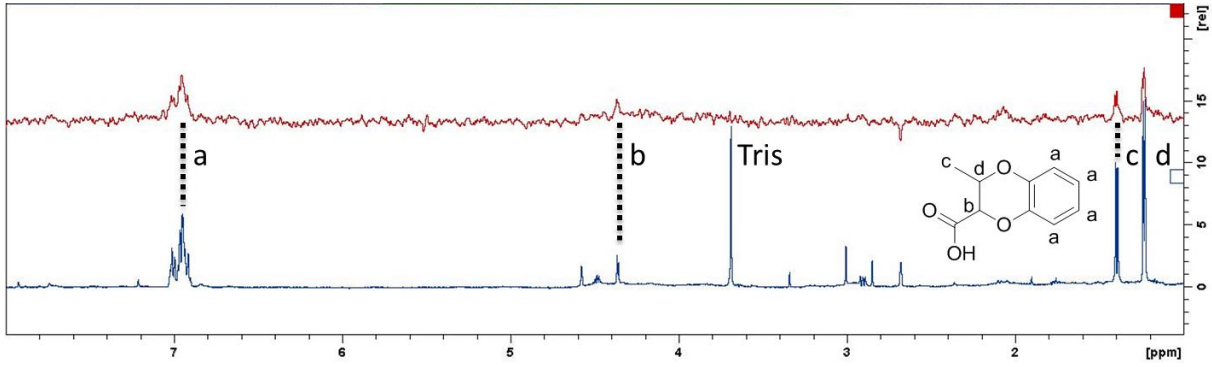


Abbildung 51: STD-NMR-Spektrum von MBL73 (400 µM) mit NDM-1

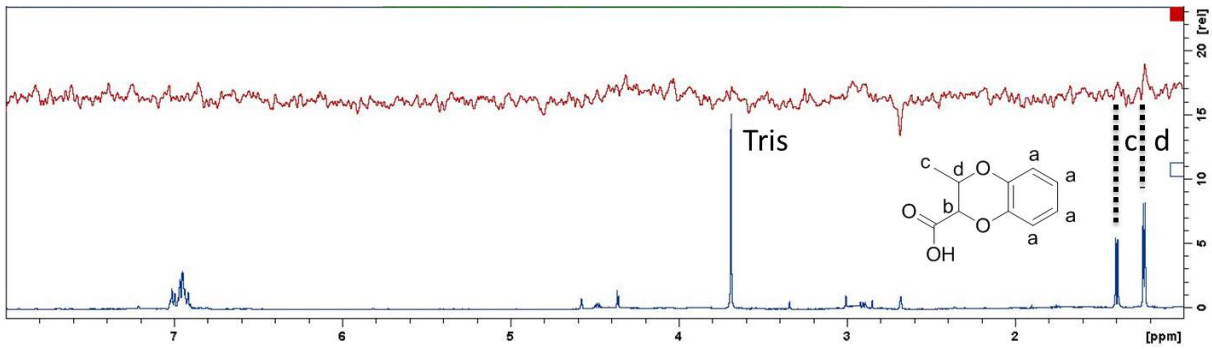


Abbildung 52: STD-NMR-Spektrum von MBL73 (400 µM) mit IMP-7

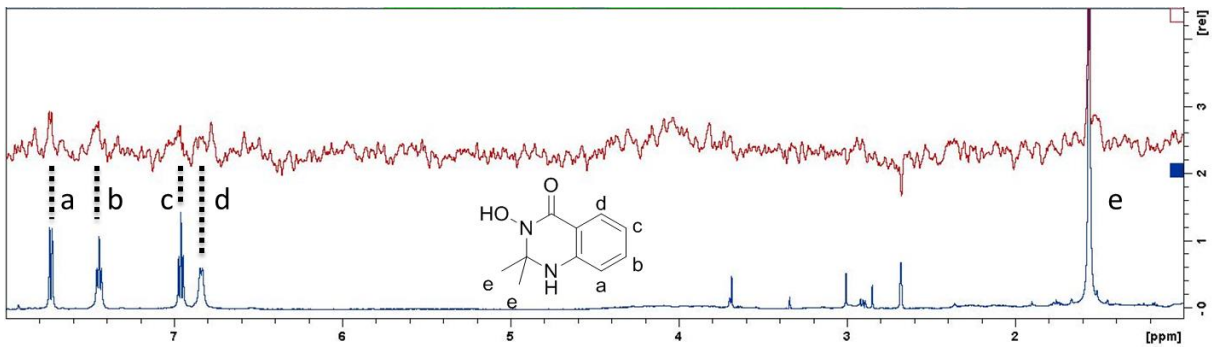


Abbildung 53: STD-NMR-Spektrum von MBL65 (400 µM) mit VIM-1

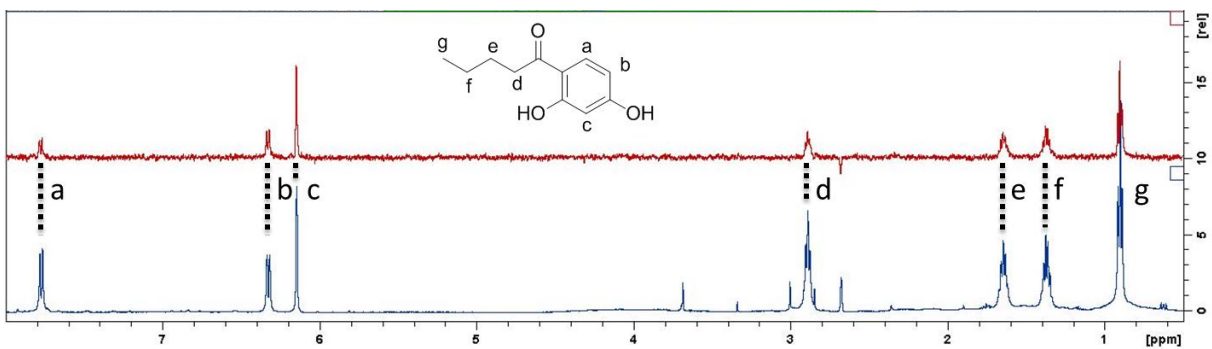


Abbildung 54: STD-NMR-Spektrum von MBL79 (800 µM) mit VIM-1

## Anhang

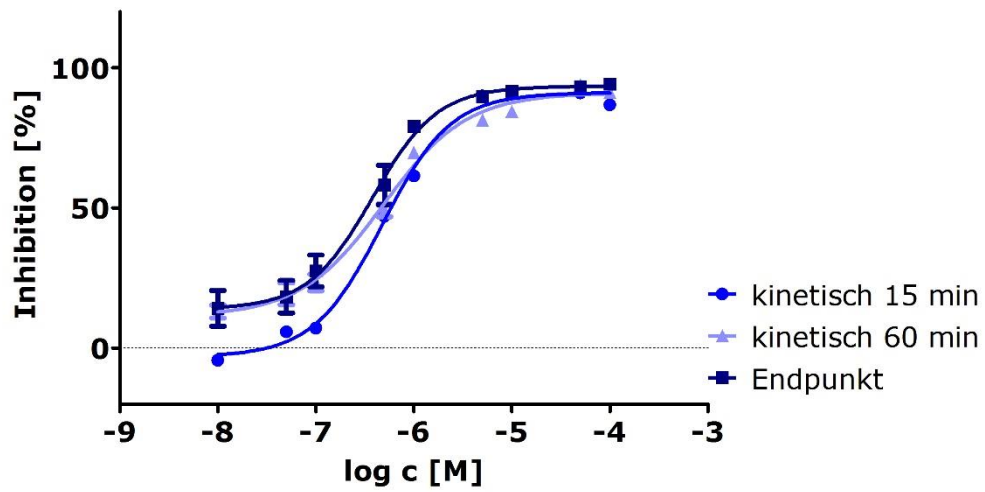


Abbildung 55:  $IC_{50}$ -Kurve des Referenz-Inhibitors Ebselen. Kinetische Auswertung mit jeweils 5 Punkten nach 60 Min und 15 Min, sowie nach Abstoppen der Reaktion nach 60 Min

## 13 Publikation

## Approved Drugs Containing Thiols as Inhibitors of Metallo- $\beta$ -lactamases: Strategy To Combat Multidrug-Resistant Bacteria

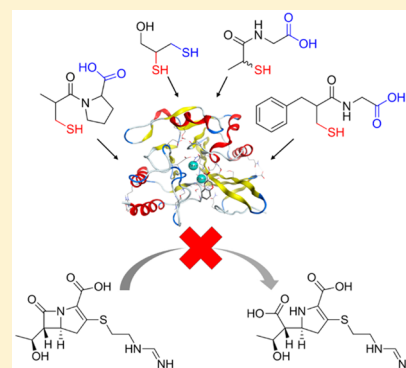
Franca-M. Klingler,<sup>†</sup> Thomas A. Wichelhaus,<sup>§</sup> Denia Frank,<sup>§</sup> Jenifer Cuesta-Bernal,<sup>‡</sup> Jasmin El-Delik,<sup>‡</sup> H. Florian Müller,<sup>†</sup> Hanno Sjuts,<sup>‡</sup> Stephan Göttig,<sup>§</sup> Arno Koenigs,<sup>§</sup> Klaas M. Pos,<sup>‡</sup> Denys Pogoryelov,<sup>‡</sup> and Ewgenij Proschak<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Institute of Pharmaceutical Chemistry, and <sup>‡</sup>Institute of Biochemistry, Goethe University Frankfurt, Max-von-Laue-Straße 9, 60438 Frankfurt, Germany

<sup>§</sup>Institute of Medical Microbiology and Infection Control, Paul-Ehrlich-Straße 40, 60596 Frankfurt, Germany

### S Supporting Information

**ABSTRACT:** Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics can be mediated by metallo- $\beta$ -lactamase enzymes (MBLs). An MBL inhibitor could restore the effectiveness of  $\beta$ -lactams. We report on the evaluation of approved thiol-containing drugs as inhibitors of NDM-1, VIM-1, and IMP-7. Drugs were assessed by a novel assay using a purchasable fluorescent substrate and thermal shift. Best compounds were tested in antimicrobial susceptibility assay. Using these orthogonal screening methods, we identified drugs that restored the activity of imipenem.



### ■ INTRODUCTION

The increasing occurrence of multidrug-resistant bacteria is one of the major global threats to human health.<sup>1</sup> Especially Gram-negative bacteria exhibit several genes encoding for  $\beta$ -lactamases, proteins that efficiently hydrolyze  $\beta$ -lactam antibiotics. With the increasing prevalence of  $\beta$ -lactamases the effectiveness of  $\beta$ -lactam antibiotics becomes more and more impaired. Despite this,  $\beta$ -lactam antibiotics are still the most applied antibiotics in the world due to high efficacy and broad activity range combined with low toxicity in humans. Inhibiting  $\beta$ -lactamases could restore the effectiveness of  $\beta$ -lactam antibiotics in resistant organisms.<sup>2</sup> Of critical importance are the Gram-negative bacteria among the ESKAPE pathogens (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species).<sup>3</sup> These multidrug-resistant bacteria can even carry more than one resistance plasmid obtained by horizontal gene transfer and are highly pathogenic especially for immunocompromised patients.

$\beta$ -Lactamases can be categorized in mainly two groups.<sup>4</sup> Serine- $\beta$ -lactamases covalently bind to a hydrolyzed  $\beta$ -lactam by a nucleophilic serine moiety. They are further categorized as Ambler class A, C, or D, and most of them can be inhibited by compounds like clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam. Metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs, Ambler class B) contain one or two zinc ions in their active site to nucleophilically attack the  $\beta$ -lactams via a polarized water molecule. They cleave all known  $\beta$ -lactam antibiotics except for monobactams and are not

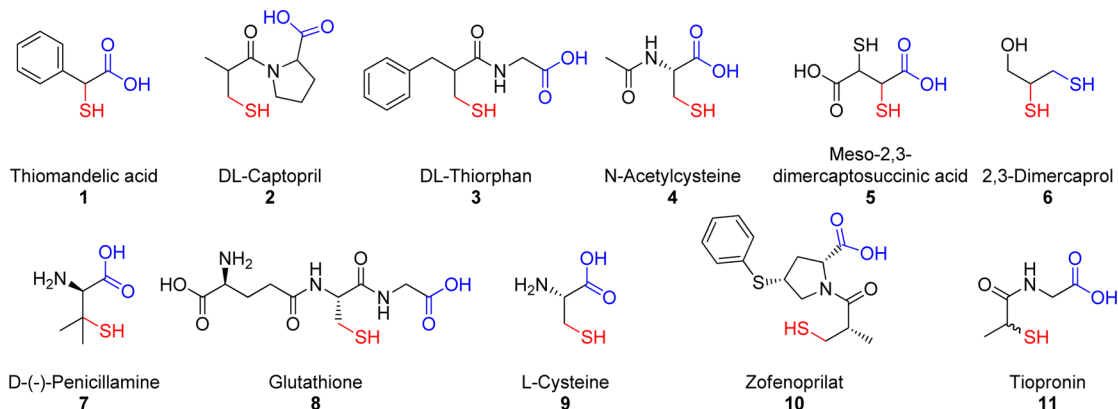
susceptible to any serine- $\beta$ -lactamase inhibitors. Further categorization into subfamily B1, B2, and B3 is determined by sequence identity and the number of bound zinc ions. King et al. recently reported the natural product aspergillomarasmine A to have MBL inhibitory activity in a murine infection model;<sup>5</sup> however, no inhibitors of class B MBLs are clinically approved so far. Thus, there is a high unmet medical need to develop novel effective inhibitors of MBLs to restore the activity of  $\beta$ -lactam antibiotics.

The objective of this study was to find already approved compounds that inhibit highly prevalent and clinically relevant MBLs. As was stated by the Nobel laureate Sir James Black: "The most fruitful basis for the discovery of a new drug is to start with an old drug."<sup>6</sup> Thiol groups are known zinc chelators<sup>7</sup> and therefore inhibit MBLs, like it is shown for captopril, an approved angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor.<sup>8</sup> Recent studies<sup>9,10</sup> indicate the inhibitory potential of captopril derivatives as NDM-1 inhibitors. Hence we chose already approved drugs that exhibit sulfhydryl moieties as screening compounds. We established a novel sensitive fluorescence-based assay platform for studying inhibition of  $\beta$ -lactamases using a commercially available substrate.<sup>11</sup> Furthermore, we confirmed the direct binding of hit compounds by performing thermal shift assays on three class B MBLs (New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1 (NDM-1), Verona integron encoded metallo- $\beta$ -

Received: November 28, 2014

Published: March 27, 2015

Chart 1. Structures of Selected Compounds



lactamase 1 (VIM-1), imipenemase 7 (IMP-7)). The most promising compounds were tested for their activity against MBL expressing bacteria and provide promising opportunities for further development.

## RESULTS AND DISCUSSION

Several assay platforms for MBLs have been reported, most of them based on chromogenic substrates, like nitrocefin or imipenem.<sup>12,13</sup> Because of rapid decomposition of those substrates by the MBLs and a bad signal-to-noise ratio at low substrate concentrations, they are not optimal for compound screening. Substrates with fluorophores have been published showing the advantages of better sensitivity and optimized kinetic parameters<sup>14</sup> but having the disadvantage that synthesis capabilities are needed in the first instance.<sup>15</sup> To overcome these drawbacks, we established a fluorescence-based assay that is applicable for all MBLs that cleave cephalosporins. The fluorogenic substrate dicefalotinodifluorofluorescein is commercially available and therefore opens up the access to a fluorescence-based assay without the necessity of synthetic work. Dicefalotinodifluorofluorescein (~1.1 kDa) consists of a difluorofluorescein core coupled to two cefalotin moieties. After cleavage of the cefem ring by a MBL, the substrate decomposes under release of the fluorescent difluorofluorescein (see Supporting Information). This procedure offers a sensitive, reliable, cheap, and easily available assay with excellent  $Z'$ -factors (>0.8)<sup>16</sup> suitable for diverse MBLs as shown in our screening.

We chose the clinically relevant MBLs NDM-1, VIM-1, and IMP-7 identified from isolates from patient samples. Genes encoding for MBLs were cloned into pET24a(+) expression vector to yield proteins carrying a hexahistidine tag for purification and were transformed in *E. coli* BL21(DE3). Overexpression was done in LB medium, and purification was via imidazole gradient on Ni-NTA column with AEKTA purifier. The purity of MBLs was over 95% as determined by SDS-PAGE. We selected 11 approved agents or their active metabolites carrying a free thiol moiety (Chart 1). All compounds are approved but for non-anti-infective indication. These compounds were subsequently purchased, and their inhibitory activity against NDM-1, VIM-1, and IMP-7 was evaluated. All substances were solved in DMSO (50 mM) and further diluted in assay buffer to reach the first test concentration of 50  $\mu$ M.

Interestingly different inhibition patterns could be observed and not all compounds were able to inhibit all three tested

MBLs (Figure 1). This implies that the thiol moiety itself is not the only parameter for inhibition of MBLs. The fact that thiols are selective inhibitors for different  $\beta$ -lactamases could not have been foreseen because the chelating effect should be the same in all binding sites. For compounds showing inhibition over 50% on at least two targets  $IC_{50}$  values were measured (Table

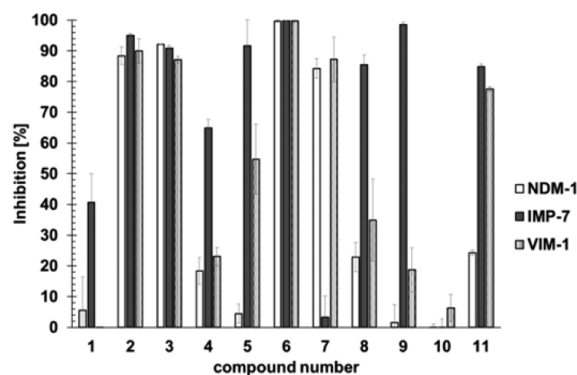


Figure 1. Inhibition [%]  $\pm$  SEM of the compounds at 50  $\mu$ M in the fluorescence-based assay.

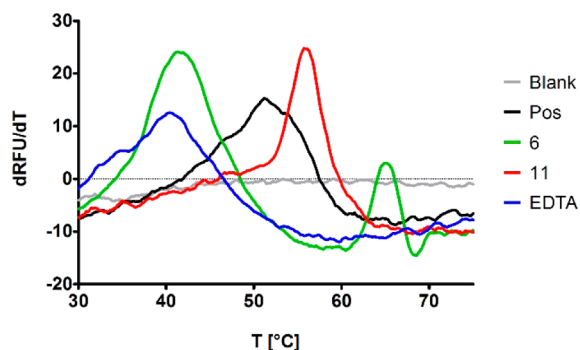
1). Some thiols (5, 7, 8) were not stable in assay buffer and discarded for further evaluation. Captopril (2), which is approved as ACE inhibitor for treatment of hypertension, showed low  $IC_{50}$  values on all three enzymes (NDM, 6.4  $\mu$ M; IMP, 2.9  $\mu$ M; VIM, 6.8  $\mu$ M). Thiorphan (3), the active metabolite of racecadotril, is an enkephalinase inhibitor and exhibits antidiarrheal effects in human. It was active on all three enzymes, too (NDM, 1.8  $\mu$ M; IMP, 5.3  $\mu$ M; VIM, 5.8  $\mu$ M). Dimercaprol (6), also known as British anti-Lewisite, which is a drug against toxic metal poisoning, showed the lowest  $IC_{50}$  values of all compounds tested on MBLs (NDM, 1.3  $\mu$ M; IMP, 3.5  $\mu$ M; VIM, 0.6  $\mu$ M). Compound 11, tiopronin, another drug against heavy metal poisoning, liver diseases, or cystenuria, was active on all MBLs (NDM, 84  $\mu$ M; IMP, 5.9  $\mu$ M; VIM, 8.6  $\mu$ M). Interestingly, the widespread molecule *N*-acetylcysteine (4) was able to inhibit IMP-7 ( $IC_{50}$  of 20.7  $\mu$ M).

To ensure that inhibitory effects result from binding of the compounds to the proteins but not from withdrawing zinc from the active site, we chose thermal shift measurement as secondary assay, a method that is widely applied to assess ligand binding.<sup>17</sup> This assay measures the melting temperature of the protein with or without an inhibitor by monitoring a fluorescent dye. In an aqueous solution of folded protein the

**Table 1.**  $IC_{50}$  (Bold) of Selected Compounds (in  $\mu M$ ) and Thermal Shifts (TS) (in  $\Delta$  °C) of Compounds at 500  $\mu M$  on Different MBLs

compd	$IC_{50}/TS$		
	NDM-1	IMP-7	VIM-1
2	<b>6.4</b> /7.0	2.9/3.4	6.8/2.2
3	<b>1.8</b> /7.2	5.3/3.6	5.8/4.6
4	inactive	20.7/1.1	inactive
6	<b>1.3</b> /8.3	3.5/1.7	<b>0.6</b> /14.9
11	<b>84</b> /4.5	5.9/1.8	8.6/5.1

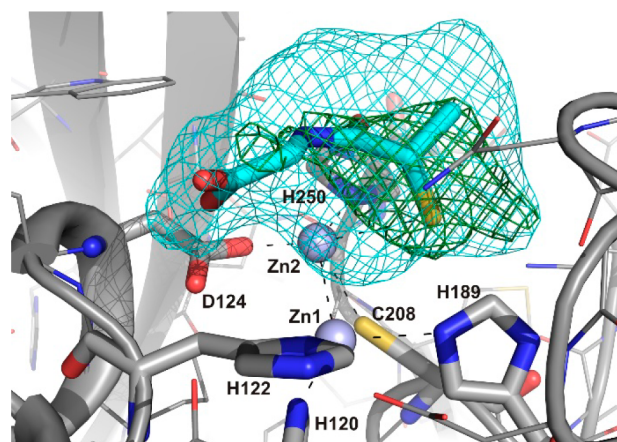
dye signal is low, but with increasing temperature the protein unfolds, exposes its hydrophobic core regions, and results in intensification of fluorescence.<sup>18</sup> It is postulated that the formation of an inhibitor protein complex stabilizes the protein, resulting in an increased melting temperature. Compounds that withdraw zinc ions from the active site, like EDTA, destabilize the protein and diminish the melting temperature (Figure 2).



**Figure 2.** Derivative of the melting curves of NDM-1 without (Pos) and with different inhibitors (500  $\mu M$ ). The maximum turning point of the derivative indicates the melting temperature of the protein.

In contrast, active site binders like tiopronin (**11**) cause an increase of the protein melting temperature. Thermal shifts are listed in Table 1 and indicated in  $+\Delta$  °C. Strong shifts can be observed for the selected compounds, thereby confirming the results of the functional assay. Interestingly **6** shows a double peak in the first derivative of the melting curve on NDM protein (Figure 2). We assume that this is an effect of enzyme destabilization by pulling zinc out of the binding site first and binding subsequently.

The direct binding of tiopronin (**11**) to NDM could be confirmed by X-ray crystallography (Figure 3). The structure of NDM-1 in complex with tiopronin was solved using molecular replacement with corresponding model of NDM-1 (PDB entry 3Q6X)<sup>12</sup> at 2.6 Å resolution. The obtained NDM-1–tiopronin complex crystals in the space group  $P4_12_12_1$  contained two protein chains in the asymmetric unit (Supporting Information). In the initial  $F_o - F_c$  difference map obtained after the molecular replacement, the pronounced region of the positive electron density (Figure 3, green mesh) was identified in the vicinity of the dizinc-containing active sites of both protein chains in the asymmetric unit. This region of positive electron density was interpreted as bound ligand after soaking of the crystals with tiopronin. Properties of the obtained  $2F_o - F_c$  electron density map allowed placement of tiopronin molecule in several conformations. Unfortunately it was not possible to unambiguously discriminate all possible conformations of the ligand in the active site of NDM-1 molecule. Therefore,



**Figure 3.** Ligand interactions in the X-ray structure of NDM-1 active site in complex with tiopronin (**11**). Ribbon representation of NDM-1 is shown. Tiopronin molecule and neighboring protein environment are shown as bold and thin stick models. The positive  $F_o - F_c$  difference maps around the molecule were calculated from the model before ligand assignment (green mesh contoured at  $2.5\sigma$  and 2 Å around the ligand) and from the final model with the omitted ligand (cyan mesh, contoured at  $3\sigma$  and 2 Å around the ligand). The black-dotted lines indicate the interactions of **11** with the zinc ions (light blue spheres) and the key residues of the active site.

tiopronin molecule was fitted into  $2F_o - F_c$  electron density map with the most profound orientation and refined at 50% occupancy for all ligand atoms. In the present model we propose that the thiol moiety of tiopronin (**11**) intercalates directly between the zinc atoms and replaces the catalytic water molecule found in the apo structure at this site. Therefore, tiopronin (**11**) competitively inhibits the active site of the enzyme in a similar manner as has been proposed for L-captopril.<sup>13</sup>

Compounds showing inhibition in the fluorescence assay and binding in the thermal shift assay were further evaluated for their potential to inhibit bacterial  $\beta$ -lactamase activity by means of antimicrobial susceptibility testing. For that purpose, imipenem-resistant Gram-negative bacteria isolated from patient samples and genetically modified *E. coli* laboratory strains carrying the MBLs NDM-1, IMP-7, and VIM-1 were exposed to imipenem combined with compounds. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of imipenem with and without the  $\beta$ -lactamase inhibitor were determined (Table 2). Notably, MBL inhibitors alone did not exhibit any intrinsic antibacterial activity at 128 mg/L in any of the isolates. All compounds were able to reduce MICs of imipenem for several MBLs. Notably, thiorphan (**3**) was able to significantly inhibit NDM-1, VIM-1, and IMP-7 in the case of *E. coli* BL21(DE3) derivatives.

## CONCLUSION

We developed an easily available, fluorescence-based, functional assay for  $\beta$ -lactamase inhibitor testing. The reliability of the system was evaluated on three different class B MBLs: NDM-1, VIM-1, and IMP-7. To find an inhibitor for these enzymes, we tested 11 approved drugs containing a thiol moiety in the fluorescent assay and  $IC_{50}$  values were determined. Remarkably, not all drugs inhibited MBLs, although every compound carried a thiol group. This effect is interesting because MBLs have conserved binding sites and the chelating effect to the zinc ion should be similar. However, comparison of substrate binding sites of NDM-1, VIM-1, and IMP-7 indicates substantial

Table 2. MIC (mg/L) of Imipenem for Clinical Isolates and *E. coli* Transformants with Respective MBL in pET24a<sup>a</sup>

isolates	Imi	Imi + 2	Imi + 3	Imi + 4	Imi + 6	Imi + 11
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) NDM-1	64	32 (2)	1 ( <b>64</b> )	32 (2)	2 ( <b>32</b> )	16 (4)
<i>K. pneumoniae</i> T2301 NDM-1	32	8 (4)	8 (4)	16 (2)	16 (2)	8 (4)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) IMP-7	2	0.25 (8)	0.25 (8)	2 (1)	0.5 (4)	1 (2)
<i>P. aeruginosa</i> T2226 IMP-7	32	32 (1)	16 (2)	8 (4)	16 (2)	1 (32)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) VIM-1	32	16 (2)	4 (8)	32 (1)	16 (2)	2 (16)
<i>K. pneumoniae</i> T2216 VIM-1	16	1 (16)	4 (4)	8 (2)	4 (4)	8 (2)

<sup>a</sup>The median of three experiments is given. MBL inhibitors in combination with imipenem (Imi) are tested at a constant concentration of 128 mg/L. Significant fold change ( $\geq 4$ ) is indicated in bold.

differences in shape and size (Supporting Information Figure S5) which could have an impact on inhibitor binding. To discriminate between zinc-withdrawing and direct binding to the enzyme, thermal shift assay was conducted. This assay combination provides a method to find inhibitors of MBLs that really bind to the active site and do not only chelate zinc. Most promising compounds were passed to antimicrobial susceptibility testing using laboratory strains and patient isolates. Results showed that some of our compounds partially restored the efficacy of imipenem against pathogenic bacteria. The difference between the results of the functional assay and cell data may be due to the fact that the compounds were not able to pass the outer membrane of Gram-negative bacteria.

With our approach we could show that some of the selected compounds inhibit recombinant protein by binding to the protein and partially restore the function of a  $\beta$ -lactam antibiotic in Gram-negative bacteria. This three-step approach provides a platform for the further development of novel specific inhibitors but indicates the difficulties of finding a universal compound inhibiting all or most MBLs. Overall, we found four approved drugs, which inhibit three clinically important MBLs, namely, captopril (2), thiorphan (3), dimercaprol (6), and tiopronin (11). This result yields a good starting point for the development of potent MBL inhibitors. The PK data of captopril (2),<sup>19</sup> thiorphan (3),<sup>20</sup> and tiopronin (11)<sup>21</sup> indicate that concentrations required for in vitro inhibition of MBLs can be reached after usual dosage of these drugs (Supporting Information, Table S2). However, concentrations needed for restoring the activity of imipenem cannot be reached. Thus, the primary optimization goal might be the uptake and activity in pathogens.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Protein Purification.** *E. coli* clones harboring MBL plasmid were grown in 500 mL of LB medium containing kanamycin (100 mg/L) at 37 °C to an OD<sup>600</sup> of 0.8–1 before induction with 400  $\mu$ M IPTG. Cells were allowed to grow for another 18–20 h at 22 °C and harvested (5000 rpm for 30 min). Cell pellets were resuspended in 30 mL of buffer (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.0, 1 dose of Complete EDTA free and a trace amount of DNase I) before passage through a cell disruptor (Constant Systems) three times at 14 500 psi. Broken cells were centrifuged for 45 min at 20 000g at 4 °C to remove unbroken cells and cell debris and subsequently subjected to high spin centrifugation at 100 000g for 70 min at 4 °C. The supernatant was applied to a 5 mL HisTrap HP (GE Healthcare) column, which was washed with buffer A (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 8.0) containing 4 mM imidazole. Purified hexa-his-tagged protein was eluted using a linear gradient from 4 to 400 mM imidazole at around 80 mM imidazole. To remove imidazole, protein was dialyzed against buffer A using a 3.5 kDa cutoff membrane followed by concentration using CentriPrep concentrator (Millipore) with a 5 kDa cutoff membrane. Protein concentrations were determined according to the method of

Bradford. Purity and identity of MBLs (>95%) were determined by SDS–PAGE and mass spectrometry analysis, respectively.

**Fluorescence Based Assay.** Activity assays for MBLs were performed at room temperature in black polystyrol 96-well plates (Corning) using dicefalotindifluorofluorescein, known as Fluorocillin (Invitrogen Darmstadt, Germany), as substrate. An amount of 10  $\mu$ L of the respective test compound at different concentrations was incubated with 80  $\mu$ L of enzyme in assay buffer (HEPES 50 mM, pH 7.5 containing 0.01% Triton X-100; final protein concentrations of (NDM-1) 0.1 nM, (VIM-1) 1.5 nM, (IMP-1) 0.15 nM) during 30 min at room temperature. Each well contained the same amount of 1% DMSO. Briefly, an amount of 10  $\mu$ L of Fluorocillin substrate (0.1  $\mu$ g/well final concentration) was added to yield the final assay volume of 100  $\mu$ L. The fluorescence emitted by the fluorescent product difluorofluorescein was monitored every 45 s for 30 cycles using a TECAN fluorescent plate reader Infinite 200 (excitation at 495 nm and emission at 525 nm) and was compared to a standard curve. The rate of the enzymatic reaction was obtained by dividing the quantity of the fluorescent product (RFU) by time (minutes). Negative controls were performed in the absence of enzyme, whereas the positive controls were done in the presence of enzyme and in the absence of inhibitors. The inhibitory effect of each substance was measured as triplicates in three independent experiments. IC<sub>50</sub> values were calculated using data obtained from measurements with at least six different inhibitor concentrations, applying a sigmoidal dose response (variable slope with four parameters) equation using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) software.

**Thermal Shift Assay.** Thermal shift assay was performed in clear 96-well plates (Invitrogen) using SYPRO Orange (Invitrogen Darmstadt, Germany) as dye. An amount of 4  $\mu$ L of test compound (500  $\mu$ M final concentration) in assay buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, containing 0.01% Triton X-100 for NDM and IMP; 50 mM MES, pH 6.0, 50 mM NaCl for VIM) was mixed with 32  $\mu$ L of enzyme in assay buffer (final protein concentrations for all MBLs 5  $\mu$ M) and 4  $\mu$ L of SYPRO Orange (2.5  $\times$  final concentration). Temperature-dependent fluorescence increase reporting protein denaturation was measured in triplicate in an ICycler (Bio-Rad) from 20 to 90 °C in steps of 0.2 °C at 300 nm excitation and 570 nm emission wavelength. The first derivative of the MBL melting curve was calculated using the Graph Pad software.

**Broth Microdilution Assay.** Antimicrobial susceptibility was evaluated by determining the minimal inhibitory concentration (MIC), i.e., the lowest concentration of the antimicrobial agent that prevents visible growth of a microorganism in a broth microdilution susceptibility test, following guidelines set by Clinical and Laboratory Standards Institute. MBL inhibitors were tested at a fixed concentration of 128  $\mu$ g/mL in combination with imipenem. A 2-fold or more MIC reduction of imipenem plus MBL inhibitor compared to imipenem alone was considered a significant increase of susceptibility. All MICs were determined in triplicate. Quality control was performed according to CLSI recommendations.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

Procedures for cloning and results from protein gels and crystallization. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*E-mail: [proschak@pharmchem.uni-frankfurt.de](mailto:proschak@pharmchem.uni-frankfurt.de). Telephone: (+49) 69 79 82 93 01.

### Author Contributions

F.-M.K. established protein purification, activity assay, thermal shift assay, tested the compounds, and wrote the manuscript. S.G. and A.K. cloned the enzymes from pathogenic bacteria. D.F. tested the compounds in pathogenic bacteria. H.F.M. purified the recombinant proteins. D.P., H.S., J.E.-D., and J.C.-B. performed the X-ray crystallography studies. E.P., T.A.W., and K.M.P. conducted the research.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland, for provision of synchrotron radiation beam time at the beamlines PX and PXIII of the SLS and thank Meitian Wang and Vincent Olieric for assistance.

## ■ ABBREVIATIONS USED

MBL, metallo- $\beta$ -lactamase; IC<sub>50</sub>, half minimal inhibitory concentration; MIC, minimal inhibitory concentration; Imi, imipenem

## ■ REFERENCES

- (1) WHO. Antibiotic Resistance. Global Report on Surveillance. 2014. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf) (accessed Oct 10, 2014).
- (2) Vella, P.; Hussein, W. M.; Leung, E. W. W.; Clayton, D.; Ollis, D. L.; Mitić, N.; Schenk, G.; McGeary, R. P. The Identification of New Metallo- $\beta$ -lactamase Inhibitor Leads from Fragment-Based Screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3282–3285.
- (3) Boucher, H. W.; Talbot, G. H.; Bradley, J. S.; Edwards, J. E.; Gilbert, D.; Rice, L. B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 1–12.
- (4) Bush, K.; Jacoby, G. A. Updated Functional Classification of Beta-Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 969–976.
- (5) King, A. M.; Reid-Yu, S. a; Wang, W.; King, D. T.; De Pascale, G.; Strynadka, N. C.; Walsh, T. R.; Coombes, B. K.; Wright, G. D. Aspergillomarasmine A Overcomes Metallo- $\beta$ -lactamase Antibiotic Resistance. *Nature* **2014**, *510*, 503–506.
- (6) Raju, T. N. The Nobel Chronicles. *Lancet* **2000**, *355*, 1022.
- (7) Bebrone, C. Metallo-[beta]-lactamases (Classification, Activity, Genetic Organization, Structure, Zinc Coordination) and Their Superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74*, 1686–1701.
- (8) Guo, Y.; Wang, J.; Niu, G.; Shui, W.; Sun, Y.; Zhou, H.; Zhang, Y.; Yang, C.; Lou, Z.; Rao, Z. A Structural View of the Antibiotic Degradation Enzyme NDM-1 from a Superbug. *Protein Cell* **2011**, *2*, 384–394.
- (9) Liénard, B. M. R.; Garau, G.; Horsfall, L.; Karsisiotis, A. I.; Damblon, C.; Lassaux, P.; Papamical, C.; Roberts, G. C. K.; Galleni, M.; Dideberg, O.; Frère, J.-M.; Schofield, C. J. Structural Basis for the Broad-Spectrum Inhibition of Metallo-beta-lactamases by Thiols. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 2282–2294.
- (10) Li, N.; Xu, Y.; Xia, Q.; Bai, C.; Wang, T.; Wang, L.; He, D.; Xie, N.; Li, L.; Wang, J.; Zhou, H.-G.; Xu, F.; Yang, C.; Zhang, Q.; Yin, Z.;

Guo, Y.; Chen, Y. Simplified Captopril Analogues as NDM-1 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 386–389.

(11) Rukavishnikov, A.; Gee, K. R.; Johnson, I.; Corry, S. Fluorogenic Cephalosporin Substrates for  $\beta$ -Lactamase TEM-1. *Anal. Biochem.* **2011**, *419*, 9–16.

(12) Makena, A.; van Berkel, S. S.; Lejeune, C.; Owens, R. J.; Verma, A.; Salimraj, R.; Spencer, J.; Brem, J.; Schofield, C. J. Chromophore-Linked Substrate (CLS405): Probing Metallo- $\beta$ -lactamase Activity and Inhibition. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1923–1929.

(13) Wang, J.-F.; Chou, K.-C. Metallo- $\beta$ -lactamases: Structural Features, Antibiotic Recognition, Inhibition, and Inhibitor Design. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, *13*, 1242–1253.

(14) Van Berkel, S. S.; Brem, J.; Rydzik, A. M.; Salimraj, R.; Cain, R.; Verma, A.; Owens, R. J.; Fishwick, C. W. G.; Spencer, J.; Schofield, C. J. Assay Platform for Clinically Relevant Metallo- $\beta$ -lactamases. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6945–6953.

(15) Shi, H.; Cheng, Y.; Lee, K. H.; Luo, R. F.; Banaei, N.; Rao, J. Engineering the Stereochemistry of Cephalosporin for Specific Detection of Pathogenic Carbapenemase-Expressing Bacteria. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 8113–8116.

(16) Iversen, P. W.; Eastwood, B. J.; Sittampalam, G. S.; Cox, K. L. A Comparison of Assay Performance Measures in Screening Assays: Signal Window, Z' Factor, and Assay Variability Ratio. *J. Biomol. Screening* **2006**, *11*, 247–252.

(17) Pantoliano, M. W.; Petrella, E. C.; Kwasnoski, J. D.; Lobanov, V. S.; Myslik, J.; Graf, E.; Carver, T.; Asel, E.; Springer, B. A.; Lane, P.; Salemme, F. R. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. *J. Biomol. Screening* **2001**, *6*, 429–440.

(18) Niesen, F. H.; Berglund, H.; Vedadi, M. The Use of Differential Scanning Fluorimetry to Detect Ligand Interactions That Promote Protein Stability. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2212–2221.

(19) Li, K.; Tan, L.; Zhou, J. A. HPLC Determination of Captopril in Human Plasma and Its Pharmacokinetic Study. *Biomed. Chromatogr.* **1996**, *10*, 237–239.

(20) Eberlin, M.; Mück, T.; Michel, M. C. A Comprehensive Review of the Pharmacodynamics, Pharmacokinetics, and Clinical Effects of the Neutral Endopeptidase Inhibitor Racecadotril. *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 93.

(21) Carlsson, M. S.; Denneberg, T.; Emanuelsson, B.-M.; Kogedal, B.; Lindgren, S. Pharmacokinetics of Oral Tiopronin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1993**, *45*, 79–84.