

**Bekämpfung antibakterieller Resistenz:
Entwicklung neuartiger Enzymassays zur Charakterisierung von
Inhibitoren der Lipid A-Biosynthese**

*Fighting antimicrobial resistance:
Development of novel enzyme assays for the characterization of
inhibitors of lipid A biosynthesis*

Dissertation

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

Am Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

Vorgelegt von

Katharina Hoff

Hamburg, Juni 2024

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2018 bis Mai 2024 in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Ralph Holl am Institut für Organische Chemie des Fachbereiches Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften durchgeführt.

Erstgutachter: Professor Dr. Ralph Holl
Zweitgutachter: Professor Dr. Sebastian Wicha

Datum der Disputation: 26.07.2024
Datum der Druckfreigabe: 27.07.2024

Publikationsliste

1. K. Hoff, S. Mielniczuk, O. Agoglitta, M. T. Iorio, M. Caldara, E. F. Bülbül, J. Melesina, W. Sippl, R. Holl, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2020**, *28*, 115529.
2. A. Dreger, K. Hoff, O. Agoglitta, E. F. Bülbül, J. Melesina, W. Sippl, R. Holl, *Bioorganic Chemistry* **2021**, *117*, 105403.
3. A. Dreger, K. Hoff, O. Agoglitta, S.-K. Hotop, M. Brönstrup, P. Heisig, J. Kirchmair, R. Holl, *Bioorganic Chemistry* **2021**, *107*, 104603.
4. S. Wimmer, K. Hoff, B. Martin, M. Grewer, L. Denni, R. Lascorz Massanet, M. V. Raimondi, E. F. Bülbül, J. Melesina, S.-K. Hotop et al., *Bioorganic Chemistry* **2023**, *131*, 106331.
5. S. Mielniczuk, K. Hoff, F. Baseliouis, Y. Li, J. Hauptenthal, A. M. Kany, M. Riedner, H. Rohde, K. Rox, A. K. H. Hirsch, I. Krimm, W. Sippl, R. Holl, *Development of fragment-based inhibitors of the bacterial deacetylase LpxC with low nM activity* (submitted).

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	I
Aminosäureverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
1 Zusammenfassung	1
2 Abstract	5
3 Einleitung	9
3.1 Antibakterielle Resistenz	11
3.2 Lipid A-Biosynthese	15
3.2.1 Die bakterielle Deacetylase LpxC	16
3.2.2 Die bakteriellen Acyltransferasen LpxA und LpxD	19
3.3 Inhibitoren der Lipid A-Biosynthese	23
3.3.1 Literaturbekannte LpxC-Inhibitoren	23
3.3.2 Literaturbekannte LpxA-Inhibitoren	25
3.3.3 Modellinhibitoren im AK Holl	26
3.4 Methoden	28
3.4.1 Enzymkinetische Untersuchungen	28
3.4.2 Massenspektrometrie	29
3.4.3 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	30
4 Aufgabenstellung	33
5 Ergebnisse und Diskussion	34
5.1 Die bakterielle Deacetylase <i>E. coli</i> LpxC C63A	34
5.1.1 Proteinexpression und -aufreinigung	34
5.1.2 Etablierung und Anwendung des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays	37
5.1.3 Entwicklung eines massenbasierten LpxC-Enzymassays	43
5.1.4 Entwicklung eines SPR-basierten LpxC-Enzymassays	51
5.1.5 Struktur-Wirkungsbeziehungen von LpxC-Inhibitoren	68
5.2 Übertragung der entwickelten Testsysteme auf weitere Enzyme der Lipid A-Biosynthese	100
5.2.1 Die bakterielle Deacetylase <i>P. aeruginosa</i> LpxC	100
I. Proteinexpression und -aufreinigung	100
II. Der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay	105
III. Der massenbasierte LpxC-Enzymassay	109
IV. Der SPR-basierte LpxC-Enzymassay	114
V. Struktur-Wirkungsbeziehungen	118
5.2.2 Die bakterielle Acyltransferase <i>E. coli</i> LpxA	131
I. Proteinexpression und -aufreinigung	131

II. SPR-Experimente	133
5.2.3 Die bakterielle Acyltransferase <i>E. coli</i> LpxA mit <i>N</i> -terminalem Strep-Tag II	137
I. Proteinexpression und -aufreinigung	138
II. SPR-Experimente	139
5.2.4 Vergleich und Bewertung der entwickelten Testsysteme	151
I. Vergleich der entwickelten Enzymassays zur Identifizierung von LpxC-Inhibitoren	151
II. Vergleich der SPR-basierten Enzymassays zur Identifizierung von LpxA-Inhibitoren	155
5.3 Weiterführende Charakterisierung von LpxC-Inhibitoren	157
5.3.1 Kombinationsexperimente mit einem Effluxpumpeninhibitor	157
5.3.2 Kombinationsexperimente mit zugelassenen Antibiotika	161
5.3.3 Photoexperimente	167
6 Experimententeil	172
6.1 Materialien	172
6.1.1 Chemikalien	172
6.1.2 Verbrauchsmaterialien	173
6.1.3 Größenmarker	173
6.1.4 Kommerzielle Kits	173
6.1.5 Bakterienstämme	173
6.1.6 Plasmide	174
6.1.7 Proteinsequenzen	174
6.1.8 Puffer und Medien	175
6.1.9 Geräte und Software	179
6.2 Allgemeine und nach Optimierung routinemäßig angewandte Methoden	181
6.2.1 Biochemische Arbeiten	181
I. Methoden der Mikrobiologie	181
II. Methoden der Molekularbiologie	182
III. Proteinaufreinigung	183
6.2.2 Biologische Testung	184
I. Agardiffusionstests	184
II. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	185
III. Der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay	185
6.2.3 Der massenbasierte LpxC-Enzymassay	186
6.2.4 SPR-Experimente	187
I. Ungetaggte Enzyme	188
II. Enzyme mit <i>N</i> -terminalem Strep-Tag II	189
6.3 (Weiter-)Entwicklung von Testsystemen	190
6.3.1 Der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay	190
I. Einstellung der optimalen Enzymkonzentration	190

II. Bestimmung der Produktkonzentration anhand von Kalibrierkurven primärer Amine	190
III. Bestimmung enzymkinetischer Parameter	191
6.3.2 Der massenbasierte LpxC-Enzymassay	191
I. Überprüfung limitierender Reaktionsbedingungen	191
II. Bestimmung enzymkinetischer Parameter	192
III. Entwicklung standardisierter Reaktionsbedingungen	192
6.3.3 SPR-Experimente	193
I. <i>E. coli</i> LpxA	193
II. <i>E. coli</i> LpxA mit <i>N</i> -terminalem Strep-Tag II	194
III. <i>E. coli</i> LpxC C63A	195
IV. <i>E. coli</i> LpxC C63A mit <i>N</i> -terminalem Strep-Tag II	199
V. <i>P. aeruginosa</i> LpxC	200
6.4 <i>P. aeruginosa</i> LpxC	202
6.4.1 Proteinexpression und -aufreinigung	202
6.4.2 Der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay	203
6.5 Weiterführende biologische Testung	204
6.5.1 Kombinationsexperimente	204
I. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	204
II. Droplet-Plate-Assay	204
III. Konzentrations-Effektkurven	204
IV. Kombinationsansätze	205
6.5.2 Einfluss des Effluxpumpeninhibitors PAβN auf die MHK	206
6.5.3 Photoaktivierbare Substanzen	206
I. Bestimmung der antibakteriellen Aktivität	206
II. Bestimmung von K_i -Werten	207
7 Literaturverzeichnis	208
8 Anhang	212
8.1 Sicherheitsdatenblatt	212
8.2 KMR-Verzeichnis	217
8.3 Rohdaten der standardmäßig durchgeführten biologischen Testung	218
9 Danksagung	225
10 Eidesstattliche Erklärung	226

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

ABC	ATP-bindende Kasette (<i>ATP-binding cassette</i>)
ACP	Acyl-Carrier-Protein
AEX	Anionenaustauschchromatographie (<i>anion exchange chromatography</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
CAP	Katabolit-Aktivatorprotein (<i>catabolite activator protein</i>)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cfu	koloniebildende Einheiten (<i>colony forming units</i>)
CM5	carboxymethylierte Dextranschicht mit normaler Liganddichte
CM7	carboxymethylierte Dextranschicht mit höherer Liganddichte
D	Durchlauf
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E	Enzym Eluat (wenn Fraktion auf dem SDS-Gel)
EI	Elektronenstoßionisation
EPI	Effluxpumpeninhibitor
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ESBL	β -Lactamasen mit erweitertem Substratspektrum (<i>extended spectrum β-lactamases</i>)
ESI	Elektrosprayionisation
EXAFS	Röntgenabsorptionsspektroskopie (<i>extended x-ray absorption fine structure</i>)
F	Fraktion
FC	Flusszelle (<i>flow cell</i>)
GC	Gaschromatographie
HD	(<i>R</i>)-3-Hydroxydecanoyl
HM	(<i>R</i>)-3-Hydroxymyristoyl
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IEP	isoelektrischer Punkt (pH-Wert, bei dem die Nettoladung einer Aminosäure/ eines Proteins gleich Null ist)
KDO	2-Keto-3-desoxy-D-mannooctulosonsäure
Konfig.	Konfiguration
Konz.	Konzentration
L	Lysat
L β H	linksgängige β -Helix
LC	Flüssigchromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
LP	Laufpuffer
LPS	Lipopolysaccharid
M	Marker
MATE	<i>multidrug and toxin extrusion</i> (Familie von Effluxpumpen)
MFS	<i>major facilitator superfamily</i> (Familie von Membranproteinen)
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> Ribonucleinsäure

MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NTA	Nitilotriessigsäure (funktionalisierte SPR-Sensorchipoberfläche)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhanced Spectroscopy</i>
P	Protein
	Pellet (wenn Fraktion auf dem SDS-Gel)
PDB-ID	Identifikationscode in der Proteindatenbank
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Q1	erster Quadrupol-Analysator in der Tandem-Massenspektrometrie
Q3	dritter Quadrupol-Analysator in der Tandem-Massenspektrometrie
R	Rest (Substituent)
RND	<i>resistance-nodulation-(cell)division</i> (Superfamilie von Effluxpumpen)
S	Substrat
SA	Streptavidin (funktionalisierte SPR-Sensorchipoberfläche)
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SMR	<i>small multidrug resistance</i> (Familie von integralen Membranproteinen)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (<i>surface plasmon resonance spectroscopy</i>)
Standardabw.	Standardabweichung
STD	Sättigungs-Transfer-Differenz (<i>saturation transfer difference</i>)
tRNA	<i>transfer</i> Ribonucleinsäure
Ü	Überstand
ÜNK	Übernachtkultur
UDP	Uridindiphosphat
VEE	Effekt ausgeschlossenen Volumens (<i>volume exclusion effect</i>)
W	Waschen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organization</i>)

Chemikalien

βME	2-Mercaptoethanol
AcOH	Essigsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Borax	Dinatriumtetraborat-Decahydrat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
Gluc	Glucose
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
LB	<i>lysogeny broth</i> (Nährmedium)
MeOH	Methanol
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MHB	Müller-Hinton-Bouillon (Nährmedium)
NaCl	Natriumchlorid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
OPA	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
PAβN	Phenylalanin-Arginin-β-Naphthylamid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZnCl ₂	Zinkchlorid
ZnSO ₄	Zinksulfat

Lateinische Formelzeichen und Symbole

E_{\max}	maximaler Effekt
F	Fluoreszenzintensität
F_{\min}	minimale Fluoreszenzintensität
F_{\max}	maximale Fluoreszenzintensität
IC_{50}	Inhibitorkonzentration, bei der die biologische Aktivität zu 50% gehemmt ist Analog dazu gilt die Definition für jeden anderen Index
k_1	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (Substrat)
k_{-1}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (Substrat)
k_2	Wechselzahl eines Enzyms
k_{on}	Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (Ligand)
k_{off}	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (Ligand)
K_i	Inhibitionskonstante
K_D	Dissoziationskonstante
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
OD_{600}	optische Dichte (Absorption) bei $\lambda = 600$ nm
R_L	Immobilisierungslevel eines SPR-Experimentes
R_{\max}	maximale <i>response</i> eines SPR-Experimentes
t	Zeit(punkt)
T	Temperatur
v_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit

Griechische Formelzeichen und Symbole

Δ	Differenz
λ	Wellenlänge
Θ_0	Einstrahlwinkel, der vor Bindung Resonanzbedingungen hervorruft
Θ_1	Einstrahlwinkel, der nach Bindung Resonanzbedingungen hervorruft

Bakterienstämme

<i>A. aeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>L. interrogans</i>	<i>Leptospira interrogans</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Enzyme

LpxA	UDP- <i>N</i> -Acetylglucosaminacyltransferase
^{Ec} LpxA	UDP- <i>N</i> -Acetylglucosaminacyltransferase aus <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> LpxA
LpxC	UDP-3- <i>O</i> -Acyl- <i>N</i> -acetylglucosamindeacetylase
^{Ec} LpxC	UDP-3- <i>O</i> -[(<i>R</i>)-3-Hydroxymyristoyl]- <i>N</i> -acetylglucosamindeacetylase, <i>E. coli</i> LpxC
^{Pae} LpxC	UDP-3- <i>O</i> -[(<i>R</i>)-3-Hydroxydecanoyl]- <i>N</i> -acetylglucosamindeacetylase, <i>P. aeruginosa</i> LpxC
LpxD	UDP-3- <i>O</i> -Acyl-glucosamin- <i>N</i> -acyltransferase

Aminosäureverzeichnis

Aminosäure	Drei-Buchstaben-Code	Ein-Buchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitstrahl der Entdeckung heutzutage verfügbarer Antibiotika.....	9
Abbildung 2: Klassifizierung bakterieller Resistenzmechanismen nach ihrer Herkunft	12
Abbildung 3: Übersicht der Familien bakterieller Effluxpumpen	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung einer dreiteiligen Effluxpumpe	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus der Zellwand gramnegativer Bakterien	15
Abbildung 6: Biosynthese von KDO ₂ -Lipid A (5) in <i>E. coli</i>	16
Abbildung 7: Proteinstruktur von <i>E. coli</i> LpxC	17
Abbildung 8: Konservierte Regionen im aktiven Zentrum von LpxC.....	18
Abbildung 9: Strukturelle Unterschiede der Inserts von LpxC verschiedener Bakterienspezies	19
Abbildung 10: Proteinstruktur von LpxA	20
Abbildung 11: Konservierte Reste im aktiven Zentrum von LpxA.....	21
Abbildung 12: Vergleich der Acyltransferasen LpxA und LpxD.....	22
Abbildung 13: Übersicht über verschiedene Klassen von LpxC-Inhibitoren	23
Abbildung 14: Bindungsmodus von CHIR-090 (12) an das aktive Zentrum von LpxC	24
Abbildung 15: Peptidsequenzen der Dodecapeptide P920 (15) und RJPXD33 (16).....	25
Abbildung 16: Bindungsmodi der Peptidinhibitoren P920 (15) und RJPXD33 (16) an LpxA	26
Abbildung 17: Übersicht der im Arbeitskreis Holl entwickelten Modellinhibitoren	27
Abbildung 18: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers	29
Abbildung 19: Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	30
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Biacore-Technologie.....	31
Abbildung 21: Exemplarische Darstellung eines Sensorgrammes einer SPR-Messung	32
Abbildung 22: Schematische Darstellung des lac-Operons.....	34
Abbildung 23: Reinigung von <i>E. coli</i> LpxC C63A mittels Anionenaustauschchromatographie (AEX)	35
Abbildung 24: Reinigung von <i>E. coli</i> LpxC C63A mittels Größenausschlusschromatographie (SEC).....	36
Abbildung 25: Durchführung des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays in Abwesenheit eines LpxC-Inhibitors	37
Abbildung 26: Verfolgung des Substratumsatzes durch <i>E. coli</i> LpxC C63A.....	38
Abbildung 27: Kalibrierkurve der Fluoreszenzintensität des Isoindols von Glucosamin	40
Abbildung 28: Kalibrierkurven der Fluoreszenzintensitäten der Isoindole der primären Amine 2-Iodanilin und Tris	41
Abbildung 29: Bestimmung der Initialgeschwindigkeiten von <i>E. coli</i> LpxC C63A	42
Abbildung 30: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_M -Wertes von <i>E. coli</i> LpxC C63A	43
Abbildung 31: Durchführung des massenbasierten LpxC-Enzymassays in Abwesenheit eines LpxC-Inhibitors	44
Abbildung 32: Beobachtete Fragmente von Substrat 2 und Produkt 3 nach LC-MS/MS-Analyse.....	45
Abbildung 33: Initiale Voruntersuchungen zur Durchführung des massenbasierten <i>E. coli</i> LpxC-Enzymassays	46
Abbildung 34: Bestimmung der Initialgeschwindigkeiten von <i>E. coli</i> LpxC C63A	47
Abbildung 35: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_M -Wertes von <i>E. coli</i> LpxC C63A	47
Abbildung 36: Initiales pH-Scouting von <i>E. coli</i> LpxC C63A unter Verwendung von Laufpuffer 1	51
Abbildung 37: Optimierung des pH-Scoutings von <i>E. coli</i> LpxC C63A unter Verwendung der Laufpuffer 1a–1i	52
Abbildung 38: Vergleich der pH-Scoutings von <i>E. coli</i> LpxC C63A bei pH = 4.5 und pH = 5.0	53
Abbildung 39: Optimierung des pH-Scoutings von <i>E. coli</i> LpxC C63A unter Verwendung der Laufpuffer 1j–1m	54
Abbildung 40: Optimierung des pH-Scoutings von <i>E. coli</i> LpxC C63A unter Verwendung der Laufpuffer 2(a)–4(a)	55
Abbildung 41: Immobilisierung von <i>E. coli</i> LpxC C63A auf einem CM7-Sensorchip	56
Abbildung 42: Sensorgramme der Affinitätsmessungen von 17 für <i>E. coli</i> LpxC C63A bei 20 °C und pH = 7.5	58

Abbildung 43: Sensorgramme der Affinitätsmessungen von 18 für <i>E. coli</i> LpxC C63A bei 20 °C und pH = 7.5	59
Abbildung 44: Sensorgramme der Affinitätsmessungen von 19 für <i>E. coli</i> LpxC C63A bei 20 °C und pH = 7.5	60
Abbildung 45: Analyse der Sensorgramme von 17 , 18 und 19 für <i>E. coli</i> LpxC C63A bei 20 °C und pH = 7.5	61
Abbildung 46: Überprüfung des <i>volume exclusion effects</i> (VEE) in SPR-Experimenten	63
Abbildung 47: Sensorgramme der Affinitätsmessungen von 17 , 18 , 19 für <i>E. coli</i> LpxC C63A bei 20 °C und pH = 6.0	64
Abbildung 48: Analyse der Sensorgramme von 17 , 18 und 19 für <i>E. coli</i> LpxC C63A bei 20 °C und pH = 6.0	65
Abbildung 49: Sensorgramme der pH-abhängigen Affinitätsmessungen von 17 und 18 für <i>E. coli</i> LpxC C63A	66
Abbildung 50: Analyse der Sensorgramme von 17 und 18 für <i>E. coli</i> LpxC C63A in Abhängigkeit vom pH-Wert	67
Abbildung 51: Übersicht über die Entwicklung im Arbeitskreis Holl hergestellter LpxC-Inhibitoren	68
Abbildung 52: Übersicht über die Entwicklung neuer LpxC-Inhibitoren	70
Abbildung 53: Übersicht über die untersuchten Hydroxamsäuren mit Etherfunktion in α -Position	85
Abbildung 54: Analyse der Testexpressionen von <i>P. aeruginosa</i> LpxC	100
Abbildung 55: Analyse der Zellaufschlüsse der zuvor durchgeführten Testexpressionen von <i>P. aeruginosa</i> LpxC	101
Abbildung 56: Analyse der Variation der OD_{600} während der Induktion bei der Expression von <i>P. aeruginosa</i> LpxC	102
Abbildung 57: Analyse der Variation der Dauer und Temperatur bei der Expression von <i>P. aeruginosa</i> LpxC	102
Abbildung 58: Analyse der Variation der Zellaufschlussbedingungen nach der Expression von <i>P. aeruginosa</i> LpxC	103
Abbildung 59: Reinigung von <i>P. aeruginosa</i> LpxC mittels Anionenaustauschchromatographie (AEX)	104
Abbildung 60: Reinigung von <i>P. aeruginosa</i> LpxC mittels Größenausschlusschromatographie (SEC)	105
Abbildung 61: Bestimmung des IC_{50} -Wertes von CHIR-090 (12) gegen <i>P. aeruginosa</i> LpxC	107
Abbildung 62: Verfolgung des Umsatzes des <i>E. coli</i> -Substrates 2 durch <i>P. aeruginosa</i> LpxC	108
Abbildung 63: Initiale Voruntersuchungen zur Durchführung des massenbasierten <i>P. aeruginosa</i> LpxC-Enzymassays	110
Abbildung 64: Bestimmung der Initialgeschwindigkeiten von <i>P. aeruginosa</i> LpxC	111
Abbildung 65: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_M -Wertes von <i>P. aeruginosa</i> LpxC	112
Abbildung 66: pH-Scouting von <i>P. aeruginosa</i> LpxC	114
Abbildung 67: Immobilisierung von <i>P. aeruginosa</i> LpxC auf einem CM7-Sensorchip	115
Abbildung 68: Affinitätsmessungen von 17 und 18 für <i>P. aeruginosa</i> LpxC bei 20 °C	115
Abbildung 69: Affinitätsmessungen von 19 und 68 für <i>P. aeruginosa</i> LpxC bei 20 °C	116
Abbildung 70: Kinetische Auswertung der Affinitätsmessungen von 19 und 68 für <i>P. aeruginosa</i> LpxC bei 20 °C	117
Abbildung 71: Reinigung von <i>E. coli</i> LpxA mittels Anionenaustauschchromatographie (AEX)	131
Abbildung 72: Reinigung von <i>E. coli</i> LpxA mittels Größenausschlusschromatographie (SEC)	132
Abbildung 73: pH-Scouting von <i>E. coli</i> LpxA	133
Abbildung 74: Immobilisierung von <i>E. coli</i> LpxA auf einem CM5-Sensorchip	133
Abbildung 75: Affinitätsmessung von P920 (15) für <i>E. coli</i> LpxA bei 25 °C	134
Abbildung 76: Affinitätsmessung von RJPXD33 (16) für <i>E. coli</i> LpxA bei 25 °C	135
Abbildung 77: Variation des Konzentrationsbereiches von RJPXD33 (16) für <i>E. coli</i> LpxA bei 25 °C	136
Abbildung 78: Affinitätsmessung von HM-UDP-GlcNAc (2) für <i>E. coli</i> LpxA bei 25 °C	137
Abbildung 79: Reinigung von <i>E. coli</i> LpxA mit N-terminalem Strep-Tag II	138
Abbildung 80: Immobilisierung von <i>E. coli</i> LpxA über seinen N-terminalen Strep-Tag II	139
Abbildung 81: Sensorgramme der Affinitätsmessungen der Peptidinhibitoren P920 (15) und RJPXD33 (16) sowie des natürlichen Substrates 1 für <i>E. coli</i> LpxA bei 20 °C	140
Abbildung 82: Analyse der Sensorgramme der Peptidinhibitoren P920 (15) und RJPXD33 (16) sowie des natürlichen Substrates 1 für <i>E. coli</i> LpxA bei 20 °C	141
Abbildung 83: Sensorgramme der Affinitätsmessungen der Peptidinhibitoren P920 (15) und RJPXD33 (16) sowie des natürlichen Substrates 1 und des Reaktionsproduktes 2 für <i>E. coli</i> LpxA bei 20 °C	142

Abbildung 84: Analyse der Sensorgramme der Peptidinhibitoren P920 (15) und RJPXD33 (16) sowie des natürlichen Substrates 1 und des Reaktionsproduktes 2 für <i>E. coli</i> LpxA bei 20 °C.....	143
Abbildung 85: Übersicht über potentielle LpxA-Inhibitoren aus der Molport-Datenbank	144
Abbildung 86: Sensorgramme der Affinitätsmessungen der Molport-Substanzen für <i>E. coli</i> LpxA bei 20 °C.....	145
Abbildung 87: Analyse der Sensorgramme der Molport-Substanzen für <i>E. coli</i> LpxA bei 20 °C.....	146
Abbildung 88: Übersicht über die untersuchten Verbindungen, die auf literaturbekannten sowie patentierten LpxA-Inhibitoren basieren.....	147
Abbildung 89: Sensorgramme der Affinitätsmessungen der auf literaturbekannten und patentierten LpxA-Inhibitoren basierenden Verbindungen für <i>E. coli</i> LpxA bei 20 °C	147
Abbildung 90: Analyse der Sensorgramme der auf literaturbekannten und patentierten LpxA-Inhibitoren basierenden Verbindungen für <i>E. coli</i> LpxA bei 20 °C	148
Abbildung 91: Übersicht potentieller LpxA-Inhibitoren aus der PrincetonBio-Datenbank	149
Abbildung 92: Sensorgramme der Affinitätsmessungen der PrincetonBio-Substanzen für <i>E. coli</i> LpxA bei 20 °C.....	150
Abbildung 93: Analyse der Sensorgramme der PrincetonBio-Substanzen für <i>E. coli</i> LpxA bei 20 °C.....	151
Abbildung 94: Übersicht über die in Kombination mit einem Effluxpumpeninhibitor untersuchten LpxC-Inhibitoren.....	157
Abbildung 95: Übersicht über die bei den Kombinationsexperimenten untersuchten Substanzen	162
Abbildung 96: Quantifizierung der Zellanzahl bei der MHK von 18 sowie vier kommerziell verfügbaren Antibiotika.....	163
Abbildung 97: Konzentrations-Effektkurven von 18 und Moxifloxacin (178)	164
Abbildung 98: Response Surface Plot zur Modellierung der Interaktion von 18 und Moxifloxacin (178)	166
Abbildung 99: Schematische Darstellung der Freisetzung kationischer LpxC-Inhibitoren	167
Abbildung 100: Übersicht über die für die Photoexperimente verwendeten LpxC-Inhibitoren.....	168
Abbildung 101: Untersuchung des Einflusses einer zehnminütigen Bestrahlung auf das Bakterienwachstum.....	168
Abbildung 102: Untersuchung des Einflusses der (photoaktivierbaren) LpxC-Inhibitoren 116 , 126 und 130 auf das Wachstum von <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	169

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bestimmung des IC_{50} -Wertes des <i>tight-binding inhibitors</i> CHIR-090 (12) gegen <i>E. coli</i> LpxC C63A in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.....	39
Tabelle 2: Beobachtete Massenübergänge mit höchster Intensität bei der massenspektrometrischen Analyse des <i>E. coli</i> -Substrates 2 sowie des <i>E. coli</i> -Produktes 3	44
Tabelle 3: Linearer Scale-Down der Enzym- und Substratkonzentration im massenbasierten <i>E. coli</i> LpxC-Enzymassay.....	48
Tabelle 4: Nicht-linearer Scale-Down der Enzym- und Substratkonzentration im massenbasierten <i>E. coli</i> LpxC-Enzymassay	49
Tabelle 5: Bestimmung der IC_{50} -Werte von 12 , 18 und 19 mithilfe des massenbasierten <i>E. coli</i> LpxC-Enzymassays bei verschiedenen Substratkonzentrationen	49
Tabelle 6: Bestimmung der K_i -Werte von 12 , 18 und 19 mithilfe des massenbasierten <i>E. coli</i> LpxC-Enzymassays bei verschiedenen Substratkonzentrationen	50
Tabelle 7: Quantifizierung der Abweichungen der unter verschiedenen Reaktionsbedingungen ermittelten K_i -Werte.....	50
Tabelle 8: Übersicht der auf Basis von Laufpuffer 1 optimierten Laufpuffer 1a–1i.....	52
Tabelle 9: Übersicht der auf Basis von Laufpuffer 1 optimierten Laufpuffer 1j–1m	53
Tabelle 10: Übersicht der Laufpuffer 2(a)–4(a)	55
Tabelle 11: Optimierung der Immobilisierungsbedingungen von <i>E. coli</i> LpxC C63A auf einem CM7-Sensorchip	56
Tabelle 12: Übersicht der untersuchten Konzentrationsbereiche von 17 , 18 , 19 bei den initialen Affinitätsmessungen.....	57
Tabelle 13: Übersicht der K_D -Werte von 17 , 18 und 19 für <i>E. coli</i> LpxC C63A bei 20 °C und pH = 7.5.....	62
Tabelle 14: Vergleich der K_D -Werte von 17 und 18 in Abhängigkeit von dem pH-Wert des Laufpuffers	67
Tabelle 15: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten bereits publizierter LpxC-Inhibitoren	69
Tabelle 16: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Peptidderivaten	71
Tabelle 17: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Morpholinderivaten	72
Tabelle 18: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten C-furanosidischer LpxC-Inhibitoren	75
Tabelle 19: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten C-pyranosidischer LpxC-Inhibitoren.....	78
Tabelle 20: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Prolinderivaten.....	80
Tabelle 21: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von LpxC-Inhibitoren, die die UDP-Bindungstasche adressieren sollten.....	83
Tabelle 22: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem Substituenten mit Etherfunktion in α -Position.....	86
Tabelle 23: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem 1,4-substituierten Triazolmotiv in α -Position.....	88
Tabelle 24: Vergleich der antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem 1,4- und 1,5-substituierten Triazolmotiv in Benzylposition.....	90
Tabelle 25: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem 1,4-substituierten Triazolmotiv in Benzylposition	90
Tabelle 26: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem Amidmotiv in α -Position.....	94
Tabelle 27: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Eigenschaften von Hydroxamsäuren mit einem Amidmotiv in Benzylposition	97
Tabelle 28: Initiale Überprüfung der Aktivität des isolierten <i>P. aeruginosa</i> LpxC.....	106
Tabelle 29: Variation des Assaypuffers zur Überprüfung der Aktivität des isolierten <i>P. aeruginosa</i> LpxC.....	106

Tabelle 30: Biologische Testung potentieller LpxC-Inhibitoren gegen <i>P. aeruginosa</i> LpxC mithilfe des fluoreszenz-basierten LpxC-Enzymassays	108
Tabelle 31: Beobachtete Massenübergänge mit höchster Intensität bei der massenspektrometrischen Analyse des <i>E. coli</i> -Substrates 2 sowie des <i>E. coli</i> -Produktes 3	109
Tabelle 32: Linearer Scale-Down der Enzym- und Substratkonzentration im massenbasierten <i>P. aeruginosa</i> LpxC-Enzymassay	112
Tabelle 33: Bestimmung der IC_{50} -Werte von CHIR-090 (12) und 19 mithilfe des massenbasierten <i>P. aeruginosa</i> LpxC-Enzymassays bei verschiedenen Substratkonzentrationen.....	113
Tabelle 34: Bestimmung der K_i -Werte von CHIR-090 (12) und 19 mithilfe des massenbasierten <i>P. aeruginosa</i> LpxC-Enzymassays bei verschiedenen Substratkonzentrationen.....	113
Tabelle 35: Vergleich der K_D -Werte von 19 und 68 für <i>P. aeruginosa</i> LpxC bei 20 °C	118
Tabelle 36: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von Peptidderivaten gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies ...	119
Tabelle 37: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten ausgewählter Morpholinderivate gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies.....	120
Tabelle 38: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten ausgewählter C-Furanoside gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies.....	121
Tabelle 39: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten aller C-Pyranoside gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies	122
Tabelle 40: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von Glucose-basierten C-Pyranosiden, die sich in der Rigidität der Tail-Struktur unterscheiden, gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies.....	124
Tabelle 41: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von LpxC-Inhibitoren, die die UDP-Bindungstasche adressieren sollten, gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies	125
Tabelle 42: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem 1,4-substituierten Triazolmotiv in α -Position gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies	126
Tabelle 43: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem 1,4-substituierten Triazolmotiv in Benzylposition sowie von Modellanalyt 18 gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies	127
Tabelle 44: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem Amidmotiv in α -Position gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies	128
Tabelle 45: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem Amidmotiv in Benzylposition gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies.....	130
Tabelle 46: Vergleich der Werte der Affinitätskonstanten, die mithilfe verschiedener Enzymassays bestimmt wurden	152
Tabelle 47: MHK-Experimente in Ab- sowie in Anwesenheit des Effluxpumpeninhibitors PA β N gegen <i>E. coli</i>	158
Tabelle 48: MHK-Experimente in Ab- sowie in Anwesenheit des Effluxpumpeninhibitors PA β N gegen <i>P. aeruginosa</i>	159
Tabelle 49: Charakteristische inhibitorische Konzentrationen von LpxC-Inhibitor 18 und Fluorchinolon 178	165
Tabelle 50: Kombinationsexperimente von 18 und Moxifloxacin (178) zur Charakterisierung der Wechselwirkung	165
Tabelle 51: Kombinationsexperimente von 18 und Moxifloxacin (178) zur Quantifizierung des Synergieeffektes.....	166
Tabelle 52: Untersuchung des Einflusses einer zehnminütigen Bestrahlung ($\lambda = 300$ nm) auf die enzymatische Aktivität...	171
Tabelle 53: Bestimmung des IC_{50} -Wertes von 126 in seiner nativen sowie der photoaktivierten Form	171
Tabelle 54: Übersicht über die verwendeten Chemikalien sowie deren Hersteller.....	172
Tabelle 55: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller.....	173
Tabelle 56: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme inklusive ihrer genetischen Eigenschaften	174
Tabelle 57: Übersicht über die verwendeten Plasmide inklusive ihrer Vektoreigenschaften	174
Tabelle 58: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Medien, Antibiotika.....	175
Tabelle 59: Übersicht über die verwendeten Puffer bei der Proteinaufreinigung	176
Tabelle 60: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	177

Tabelle 61: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen im fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay.....	177
Tabelle 62: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen bei den SPR-Experimenten.....	178
Tabelle 63: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen im massenbasierten LpxC-Enzymassay	179
Tabelle 64: Übersicht über die verwendete Software sowie deren Hersteller.....	179
Tabelle 65: Übersicht über die verwendeten Geräte sowie deren Hersteller	180
Tabelle 66: Übersicht über die variablen Expressionsbedingungen.....	182
Tabelle 67: Zuordnung der verschiedenen Puffer bei der Proteinaufreinigung	183
Tabelle 68: Zuordnung der Reaktionsbedingungen im fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay	185
Tabelle 69: Übersicht über die Enzym- und Inhibitorkonzentrationen im massenbasierten LpxC-Enzymassay	186
Tabelle 70: Messparameter bei der massenspektrometrischen Analyse des LpxC-Enzymassays	186
Tabelle 71: Analysierte Massenübergänge.....	187
Tabelle 72: Zuordnung der SPR-Laufpuffer zu den untersuchten Liganden	188
Tabelle 73: Übersicht über die exakten Stopp-Zeitpunkte in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bei der Verfolgung des Reaktionsumsatzes	190
Tabelle 74: Übersicht über die exakten Reaktionszeiten bei der Bestimmung des K_M -Wertes von <i>E. coli</i> LpxC C63A.....	191
Tabelle 75: Übersicht über die exakten Reaktionszeiten bei der Bestimmung des K_M -Wertes von <i>P. aeruginosa</i> LpxC	191
Tabelle 76: Übersicht über die exakten Reaktionszeiten für die einzelnen Substratkonzentrationen bei der Bestimmung des K_M -Wertes von <i>P. aeruginosa</i> LpxC sowie <i>E. coli</i> LpxC C63A für das <i>E. coli</i> -Substrat 2	192
Tabelle 77: Übersicht über die in Abhängigkeit von der Substratkonzentration verwendeten Enzym- und Inhibitorkonzentrationen im massenbasierten LpxC-Enzymassay	192
Tabelle 78: Übersicht über die einzelnen Experimente zur Immobilisierung von <i>E. coli</i> LpxA	193
Tabelle 79: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Affinität für <i>E. coli</i> LpxA.....	193
Tabelle 80: Übersicht über die Experimente zur Immobilisierung von <i>E. coli</i> LpxA mit <i>N</i> -terminalem Strep-Tag II	194
Tabelle 81: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Affinität für <i>E. coli</i> LpxA mit <i>N</i> -terminalem Strep-Tag II	194
Tabelle 82: Übersicht über die Kombinationen der Additive DTT und Zinkchlorid, basierend auf Laufpuffer 1	195
Tabelle 83: Übersicht über die Kombination weiterer Additive (2-Mercaptoethanol, Zinkchlorid und Zinksulfat), die für den Laufpuffer 1 (40 mM MES, pH = 6,0, 0.05% Triton X-100) getestet wurden	195
Tabelle 84: Übersicht über die Laufpuffer 2-4 mit verschiedenen Salzkonzentrationen ohne weitere Additive	195
Tabelle 85: Übersicht über die initialen Experimente zur Immobilisierung von <i>E. coli</i> LpxC C63A	196
Tabelle 86: Übersicht über die Experimente zur Optimierung der Immobilisierung von <i>E. coli</i> LpxC C63A.....	196
Tabelle 87: Übersicht über die Experimente zur Immobilisierung von <i>E. coli</i> LpxC C63A	197
Tabelle 88: Übersicht über die verwendeten Bedingungen bei der Optimierung der Bestimmung der Affinität der Analyten für <i>E. coli</i> LpxC C63A	197
Tabelle 89: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Affinität für <i>E. coli</i> LpxC C63A	198
Tabelle 90: Übersicht über die Experimente zur Optimierung der Immobilisierungsbedingungen von <i>E. coli</i> LpxC C63A mit <i>N</i> -terminalem Strep-Tag II.....	199
Tabelle 91: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Affinität für <i>E. coli</i> LpxC C63A mit <i>N</i> -terminalem Strep-Tag II	200
Tabelle 92: Übersicht über die Experimente zur Immobilisierung von <i>P. aeruginosa</i> LpxC, mit dem anschließend Experimente zur Bestimmung der Affinität unter standardisierten Bedingungen durchgeführt wurden	200
Tabelle 93: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Affinität für <i>P. aeruginosa</i> LpxC	201
Tabelle 94: Übersicht über die getesteten Bedingungen zur Induktion bei der Optimierung der <i>P. aeruginosa</i> LpxC-Expression	202

Tabelle 95: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Aufschlusspuffer bei der Optimierung der <i>P. aeruginosa</i> LpxC-Aufreinigung	203
Tabelle 96: Übersicht über die verwendeten Puffer bei der Identifikation einer geeigneten Reaktionsumgebung für <i>P. aeruginosa</i> LpxC im fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay.....	203
Tabelle 97: Getestete Konzentrationen in Abhängigkeit von der MHK für 18 und Moxifloxacin.....	205
Tabelle 98: Übersicht über 16 getestete Kombinationen basierend auf den IC_{10} -, IC_{50} - und IC_{90} -Werten.....	205
Tabelle 99: Übersicht über 36 getestete Kombinationen basierend auf den $IC_{0.1}$ -, IC_1 -, $IC_{2.5}$ -, IC_5 - und IC_{10} -Werten.....	205
Tabelle 100: Übersicht über die Bestrahlungszeitpunkte bei der Untersuchung des generellen Einflusses der Bestrahlung auf die Bakterien	206
Tabelle 101: Übersicht über die Bestrahlungszeitpunkte bei der biologischen Testung photoaktivierbarer Substanzen.....	207
Tabelle 102: Verwendete Chemikalien inklusive ihrer Gefahrenpiktogramme sowie H- und P-Sätze	212
Tabelle 103: Verwendete KMR-Stoffe inklusive CAS-Nummer und Einordnung in die entsprechende Kategorie.....	217

1 Zusammenfassung

Aufgrund der Zunahme antimikrobieller Resistenzen in den vergangenen Jahrzehnten warnt die WHO seit 2014 vor dem Anbruch einer postantibiotischen Ära. Um dieses Szenario zu verhindern, wird eine Vielzahl an Strategien gegen die weitere Zunahme antibakterieller Resistenzen sowie zur Behandlung entsprechender Infektionen verfolgt. Diese umfassen beispielsweise das Adressieren neuartiger Targets oder die Verwendung von Kombinationsansätzen. Ein vielversprechendes Target sind in gramnegativen Bakterien die an der Lipid A-Biosynthese beteiligten Enzyme. Lipid A stellt dabei den hydrophoben Membrananker der Lipopolysaccharide im äußeren Monolayer der zusätzlichen äußeren Membran gramnegativer Bakterien dar. Aufgrund dieser Funktion ist Lipid A essentiell für das Wachstum und die Viabilität gramnegativer Bakterien. Der Fokus dieser Arbeit lag auf den ersten zwei Enzymen der Lipid A-Biosynthese, LpxA und LpxC. Dabei wurden sowohl neuartige Enzymassays entwickelt als auch potentielle Inhibitoren auf ihre antibakteriellen und inhibitorischen Aktivitäten zur Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen untersucht.

Im ersten Schritt konnte *E. coli* LpxC C63A erfolgreich exprimiert und isoliert werden. Die über alle Bakterienspezies hoch konservierte, zinkabhängige Metalloamidase LpxC katalysiert den zweiten Schritt der Lipid A-Biosynthese, die irreversible Deacetylierung von HM-UDP-GlcNAc. Ausgehend vom literaturbekannten Fluoreszenzassay konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl ein inhibitions-kinetischer Assay als auch ein Affinitätsassay etabliert werden. Zusätzlich dazu wurde der fluoreszenz-basierte Enzymassay für die routinemäßige biologische Testung optimiert und als Referenz bei der Entwicklung der neuartigen Enzymassays angewandt.

Bei der Etablierung des LC-MS/MS-basierten Enzymassays wurde in Analogie zum fluoreszenz-basierten LpxC-Enzymassay die Inhibition einer enzymatischen Reaktion untersucht, der dabei ermittelte Parameter war die Inhibitionskonstante K_i . Neben dem unterschiedlichen Abbruch der enzymatischen Reaktion (sauer statt basisch) zur Vermeidung einer unerwünschten, unvollständigen Deacylierung von Substrat und Produkt lag der Unterschied der beiden Assays in der Detektion des Produktes. Nach der chromatographischen Trennung des Reaktionsgemisches wurden das Substrat sowie das Produkt mittels ESI ionisiert. Dies führte zunächst zur Detektion von nicht-fragmentiertem Substrat ($m/z = 832$) und nicht-fragmentiertem Produkt ($m/z = 790$) im negativen Ionenmodus. Die Fragmentierung beider Vorläuferionen lieferte anschließend für beide dieselben Produktionen. Der Vergleich des jeweiligen Massenübergangs zum Phosphatfragment ($m/z 79$) diente zur Bestimmung des prozentualen Anteils von Substrat und Produkt in der jeweiligen Probe. Aufgrund fehlender Störfaktoren wie der hohen basalen Hintergrundfluoreszenz im fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays und dem daraus resultierenden niedrigeren Detektionslimit der LC-MS/MS-basierten Methode konnte die für den Assay notwendige Substratkonzentration in einem nicht-linearen Scale-Down deutlich reduziert werden. Dabei wurde für die biologische Testung eine Reduktion der Substratkonzentration um den Faktor 10 erzielt, auch eine Reduktion um den Faktor 100 lieferte jedoch eindeutig identifizierbares und quantifizierbares Substrat und Produkt. Dies ermöglichte verglichen mit dem fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay eine präzisere Bestimmung des K_M -Wertes, da eine größere Spannbreite an Substratkonzentrationen (0.25–25 μM , Fluoreszenzassay: 1.0–25 μM) untersucht werden konnte. Zusätzlich dazu konnte der Reaktionszeitraum deutlich verkürzt werden (7 min \rightarrow 90 s), dies garantierte, dass es sich bei den Reaktionsgeschwindigkeiten um Initialgeschwindigkeiten handelte. Der mit dem LC-MS/MS-basierten LpxC-Enzymassay ermittelte K_M -Wert betrug dabei $3.63 \pm 0.50 \mu\text{M}$. Dieser war um den Faktor 3

niedriger als der mittels Fluoreszenz bestimmte K_M -Wert und lag in einer Größenordnung mit Literaturwerten. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug $7.77 \pm 0.88 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Bei den SPR-basierten LpxC-Enzymassays wurde ein alternatives Konzept zur Charakterisierung von Inhibitoren angewandt: Die Beobachtung einer Bindung der untersuchten Substanz an immobilisiertes Enzym in Abwesenheit von Substrat. Der ermittelte Parameter war die Dissoziationskonstante K_D . Hierbei erfolgte zunächst eine Optimierung der Immobilisierungsbedingungen des Enzyms, welches nach elektrostatischer Präkonzentrierung mithilfe einer Amidkupplung an die Sensorchipoberfläche gebunden werden sollte. Ausgehend von einem 10 mM Acetatpuffer (pH = 4.0–5.0), welcher eine starke Denaturierung des Enzyms, resultierend in einer hohen unspezifischen Restbindung (>50%), hervorrief, wurde zunächst die elektrostatische Präkonzentrierung durch Kombination verschiedener Reduktionsmittel und Cofaktor-Donoren optimiert. Dabei erwiesen sich 1 mM DTT und 0.1 mM ZnCl_2 als die am besten geeigneten Additive zur Stabilisierung des Enzyms bei einem pH-Wert von 4.5 bzw. 5.0. Bei der anschließenden Amidkupplung konnte die höchste Kupplungseffizienz durch Verwendung eines leicht basischen Laufpuffers (pH = 7.5) erzielt werden. Zusätzlich dazu konnte durch einen ausreichenden Salzgehalt im Puffer (150 mM NaCl) eine unspezifische Restbindung von lediglich elektrostatisch gebundenem Enzym weitestgehend verhindert werden. Bei den anschließenden Affinitätsmessungen konnte eine starke pH-Abhängigkeit der Bindung beobachtet werden. Während sowohl die Messungen mit dem Laufpuffer der Immobilisierung (pH = 7.5) als auch Messungen bei pH = 7.0 vergleichbare K_D -Werte lieferten, konnte sowohl bei pH = 6.0, dem pH-Optimum von *E. coli* LpxC C63A, als auch bei pH = 6.5 keine spezifische Interaktion der LpxC-Inhibitoren mit dem Enzym beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden alle Affinitätsmessungen bei einem anderen pH-Wert (pH = 7.5) als die inhibitionskinetischen Assays durchgeführt.

Anschließend sollten die zuvor entwickelten Enzymassays auf LpxC von *P. aeruginosa* übertragen werden. Hierbei erfolgte zunächst aufgrund der sehr geringen Solubilität und der Tendenz zur Bildung von Aggregaten von *P. aeruginosa* LpxC eine Optimierung der Expressions- und Aufreinigungsbedingungen. Die initialen Versuche mit dem isolierten Enzym erfolgten mithilfe des fluoreszenzbasierten Enzymassays. Dabei zeigte sich zunächst, dass dieses unter den für *E. coli* LpxC C63A verwendeten Bedingungen inaktiv war. Durch einen Wechsel zu einem leicht basischen Phosphatpuffer unter Verwendung derselben Additive wie bei *E. coli* LpxC C63A konnte hingegen eine Produktbildung detektiert werden. Zusätzlich dazu lieferte die Bestimmung von IC_{50} -Werten ausgewählter LpxC-Inhibitoren den prinzipiellen Nachweis, dass diese Substanzen auch gegen *P. aeruginosa* LpxC inhibitorische Aktivität zeigten. Dabei waren die beobachteten Fluoreszenzintensitäten jedoch deutlich niedriger als bei *E. coli* LpxC C63A, sodass zur Bestimmung enzymkinetischer Parameter ebenfalls der massenbasierte LpxC-Enzymassay angewandt wurde. Der dort ermittelte K_M -Wert betrug $4.66 \pm 0.24 \text{ } \mu\text{M}$ und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $11.6 \pm 0.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Somit wies *P. aeruginosa* LpxC eine ähnliche Affinität für das natürliche Substrat von *E. coli* LpxC wie das *E. coli*-Enzym selber auf. Die Umsetzung des nicht-natürlichen Substrates erfolgte hingegen geringfügig langsamer als durch *E. coli* LpxC C63A, jedoch lagen auch diese Werte in einer Größenordnung. Für die weitere biologische Testung konnte sowohl der zuvor entwickelte LC-MS/MS-basierte Enzymassay (mit Ausnahme des im Fluoreszenzassay identifizierten Reaktionspuffers) als auch der zuvor entwickelte SPR-basierte Affinitätsassay ohne weitere Optimierung der Bedingungen auf *P. aeruginosa* LpxC übertragen werden.

Der Vergleich der drei entwickelten bzw. verwendeten Assays zeigte, dass am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg alle drei Assays geeignet und aufgrund der Vielzahl limitierender Fak-

toren gleichermaßen notwendig sind. Insbesondere dann, wenn bereits antibakterielle Daten und kein generelles Ausschlusskriterium wie ein primäres Amin oder eine intrinsische Fluoreszenz der zu untersuchenden Substanz vorliegen, liefert der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay die einfachste und schnellste Methode zur Bestimmung von K_i -Werten gegen *E. coli* LpxC C63A. Bei Vorliegen eines der genannten Ausschlusskriterien oder einer prinzipiell niedrigen Fluoreszenzintensität wie unter den bei *P. aeruginosa* LpxC verwendeten Bedingungen bieten hingegen sowohl der LC-MS/MS-basierte als auch der SPR-basierte Enzymassay eine geeignete Alternative. Zusätzlich dazu ermöglicht der massenbasierte LpxC-Enzymassay aufgrund des niedrigeren Detektionslimits eine deutliche Reduktion der Substratkonzentration, welche mit einer Kostenreduktion einhergeht. Nachteil sind hierbei die Assaydauer, welche sich jedoch durch die Automatisierung des Assays relativiert, sowie die Verfügbarkeit des Spektrometers. Der SPR-basierte Enzymassay eignet sich unter Verwendung der optimierten Bedingungen primär zur Screening-basierten Identifikation von Inhibitoren anstelle zur Bestimmung von konkreten K_D -Werten. Dabei weist dieser Assay den Vorteil auf, dass ein isoliertes Bindungsgeschehen beobachtet wird und gar kein Substrat notwendig ist. Aus diesem Grund wurde der entwickelte SPR-basierte Enzymassay anschließend auf LpxA, welches den ersten Schritt der Lipid A-Biosynthese katalysiert, übertragen. Hierbei handelt es sich um eine thermodynamisch ungünstige, zwei Substrate beinhaltende Reaktion, welche dadurch weniger gut für einen inhibitionskinetischen Assay geeignet ist. Neben der Identifikation von LpxA-Inhibitoren war in diesem Assay die Gegenüberstellung zwei verschiedener Kupplungsstrategien das Ziel. Aus diesem Grund erfolgte zunächst die Expression und Isolierung von zwei Varianten des Enzyms, ungetaggttem *E. coli* LpxA sowie LpxA mit *N*-terminalem Strep-Tag II. Bei der anschließenden Durchführung der SPR-Experimente mit dem ungetaggtten Enzym wurde dieses mittels Amidkupplung entweder über den *N*-Terminus oder eine Lysinseitenkette auf dem Sensorchip immobilisiert. Hierbei zeigte sich im Gegensatz zu LpxC keine Denaturierung des Enzyms in den Acetatpuffern, sodass LpxA ohne weitere Optimierung bei pH = 5.0 immobilisiert werden konnte. Der dabei verwendete Laufpuffer basierte auf dem eines literaturbekannten Fluoreszenz-polarisationsassays (pH = 8.0) und lieferte ebenfalls ohne weitere Optimierung eine nahezu quantitative Kupplung des Enzyms. Die Immobilisierung des getaggtten Enzyms erfolgte hingegen ausschließlich über seinen *N*-Terminus unter physiologischen Bedingungen. Die Validierung der Assays erfolgte für beide Enzyme mithilfe des Peptidinhibitors **15** sowie HM-UDP-GlcNAc, dem Produkt der enzymatischen Reaktion. Dabei lag der für **15** ermittelte K_D -Wert für beide Enzyme in einer Größenordnung ($K_D = 233\text{--}275$ nM). Dies wies darauf hin, dass die Bindung von **15** bei der Immobilisierung über eine Amidkupplung nicht negativ beeinflusst wurde. Das Reaktionsprodukt wies hingegen eine um den Faktor 20 höhere Affinität für das getaggte Enzym ($K_D = 3.50$ μ M) auf. Je nach Bindungsregion des Inhibitors schien somit die Art der Immobilisierung einen Einfluss auf die Affinität der zu untersuchenden Substanz zu haben. Aus diesem Grund wurde für die Identifikation neuer LpxA-Inhibitoren ausschließlich getaggttes Enzym verwendet. Hierbei wurden neun Verbindungen, die mit vier verschiedenen, struktur- und ligandbasierten virtuellen Screening-Ansätzen identifiziert wurden, sowie vier Verbindungen, die Derivate von literaturbekannten und patentierten LpxA-Inhibitoren darstellten, auf ihre Affinität zu LpxA untersucht. In den SPR-Experimenten konnte Verbindung **174**, die unter Verwendung eines strukturbasierten Ansatzes identifiziert worden war, als LpxA-Inhibitor bestätigt werden. Der K_D -Wert von **174** betrug dabei 13.3 μ M. Somit lag die Affinität von **174** in einer Größenordnung mit der des literaturbekannten Peptidinhibitors **16**.

Anschließend wurden mittels der entwickelten Enzymassays 155 Verbindungen auf inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A untersucht und aus den erhaltenen Daten Struktur-Wirkungs-

beziehungen abgeleitet. Zunächst wurden Peptid- und Morpholinderivate mit alternativer zinkbindender Gruppe untersucht. Anschließend erfolgten basierend auf LpxC-Inhibitoren aus dem Arbeitskreis Holl, insbesondere dem potentesten C-Furanosid **17** ($K_i = 411$ nM), Variationen des zentralen Bausteins zwischen den pharmakophoren Elementen, dem Hydroxamsäuremotiv und der lipophilen Seitenkette, sowie eine systematische Untersuchung von Substituenten, die die UDP-bindende Tasche adressieren sollten.

Hierbei zeigte sich zunächst, dass unabhängig vom zentralen Baustein das in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv (*S*)-konfigurierte Stereoisomer in der Regel das Eutomer der entsprechenden Enantiomerenpaare darstellt. Während der Austausch des Tetrahydrofuran- durch einen Pyrrolidinring verglichen mit C-Furanosid **17** keine Erhöhung der inhibitorischen Aktivität hervorrief, führte die Ringerweiterung zu einem Tetrahydropyranring zu zwei Verbindungen mit höherer inhibitorischer Aktivität, Glucopyranosid **67** und Mannopyranosid **68** ($K_i \approx 130$ nM).

Die Untersuchung von Verbindungen mit einer offenkettigen Struktur als zentralem Baustein diente primär der Identifikation von Substituenten, die die UDP-bindende Tasche adressieren sollten. Hierbei erfolgte zunächst in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv die Einführung eines Phenylsubstituenten über verschiedene Linker. Dabei zeigte sich folgender Trend bezüglich der inhibitorischen Aktivitäten: 1,4-substituiertes Triazol (**100**, $K_i = 24.6$ nM) > Amid > Ether > sekundäres Amin > 1,5-substituiertes Triazol. Im Folgenden wurde der Phenylring durch verschiedene Substituenten ausgetauscht. Bei der Untersuchung regioisomerer Biphenyl-, Chinolin- und Indolderivate konnte für alle Substituenten ein deutlicher Aktivitätsunterschied der Regioisomere gezeigt werden. Dies zeigte, dass für die Weiterentwicklung von LpxC-Inhibitoren in Richtung UDP-Bindetasche die Identifikation eines geeigneten Fragmentes nicht ausreicht, sondern die Position der Verknüpfung dieses Fragmentes von essentieller Bedeutung ist. Bei den aktivsten Verbindungen dieses Screenings handelte es sich um drei Indolderivate, Indol-3-carboxamid **19** und Indol-5-carboxamid **140** ($K_i \approx 10.0$ nM) und das 1,4-substituierte Triazol **113** ($K_i = 3.02$ nM), welches ebenfalls einen Indolsubstituenten trug. Von den untersuchten Hydroxamsäuren mit Triazol- bzw. Amidmotiv in Benzylposition zeigte keine Verbindung eine höhere Aktivität als ihr in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv substituiertes Regioisomer.

Anschließend wurden ausgewählte Substanzen auf ihre inhibitorische Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC untersucht. Hierbei zeigte sich, dass alle Substanzen, die gegen *E. coli* LpxC C63A Aktivität zeigten, mindestens dieselbe Potenz gegen *P. aeruginosa* LpxC aufwiesen. Zusätzlich war die strukturelle Diversität der identifizierten Inhibitoren größer. Bei der aktivsten Verbindung handelte es sich wie bei *E. coli* LpxC C63A um Hydroxamsäure **113** ($K_i = 1.30$ nM), die in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv einen 1,4-substituierten Triazolring mit einem Indol-3-yl-Rest aufweist.

Zuletzt erfolgte die biologische Testung ausgewählter LpxC-Inhibitoren in Kombinationsexperimenten. Dabei zeigte die Kombination von zehn Verbindungen mit dem Effluxpumpeninhibitor PA β N, dass die MHK aller Substanzen gegen *P. aeruginosa* und die MHK von neun Substanzen gegen *E. coli* im Durchschnitt um drei serielle 1:2-Verdünnungsstufen gesenkt werden konnte. Lediglich C-Furanosid **17** schien kein Target der durch PA β N gehemmten Effluxpumpen von *E. coli* zu sein. Bei der Kombination des LpxC-Inhibitors **18** mit dem zugelassenen Antibiotikum Moxifloxacin konnte ein durch **18** dominierter synergistischer Effekt beobachtet werden. Dabei reduzierte **18** den IC_{50} -Wert von Moxifloxacin um 61%. Somit stellen Kombinationen von LpxC-Inhibitoren mit kommerziell verfügbaren Antibiotika einen vielversprechenden Ansatz zur Erhöhung der Effektivität letzterer dar.

2 Abstract

Due to the increasing number of antimicrobial resistant bacteria in the past decades, the WHO warned in 2014 against the dawn of a postantibiotic era. In order to avoid this, a huge number of different strategies against the further increase of antimicrobial resistance as well as the treatment of the respective infections are taken. These include, for instance, the addressing of novel targets or the use of combination approaches. In this respect, the enzymes which are involved in lipid A-biosynthesis in gram-negative bacteria represent promising targets. Lipid A constitutes the hydrophobic membrane anchor of the lipopolysaccharides in the outer monolayer of the additional outer membrane in gram-negative bacteria. This makes lipid A essential for the growth and viability of gram-negative bacteria. In this work, the main focus was on the first two enzymes of lipid A-biosynthesis, LpxA and LpxC. This involved both the development of novel enzyme assays as well as the investigation of potential inhibitors regarding their antibacterial and inhibitory activities in order to establish structure-activity relationships. In the first step, the enzyme *E. coli* LpxC C63A was successfully expressed and isolated. The highly conserved, zinc-dependent metalloamidase LpxC catalyzes the second step of lipid A-biosynthesis, the irreversible deacetylation of HM-UDP-GlcNAc. Starting from a literature-known, fluorescence-based enzyme assay both an inhibition as well as an affinity assay could be established in this work. Furthermore, the fluorescence-based enzyme assay was optimized for routine biological testing and used as reference for the development of the novel enzyme assays.

During the establishment of the LC-MS/MS-based enzyme assay, the inhibition of the enzymatic reaction was investigated in analogy to the fluorescence-based LpxC-enzyme assay. The thereby determined enzymatic parameter was the inhibition constant K_i . Beside the different stop conditions of the enzymatic reaction (acidic instead of basic) to avoid an unwanted, incomplete deacylation of both substrate and product, the main difference of these assays was the detection of the product. After the chromatographic separation of the reaction mixture, both substrate and product were ionized using ESI. First, this led to the detection of non-fragmented substrate ($m/z = 832$) and non-fragmented product ($m/z = 790$) using the negative ion-mode. Afterwards, fragmentation of both precursor ions resulted in the detection of the same product ions. The comparison of the respective mass transition to the phosphate fragment ($m/z 79$) was used for the determination of the amount of substrate and product in the respective sample. Due to the lack of interfering factors like the high, basal background fluorescence in the fluorescence-based LpxC-enzyme assay and the resulting lower detection limit using the LC-MS/MS-based method, the initial substrate concentration could be significantly reduced in a non-linear scale-down approach. Thereby, a reduction of the substrate concentration by the factor 10 could be achieved for the routine biological testing. In addition, a reduction by the factor 100 yielded clearly identifiable and quantifiable substrate and product as well. This offered the possibility of a more precise determination of the K_M -value compared to the fluorescence-based enzyme assay as a broader range of substrate concentrations (0.25–25 μM , fluorescence-based enzyme assay: 1.0–25 μM) could be investigated. Furthermore, the reaction time could be significantly shortened (7 min \rightarrow 90 s). This guaranteed, that the used reaction rates were initial velocities. The K_M -value determined using the LC-MS/MS-based enzyme assay amounted to $3.63 \pm 0.50 \mu\text{M}$. This value was around three times lower than the K_M -value determined using the fluorescence-based enzyme assay and in the range of literature-known values. The maximum reaction rate amounted to $7.77 \pm 0.88 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

In case of the SPR-based LpxC-enzyme assay, an alternative concept for the characterization of inhibitors was used: the observation of isolated substance-binding at the immobilized enzyme in the

absence of substrate. The determined enzymatic parameter was the dissociation constant K_D . Hereby, the first step was the optimization of the enzyme's immobilization conditions, which should be covalently bound via amide coupling to the sensorchip surface after an electrostatic preconcentration. Starting from a 10 mM acetate buffer (pH = 4.0-5.0), which led to strong enzyme denaturation, resulting in a high non-specific residual binding (>50%), the electrostatic preconcentration was optimized first by the combination of different reducing agents and cofactor donors. Thereby, 1 mM DTT and 0.1 mM $ZnCl_2$ turned out as the most suitable additives for enzyme stabilization at both pH = 4.5 and pH = 5.0. During the subsequent amide coupling, the highest coupling efficiency could be achieved using a slightly basic running buffer (pH = 7.5). Furthermore, the addition of a sufficient salt content in the running buffer (150 mM NaCl) offered the possibility to largely prevent non-specific residual binding of electrostatic bound enzyme. In the following affinity measurements, a strong pH-dependency of analyte binding could be observed. While both the immobilization buffer (pH = 7.5) as well as a buffer at pH = 7.0 yielded similar K_D -values, neither measurements at pH = 6.0, the pH-optimum of *E. coli* LpxC, nor measurements at pH = 6.5 led to the observation of specific interactions of the investigated compounds with the enzyme. For this reason, all affinity measurements were performed at a pH-value (pH = 7.5) that was different from the enzyme's pH-optimum.

Afterwards, all previously developed enzyme assays should be transferred to LpxC from *P. aeruginosa*. Hereby, the first step was an optimization of the conditions of both enzyme expression as well as purification due to the low solubility and the trend for aggregate formation of the desired enzyme. Afterwards, initial experiments with this enzyme were carried out using the fluorescence-based enzyme assay. This led first to the observation that the *P. aeruginosa* enzyme was inactive when using the *E. coli* conditions. In contrast, the use of a slightly basic phosphate buffer using the same additives as in the *E. coli* enzyme assay, led to the detection of product formation. In addition, the determination of IC_{50} -values of selected LpxC-inhibitors revealed, that these compounds show principally inhibitory activity against the *P. aeruginosa* enzyme as well. Unfortunately, the hereby observed fluorescence intensities were even lower than for *E. coli* LpxC C63A. For this reason, the mass-based enzyme assay was used for the determination of the enzymatic parameters of *P. aeruginosa* LpxC as well. The hereby determined K_M -value amounted to $4.66 \pm 0.24 \mu M$ and the maximum reaction rate to $11.6 \pm 0.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Therefore, *P. aeruginosa* LpxC showed similar affinity for the *E. coli*-substrate like the *E. coli*-enzyme itself. In contrast, the conversion of the foreign substrate was slightly lower than for *E. coli* LpxC C63A. Nonetheless, these values were still in the same order of magnitude. For further biological testing, both the previously developed LC-MS/MS-based enzyme assay (except from the reaction buffer identified with the help of the fluorescence-based enzyme assay) as well as the SPR-based affinity assay could be transferred without any further optimization.

The comparison of all three developed respectively used enzyme assays showed, that all three assays are suitable and equally necessary at the Institute of Organic Chemistry of the University of Hamburg due to the high number of limiting factors. Especially if antibacterial data are already available and if there are no general exclusion criteria like a primary amine in the structure of the investigated compound or an intrinsic fluorescence, the fluorescence-based enzyme assay offers the fastest and simplest method for the determination of K_i -values against *E. coli* LpxC C63A. In case of one of the above-mentioned exclusion criteria or a generally low fluorescence intensity as observed under the conditions of the fluorescence-based *P. aeruginosa* LpxC assay, the LC-MS/MS-based and the SPR-based enzyme assay offer well-suited alternatives. In addition, the mass-based LpxC-enzyme assay offers the possibility of a significant reduction of substrate concentration due to the lower detection limit, which leads to a

reduction of costs. Disadvantages of this assay are the duration, which is relativized by assay automation, as well as the availability of the mass spectrometer. Using the optimized conditions, the SPR-based enzyme assay is primarily suited for the screening-based identification of inhibitors instead of the determination of concrete K_D -values. Furthermore, this assay shows the advantage that an isolated binding event is observed and the substrate is not required. For this reason, the developed SPR-based enzyme assay was subsequently applied for LpxA, which catalyzes the first step of lipid A-biosynthesis. This first step is a thermodynamically unfavored two-substrate reaction and therefore poorly suited for an inhibition assay.

Beside the identification of LpxA-inhibitors, a major goal of this assay was the comparison of two different immobilization strategies. For this reason, two different variants of the enzyme, untagged and *N*-terminal-tagged LpxA, were expressed and isolated. During the subsequent SPR-experiments, the untagged enzyme was immobilized on the sensorchip surface via amide coupling, either using the *N*-terminus or a lysine sidechain. In contrast to the previous LpxC-experiments, no denaturation of the enzyme in the acetate buffers could be observed. For this reason, LpxA was immobilized without any further optimization at pH = 5.0. The running buffer was based on a literature-known fluorescence polarization assay (pH = 8.0) and yielded without any further optimization nearly quantitative enzyme coupling. The immobilization of the tagged enzyme was realized in contrast exclusively via its *N*-terminus using physiological conditions. The validation of the enzyme assay was done for both variants with the help of the peptide inhibitor **15** and the product of the enzymatic reaction HM-UDP-GlcNAc. The determined K_D -value of **15** was in the same order of magnitude for both enzyme variants ($K_i = 233\text{--}275$ nM). This indicated that the binding of **15** was not negatively influenced through the immobilization via amide coupling. In contrast, the reaction product showed a twenty times higher affinity for the tagged enzyme ($K_D = 3.50$ μ M). This led to the conclusion that depending on the inhibitor's binding region, the way of immobilization seemed to influence the compound's affinity. For this reason, only the tagged enzyme was used for the subsequent identification of novel LpxA-inhibitors. Hereby, nine compounds, which were identified with the help of four different, structure- and ligand-based approaches, as well as four derivatives of literature-known and patented LpxA-inhibitors were investigated for affinity toward LpxA. In the SPR-experiments, compound **174**, which had been identified using a structure-based approach, could be confirmed as LpxA-inhibitor. The K_D -value of **174** amounted to 13.3 μ M and was therefore in the same order of magnitude as the one of the literature-known peptide inhibitor **16**.

Afterwards, the developed LpxC-enzyme assays were applied to determine the inhibitory activity of 155 compounds toward *E. coli* LpxC C63A and to derive structure-activity relationships from the obtained data. First, peptide and morpholine derivatives with an alternative zinc-binding group were analyzed. Secondly, based on LpxC-inhibitors from the working group Holl, particularly the most potent *C*-furanoside **17** ($K_i = 411$ nM), variations of the central building block between the pharmacophoric elements, the hydroxamic acid moiety and the lipophilic tail, as well as a systematic investigation of additional substituents, which should address the UDP-binding pocket, were performed.

Initially it could be shown that, irrespective of the central building block, the stereoisomers exhibiting (*S*)-configuration in α -position of the hydroxamate moiety generally constitute the eutomer of the respective pair of enantiomers. While the exchange of the tetrahydrofuran to a pyrrolidine ring did not lead to an increase in inhibitory activity compared to *C*-furanoside **17**, a ring extension led to two compounds with higher inhibitory affinity, glucopyranoside **67** and mannopyranoside **68** ($K_i \approx 130$ nM).

The investigation of compounds with an open-chain structure as central building block served primarily to identify substituents addressing the UDP-binding site. Thus, a phenyl ring was initially introduced in the α -position of the hydroxamate moiety via various linkers. Hereby, the following trend regarding the inhibitory activity could be observed: 1,4-substituted triazole (**100**, $K_i = 24.6$ nM) > amide > ether > secondary amine > 1,5-substituted triazole. Subsequently, this phenyl ring was replaced by different substituents. When investigating regioisomeric biphenyl, quinolone and indole derivatives, a clear difference in activity could be observed for all regioisomers. This showed that the identification of a suitable fragment for the further extension of LpxC-inhibitors into the UDP-binding pocket is not sufficient, but the location of the linkage of this fragment is also of essential importance. The most active compounds of this screening were three indole derivatives, namely indole-3-carboxamide **19** and indole-5-carboxamide **140** ($K_i \approx 10.0$ nM) as well as the 1,4-substituted triazole **113** ($K_i = 3.02$ nM), also bearing an indole substituent. Among the investigated hydroxamic acids with either an amide or a triazole motive in the benzylic position none of the compounds exhibited higher inhibitory activity than its regioisomer being substituted in α -position.

Subsequently, selected compounds were tested for inhibitory activity toward *P. aeruginosa* LpxC. It could be shown that all compounds with inhibitory activity against *E. coli* LpxC C63A exhibited at least the same potency against *P. aeruginosa* LpxC. In addition, the structural diversity of the identified inhibitors was higher than for *E. coli* LpxC C63A. The most potent compound was, as for *E. coli* LpxC C63A, hydroxamic acid **113** ($K_i = 1.30$ nM) bearing in α -position a 1,4-substituted triazole ring with an indole-3-yl residue.

Finally, selected LpxC-inhibitors were tested in combination experiments for antibacterial activity. The combination of ten compounds with the efflux pump inhibitor PA β N showed that the MIC of all compounds against *P. aeruginosa* and the MIC of nine compounds against *E. coli* could be lowered in average by three serial 1:2-dilution steps. Only C-furanoside **17** appeared not to be a target of the efflux pumps in *E. coli*, which are inhibited by PA β N. With respect to the combination of LpxC-inhibitor **18** with the approved antibiotic moxifloxacin, a synergistic effect dominated by **18** could be observed. Thereby, **18** reduced the IC_{50} -value of moxifloxacin by 61%. Thus, combination of LpxC-inhibitors with commercially available antibiotic represents a promising approach to enhance the efficacy of the latter.

3 Einleitung

Im Jahr 2014 warnte die Weltgesundheitsorganisation (WHO, *world health organization*) in ihrem Bericht über die aktuelle Lage der Antibiotika-Resistenzen vor dem Anbruch einer postantibiotischen Ära.^[1] Heutzutage versteht man unter Antibiotika sowohl Naturstoffe als auch synthetische Verbindungen, die antibakterielle Wirkung aufweisen. Ende des 19. Jahrhunderts läuteten Robert Koch und Louis Pasteur durch Untersuchungen der Zusammenhänge von Bakterien und Infektionskrankheiten eine moderne Ära der Medizin ein. Zunächst konnte von Joseph Lister durch Verwendung von Phenol als desinfizierender Substanz die Sterblichkeit an Infektionskrankheiten nach Operationen gesenkt werden.^[2,3] Im Jahr 1893 wurde dann erstmals in Italien die Mycophenolsäure, welche das Wachstum des Milzbranderreger *Bacillus anthracis* inhibiert, aus einem Schimmelpilz isoliert. Später konnte gezeigt werden, dass diese Verbindung ebenfalls antivirale, antifungale und antitumor Eigenschaften aufweist. Zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung fand Mycophenolsäure weltweit jedoch keine Beachtung.^[3] Die erste klinische Anwendung eines Antibiotikums erfolgte im Jahr 1911 als das von Paul Ehrlich entwickelte Arsphenamin zur Behandlung von Syphilis in den Handel kam. Der endgültige Durchbruch der Antibiotika gelang jedoch erst während des Zweiten Weltkrieges, als Pfizer die Tiefentankerfermentation entwickelte, um das 1928 durch Alexander Fleming entdeckte Penicillin im Großmaßstab zu produzieren.^[2-4] Anschließend begann das Goldene Zeitalter der Antibiotika, in welchem der Großteil der heute kommerziell erhältlichen Substanzen entdeckt wurde. Diese umfassen dabei auf der einen Seite Naturstoffe, isoliert aus Actinomyceten, sonstigen Bakterien oder Pilzen, und auf der anderen Seite synthetische Substanzen, welche teils durch Naturstoffe inspiriert wurden (Abb. 1).^[5]

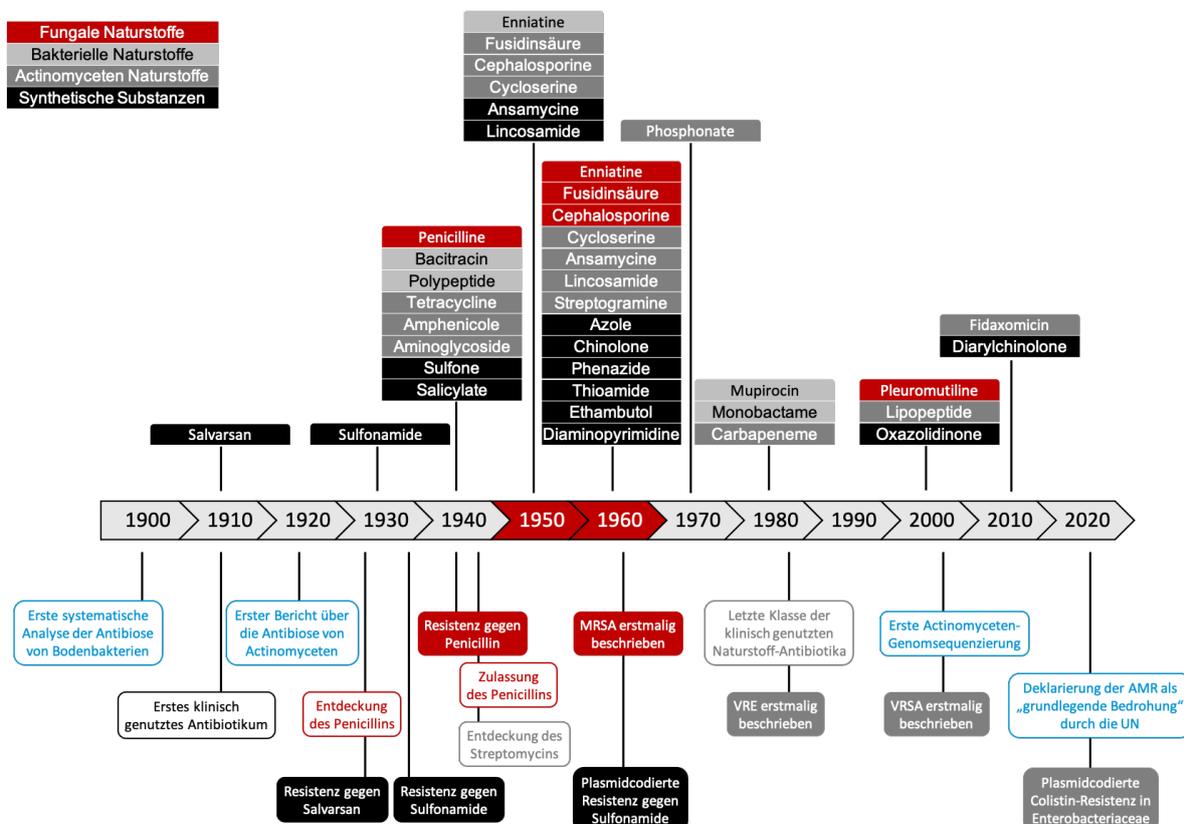


Abbildung 1: Zeitstrahl der Entdeckung heutzutage verfügbarer Antibiotika. Diese werden nach ihrer Herkunft in Naturstoffe sowie synthetische Substanzen unterteilt. Zusätzlich dazu sind weitere Meilensteine in der Forschung, der klinischen Verwendung sowie der Resistenzentwicklung dargestellt. Verändert nach Hurchings *et al.*^[5]

Unabhängig von ihrer Herkunft lassen sich die meisten verwendeten Antibiotika aufgrund ihres Wirkungsmechanismus in folgende vier Klassen einteilen: Inhibitoren der bakteriellen Zellwandsynthese (bspw. Penicilline, Cephalosporine, Vancomycin, Bacitracin), Inhibitoren der bakteriellen Replikation (bspw. Metronidazol, Ciprofloxacin), Inhibitoren der Proteinbiosynthese (bspw. Aminoglycoside, Tetracycline, Makrolide) sowie Inhibitoren bakterieller Stoffwechselwege (bspw. Sulfonamide als Inhibitoren der Folat-Synthese und Diarylchinoline als Inhibitoren der Adenosintriphosphat (ATP)-Synthese).^[5]

Seit Beginn der 1970er Jahre nahm die Anzahl neu zugelassener Substanzen jedoch drastisch ab. So konnten in den vergangenen 50 Jahren lediglich vier gänzlich neue Antibiotikaklassen auf den Markt gebracht werden. Die übrigen neu zugelassenen Antibiotika stellten Derivate bereits zugelassener Verbindungen dar. Das zuletzt zugelassene neue Antibiotikum war das cyclische Lipopeptid Daptomycin, dessen Wirkungsweise erst kürzlich vollständig aufgeklärt wurde.^[6] Erschwerend zur Abnahme der Anzahl neuer Substanzklassen kommt hinzu, dass die moderne Medizin in den vergangenen Jahrzehnten durch das Auftreten antibiotikaresistenter Bakterien vor neue Herausforderungen gestellt wurde. Bereits vor Beginn der Coronavirus-Pandemie belegten im Jahr 2019 unter den ansteckenden Erkrankungen die Infektionen der unteren Atemwege Platz 1 der Todesursachen in Industrieländern. Bemerkenswert hierbei ist, dass im Vergleich zum Jahr 2000 die absolute Anzahl an Toten um ca. 0.5 Millionen auf 2.6 Millionen Tote weltweit gesenkt werden konnte.^[7] Berichte aus dem Jahr 2019 zeigten jedoch auch, dass mittlerweile die Anzahl Verstorbener durch Infektionen mit multiresistenten Bakterien jährlich ca. 0.7 Millionen betrug. Diese Infektionen umfassten gewöhnliche Infektionen wie Infektionen der unteren Atemwege, des Urogenitaltraktes oder sexuell übertragbare Erkrankungen, aber auch Bakteriämien.^[8,9]

Die Strategien gegen die weitere Zunahme antimikrobieller Resistenzen und zur Behandlung entsprechender Infektionen sind vielfältig. Zunächst ist ein verantwortungsvoller Einsatz bereits zugelassener Antibiotika notwendig, um das Auftreten neuer Resistenzen einzudämmen. Aktuell wird die Mehrheit der zugelassenen Antibiotika gegen Infektionen der Atemwege, der Haut, der Zähne und des Urogenitaltrakts eingesetzt, welche bei dermalen und urogenitalen Infektionen auch mit einem hohen Nutzen für die Patienten verbunden sind. Insbesondere in Bezug auf akute respiratorische Infektionen, die zum Großteil durch virale Erreger verursacht werden, entsteht durch Antibiotikagabe jedoch kein zusätzlicher Nutzen für die Patienten. Eine alternative Strategie bietet hier der vermehrte Einsatz von Impfungen, um die virale Infektion sowie die bakterielle Pneumonie als Sekundärinfektion zu vermeiden.^[10] Bezüglich der Behandlung bestehender Resistenzen bietet vor allem das Adressieren neuartiger Targets eine Möglichkeit bei der Wirkstoffentwicklung. Eine weitere Möglichkeit der Behandlung bietet die Anwendung von Kombinationsansätzen. Dies kann beispielsweise die Kombination verschiedener antibakterieller Substanzen oder die Kombination einer antibakteriellen Substanz mit einem Effluxpumpeninhibitor (EPI) beinhalten.^[11]

3.1 Antibakterielle Resistenz

Die Entwicklung antibakterieller Resistenzen stellt einen natürlichen Evolutionsprozess dar. Da es sich bei einem Großteil der heute erhältlichen antibakteriellen Substanzen um Naturstoffe handelt, konnte beispielsweise bereits vor dem flächendeckenden therapeutischen Einsatz des Penicillins eine β -Lactamase identifiziert werden, welche in der Lage war, das Antibiotikum zu inaktivieren.^[12] In den vergangenen Jahrzehnten begünstigte jedoch der vermehrte Einsatz antibakterieller Substanzen in der Humanmedizin eine Beschleunigung bei der Entstehung und Verbreitung antibakterieller Resistenzen. Neben dem therapeutischen Nutzen in der Medizin wurde durch unsachgemäßes Verschreiben in Industriestaaten sowie der Abwesenheit von Verschreibungspflichten in Entwicklungsländern der Selektionsdruck in Richtung resistenter Bakterien verschoben.^[13] Auch in der Landwirtschaft bewirkt der Einsatz von Antibiotika im Viehfutter, dass diese in das Grundwasser gelangen und dort das natürliche Biom verändern.^[14] Aktuell werden vor allem vier verschiedene Infektionen durch drei resistente Bakterienarten im Krankenhaus und im Alltag verursacht: Urogenitaltraktinfektionen und Bakteriämien, verursacht durch *Escherichia coli* (*E. coli*), welche gegenüber Fluorochinolonen oder Cephalosporinen der dritten Generation resistent sind, Urogenitaltraktinfektionen, Bakteriämien und Pneumonien, verursacht durch *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), welche gegenüber Cephalosporinen und Carbapenemen der jeweils dritten Generation resistent sind, sowie Wundinfektionen und Bakteriämien, verursacht durch den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA).^[1]

Besonders besorgniserregend ist im Kontext antibakterieller Resistenzen die Zunahme multiresistenter Bakterienstämme. Multiresistenz beschreibt dabei das Nicht-Ansprechen auf mindestens jeweils eine antibakterielle Substanz aus mindestens drei verschiedenen Substanzklassen.^[15] Im Jahr 2017 wurde von der WHO erstmalig eine Prioritätenliste veröffentlicht, welche zwölf multiresistente Bakterienarten beinhaltet, gegen die die Entwicklung neuer Antibiotika die höchste Dringlichkeit aufweist. Diese Liste umfasst sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien und gliedert sich in drei Untergruppen.^[16] Die höchste Priorität besteht gegenüber den gramnegativen Arten *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) sowie verschiedenen Enterobacter-Spezies, welche eine Carbapenem-Resistenz aufweisen. Carbapeneme gehören bereits zu den Reserveantibiotika und bieten aktuell die bestmögliche Therapie gegen die meisten multiresistenten Bakterien. Gegen alle Pathogene der ersten Gruppe steht somit lediglich Colistin zur Behandlung zur Verfügung, wobei auch hier bereits vereinzelt Resistenzen beobachtet werden konnten. Dies macht die Entwicklung neuartiger Antibiotika dringend notwendig.^[9,16] Voraussetzung dafür ist das Verständnis existierender Resistenzmechanismen. Eine mögliche Klassifizierung dieser bietet die Herkunft des Resistenzmechanismus (Abb. 2).^[17]

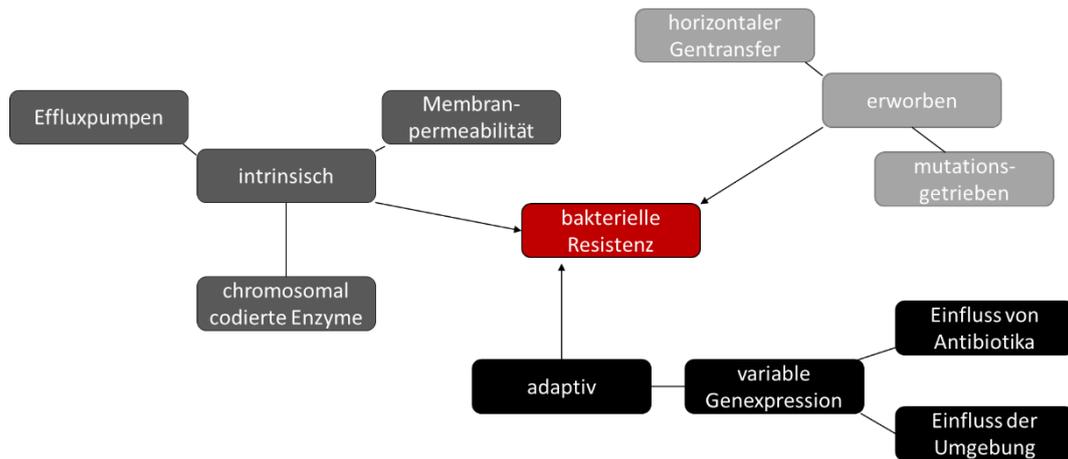


Abbildung 2: Klassifizierung bakterieller Resistenzmechanismen nach ihrer Herkunft. Diese umfassen auf der einen Seite intrinsische und erworbene Resistenzen, die ohne direkten Kontakt des Bakteriums zu der antibakteriellen Substanz vorhanden sind. Auf der anderen Seite wird durch adaptive Resistenz eine temporäre Resistenz aufgrund eines direkten Kontaktes des Bakteriums mit der antibakteriellen Substanz beschrieben. Verändert nach Pires *et al.*^[17]

Adaptive Resistenz setzt voraus, dass ein spezifisches Bakterium direkten Kontakt zu dem entsprechenden Antibiotikum hatte und durch beispielsweise eine veränderte Genexpression eine temporäre Resistenz entwickelt.^[18] Intrinsische und erworbene Resistenzmechanismen sind hingegen sehr stabil und aufgrund früherer Evolutionsmechanismen über Generationen in Bakterienstämmen verankert, ohne dass ein spezifisches Bakterium jemals selbst mit dem Antibiotikum in Kontakt gekommen ist.^[19] Intrinsische Resistenzmechanismen beschreiben dabei eine natürlich vorkommende Eigenschaft einer ganzen Bakterienspezies. So dient die äußere Zellmembran bei allen gramnegativen Bakterien als Permeabilitätsbarriere. Des Weiteren führen konstitutiv exprimierte Effluxpumpen, die toxische Substanzen aus dem Zellinneren hinausbefördern, oder chromosomal codierte Enzyme, die das Antibiotikum inaktivieren, zu einer basalen Resistenz. Zusätzlich dazu zeigen einzelne Stämme einer Bakterienspezies eine durch eine zufällige Mutation oder durch horizontalen Gentransfer erworbene Resistenz. Im Fall der Carbapenem-resistenten Bakterienstämme ist das eine Mutation in der β -Lactamase, sodass diese β -Lactamasen ein erweitertes Substratspektrum (ESBL, *extended spectrum β -lactamases*) aufweisen und auch Carbapeneme inaktivieren können.^[20] Eine weitere häufig erworbene Resistenz beinhaltet eine veränderte Akkumulation der Substanzen im Zellinneren. Dies kann auf der einen Seite durch einen erniedrigten Influx geschehen, indem Porine, welche die Aufnahme lipophiler Substanzen ermöglichen, herunterreguliert werden. Auf der anderen Seite bietet eine Hochregulation von Effluxpumpen einen schnellen und effektiven Resistenzmechanismus. Derzeit sind sechs verschiedene Familien bakterieller Effluxpumpen bekannt, die ein breites Substratspektrum besitzen und stark in erworbene Resistenzen involviert sind (Abb. 3).^[21]

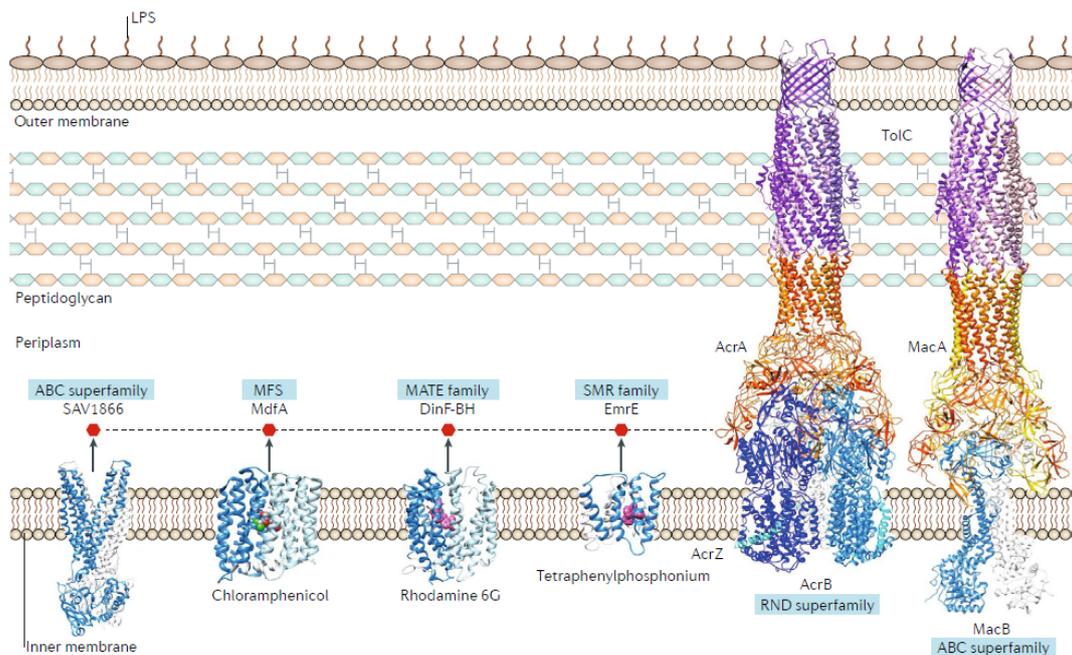


Abbildung 3: Übersicht der Familien bakterieller Effluxpumpen. Diese werden in ABC-Transporter, die aktiv Substanzen befördern, und sekundäre Effluxpumpen unterteilt, und sind in der inneren Zellmembran lokalisiert. Dort können diese als eigenständige Transporter fungieren oder Teil einer dreiteiligen Effluxpumpe, die bis zur äußeren Zellmembran reicht, sein. Die weitere Unterteilung der sekundären Transporter erfolgt aufgrund struktureller Merkmale der Proteine.^[21]

Diese Familien sind in Abhängigkeit von ihrer Energiequelle in zwei Hauptklassen unterteilt. Auf der einen Seite gibt es die ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*), die durch ATP-Hydrolyse aktiv Substanzen aus dem Zellinneren in das Periplasma hinaus- bzw. in das Zellinnere hineinpumpen. ABC-Transporter sind entweder eigenständig in der inneren Membran lokalisiert oder Teil einer dreiteiligen Effluxpumpe wie MacAB-TolC. Auf der anderen Seite gibt es sekundäre Transporter, welche einen elektrochemischen Protonengradienten als Energiequelle nutzen. Die einzelnen Familien der sekundären Transporter unterscheiden sich in ihrem strukturellen Aufbau. Die SMR-Familie (*small multidrug resistance family*) umfasst nur wenige Effluxpumpen. Charakteristisch hierbei ist, dass das Protein sehr klein ist. Das Substratspektrum umfasst lipophile Kationen und quartäre Ammoniumsalze. Die MFS (*major facilitator superfamily*) hingegen ist die größte und diverseste Familie und umfasst Uniporter, Symporter und Antiporter. Substrate sind zum Beispiel das natürliche Stoffwechselprodukt Lactose, aber auch die antibakterielle Substanz Chloramphenicol. Die MATE-Familie (*multidrug and toxin extrusion family*) ist strukturell der MFS sehr ähnlich, bildet jedoch eine eigenständige Gruppe aufgrund von Aminosäuresequenzhomologien. Substrate der MATE-Familie sind polyaromatische oder kationische Wirkstoffe wie Aminoglycoside und Fluorochinolone.^[21]

Die am besten charakterisierten Effluxpumpen gehören zur RND-Superfamilie (*resistance nodulation division superfamily*), da diese im Kontext klinischer antimikrobieller (Multi-) Resistenzen die höchste Relevanz aufweist. Häufig sind diese RND-Transporter Teil einer dreiteiligen Effluxpumpe mit einer „homotrimeren“ Struktur (Abb. 4).^[22]

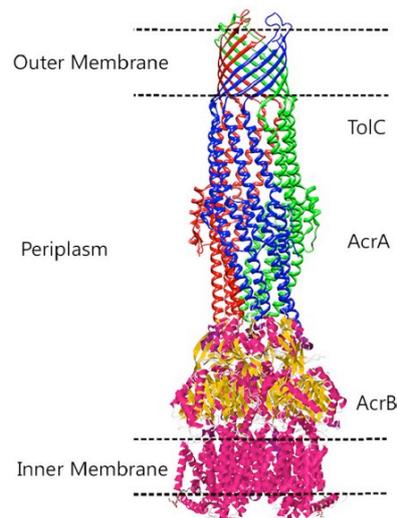


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer dreiteiligen Effluxpumpe, die Substanzen aus dem Zellinneren hinaus befördert. Ausgehend von einem Protonen-Antiporter in der inneren Zellmembran (bspw. AcrB) erfolgt über ein Verbindungsprotein (bspw. ein AcrA-Dimer) die Verknüpfung zu einem Membrankanal in der äußeren Zellmembran (bspw. TolC). Durch Trimerisierung entsteht die dreiteilige Effluxpumpe, welche ein Verhältnis der einzelnen Komponenten von 3:6:3 aufweist.^[22]

In der äußeren Membran befindet sich der Membrankanal TolC, welcher die Substanz aus dem Zellinneren hinaus befördert. Anschließend folgt im Periplasma das AcrA-Dimer, welches als Verbindungsprotein zum integralen Membranprotein, dem RND-Protonen-Antiporter AcrB, fungiert. Drei AcrAB-TolC-Einheiten bilden ein „Homotrimer“ aus, sodass eine dreiteilige Effluxpumpe mit einem 3:6:3-Verhältnis der einzelnen Komponenten entsteht. Im Apo-Zustand besitzen die drei AcrB-Proteine tatsächlich eine homotrimere Struktur. Durch Substratbindung im Periplasma bzw. an der periplasmatischen Seite der inneren Membran erfolgt jedoch eine Konformationsänderung der einzelnen AcrB-Proteine, sodass sie drei nicht-äquivalente Strukturen aufweisen, die mit hoher katalytischer Kooperativität arbeiten und das Substrat über die äußere Membran aus der Zelle hinaus befördern. Bekannte Beispiele für dreiteilige Effluxpumpen sind AcrAB-TolC in *E. coli* sowie MexAB-OprM in *P. aeruginosa*. Das Substratspektrum dieser ist breit gefächert und umfasst u.a. Aminoglycoside, β -Lactame, Cephalosporine, Detergenzien, Fluorchinolone, kationische Farbstoffe, Tetracycline und Makrolide. Die einzige Gemeinsamkeit ist, dass alle einen lipophilen Anteil aufweisen.^[21–23]

3.2 Lipid A-Biosynthese

Das vermehrte Auftreten antibakterieller Resistenzen bei gramnegativen Bakterien lässt sich durch strukturelle Besonderheiten beim Aufbau ihrer Zellwand begründen. Während grampositive Bakterien lediglich eine Zellwand aus mehreren (quer)vernetzten Schichten Murein besitzen, ist der Aufbau bei gramnegativen Bakterien deutlich komplexer und bietet einen intrinsischen Schutz (Abb. 5).^[24]

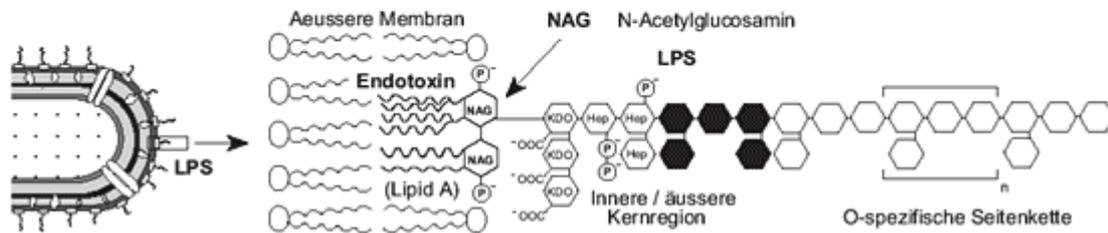


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus der Zellwand gramnegativer Bakterien. Zusätzlich zur inneren Zellmembran sowie einer dünnen Mureinschicht weisen gramnegative Bakterien eine asymmetrische äußere Zellmembran auf. Die Lipopolysaccharide der äußeren Schicht der Lipiddoppelschicht der äußeren Zellmembran sind aus drei Strukturelementen aufgebaut: (i) innen: Lipid A, (ii) mittig: saccharidhaltige Kernregion, (iii) außen: O-Antigendomäne.^[24]

Neben der inneren Membran sowie einer dünnen Mureinschicht sind gramnegative Bakterien zusätzlich durch eine äußere Membran geschützt, die als weitere Permeabilitätsbarriere fungiert. Der äußere Monolayer dieser äußeren Membran besteht aus ca. 10^6 Molekülen Lipid A. Lipid A ist ein phosphoryliertes β -1,6-verknüpftes Glucosamindisaccharid, welches die in den Extrazellularraum gerichteten, aus insgesamt drei Teilstrukturen aufgebauten Lipopolysaccharide (LPS) in der Zellmembran verankert. An Lipid A gebunden folgt eine Kernregion, die aus einem Oligosaccharid besteht und über 2-Keto-3-desoxy-D-mannooctulosäure (KDO) an Lipid A gebunden ist. Der dritte, äußere Bereich der LPS ist ein Polysaccharid, die O-Antigen-Domäne, welche für jeden Bakterienstamm spezifisch ist.^[25,26] Aufgrund seiner Funktion als Membrananker ist Lipid A essentiell für das Wachstum und die Viabilität gramnegativer Bakterien. Zusätzlich dazu fungiert Lipid A als Endotoxin und bildet somit auch die biologisch aktive Komponente des Lipopolysaccharids. Die Aktivierung des innate Immunsystems nach Lipid A-Kontakt bewirkt eine Zytokinausschüttung, welche zu einem septischen Schock führen kann, der mit einer hohen Sterblichkeit assoziiert ist. Dies zusammen macht die Lipid A-Biosynthese zu einem interessanten Angriffspunkt bei der Entwicklung neuartiger Antibiotika.^[27,28]

Die Lipid A-Biosynthese geht von Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc, **1**) aus, erfolgt durch neun konservierte Enzyme und liefert KDO₂-Lipid A (**5**) (Abb. 6).^[26,29]

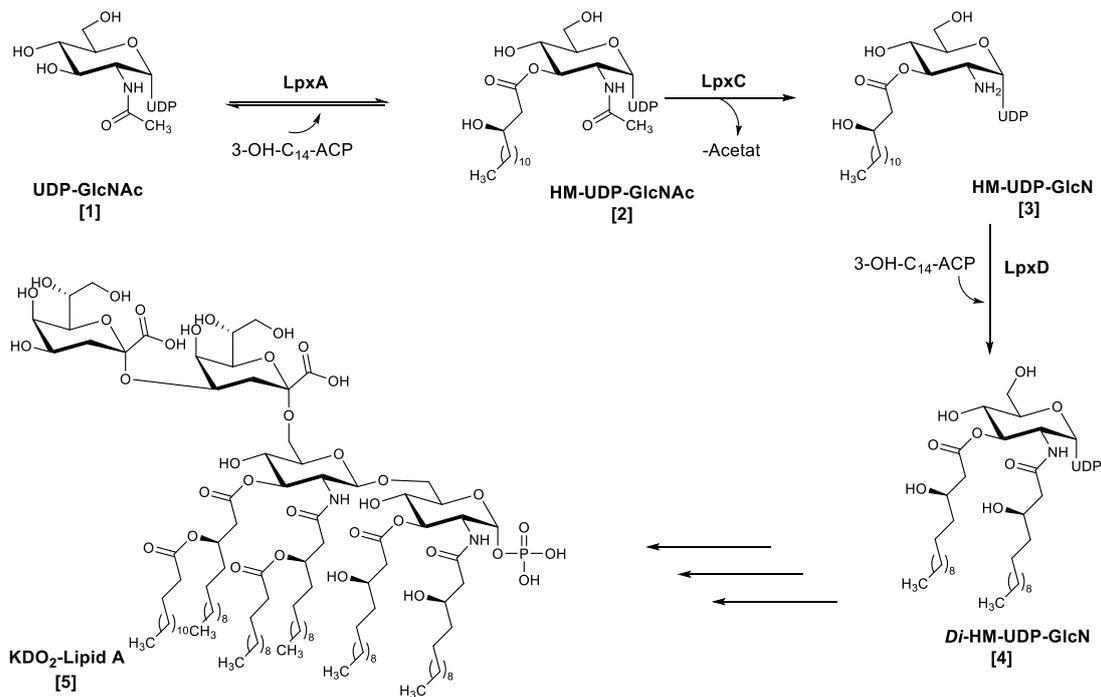


Abbildung 6: Biosynthese von KDO₂-Lipid A (5) in *E. coli*. Ausgehend von UDP-GlcNAc (1) erfolgt zunächst durch cytosolische Enzyme die Biosynthese von Di-HM-UDP-GlcN (4). Nach reversibler 3-Acylierung durch LpxA wird der Schlüsselschritt der Lipid A-Biosynthese, die irreversible Deacetylierung von HM-UDP-GlcNAc (2), durch LpxC katalysiert. Anschließend erfolgt die 2-Acylierung von HM-UDP-GlcN (3) durch LpxD. Die weitere Biosynthese von KDO₂-Lipid A (5) erfolgt in sechs Schritten. Dabei werden die ersten beiden durch periphere und die letzten vier durch integrale Membranproteine katalysiert.

Interessante Targets bieten hierbei in Bezug auf eine Assayentwicklung vor allem die ersten drei Schritte, da sie durch cytosolische Enzyme katalysiert werden. Die folgenden beiden werden durch periphere, die letzten vier durch integrale Membranproteine katalysiert.^[30]

3.2.1 Die bakterielle Deacetylase LpxC

Die zinkabhängige Metalloamidase UDP-3-*O*-Acyl-*N*-acetylglucosamindeacetylase (LpxC) katalysiert den zweiten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Lipid A-Biosynthese.^[31] Bis auf wenige Ausnahmen ist dies nach reversibler 3-Acylierung von UDP-GlcNAc (1) durch die UDP-*N*-Acetylglucosaminacyltransferase (LpxA) die irreversible Deacetylierung des Glucosaminderivates 2. Die Länge der Acylkette des LpxC-Substrates variiert hierbei je nach Bakterienspezies. In *E. coli* ist diese eine (*R*)-3-Hydroxymyristoylkette und das zugehörige Enzym die UDP-3-*O*-[(*R*)-3-Hydroxymyristoyl]-*N*-acetylglucosamindeacetylase (*E. coli* LpxC).^[32–34] Trotz der Unterschiede in der Länge der Acylkette des Substrates sind sowohl die Sequenz als auch die Struktur des LpxC-Enzyms über alle gramnegativen Bakterienspezies hoch konserviert, ohne dass es Ähnlichkeiten zu anderen Deacetylasen oder zu Säugerproteinen aufweist (Abb. 7).^[29,35]

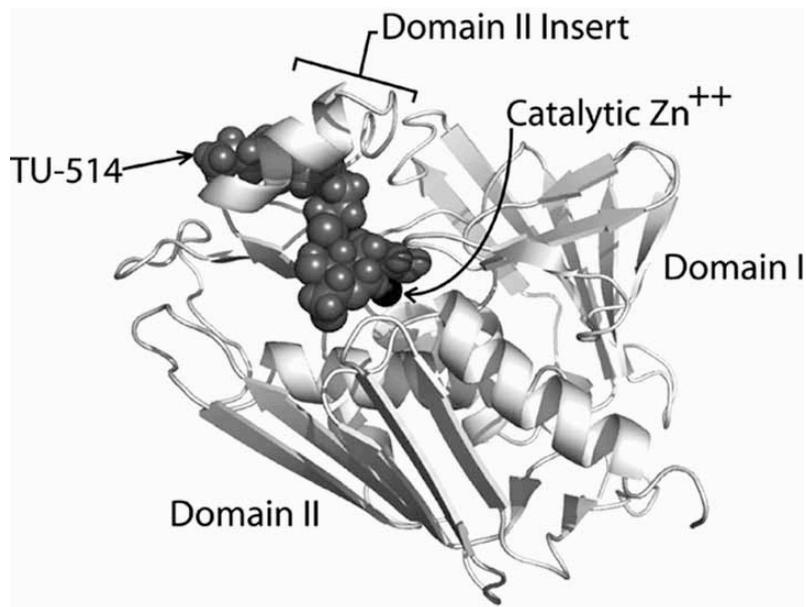


Abbildung 7: Proteinstruktur von *E. coli* LpxC. Diese ist als Komplex mit gebundenem Substratanalogen TU-514 (6) dargestellt. Das Enzym weist dabei zwei ähnliche Domänen, die jeweils aus einem β -Faltblatt aus fünf β -Strängen, zwei α -Helices und einem Insert aufgebaut sind, auf. In der Tertiärstruktur führt dies zu einer β - α - β -Sandwich-Faltung des Enzyms. Das aktive Zentrum des Enzyms mit dem katalytischen Zn^{2+} -Ion befindet sich auf einer Seite des Sandwiches an der Berührungsfläche beider Domänen.^[35]

Das LpxC-Enzym zeichnet eine einzigartige β - α - β -Sandwich-Faltung aus. Es weist zwei Domänen mit ähnlicher Struktur auf. Jede dieser Domänen beinhaltet zwei α -Helices, ein β -Faltblatt, bestehend aus fünf β -Strängen, und eine Insert-Region. Die sandwichartige Faltung entsteht dadurch, dass die vier α -Helices zwischen den β -Faltblättern lokalisiert sind. Die Geometrie dieser zwei Domänen ist jedoch nicht identisch. Während in Domäne I das β -Faltblatt leicht verdreht ist, ist das β -Faltblatt in Domäne II flach. Auch die Inserts unterscheiden sich: In Domäne I bildet ein dreisträngiges antiparalleles β -Faltblatt die entsprechende Region. In Domäne II ist das Insert hingegen helixförmig und bildet eine hydrophobe Passage aus, die als Bindungsstelle für die Acylkette des Substrates dient, wie mithilfe des Substratanalogons TU-514 (6) gezeigt werden konnte.^[35,36]

Auf der einen Seite des Sandwiches befindet sich an der Berührungsfläche der Domänen das aktive Zentrum mit dem katalytischen Zn^{2+} -Ion. Das Vorhandensein dieses Ions konnte bereits vor der ersten Röntgenkristallstruktur nachgewiesen werden, nachdem beobachtet wurde, dass LpxC-Inhibitoren häufig ein Hydroxamsäuremotiv aufwiesen, welches in der Lage ist, Zinkionen zu chelatisieren.^[37,38] Röntgenkristallstrukturen zeigten, dass das katalytische Zinkion His79, His238 und Asp242 des LpxC-Enzyms sowie abhängig von der Umgebung ein oder zwei weitere Liganden koordinieren kann: Im Fall von insgesamt fünf Liganden wird eine quadratisch-pyramidale Geometrie mit His79 in apikaler Position ausgebildet. Dies konnte in Anwesenheit des Substratanalogons TU-514 (6) sowie in Anwesenheit von Palmitat beobachtet werden. Im Fall von insgesamt vier Liganden, wie es in Anwesenheit von Dimethylarsinsäure und Imidazol beobachtet werden konnte, wird eine tetraedische Geometrie ausgebildet. Bemerkenswerterweise konnte in Anwesenheit von Imidazol außerdem beobachtet werden, dass ca. 50% der LpxC-Zink-Komplexe zwei Wassermoleküle anstelle eines Imidazolmoleküls gebunden hatten und ein dynamisches Gleichgewicht zwischen quadratisch-pyramidaler und tetraedischer Geometrie vorlag.^[39] Im Zuge dieser Strukturuntersuchungen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass bei Zinküberschuss neben dem katalytischen Zinkion auch ein inhibitorisches Zinkion durch LpxC gebunden wird. In diesem Fall koordiniert das katalytische Zinkion

in tetraedischer Geometrie ein Wassermolekül. Das inhibitorische Zinkion koordiniert dasselbe Wassermolekül sowie Glu78 und His265. Der vierte Ligand war in diesem Experiment ein freies Palmitatmolekül. EXAFS-Untersuchungen (*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*) zeigten später, dass in Abwesenheit des Palmitatliganden ein Schwefelatom koordiniert wird und somit Cys63 den vierten nativen Liganden darstellt.^[39,40] Sowohl Glu78 als auch His265 spielen eine essentielle Rolle in dem Reaktionsmechanismus der LpxC-katalysierten Reaktion, da sie dort gemeinsam als Säure-Base-Paar fungieren.^[41] Abgesehen von den bisher beschriebenen Aminosäuren sind im aktiven Zentrum zwei weitere konservierte Regionen in Substratbindung und Katalyse involviert (Abb. 8).^[42]

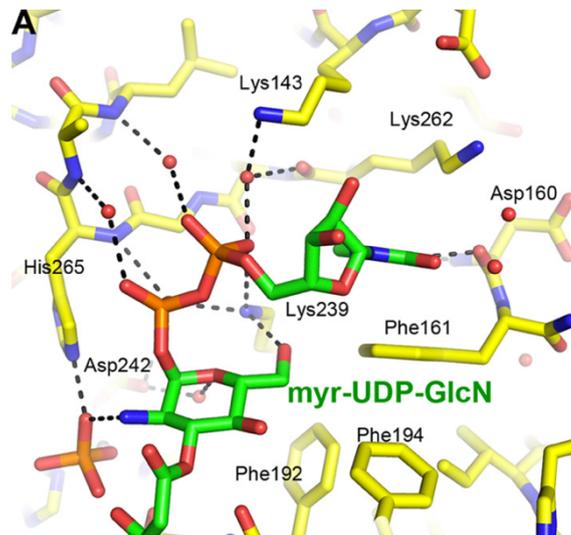


Abbildung 8: Konservierte Regionen im aktiven Zentrum von LpxC. Gezeigt ist ein Ausschnitt der Röntgenkristallstruktur von *E. coli* LpxC mit gebundenem Produkt (3). Dabei ist auf einer Seite des aktiven Zentrums, gegenüber dem hydrophoben Tunnel, ein *basic patch* lokalisiert, der durch Lys143, Lys239, Lys262 und His265 gebildet wird. Zusätzlich dazu befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite des aktiven Zentrums, benachbart zum hydrophoben Tunnel, ein *hydrophobic patch*, der durch Phe161, Phe192 und Phe194 gebildet wird. Aminosäuren beider Regionen binden 3 sowohl über Wasserstoffbrücken als auch über π -stacking und hydrophobe Wechselwirkungen.^[42]

Zum einen bilden Lys143, Lys239, Lys262 sowie His265 im ionisierten Zustand den sogenannten *basic patch*. Dieser ist im aktiven Zentrum gegenüber dem hydrophoben Tunnel lokalisiert und interagiert vor allem mit der Uridindiphosphat-Einheit des natürlichen Substrates. Während Lys239 direkt die α - und β -Phosphatgruppen bindet, stabilisiert Lys143 das Diphosphat durch einen wasservermittelten Kontakt. Lys262 bindet sowohl über hydrophobe Wechselwirkungen als auch mittels π -stacking an die Uridin-Einheit. Neben den Interaktionen mit dem Nukleotid bildet Lys239 außerdem eine Wasserstoffbrücke zum 6'-OH des Glucosamins aus. Zum anderen wird durch Phe161, Phe192 und Phe194 ein sogenannter *hydrophobic patch* gebildet, welcher zwischen dem *basic patch* und dem hydrophoben Tunnel lokalisiert ist. Während Phe192 und Phe194 mit dem Kohlenwasserstoffgrundgerüst des Glucosaminrings interagieren, bindet Phe161 analog zu Lys143 sowohl über hydrophobe Wechselwirkungen als auch mittels π -stacking an das Uridin. Zusätzlich dazu sind noch zwei konservierte Aspartatreste an der Substratbindung beteiligt: Asp242 bindet wasservermittelt sowohl das Diphosphat als auch den Glucosaminring. Asp160 bildet ausgehend von der Peptidbindung des Rückgrats zwei Wasserstoffbrücken zum Uridin aus.^[42] Neben den hoch konservierten Regionen des LpxC-Enzyms sind jedoch über alle gramnegativen Spezies auch einige strukturelle Unterschiede zu beobachten. Diese betreffen vor allem die Insert-Regionen (Abb. 9).^[43]

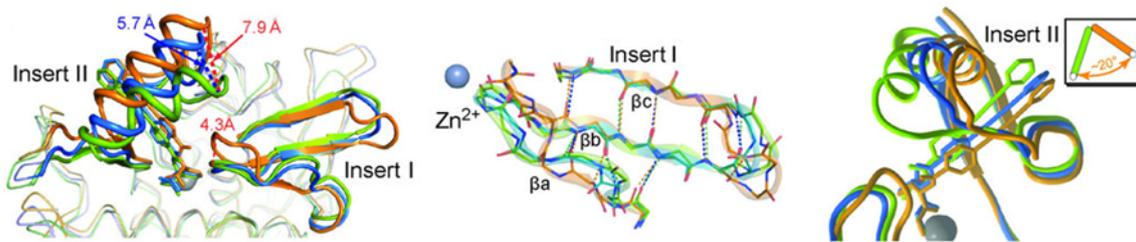


Abbildung 9: Strukturelle Unterschiede der Inserts von LpxC verschiedener Bakterienspezies. Zum Vergleich des Aufbaus der Inserts wurden die Kristallstrukturen von *Aquifex aeolicus* LpxC (grün, PDB-ID: 3P3C), *Escherichia coli* LpxC (orange, PDB-ID: 3P3G) und *Pseudomonas aeruginosa* LpxC (blau, PDB-ID: 3P3E) jeweils im Komplex mit LPC-009 (**13**, vgl. Abb. 13) übereinandergelegt. Links: Gesamtansicht des aktiven Zentrums, mitte: Insert I, rechts: Insert II. Die Unterschiede liegen dabei vor allem in der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den β -Faltblättern von Insert I sowie der Orientierung der Helix von Insert II.^[43]

Das aus drei β -Strängen bestehende Insert I zeigt Ausbuchtungen an verschiedenen Stellen. In *E. coli* LpxC ist die Ausbuchtung direkt nach der β -Schleife zwischen dem zweiten (β b) und dritten (β c) β -Strang lokalisiert. In *P. aeruginosa* sowie in *Aquifex aeolicus* (*A. aeolicus*) LpxC hingegen ist die Ausbuchtung am Ende des ersten β -Strangs (β a) lokalisiert. Dies führt zu Unterschieden bei der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den β -Strängen und somit auch zu einem unterschiedlichen Volumen des aktiven Zentrums (*E. coli*: 330 \AA^3 , *A. aeolicus* und *P. aeruginosa*: $255\text{--}272 \text{ \AA}^3$). Noch deutlicher zu beobachten sind die Unterschiede in der Orientierung der Helix des Insert II, welche den hydrophoben Tunnel aufbaut. In *E. coli* LpxC ist die Helix des Insert II am weitesten vom aktiven Zentrum entfernt und bildet die schmalste hydrophobe Passage aus, der Durchmesser beträgt hier lediglich 4.4 \AA . Bei *P. aeruginosa* LpxC ist die hydrophobe Passage ebenfalls relativ schmal ($\varnothing = 5.8 \text{ \AA}$). Bei *A. aeolicus* LpxC ist die Helix des Insert II am dichtesten am aktiven Zentrum gelegen und bildet die weiteste Passage mit einem Durchmesser von 7.5 \AA aus.^[43]

3.2.2 Die bakteriellen Acyltransferasen LpxA und LpxD

Die bakterielle Acyltransferase LpxA katalysiert den ersten Schritt der Lipid A-Biosynthese, die 3-Acylierung von UDP-*N*-Acetylglucosamin (**1**). Bis auf wenige Ausnahmen wird in allen gramnegativen Bakterienspezies eine β -Hydroxyacylkette auf die 3'-OH-Gruppe von UDP-GlcNAc (**1**) übertragen, *E. coli* LpxA überträgt eine (*R*)-3-Hydroxymyristoylkette. Diese Veresterung ist thermodynamisch ungünstig und das Reaktionsgleichgewicht liegt somit auf der Seite der Edukte.^[33] Eine Ausnahme stellt *Chlamydia trachomatis* dar. Hier wird eine einfache Myristoylkette ohne zusätzliche β -Hydroxygruppe übertragen.^[44] Eine weitere Ausnahme bilden einige wenige Organismen inklusive *Leptospira interrogans*, bei denen UDP-2,3-Diamino-2,3-dideoxy-D-glucopyranosid als Substrat dient, sodass hier die Übertragung einer β -Hydroxyacylkette eine thermodynamisch günstige Amidierung darstellt und das Reaktionsgleichgewicht auf Seiten der Produkte liegt.^[34] Wie zuvor für LpxC beschrieben sind auch bei LpxA sowohl die Sequenz als auch die Struktur hochkonserviert (Abb. 10).^[45]

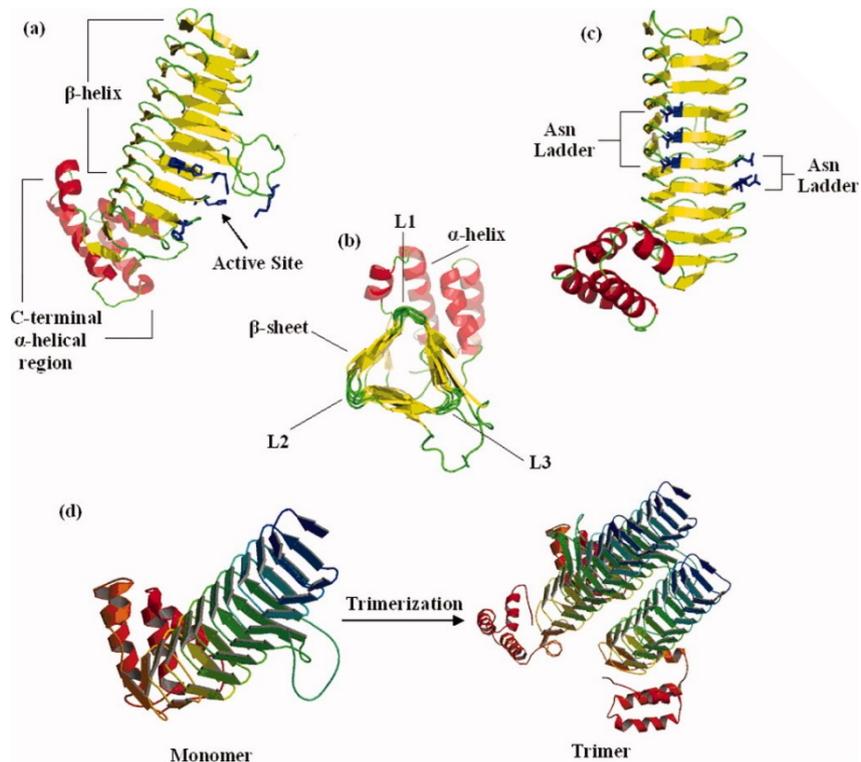


Abbildung 10: Proteinstruktur von LpxA. Oben (a-c) = Tertiärstruktur eines LpxA-Monomers. Rot = C-Terminus mit α -helicaler Struktur, gelb-grün = linksgängige β -Helix (L β H), blau = Aminosäurereste des aktiven Zentrums. Die L β H ist dabei aus 24 vollständigen und sechs unvollständigen Hexapeptiden aufgebaut, jeweils drei Hexapeptide bilden eine Windung der Helix. Eine Asn-Leiter stabilisiert die dreidimensionale Struktur der L β H. Unten (d) = Quartärstruktur von LpxA. Durch Trimerisierung von drei Monomeren bildet sich ein Homotrimer.^[45]

Das LpxA-Enzym besteht aus drei identischen Monomeren, die in der Quartärstruktur ein Homotrimer ausbilden. Jedes Monomer beinhaltet dabei zwei Domänen. Die N-terminale Domäne weist das seltene Strukturmotiv einer parallelen linksgängigen β -Helix (L β H), bestehend aus 30 einzelnen β -Strängen, auf. Hierbei bilden jeweils drei β -Stränge ein gleichseitiges Dreieck und eine Windung der β -Helix. Bis auf sechs Ausnahmen sind die β -Stränge vollständige Hexapeptide, alle β -Stränge weisen eine ähnliche Sequenz auf. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Position in den unvollständigen Hexapeptiden ist jede sechste Aminosäure eine Aminosäure mit aliphatischem Rest: Leucin, Isoleucin oder Valin. Zwei Positionen vor dieser aliphatischen Aminosäure findet sich je eine sehr kleine Aminosäure. Die Art der Seitenkette variiert bei jedem β -Strang. Geladene Aminosäuren sind jedoch nicht im Inneren der L β H zu finden. Neben den Hexapeptiden beinhaltet die linksgängige β -Helix zusätzlich zwei externe Loops.^[45,46] Die C-terminale Domäne von LpxA ist deutlich kleiner als die N-terminale Domäne und besteht aus je vier α -Helices. Alle α -Helices beinhalten vor allem Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten. In der trimeren Struktur interagieren die drei C-terminalen Domänen jedoch nicht miteinander, sondern weisen voneinander weg.^[47]

Das aktive Zentrum des Enzyms befindet sich zwischen zwei benachbarten Monomeren. Insgesamt besitzt das LpxA-Enzym somit drei aktive Zentren. Mittels ortsgerichteter Mutagenese konnten 1999 sechs konservierte, an der Katalyse beteiligte Aminosäuren identifiziert werden, die in einer tiefen Tasche zwischen den Monomeren lokalisiert sind (Abb. 11).^[48]

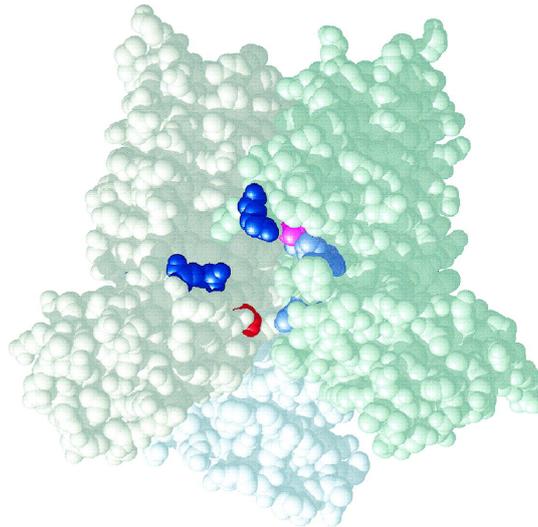


Abbildung 11: Konservierte Reste im aktiven Zentrum von LpxA. Dargestellt ist ein Oberflächen-Modell von LpxA. Dabei sind die Monomere des trimeren Enzyms jeweils in einer anderen Farbe schattiert. Farblich hervorgehoben sind sechs basische Aminosäuren, die über 15 Spezies konserviert sind. Die Zuordnung der spezifischen Aminosäuren bezieht sich auf *E. coli* LpxA: dunkelblau = Lys76 und Arg204, magenta = His125, hellblau = His122, His144 und His160. Zusätzlich dazu ist Gly173 rot markiert. Diese Aminosäure liegt konserviert in LpxA-Enzymen vor, die eine Selektivität für eine Acylkette mit 14 C-Atomen aufweisen.^[48]

Vier Aminosäuren, His122, His125, His144 und His160, sind Bestandteil der linksgängigen β -Helix. Lys76 ist Teil eines externen Loops in der *N*-terminalen Domäne und Arg204 ist in der *C*-terminalen Domäne lokalisiert.^[48] Durch den Vergleich der Aminosäuresequenzen 26 verschiedener Spezies konnten im Jahr 2003 weitere konservierte Aminosäurereste identifiziert werden. Diese sind vier Glycinreste, ein Glutamatrest sowie ein Glutaminrest in der *N*-terminalen Domäne und Asn199 in der *C*-terminalen Domäne.^[47]

Während die Glycinreste vor allem eine strukturelle Funktion aufweisen, sind His122, His144 und Gln161 an der Substratbindung beteiligt. Gemeinsam mit His125, welche als katalytische Base fungiert, definieren diese drei Aminosäuren den Bereich des aktiven Zentrums. Die zuvor identifizierten Reste Lys76 sowie His160 sind ebenfalls an der Substratbindung beteiligt, jedoch weniger stark konserviert. Dies deutet darauf hin, dass diese Reste nicht essentiell für die Substratbindung sind.^[47] Die beiden hochkonservierten Reste Asn199 und Arg204 am *C*- bzw. *N*-Terminus der ersten α -Helix der *C*-terminalen Domäne flankieren einen Bereich mit positiv geladener Oberfläche. Dieser dient am benachbarten Monomer als Bindungsstelle für das negativ geladene Acyl-Carrier-Protein (ACP), insbesondere den Phosphopantetheinarm.^[48,47] Von besonderer Bedeutung im aktiven Zentrum ist eine weitere Aminosäure, die auch als „*hydrocarbon ruler*“ bezeichnet wird. Diese ist für die Acylkettenselektivität verschiedener Spezies verantwortlich. In *E. coli* wurde lange Zeit Gly173 diese Funktion zugeschrieben, da in Mutagenesestudien die Mutation G173M die Selektivität von 14 C-Atomen auf 10 C-Atome verringerte.^[49] Eine später veröffentlichte Kristallstruktur zeigte jedoch, dass Gly173 in der Nähe vom C-12 der Acylkette positioniert ist und die Mutation G173M eine so starke sterische Hinderung verursacht, dass nur noch kürzere Fettsäureseitenketten binden können. Der *hydrocarbon ruler* selber ist jedoch His191, welcher auf Höhe des terminalen C-14 liegt.^[50] Weitere Beispiele für den *hydrocarbon ruler* sind M169 in *P. aeruginosa*, welcher für die Selektivität für eine (*R*)-3-Hydroxydecanoylkette (10 C-Atome) verantwortlich ist und K171 in *L. interrogans*, welcher für die Selektivität für eine (*R*)-3-Hydroxydodecanoylkette (12 C-Atome) verantwortlich ist.^[32,49]

Die durch LpxA katalysierte Reaktion folgt einem sequentiellen Mechanismus. Zunächst erfolgt die Bindung des Acyl-ACPs, anschließend die Bindung des Glucosaminderivates **1**. Die Reaktion selber

folgt einem Additions-Eliminierungsmechanismus. Im ersten Schritt wird die 3'-OH-Gruppe von UDP-GlcNAc (**1**) durch His125, welches durch das konservierte Glu126 stabilisiert wird, deprotoniert. Anschließend erfolgt der nucleophile Angriff dieser Alkoholatgruppe auf die Thioesterbindung des Acyl-ACPs und die Acylgruppe wird unter Rückbildung des ACPs auf das Glucosaminderivat **1** übertragen.^[48]

Die bakterielle Acyltransferase LpxD (UDP-3-O-Acyl-glucosamin-N-acyltransferase) katalysiert den dritten Schritt der Lipid A-Biosynthese, die 2-Acylierung von UDP-3-O-Acyl-glucosamin (**3**). Im Gegensatz zu LpxA werden durch LpxD jedoch nur β -Hydroxyacylketten übertragen. Des Weiteren ist diese enzymatische Reaktion aufgrund des Substrates für alle Spezies thermodynamisch günstig. Obwohl *E. coli* LpxA und *E. coli* LpxD lediglich 28% Sequenzidentität aufweisen, sind die beiden Enzyme Strukturhomologe (Abb. 12).^[32,51]

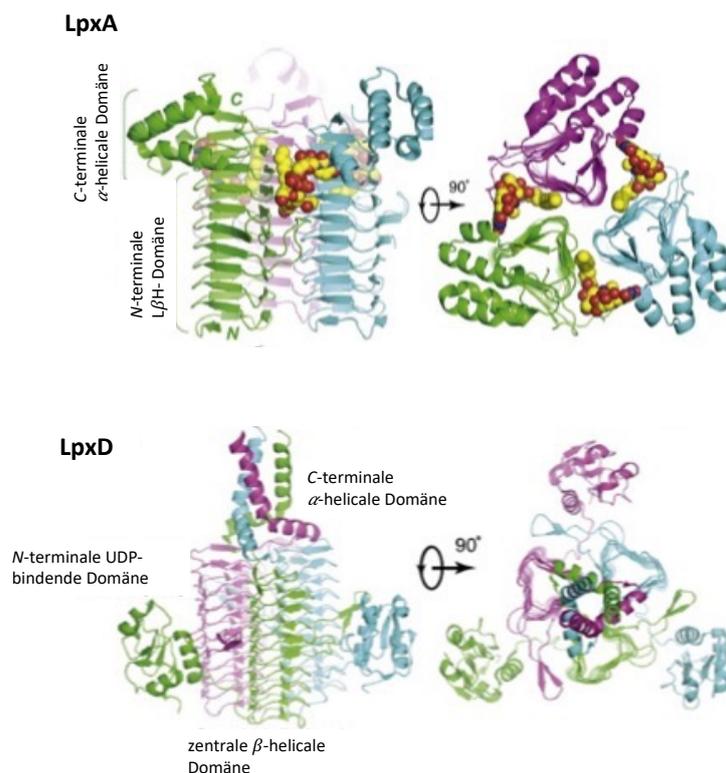


Abbildung 12: Vergleich der Acyltransferasen LpxA und LpxD. Oben = LpxA, unten = LpxD. Links = Seitenansicht, rechts = Draufsicht. Sowohl LpxA als auch LpxD bestehen aus drei identischen Monomeren, die in der Quartärstruktur ein Homotrimer ausbilden. Jedes Enzym verfügt dabei über drei aktive Zentren, die zwischen den Monomeren lokalisiert sind. Des Weiteren weisen beide Enzyme das Strukturmotiv einer linksgängigen β -Helix auf. Unterschiede liegen in der Orientierung der C-terminalen Domäne. Zusätzlich dazu weist LpxD eine N-terminale Domäne auf, die bei LpxA nicht vorhanden ist. Verändert nach Zhou *et al.*^[32]

Das LpxD-Enzym besteht ebenfalls aus drei identischen Monomeren, welche als Quartärstruktur ein Homotrimer ausbilden. Jedes Monomer weist dabei wie LpxA das besondere Strukturmotiv einer linksgängigen β -Helix auf, welche von zehn Helices aus 28 β -Faltblättern gebildet wird. Die C-terminale Domäne ist hingegen gänzlich anders aufgebaut. Zusätzlich dazu weist das LpxD-Enzym eine N-terminale Domäne auf, die bei LpxA vollkommen fehlt.^[51]

3.3 Inhibitoren der Lipid A-Biosynthese

In der Literatur sind für die bakterielle Deacetylase LpxC eine Vielzahl niedermolekularer Inhibitoren aus verschiedenen Inhibitorklassen bekannt. Für die bakterielle Acyltransferase LpxA sind hingegen nur wenige niedermolekulare Inhibitoren identifiziert. Bei den beiden am besten charakterisierten handelt es sich um zwei Peptide. Aus diesem Grund stand bislang auch in der Arbeitsgruppe Holl die Entwicklung von Inhibitoren der bakteriellen Deacetylase LpxC im Mittelpunkt der Forschung.

3.3.1 Literaturbekannte LpxC-Inhibitoren

Allen literaturbekannten LpxC-Inhibitoren gemeinsam ist das strukturelle Element der Zn^{2+} -bindenden Gruppe. Diese ist entweder mit einem lipophilen Strukturelement verknüpft, das den fettsäurebindenden hydrophoben Tunnel des aktiven Zentrums adressiert, oder mit einem Element, welches die UDP-Bindungsstelle des Enzyms adressiert. Die Inhibitorklassen umfassen Substratanaloga, Sulfonamide, Aryloxazoline, *N*-Aroyl-L-threoninhydroxamsäuren sowie Uridin-basierte Inhibitoren (Abb. 13).^[28]

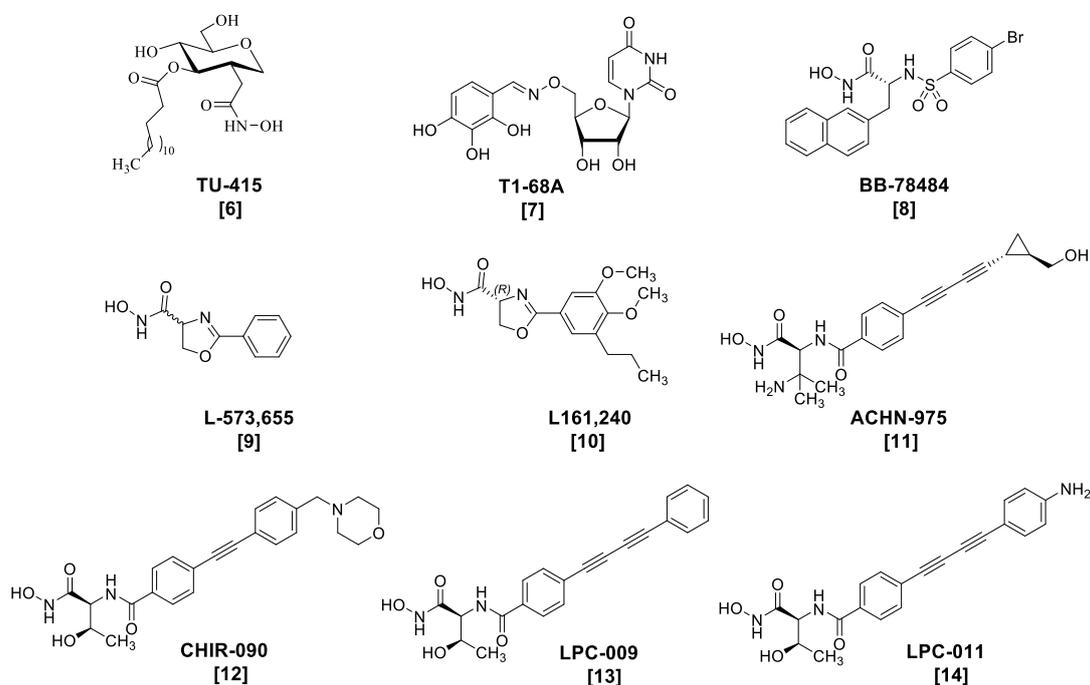


Abbildung 13: Übersicht über verschiedene Klassen von LpxC-Inhibitoren. Oben links: Substratanalogon TU-514 (6), oben mitte: Uridin-basierter Inhibitor T1-68A (7). Oben rechts: Sulfonamid BB-78484 (8). Mitte links und mitte: Aryloxazoline L-573,655 (9) und L-161,240 (10), mitte rechts: Butadiinylderivat ACHN-975 (11). Unten: *N*-Aroyl-L-threoninhydroxamsäuren CHIR-090 (12), LPC-009 (13) und LPC-011 (14).

Der Inhibitor TU-514 (6) stellt ein Substratanalogon dar, welchem jedoch die substrattypische β -Hydroxygruppe in der Fettsäureseitenkette sowie der UDP-Rest fehlen. Stattdessen wurde das zinkbindende Motiv einer Hydroxamsäure eingefügt. *In vitro* zeigte 6 inhibitorische Aktivität gegen LpxC verschiedener Spezies (*E. coli*, *P. aeruginosa* sowie *A. aeolicus*), die Inhibitionskonstante (K_i) lag dabei im niedrigen mikromolaren Bereich. Allerdings zeigte 6 gegen keine dieser Spezies antibakterielle Aktivität.^[52]

Der Inhibitor 1-68A (7) wurde in einem Screening UDP-basierter Substanzen identifiziert und adressiert demzufolge die UDP-Bindungsstelle. Die Dissoziationskonstante (K_D) von 7 betrug $54 \mu M$.^[53] Analog zu TU-514 (6) wies auch diese Substanz keine antibakterielle Aktivität auf.^[28]

Ebenfalls einem Screening entstammt BB-78484 (8). Bei diesem Screening wurde jedoch zunächst die antibakterielle Aktivität nachgewiesen. Die Substanzbibliothek beinhaltete dabei Substanzen mit

verschiedenen metallchelatisierenden Gruppen. Target dieses Screenings war der defiziente Stamm *E. coli* D22. Als eine der potentesten Verbindungen zeigte sich das Sulfonamid einer α -(*R*)-Amino-hydroxamsäure, welche *E. coli* D22 mit einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) von $0.16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ inhibierte. In einem darauffolgenden enzymatischen Assay zeigte Sulfonamid **8** einen K_i -Wert von 50 nM gegen *E. coli* LpxC.^[54] Allerdings zeigte diese Substanz keine antibakterielle Aktivität gegen *P. aeruginosa*. Dies liegt vor allem an dem sterisch anspruchsvollen Naphthalin-substituenten, welcher eine Verschiebung der $\beta\alpha\beta$ -Subdomäne von *P. aeruginosa* LpxC induziert und dadurch den hydrophoben Tunnel verschließt.^[55]

Unabhängig von der Beschaffenheit des natürlichen Substrates wurden bereits in den 90er Jahren durch die Firma Merck verschiedene Oxazolinhydroxamsäuren als niedermolekulare LpxC-Inhibitoren entwickelt. Leitstruktur war hierbei L-573,655 (**9**), welche mit einem K_i -Wert von 24 μM schwächere Aktivität gegen *E. coli* zeigte als das Substratanalogon **6** und in einer Größenordnung mit dem UDP-basierten Inhibitor **7** lag. Im Zuge einer Optimierung zeigte sich, dass die Stereochemie dieser Substanz für die biologische Aktivität von Bedeutung war und lediglich das (*R*)-Enantiomer inhibitorische Aktivität aufwies. Weitere Optimierungen zeigten die Notwendigkeit des Hydroxamsäuremotivs, des Phenylrings sowie die Tatsache, dass die Sterik der Substituenten am Phenylring wichtiger als deren elektronische Eigenschaften waren. Der potenteste Inhibitor dieser Optimierung war Aryloxazolin L-161,240 (**10**) mit einem K_i -Wert von ca. 50 nM gegen *E. coli* LpxC. Ähnlich dem Sulfonamid **8** zeigte jedoch auch diese Substanz kaum Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC.^[37]

Der bekannteste und am besten charakterisierte LpxC-Inhibitor ist die *N*-Aroyl-L-threoninhydroxamsäure CHIR-090 (**12**). Dieser zeigt selbst gegen *P. aeruginosa* antibakterielle Aktivität, die mit der kommerziell erhältlicher Antibiotika wie Ciprofloxacin vergleichbar ist.^[56] Auch auf enzymatischer Ebene zeigt **12** gegen das LpxC-Enzym diverser gramnegativer Spezies K_i -Werte im niedrigen nanomolaren Bereich. Der K_i -Wert gegen *E. coli* LpxC betrug 4.0 nM.^[57] Die Interaktionen von **12** mit dem LpxC-Enzym lassen sich in drei Bereiche einteilen: die Threonylhydroxamatgruppe, die Diphenylacetyleneinheit sowie den Morpholinring (Abb. 14).^[58]

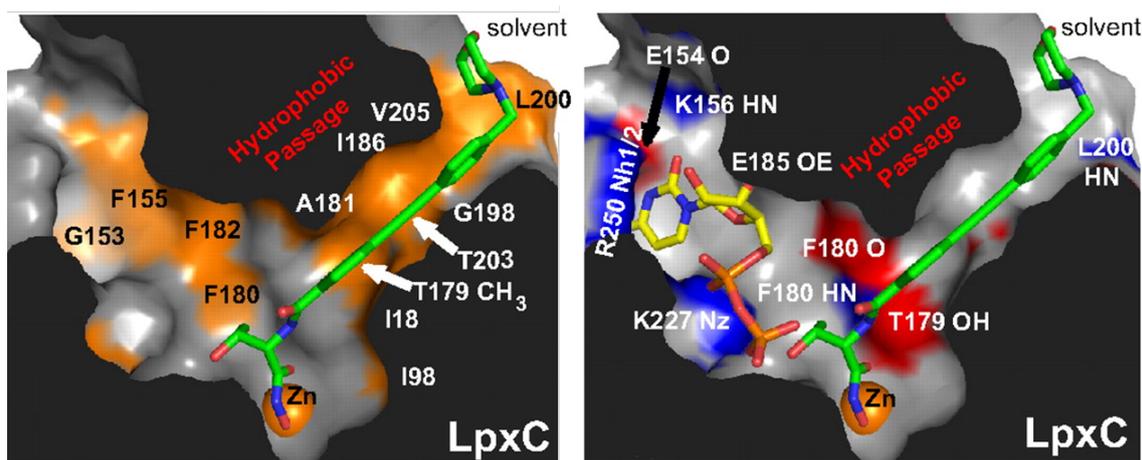


Abbildung 14: Bindungsmodus von CHIR-090 (12**) an das aktive Zentrum von LpxC.** Gezeigt ist die Kristallstruktur von *A. aeolicus* LpxC im Komplex mit CHIR-090 (**12**). Dabei ist die Oberfläche des Enzyms in grau und **12** mithilfe des Stäbchenmodells in grün dargestellt. Zusätzlich dazu ist das katalytische Zn^{2+} -Ion (orange) gezeigt. Links: Hervorhebung der hydrophoben Interaktionen (orange). Rechts: Hervorhebung der polaren Interaktionen (blau = Wasserstoffbrückendonoren, rot = Wasserstoffbrückenakzeptoren). Analog dazu sind auch die Stickstoff- (blau) und Sauerstoffatome (rot) von **12** farblich hervorgehoben. Die Interaktionen von **12** mit dem LpxC-Enzym gliedern sich in drei Bereiche: die Threonylhydroxamatgruppe, die Diphenylacetyleneinheit sowie den Morpholinring.^[58]

Die Threonylhydroxamatgruppe interagiert sowohl durch hydrophile als auch durch hydrophobe Elemente mit dem LpxC-Enzym. Auf der einen Seite chelatisiert die Hydroxamsäure das Zn^{2+} -Ion im aktiven Zentrum. Das Amidproton ist an der Ausbildung einer Wasserstoffbrücke mit T179 beteiligt. Auf der anderen Seite bindet die Methylgruppe des Threonylrestes über van-der-Waals-Kräfte an die hydrophobe Seitenkette von Phe180. Das zweite strukturelle Element, die Diphenylacetyleneinheit, adressiert den hydrophoben Tunnel des Enzyms. Der Morpholinring liegt am äußeren Ende des hydrophoben Tunnels in einer hydrophoben Tasche und nimmt eine Boot-Konformation ein.^[58]

In Bakterienspezies, die eine geringere Empfindlichkeit gegen **12** zeigten, konnte ein kritischer Rest am Ende des hydrophoben Tunnels identifiziert werden, welcher diese Passage verengt. Aus diesem Grund wurde LPC-009 (**13**) ausgehend von CHIR-090 (**12**) entwickelt. Dieses zeichnet sich aufgrund seiner Diphenyldiacetyleneinheit durch eine schmalere lipophile Seitenkette aus und inhibiert ein noch breiteres Spektrum gramnegativer Bakterien. Des Weiteren wurde auch der K_i -Wert gegen *E. coli* LpxC um den Faktor 20 auf 0.18 nM gesenkt. Allerdings führte der Verlust des Morpholinrings zu einer deutlichen Reduktion der Löslichkeit dieses Inhibitors. LPC-011 (**14**) wurde ursprünglich entwickelt, um die Löslichkeit im Vergleich zu **13** zu erhöhen. Neben dem Effekt der besseren Löslichkeit führte diese Variation zu einer weiteren Erniedrigung des K_i -Wertes auf 0.067 nM.^[59]

Der bislang einzige LpxC-Inhibitor, der in einer klinischen Studie in der Humanmedizin untersucht wurde, ist das Butadiinyl-Derivat ACHN-975 (**11**). Dieses weist strukturelle Ähnlichkeiten zu CHIR-090 (**12**) sowie LPC-009 (**13**) und LPC-011 (**14**) auf. Aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen bei den Teilnehmenden der Studie wurde diese jedoch abgebrochen.^[60]

3.3.2 Literaturbekannte LpxA-Inhibitoren

Bei den beiden literaturbekannten *E. coli* LpxA-Inhibitoren P920 (**15**) und RJPXD33 (**16**) handelt es sich um zwei mittels Phagendisplay identifizierte Peptide (Abb. 15).

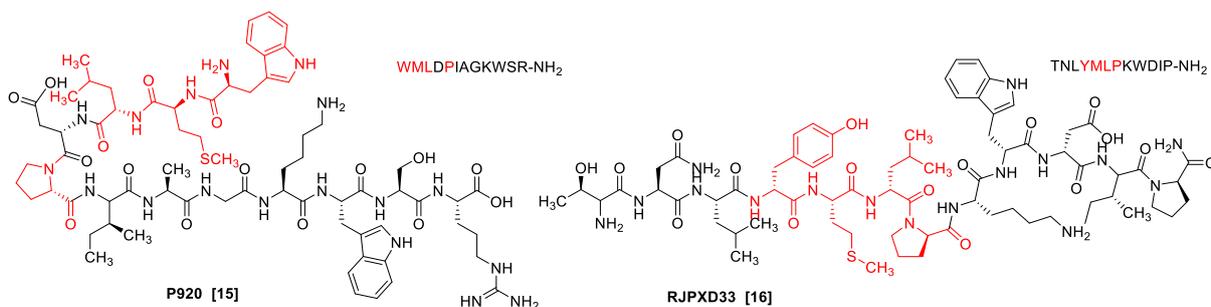


Abbildung 15: Peptidsequenzen der Dodecapeptide P920 (15**) und RJPXD33 (**16**).** Trotz Sequenzähnlichkeit (dargestellt in rot) weisen beide Peptide eine unterschiedliche räumliche Struktur auf. Diese ist im Fall von **15** eine Haarnadelschleife und im Fall von **16** flach orientiert.

Trotz ihrer Sequenzähnlichkeit weisen beide eine unterschiedliche räumliche Struktur auf. Während P920 (**15**) eine Haarnadelkonformation einnimmt, ist RJPXD33 (**16**) flach orientiert. Dies spiegelt sich auch in einem gänzlich unterschiedlichen Bindungsmodus an LpxA wider (Abb. 16).^[61]

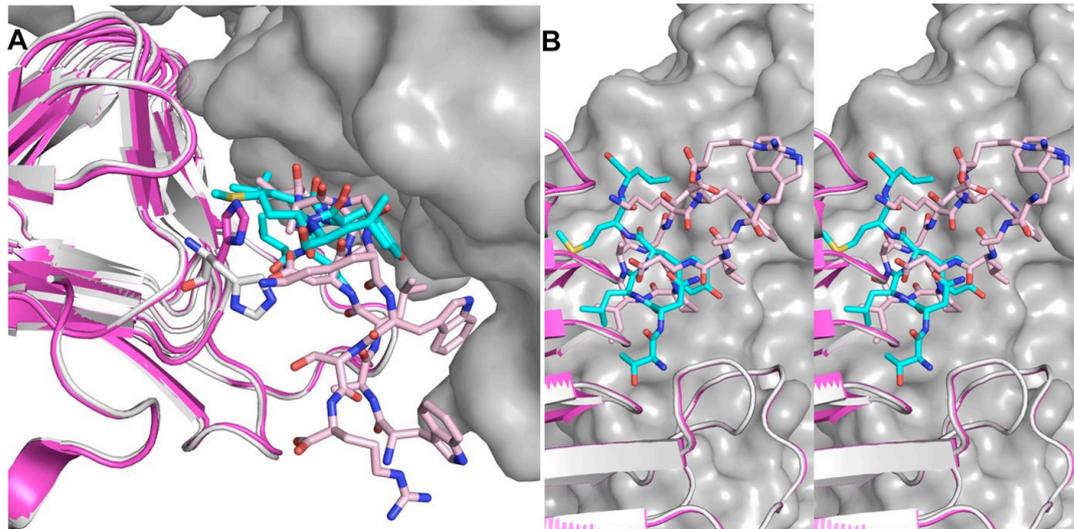


Abbildung 16: Bindungsmodi der Peptidinhibitoren P920 (15) und RJPXD33 (16) an LpxA. Zum Vergleich der Bindungsmodi wurden die Kristallstrukturen der Inhibitoren in Komplex mit LpxA überlagert. Dabei sind jeweils zwei LpxA-Monomere in der Oberflächenansicht in dunkelgrau sowie jeweils ein LpxA-Monomer und ein Inhibitormolekül im Stäbchenmodell dargestellt. Rosa = **15** (PDB-ID:4J09, LpxA-Monomer = hellgrau). Blau = **16** (PDB-ID: 2AQ9, LpxA-Monomer = magenta). Links = Draufsicht, rechts: Frontalansicht. Während **15** orthogonal zur L β H bindet, bindet **16** parallel zur L β H.^[61]

RJPXD33 (**16**) bindet parallel zu der linksgängigen β -Helix zwischen den Schlaufen 6 bis 10. Hierbei wird vor allem die Bindungstasche der Fettsäureseitenkette besetzt, das Peptidrückgrat von **16** imitiert somit den Phosphopantetheinarm. P920 (**15**) hingegen bindet orthogonal zur linksgängigen β -Helix. Lediglich das in der Haarnadelschleife liegende Isoleucin besetzt einen kleinen Teil der fettsäurebindenden Region. Sowohl der *N*- als auch der *C*-Terminus ragen jedoch aus der Fettsäure-Bindungstasche heraus und adressieren die UDP-bindende Region.^[61]

Während P920 (**15**) lediglich LpxA inhibiert ($K_i = 0.050\text{--}4.7\ \mu\text{M}$)^[62–64], handelt es sich bei RJPXD33 (**16**) um einen dualen Inhibitor, der sowohl LpxA ($K_D = 22\ \mu\text{M}$) als auch LpxD ($K_D = 6.5\ \mu\text{M}$) inhibiert.^[63]

3.3.3 Modellinhibitoren im AK Holl

Ausgehend von der literaturbekannten *N*-Aroyl-L-threoninhydroxamsäure CHIR-090 (**12**) führte die systematische Entwicklung weiterer LpxC-Inhibitoren im Arbeitskreis Holl zu drei Substanzen, die als Modellinhibitoren dienten (Abb. 17).

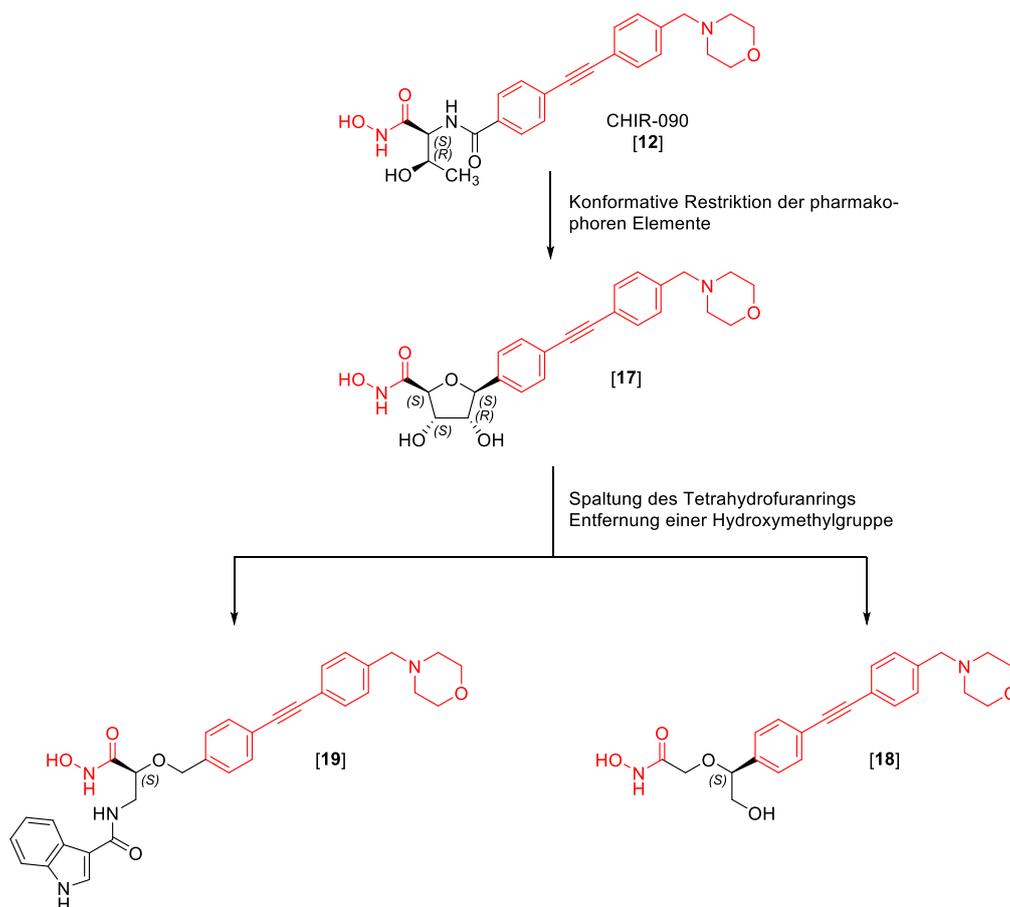


Abbildung 17: Übersicht der im Arbeitskreis Holl entwickelten Modellinhibitoren, die bei der Entwicklung von Testsystemen zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegenüber LpxC verwendet wurden. Ausgehend von der literaturbekannten *N*-Aroyl-L-threoninhydroxamsäure CHIR-090 (**12**) wurden drei weitere LpxC-Inhibitoren verwendet, bei denen schrittweise eine Variation der chemischen Struktur vorgenommen wurde. Die Fixierung der pharmakophoren Elemente (dargestellt in rot) mithilfe eines Tetrahydrofuranrings lieferte C-Glycosid **17**. Die anschließende Spaltung des Tetrahydrofuranrings, gefolgt von der Entfernung der Hydroxymethylgruppe in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv führte zu dem in Benzylposition substituierten Phenylethylenglycolderivat **18**. Im Gegensatz dazu stellt Indol **19** eine lediglich in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv substituierte Verbindung dar.

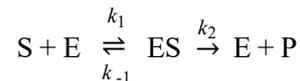
Hierbei stellt C-Furanosid **17** zunächst eine Verbindung dar, bei der das Hydroxamsäuremotiv, welches die zinkbindende Funktion darstellt, sowie die Diphenylacetyleneinheit, welche den hydrophoben Tunnel von LpxC adressiert, unter dem Aspekt der konformativen Restriktion über ein C-glycosidisches Grundgerüst fixiert wurden. Die Spaltung des Tetrahydrofuranrings sowie die Entfernung einer Hydroxymethylgruppe lieferte das in Benzylposition substituierte Phenylethylenglycolderivat **18**. Im Gegensatz dazu stellt Indol **19** eine lediglich in α -Position zur Hydroxamsäurefunktion substituierte Verbindung mit einem modifizierten Substituenten dar.

3.4 Methoden

Die Charakterisierung von Enzym-Inhibitor-Wechselwirkungen kann mithilfe verschiedener analytischer Methoden wie der Massenspektrometrie sowie der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie erfolgen. Grundlage für die Bestimmung der Inhibitorstärke sind vorherige enzymkinetische Untersuchungen, in denen die nicht-inhibierte enzymatische Reaktion untersucht wird.

3.4.1 Enzymkinetische Untersuchungen

Der einfachste Fall einer enzymatischen Reaktion, der direkte und irreversible Umsatz eines Enzym-Substrat-Komplexes, wird durch die Michaelis-Menten-Theorie beschrieben (Gleichung 1).^[65]



Gleichung 1: Schematische Darstellung einer irreversiblen enzymatischen Reaktion, welche in einem Schritt verläuft. Die Reaktionsteilnehmer sind: E = Enzym, S = Substrat, ES = Enzym-Substrat-Komplex, P = Produkt. Die Reaktionskinetik wird durch drei Geschwindigkeitskonstanten beschrieben: die Assoziationskonstante k_1 , die Dissoziationskonstante k_{-1} und die Wechselzahl k_2 .

Hierbei untersuchten MICHAELIS und MENTEN 1913 den Initialbereich einer enzymatischen Reaktion, in der keine limitierenden Faktoren auf die Reaktionsgeschwindigkeit einwirken. Zusätzlich dazu trafen sie die Annahme, dass die Wechselzahl k_2 vernachlässigbar klein sei.^[66]

Die Weiterentwicklung der Michaelis-Menten-Theorie erfolgte 1925 durch BRIGGS und HALDANE. Diese postulierten einen quasi-stationären Zustand (*steady-state*-Bedingungen) für den Enzym-Substrat-Komplex. Voraussetzung hierbei ist, dass die Enzymkonzentration deutlich unterhalb der Substratkonzentration liegt, sodass trotz abnehmender Substrat- und zunehmender Produktkonzentration die Substratkonzentration so hoch ist, dass eine konstante Anzahl an Enzymen im Enzym-Substrat-Komplex gebunden ist. Dadurch ergibt sich die für alle enzymatischen Reaktionen gültige Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 2).^[67]

$$\frac{d[P]}{dt} = v_{max} \cdot \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

Gleichung 2: Michaelis-Menten-Gleichung. Diese gibt den Verlauf der Produktkonzentration ($d[P] \cdot dt^{-1}$) einer enzymatischen Reaktion an. Dabei gilt: $[S]$ = Substratkonzentration, v_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit, K_M = Michaelis-Menten-Konstante.

Die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) beschreibt die Substratkonzentration, bei der die Hälfte der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) erreicht ist, und ist abhängig von den Geschwindigkeitskonstanten k_1 , k_{-1} und k_2 (Gleichung 3).

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Gleichung 3: Michaelis-Menten-Konstante. Diese beschreibt die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion erreicht wird, und ist abhängig von den drei Geschwindigkeitskonstanten k_1 , k_{-1} und k_2 . Zusätzlich dazu gilt sie als Maß für die Substrataffinität eines Enzyms.

Ein niedriger K_M -Wert korreliert dabei mit einer hohen Substrataffinität, ein hoher K_M -Wert mit einer niedrigen Substrataffinität. Die Maximalgeschwindigkeit v_{max} beschreibt die Geschwindigkeit für den Fall, dass alle Enzyme zeitgleich einen Enzym-Substrat-Komplex ausbilden.^[65]

3.4.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) stellt eine der wichtigsten und vielseitigsten analytischen Methoden in der Wirkstoffentwicklung dar. Sie liefert zunächst durch die Aufklärung von Proteinstrukturen sowie posttranslationaler Modifikationen wichtige Hinweise bei der Target-Identifizierung. Anschließend können aufgrund der Möglichkeit der Automatisierung und der damit verbundenen Geschwindigkeit potentielle Wirkstoffkandidaten oder Fragmente potentieller Wirkstoffkandidaten in einem MS-basierten *High-Throughput-Screening* für eben dieses Target identifiziert werden. Auch in der finalen Wirkstoffproduktion wird die Massenspektrometrie aufgrund der hohen Sensitivität in der Qualitätskontrolle eingesetzt um nachzuweisen, dass der gewünschte Wirkstoff vorliegt und frei von Verunreinigungen ist.^[68,69]

Die Massenspektrometrie beruht darauf, dass ein Ionen-Gemisch in die Gasphase überführt und im Hochvakuum mittels eines elektrischen Felds beschleunigt wird. Die Geschwindigkeit der Ionen ist dabei abhängig von ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z), sodass diese separiert werden können. Der prinzipielle Aufbau eines Massenspektrometers umfasst drei Komponenten: den Probeneinlass, die Ionenquelle sowie den Massenanalysator (Abb. 18).^[70]

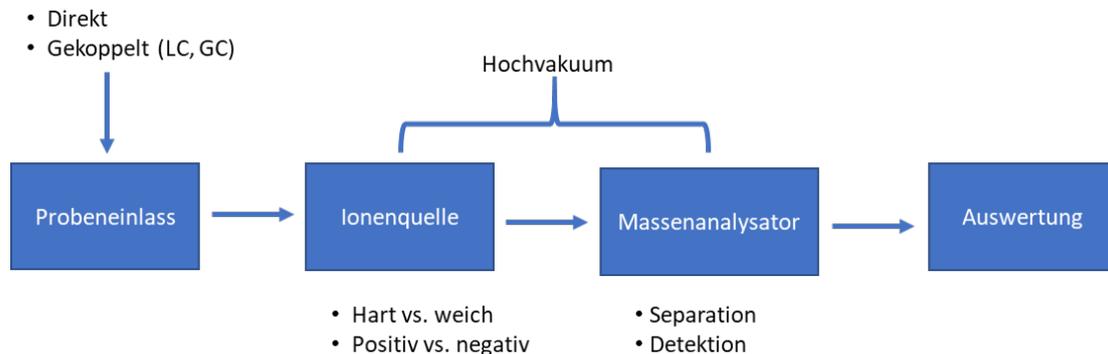


Abbildung 18: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers. Im Probeneinlass wird die zu untersuchende Probe zunächst in die Gasphase überführt. Die Injektion kann dabei direkt erfolgen, oder an eine Flüssig- (LC) bzw. Gaschromatographie (GC) gekoppelt sein. Anschließend wird im Hochvakuum der Analyt ionisiert, separiert sowie detektiert. Der Analyt kann dabei sowohl positiv als auch negativ geladen und in Abhängigkeit von der Ionenquelle entweder intakt (weich) oder fragmentiert (hart) vorliegen.

Der Probeneinlass dient dazu, die zu untersuchende Probe zunächst in die Gasphase zu überführen. Abhängig vom Anwendungszweck kann es sich hierbei um eine einzelne Verbindung, ein komplexes Gemisch oder einzelne Fraktionen einer zuvor mittels HPLC aufgetrennten Probe handeln. An den Einlass gekoppelt befindet sich die Ionenquelle, welche den Analyten ionisiert. Hierbei wird zwischen einer harten Ionisationsquelle wie der Elektronenstoßionisation (EI) und weichen Ionisationsquellen wie der Elektrosprayionisation (ESI) unterschieden. Harte Ionisationsquellen sind mit einer hohen Ionisierungsenergie verbunden und die Ionisation erfolgt dadurch, dass ein Elektron des Analyten herausgeschlagen wird. Dies hat zur Folge, dass häufig eine Fragmentation des zu untersuchenden Analyten stattfindet. Der Anwendungszweck der EI liegt somit vor allem in der Strukturaufklärung. Weiche Ionisationsquelle sind hingegen mit einer niedrigen Ionisierungsenergie verbunden. Die Ionisation erfolgt durch Protonierung oder Deprotonierung des Analyten. Dies hat zur Folge, dass der Analyt intakt bleibt. Nach der Ionisation werden die Ionen beschleunigt und im Massenanalysator nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis aufgetrennt und anschließend detektiert.^[70]

Eine Weiterentwicklung der linearen Massenspektrometrie ist die Tandem-Massenspektrometrie. Hierbei werden mehrere Massenanalysatoren hintereinander gekoppelt, sodass nach einer Ionisation

mittels ESI und Selektion von Vorläuferionen diese in einer Kollisionszelle fragmentiert werden können.^[68]

3.4.3 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR) stellt einen optischen Biosensor dar. Als Biosensoren werden allgemein Messsysteme bezeichnet, die entweder eine biologische Komponente beinhalten oder eine biologische Anwendung haben. Diese kann in der klinischen Diagnostik, in der Lebensmittelanalytik oder der Umweltanalytik liegen. Die Detektion der Interaktion von Ligand und Analyt erfolgt über einen Signalwandler, welcher kalorimetrischer, piezoelektrischer, elektrochemischer oder optischer Natur sein kann.^[71] Oberflächenplasmonen werden dadurch generiert, dass parallel polarisiertes Licht unter Bedingungen der Totalreflexion auf ein Prisma eingestrahlt wird. An das Prisma gekoppelt befindet sich eine dünne Metalloberfläche (Abb. 19).^[72,73]

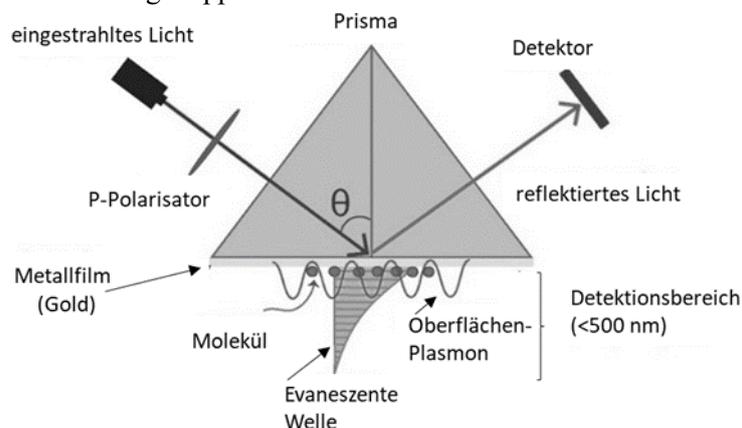


Abbildung 19: Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie. Unter Bedingungen der Totalreflexion bewirkt die Einstrahlung von parallel polarisiertem Licht auf ein Prisma, an das eine dünne Metalloberfläche gekoppelt ist, die Generierung von Oberflächenplasmonen. Grundlage dabei ist die Ausbreitung eines evaneszenten Feldes jenseits der Grenzoberfläche, die mit dem freien Elektronengas der Metalloberfläche wechselwirkt. Unter Resonanzbedingungen (einem spezifischen Einstrahlwinkel) werden diese Elektronen zu einer Plasmaschwingung angeregt. Diese wird als Oberflächenplasmonen bezeichnet. Verändert nach ^[73]

Trotz Totalreflexion bereitet sich jenseits der Grenzfläche eine evaneszente Welle aus. Die Eindringtiefe der Photonen beträgt dabei ca. $\frac{1}{4} \lambda$. In diesem evaneszenten Feld wechselwirken die Photonen mit dem freien Elektronengas in der Metalloberfläche. Unter Resonanzbedingungen, einem bestimmten Einstrahlwinkel θ_0 , werden die Elektronen zu einer Plasmaschwingung angeregt. Diese kollektive Schwingung der Leitungsbandelektronen wird auch als Oberflächenplasmonen bezeichnet. Bezogen auf die Totalreflexion des parallel polarisierten Lichts bedeutet dies ein scharfes Minimum in der Intensitätskurve.^[72]

In ihrer Funktion als Biosensor wurde die SPR-Technologie im Jahre 1991 durch die Firma Biacore kommerziell erhältlich und beinhaltet drei Komponenten: einen Sensorchip, eine integrierte Flusszelle sowie eine Detektionseinheit (Abb. 20).^[74]

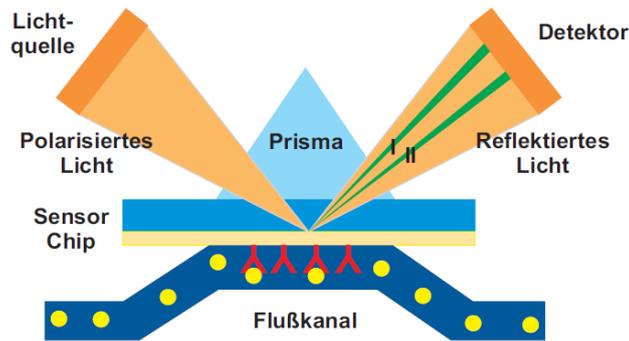


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Biacore-Technologie. Diese nutzt das Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und beinhaltet drei Komponenten: einen Sensorchip, eine integrierte Flusszelle sowie eine Detektionseinheit. Der Sensorchip bietet dabei die Möglichkeit, den Liganden über verschiedene Methoden an eine Goldoberfläche zu immobilisieren. Die integrierte Flusszelle dient dazu, eine hydrophile Umgebung für den Liganden zu liefern und bietet zusätzlich dazu die Möglichkeit, einen Analyten mit konstanter Flussgeschwindigkeit über die Chipoberfläche zu leiten. Die Detektion einer Analytbindung an den Liganden beruht darauf, dass sich durch diese Analytbindung die Resonanzbedingungen, die zur Generierung von Oberflächenplasmonen führen, ändern.^[74]

Der Sensorchip besteht aus einem Glasträger, der mit einem Goldfilm beschichtet ist. Dieser Goldfilm ist weiter funktionalisiert, sodass ein Ligand an die Goldoberfläche gebunden werden kann. Standardmäßig wird ein CM5-Sensorchip benutzt, der mit einer carboxymethylierten Dextranschicht funktionalisiert wurde. Über eine Amidkupplung kann der Ligand hier kovalent immobilisiert werden. Beinhaltet der Ligand jedoch viele primäre Amine wie bspw. ein Protein, kann nicht sichergestellt werden, über welche Stelle der Ligand immobilisiert wird. Alternativ dazu bieten beispielsweise SA-Sensorchips und NTA-Sensorchips die Möglichkeit der spezifischen Immobilisierung. Diese erfolgt in den konkreten Beispielen über eine Biotin-Streptavidin-Interaktion bzw. eine Metall-Chelatisierung des His-Tags. Die integrierte Flusszelle, die direkt an den Sensorchip anschließt, bietet dem Liganden eine hydrophile Umgebung. Diese verzögert das Denaturieren des Liganden. Des Weiteren wird durch das Flusssystem eine gleichmäßige Analytkonzentration auf der gesamten Chipoberfläche gewährleistet.^[74]

Da die evaneszente Welle den Goldfilm durchdringt, hat auch das Medium nahe der Goldoberfläche, insbesondere der Ligand, einen Einfluss auf die Resonanzbedingungen. Durch Bindung eines Analyten an den Liganden verändern sich die Eigenschaften nahe der Goldoberfläche, sodass die Resonanzbedingungen nicht mehr erfüllt sind. Eine Änderung des Einstrahlwinkels von θ_0 zu θ_1 bewirkt, dass die Resonanzbedingungen wieder erfüllt sind. Diese Winkeländerung wird in einem Sensorgramm als Änderung des Resonanzsignals dargestellt (Abb. 21).^[75]

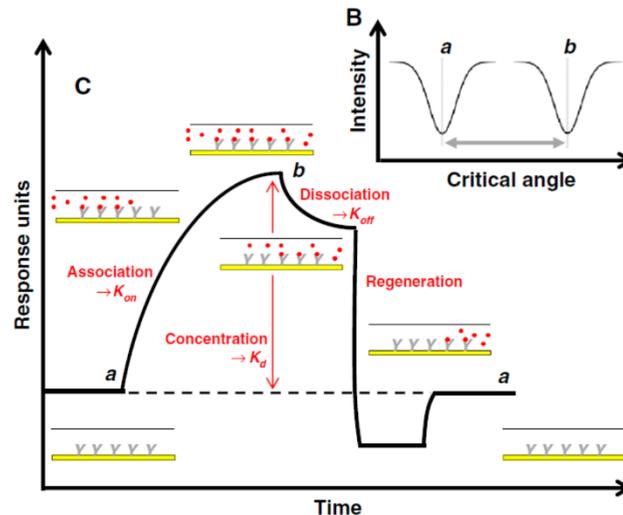


Abbildung 21: Exemplarische Darstellung eines Sensorgrammes einer SPR-Messung. Dargestellt ist die Änderung des Resonanzsignals in Abhängigkeit von der Zeit. Die Änderung des Resonanzsignals beschreibt dabei die Winkeländerung zur Aufrechterhaltung von Resonanzbedingungen. Das Experiment gliedert sich in eine Assoziations- und eine Dissoziationsphase, in der die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} bestimmt werden können. Zusätzlich dazu lässt sich die Gleichgewichtskonstante K_D bestimmen, wenn das Experiment bei verschiedenen Analytkonzentrationen durchgeführt wird.^[75]

Zu Beginn des Experimentes ist lediglich unbesetzter Ligand auf dem Sensorchip. Der Einstrahlwinkel θ_0 ist so gewählt, dass die Resonanzbedingungen erfüllt sind. Im Sensorgramm zeigt sich ein konstantes Signal (Basislinie). In der darauffolgenden Assoziationsphase wird ein Analyt über die Chipoberfläche geleitet. Dies hat eine partielle Besetzung der Liganden zur Folge. Dadurch verändert sich stetig der kritische Winkel, bei dem die Resonanzbedingungen erfüllt sind. Im Sensorgramm spiegelt sich die Winkeländerung in einer Zunahme des Signals (*response*) wider. Sobald sich ein Fließgleichgewicht eingestellt hat, ist ein zweiter konstanter kritischer Winkel (θ_1) erreicht. Die *response* ist ab dem Zeitpunkt ebenfalls konstant. In der darauffolgenden Dissoziationsphase befindet sich kein Analyt mehr im Laufpuffer. Dies hat die Dissoziation des Analyten ohne Neubesetzung der Liganden zur Folge. Mit der Abnahme besetzter Liganden ändert sich auch wieder der kritische Winkel. Dies hat ein Absinken der *response* zur Folge, bis nach vollständiger Dissoziation des Liganden wieder die Basislinie erreicht wird. Sinkt die *response* nicht auf die Basislinie ab, ist eine zusätzliche Regeneration erforderlich.^[75]

4 Aufgabenstellung

Die Lipid A-Biosynthese stellt einen vielversprechenden Angriffspunkt für die Entwicklung neuartiger Antibiotika, die zur Behandlung von antibiotikaresistenten gramnegativen Bakterien eingesetzt werden können, dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von Testsystemen zur Identifizierung und Charakterisierung von Inhibitoren verschiedener an der Lipid A-Biosynthese beteiligter Enzyme. Dabei gliedert sich diese Arbeit in mehrere Teile: Zunächst sollten exemplarisch für das Enzym *E. coli* LpxC C63A verschiedene Testsysteme entwickelt werden.

Als Ausgangspunkt sollte dabei ein literaturbekannter, fluoreszenzbasierter LpxC-Enzymassay dienen. Dieser stellt einen Assay aus dem Bereich der Inhibitionskinetik dar, bei dem die durch einen Inhibitor bedingte Reduktion der katalytischen Aktivität von LpxC untersucht wird. Die Detektion beruht auf einer chemischen Reaktion des deacetylierten Substrates mit *o*-Phthaldialdehyd und 2-Mercaptoethanol zu einem fluoreszierenden Isoindol. Dies impliziert, dass dieser Assay sowohl für potentielle Testsubstanzen mit einem primären Amin als auch für potentielle Testsubstanzen mit hoher Eigenfluoreszenz nicht anwendbar ist. Nach erfolgreicher Expression und Aufreinigung des Enzyms sollte der Assay zunächst etabliert und optimiert werden. Darüber hinaus sollten die enzymkinetischen Parameter K_M und v_{max} bestimmt werden.

Als Alternativen zum fluoreszenzbasierten Assay sollte im Rahmen dieser Arbeit sowohl ein LC-MS/MS-basierter als auch ein SPR-basierter LpxC-Enzymassay mithilfe von vier Modellinhibitoren entwickelt werden. Während der LC-MS/MS-basierte Assay ebenfalls einen Assay im Bereich der Inhibitionskinetik darstellt und sich in der Detektion des Produktes von dem fluoreszenzbasierten Assay unterscheidet, wird bei dem SPR-basierten Assay ein reines Bindungsgeschehen an dem auf einem Trägerchip immobilisierten Protein in Abwesenheit einer enzymatischen Reaktion untersucht. Anschließend sollten die zuvor entwickelten Enzymassays auf LpxC einer weiteren Bakterienspezies übertragen werden. Hierfür wurde LpxC von *P. aeruginosa*, welche höchste Priorität bei der Entwicklung neuer Antibiotika laut WHO aufweisen, ausgewählt. In einem weiteren Projekt sollte ein SPR-basierter Assay für ein alternatives Target entwickelt werden. Hierfür wurde die Acyltransferase LpxA von *E. coli*, die den ersten Schritt der Lipid A-Biosynthese katalysiert, ausgewählt.

Mithilfe der entwickelten Testsysteme sollten die in der Arbeitsgruppe Holl hergestellten potentiellen Inhibitoren der o.g. Enzyme auf ihre inhibitorische Aktivität hin untersucht werden und mittels der erhaltenen inhibitorischen Aktivitäten Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden. Darüber hinaus sollte die inhibitorische Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC mit der gegen *E. coli* LpxC verglichen werden.

Zur weiteren Charakterisierung aller potentieller LpxC-Inhibitoren wurden diese auf antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* BL21(DE3) und den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 untersucht und auch hierfür Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet. Zusätzlich dazu erfolgte ein Vergleich der antibakteriellen mit der inhibitorischen Aktivität.

Zuletzt sollte die antibakterielle Aktivität ausgewählter LpxC-Inhibitoren in Kombinationsexperimenten untersucht werden. Dies sollte sowohl in Kombination mit einem Effluxpumpeninhibitor als auch in Kombination mit kommerziell verfügbaren Antibiotika geschehen.

5 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit gliedern sich in verschiedene Themengebiete. Zunächst erfolgte exemplarisch für *E. coli* LpxC C63A die Entwicklung von Testsystemen zur Identifizierung und Charakterisierung von Inhibitoren der Lipid A-Biosynthese. Danach wurden potentielle Inhibitoren mithilfe der entwickelten Testsysteme untersucht und aus den dadurch erhaltenen inhibitorischen Aktivitäten Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet. Anschließend erfolgte die Übertragung der zuvor entwickelten Methoden auf weitere Enzyme der Lipid A-Biosynthese, um Enzymassays für diese Targets zu etablieren sowie eine Evaluierung der verschiedenen Enzymassays. Zuletzt wurden weiterführende Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität ausgewählter Testsubstanzen vorgenommen.

5.1 Die bakterielle Deacetylase *E. coli* LpxC C63A

Die bakterielle Deacetylase *E. coli* LpxC C63A katalysiert den Schlüsselschritt der Lipid A-Biosynthese: die irreversible Deacetylierung von UDP-3-O-[(R)-3-Hydroxymyristoyl]-N-acetylglucosamin (2). Verglichen mit dem LpxC-Wildtyp bewirkt die C63A-Mutation, dass dieses Enzym weniger empfindlich gegenüber hohen Zinkkonzentrationen ist, da ein nativer Ligand des inhibitorischen Zn^{2+} -Ions fehlt.

5.1.1 Proteinexpression und -aufreinigung

Im ersten Schritt wurde eine Optimierung der *E. coli* LpxC C63A-Expression durchgeführt. Hierfür wurde zunächst das Plasmid pET11EcLpxCC63A^[76] mittels Hitzeschocktransformation in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von ca. 0.6 kultiviert. Da bereits hier eine hohe basale Expression des für die Bakterien toxischen Enzyms beobachtet werden konnte und dies die Ausbeute in der folgenden Überexpression deutlich verringerte, wurde eine Katabolitrepession durchgeführt, indem dem Medium von Anfang an 0.5% Glucose hinzugegeben wurde. Eine Katabolitrepession beschreibt dabei einen der beiden Mechanismen, durch die die Genexpression im lac-Operon reguliert wird (Abb. 22).^[77]

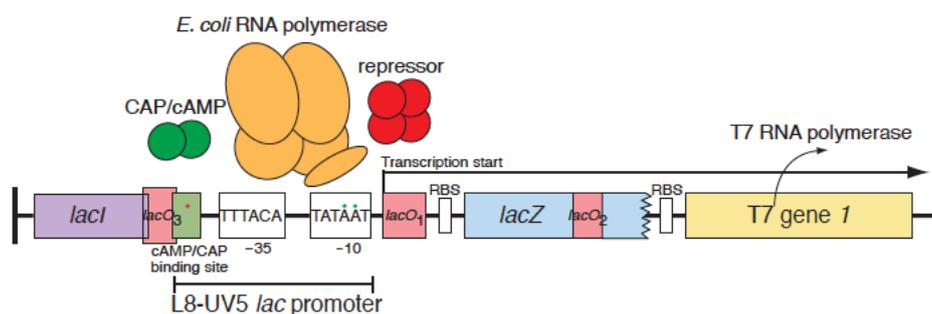


Abbildung 22: Schematische Darstellung des lac-Operons. Dieses wird von Bakterienzellen in Abhängigkeit von der zur Verfügung stehenden Energiequelle zur Verstoffwechslung von Lactose genutzt. Die Genexpression wird durch zwei Mechanismen reguliert. Die Negativregulation (rot dargestellt) inhibiert die Genexpression. Unter Normalbedingungen, d.h. in Anwesenheit einer günstigen Energiequelle wie Glucose ist ein Repressorprotein an den Promotor gebunden und verhindert, dass die RNA-Polymerase binden kann und die Gene des lac-Operons, die zur Aufnahme und Verstoffwechslung von Lactose genutzt werden, transkribiert werden. Die Positivregulation (grün dargestellt) aktiviert die Genexpression in Abwesenheit von Glucose: nach Bindung von cAMP an ein CAP-Monomer wird die Dimerisierung zweier CAP-Monomere initiiert. Die Bindung eines CAP-Dimers an den Promotor aktiviert die Genexpression. In Anwesenheit von Glucose wird die Adenylatcyclase, die cAMP aus ATP synthetisiert, inhibiert und die basale Genexpression inhibiert.^[77]

Auf der einen Seite gibt es die Positivregulation. Dies bedeutet, dass durch Bindung eines CAP-Dimers (Katabolit-Aktivatorprotein, *catabolite activator protein*) an den Promotor die Genexpression aktiviert

wird. Die Bildung eines CAP-Dimers wird durch Bindung von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) an ein CAP-Monomer initiiert. Glucose hemmt jedoch die Adenylatcyclase, welche cAMP aus ATP synthetisiert, sodass die Positivregulation inhibiert wird und keine basale Genexpression stattfindet. Auf der anderen Seite gibt es die Negativregulation. Dies bedeutet, dass ein Repressorprotein an das lac-Operon gebunden hat und die Genexpression inhibiert wird. Durch Bindung von Allolactose oder dem Allolactoseanalogon Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) an das Repressorprotein löst sich dieses vom lac-Operon und die Proteinexpression wird initiiert.

Nach Erreichen der gewünschten optischen Dichte wurde die Proteinexpression von *E. coli* LpxC C63A durch Zugabe von IPTG (1 mM) zur Bakterienkultur induziert. Zusätzlich dazu wurde ab diesem Zeitpunkt dem Expressionsmedium der Cofaktor des überexprimierten Enzyms (Zn^{2+} -Ionen in Form von $ZnCl_2$) zugegeben. Anschließend erfolgte die Proteinexpression für vier Stunden bei 30 °C. Nach dem Zellaufschluss mittels Sonifikation wurde die Reinigung des Enzyms in zwei Schritten durchgeführt, die Überprüfung fand durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese statt (Abb. 23–24).

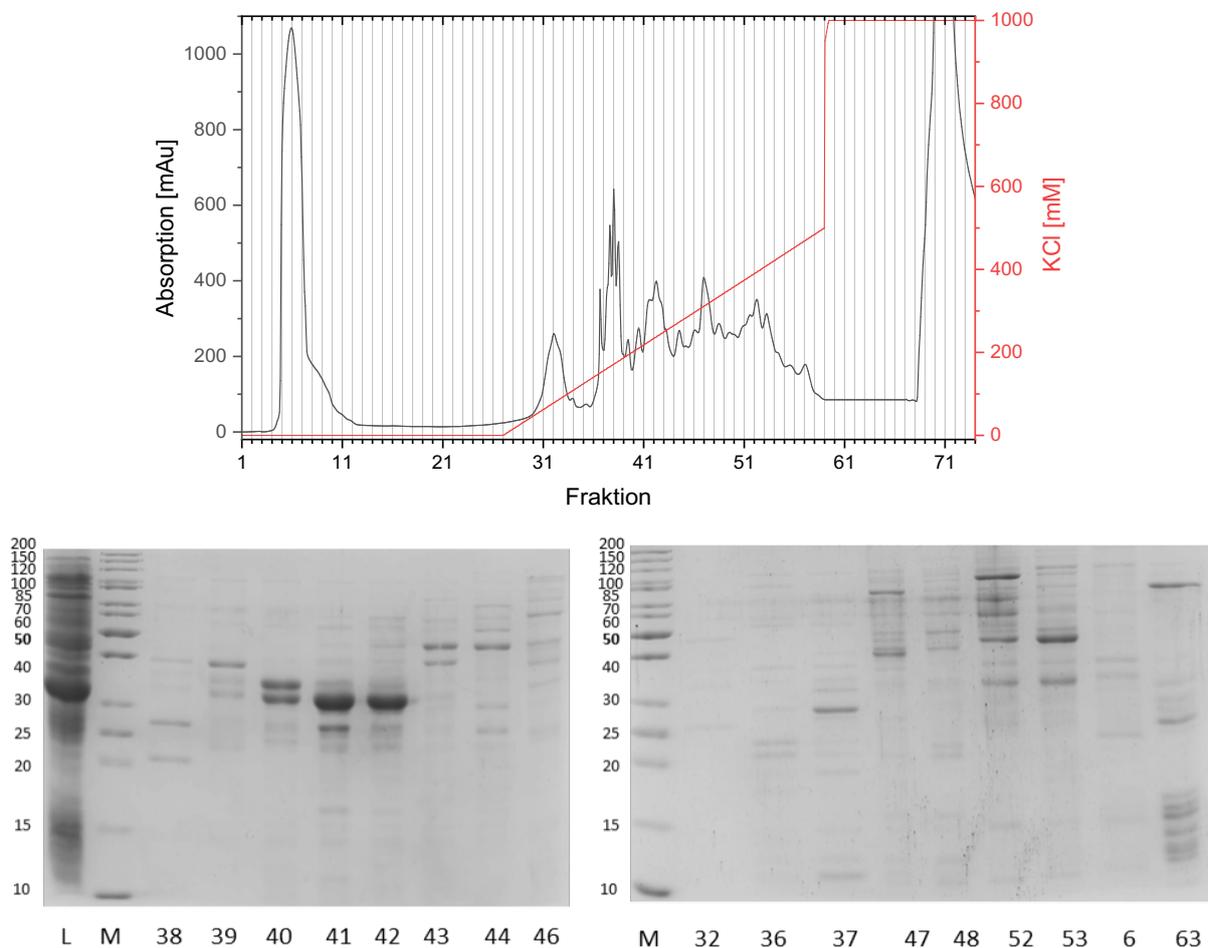


Abbildung 23: Reinigung von *E. coli* LpxC C63A mittels Anionenaustauschchromatographie (AEX). Oben: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie, unten: SDS-Polyacrylamidgele zur Analyse der Fraktionen der AEX. Links: Bahn 1 = Lysat (L), Bahn 2 = Marker (M), Bahn 3–10 = Fraktionen der AEX. Rechts: Bahn 1 = Marker (M), Bahn 2–10 = Fraktionen der AEX. Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte auf Basis von 50 mM Hepes (pH = 7.0), 2 mM DTT. Die Elution der Proteine erfolgte durch einen linearen Kaliumchloridgradienten (0 → 500 mM). *E. coli* LpxC C63A eluierte bei einer Kaliumchloridkonzentration von ca. 300 mM, die Fraktionen F41–42 zeigten eine deutliche Bande zwischen 30–40 kDa (MW (*E. coli* LpxC C63A): 33.9 kDa).

Im ersten Schritt wurde das Zelllysat, welches im SDS-Gel eine deutliche Bande zwischen 30–40 kDa zeigte und somit eine Überexpression von *E. coli* LpxC C63A aufwies, auf eine starke Anionen-

austauschsäule aufgetragen. Der Puffer (50 mM Hepes (pH = 7.0), 2 mM DTT) garantierte, dass das Enzym negativ geladen vorlag (IEP = 5.54) und unter diesen initialen Bedingungen an die stationäre Phase der Säule band. Dies zeigte sich daran, dass im Durchlauf (Fraktion 6 (F6)) keine Bande auf Höhe des Enzyms im SDS-Gel sichtbar war. Anschließend wurden die an die Säule gebundenen Proteine nacheinander von der Säule eluiert, indem die Anionenstärke im Laufpuffer kontinuierlich erhöht wurde (linearer Gradient von 0 → 500 mM Kaliumchlorid). *E. coli* LpxC C63A eluierte in einem scharfen Peak bei einer Kaliumchloridkonzentration von ca. 300 mM. Die Fraktionen F41 und F42 zeigten auf dem SDS-Gel eine deutliche Bande zwischen 30–40 kDa. Anschließend wurden die beiden Fraktionen vereinigt, auf ca. 3 mL eingengt und mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt. Auch hier wurde die Reinigung mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft (Abb. 24).

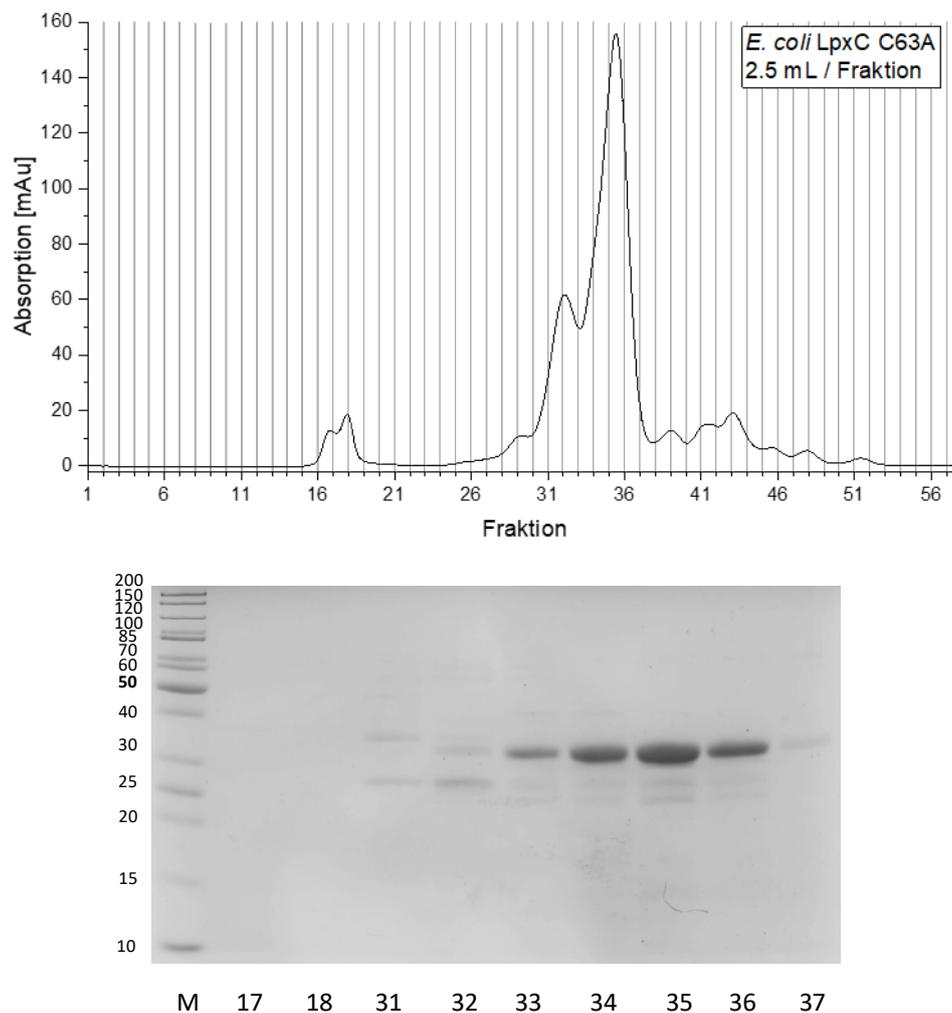


Abbildung 24: Reinigung von *E. coli* LpxC C63A mittels Größenausschlusschromatographie (SEC). Oben: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie, unten: SDS-Polyacrylamidgel zur Analyse der Fraktionen der SEC. Bahn 1 = Marker (M), Bahn 2–10 = Fraktionen der SEC. Die Größenausschlusschromatographie erfolgte mithilfe von 50 mM Bis-Tris (pH = 6.0), 150 mM Natriumchlorid. *E. coli* LpxC C63A eluierte nach ca. 80–85 mL, die Fraktionen F33–36 zeigten eine deutliche Bande zwischen 30–40 kDa (MW (*E. coli* LpxC C63A): 33.9 kDa).

Auch in der Größenausschlusschromatographie eluierte *E. coli* LpxC C63A in einem scharfen Peak (F33–36). Zusätzlich dazu konnten fluoreszierende Nicht-Proteinbestandteile (F17–18) sowie andere Proteine (F31–32) abgetrennt werden. Die Kombination beider Reinigungsschritte lieferte reines *E. coli* LpxC C63A, die Ausbeute betrug dabei 3.9 mg pro Liter Zellkultur.

5.1.2 Etablierung und Anwendung des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays

Nach erfolgreicher Enzymexpression sollten zunächst standardisierte Reaktionsbedingungen identifiziert werden, um anschließend enzymkinetische Parameter zu bestimmen. Hierfür wurde der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay^[54] verwendet, welcher auch zur biologischen Testung genutzt wurde (Abb. 25).

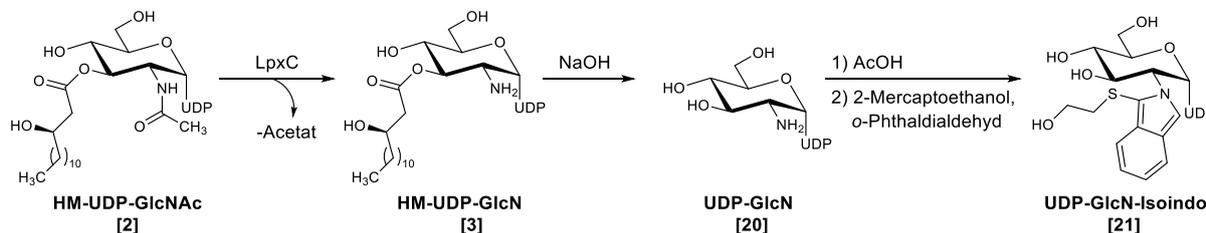


Abbildung 25: Durchführung des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays in Abwesenheit eines LpxC-Inhibitors. Die enzymatische Reaktion, die Deacetylierung des natürlichen Substrates **2** von *E. coli*, erfolgte über einen Zeitraum von 30 min bei 37 °C. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch eine basische Inaktivierung des Enzyms, dabei erfolgte zusätzlich eine Abspaltung der Fettsäureseitenkette. Zuletzt wurden die Reaktionslösung neutralisiert und die durch die Reaktion freigesetzten primären Amine mithilfe von 2-Mercaptoethanol und *o*-Phthaldialdehyd in fluoreszierende Isoindole überführt.

Im ersten Schritt wurde das natürliche Substrat HM-UDP-GlcNAc (**2**) für 30 Minuten bei 37 °C durch *E. coli* LpxC C63A deacetyliert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Natronlauge gestoppt. Dies hatte zum einen die Inaktivierung des Enzyms, zum anderen eine Abspaltung der Fettsäureseitenkette zur Folge. Nach Neutralisation mittels Essigsäure wurden die durch die enzymatische Reaktion freigesetzten primären Amine durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol und *o*-Phthaldialdehyd in fluoreszierende Isoindole überführt. Die maximale Fluoreszenzintensität (F_{\max}) wurde daher nach Ende der nicht inhibierten enzymatischen Reaktion, also nach maximalem Reaktionsumsatz in Anwesenheit von lediglich 2% DMSO ohne zusätzliche Testsubstanz, gemessen. Die minimale Fluoreszenzintensität (F_{\min}) entsprach der Fluoreszenzintensität nach der vollständig inhibierten enzymatischen Reaktion, also bei keinem Reaktionsumsatz. Dies wurde durch Zugabe des potenten LpxC-Inhibitors CHIR-090 (**12**) erreicht. Die Zugabe potentieller LpxC-Inhibitoren (gelöst in DMSO) lieferte eine Fluoreszenzintensität innerhalb dieses Bereiches, vorausgesetzt die Testsubstanzen wiesen weder ein primäres Amin noch eine Eigenfluoreszenz auf. Die prozentuale Fluoreszenzintensität korrelierte dabei mit der prozentualen Inhibition des Enzyms. Für alle Testsubstanzen wurden Fluoreszenzintensitäten in Anwesenheit dieser Substanz bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Nach anschließender Umwandlung der prozentualen Inhibitionen in Probit-Werte konnte durch eine lineare Regression aus lediglich drei Substanzkonzentrationen der IC_{50} -Wert der Testsubstanz berechnet werden.^[78]

Da der Anteil an aktivem Enzym mit jeder Enzymcharge variierte, war es für die Etablierung standardisierter Assaybedingungen jedoch nicht ausreichend, stets die gleiche Enzymkonzentration zu verwenden. Dies lag zum einen daran, dass sichergestellt werden musste, dass nach 30 Minuten kein vollständiger Reaktionsumsatz stattgefunden hatte. Auf der anderen Seite diente für alle Experimente **12**, welche Eigenschaften eines *tight-binding inhibitors* aufweist, als Referenzsubstanz. In entsprechenden Inhibitionsexperimenten ist der IC_{50} -Wert abhängig von der Enzymkonzentration. Da das aktive Zentrum des Enzyms im Falle eines *tight-binding inhibitors* länger als bei anderen Substanzen durch ein und dasselbe Molekül besetzt ist, gilt, dass je niedriger die eingesetzte Enzymkonzentration ist, desto niedriger auch der scheinbare IC_{50} -Wert ist.^[56] *Tight-binding*-Eigenschaften waren für weitere LpxC-Inhibitoren nach aktuellem Stand nicht bekannt, bei der Charakterisierung neuer Substanzen jedoch auch nicht auszuschließen, sodass alle Experimente unter möglichst identischen Bedingungen durchgeführt

werden sollten. Im ersten Schritt wurde daher der Reaktionsumsatz für drei verschiedene Enzymkonzentrationen über einen Zeitraum von 60 Minuten verfolgt (Abb. 26).

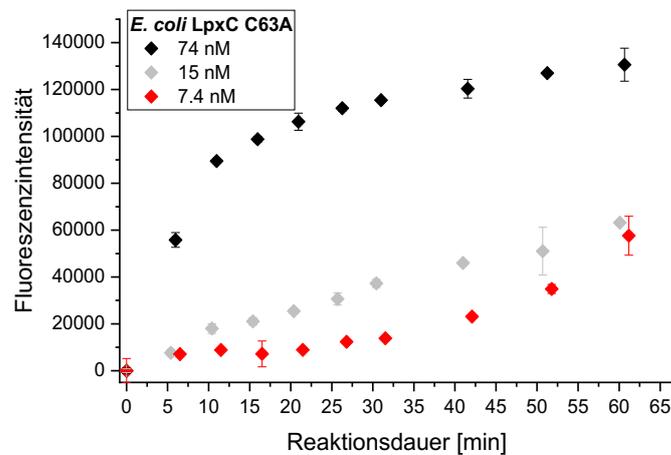


Abbildung 26: Verfolgung des Substratumsatzes durch *E. coli* LpxC C63A über einen Zeitraum von 60 min. Dabei wurden verschiedene Enzymkonzentrationen (schwarz = 74 nM, grau = 15 nM, rot = 7.4 nM) eingesetzt. Die enzymatische Reaktion, der Umsatz von 25 μ M Substrat, erfolgte bei 37 °C. Die Detektion erfolgte fluorimetrisch nach Umwandlung des deacetylierten Substrates in ein fluoreszierendes Isoindol.

Bei der höchsten Enzymkonzentration (74 nM) zeigte sich innerhalb von 15 Minuten eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität. Hiernach näherte sich die Fluoreszenzintensität einem Plateauwert an. Das deutete darauf hin, dass nach 15 Minuten das Substrat nahezu vollständig umgesetzt wurde. Dies bedeutete für den zuvor beschriebenen Enzymassay, dass alle Inhibitoren, die die Reaktion um den Faktor 2 verlangsamen, nicht erkannt werden können, da nach 30 Minuten trotzdem das Substrat vollständig umgesetzt war. Bei der niedrigsten Enzymkonzentration (7.4 nM) konnte hingegen innerhalb der ersten 30 Minuten kaum ein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Dies war in Anbetracht der relativ hohen Hintergrundfluoreszenz bei der Identifikation von LpxC-Inhibitoren problematisch, da leichte Veränderungen beim Reaktionsumsatz nicht von Schwankungen der basalen Fluoreszenz unterschieden werden konnten. Bei einer Enzymkonzentration von 15 nM konnte hingegen für den gesamten Zeitraum von 60 Minuten eine Zunahme der Fluoreszenzintensität und somit eine Zunahme der Produktkonzentration beobachtet werden. Diese Enzymkonzentration schien somit geeignet für den fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay. Zusätzlich dazu sollte im Folgenden der IC_{50} -Wert von 12 bei verschiedenen Enzymverdünnungen bestimmt werden. Als höchste Enzymkonzentration wurde 74 nM gewählt, als niedrigste Enzymkonzentration 15 nM (Tab. 1).

Tabelle 1: Bestimmung des IC_{50} -Wertes des *tight-binding inhibitors* CHIR-090 (12**) gegen *E. coli* LpxC C63A in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.** Dabei wurden sechs verschiedene Enzymkonzentrationen zwischen 15–74 nM untersucht. Die enzymatische Reaktion erfolgte über einen Zeitraum von 30 min bei 37 °C. Die Detektion erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays. Zusätzlich zu der Bestimmung des IC_{50} -Wertes von **12** wurde in Abwesenheit eines Inhibitors die maximale Fluoreszenzintensität (F_{max}) als Maß für den Reaktionsumsatz sowie die minimale Fluoreszenzintensität (F_{min}) als Maß für die basale Hintergrundfluoreszenz, die durch das Enzym verursacht wurde, untersucht.

	Konzentration	F_{min}	F_{max}	ΔF	$IC_{50, CHIR-090}$
<i>E. coli</i> LpxC C63A	74 nM (250 ng)	75 000	210 000	135 000	673 nM
	37 nM (125 ng)	65 000	230 000	165 000	183 nM
	30 nM (100 ng)	53 000	177 000	124 000	185 nM
	25 nM (83.3 ng)	53 000	160 000	100 000	218 nM
	19 nM (62.5 ng)	53 000	165 000	112 000	135 nM
	15 nM (50 ng)	75 000	162 000	87 000	159 nM

Hierbei zeigte sich, dass bei einer Enzymkonzentration von 15–37 nM die IC_{50} -Werte von **12** in derselben Größenordnung lagen. Leichte Schwankungen waren dabei unabhängig von einer zunehmenden oder abnehmenden Enzymkonzentration. Somit waren innerhalb dieses Konzentrationsbereiches alle Enzymverdünnungen gleich gut geeignet. In Bezug auf die basale Hintergrundfluoreszenz war jedoch zu beachten, dass diese bei einer Enzymkonzentration von 37 nM deutlich höher als bei den Enzymkonzentrationen von 19–30 nM lag. Dieser Unterschied war durch die höhere Enzymkonzentration und die dadurch bedingte höhere Anzahl primärer Amine aufgrund der *E. coli* LpxC C63A-Seitenketten zu erklären. Unterhalb dieser Enzymkonzentration hatten hingegen andere Reagenzien des Assays einen größeren Einfluss auf die Hintergrundfluoreszenz als die Enzymseitenketten. Auch bei der niedrigsten Enzymkonzentration (15 nM) war eine höhere Hintergrundfluoreszenz zu beobachten. Diese war jedoch nicht direkt vergleichbar mit den anderen fünf Werten, da die Werte aus einem anderen Experiment stammten. Dies machte jedoch deutlich, dass die minimale sowie die maximale Fluoreszenzintensität trotz standardisierter Reaktionsbedingungen jedes Mal erneut bestimmt werden mussten. Bei einer Enzymkonzentration von 74 nM zeigte sich verglichen mit den anderen fünf getesteten Enzymkonzentrationen ein deutlich höherer IC_{50} -Wert für **12**. Dies war unabhängig von den *tight-binding*-Eigenschaften des Inhibitors in Übereinstimmung mit dem zuvor gezeigten Kinetikexperiment, in dem in Abwesenheit eines Inhibitors bereits nach 15 Minuten ein Plateauwert der Produktkonzentration erreicht wurde. Durch die deutlich längere Reaktionszeit im Enzymassay war hier eine Verlangsamung des Umsatzes nicht zwangsläufig erkennbar, sodass getestete Inhibitoren schlechter erscheinen konnten als sie tatsächlich sind.

Aufgrund des oben gezeigten Reaktionsverlaufes in Kombination mit dem IC_{50} -Wert von **12** wurde im Folgenden mit einer Enzymkonzentration von 15 nM gearbeitet. So wurde zum einen sichergestellt, dass die Reaktion nach 30 Minuten noch nicht vollständig abgelaufen war. Zum anderen zeigten die Ergebnisse, dass innerhalb des getesteten Konzentrationsbereiches die *tight-binding*-Eigenschaften von **12** zu vernachlässigen waren und stattdessen ein vollständiger Reaktionsumsatz bei einer zu hohen Enzymkonzentration sowie ein zu niedriger Unterschied zwischen minimaler und maximaler Fluoreszenzintensität bei einer zu niedrigen Enzymkonzentration die limitierenden Faktoren darstellten. Letzteres war anhand eines einzelnen Experimentes leicht nachzuweisen, sodass mit der niedrigsten Enzymkonzentration (15 nM) weitergearbeitet wurde.

Als nächstes sollte eine Kalibrierkurve erstellt werden, da aufgrund der alleinigen Messung der Fluoreszenzintensitäten unklar war, ob bei einer Enzymkonzentration von 74 nM tatsächlich ein vollständiger Reaktionsumsatz stattgefunden hatte, oder lediglich kein weiteres Substrat, beispielsweise aufgrund einer Produktinhibition, umgesetzt wurde. Hierfür wurde zunächst das dem Reaktionsprodukt ähnliche Glucosamin (eingesetzt als Hydrochlorid) gewählt und analog zum LpxC-Enzymassay mit 2-Mercaptoethanol und *o*-Phthaldialdehyd umgesetzt (Abb. 27).

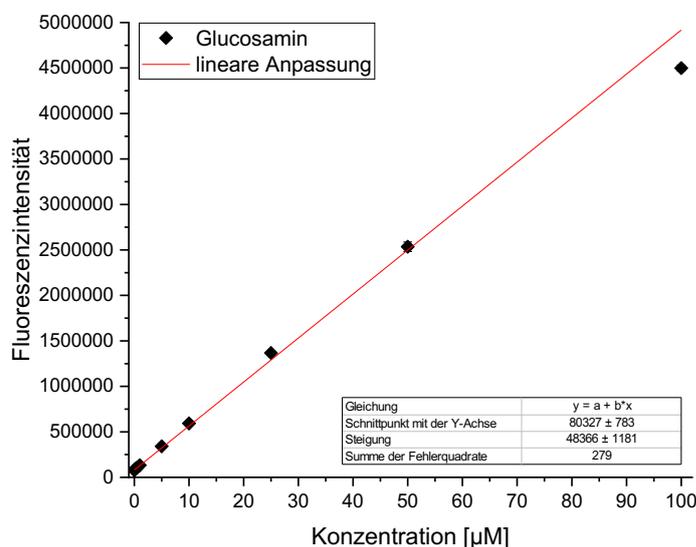


Abbildung 27: Kalibrierkurve der Fluoreszenzintensität des Isoindols von Glucosamin. Dabei wurde Glucosamin (eingesetzt als Hydrochlorid) analog zum fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay mithilfe von 2-Mercaptoethanol und *o*-Phthaldialdehyd in ein fluoreszierendes Isoindol überführt und die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der eingesetzten Glucosaminkonzentration bestimmt.

Bei der Kalibrierkurve zeigte sich im Bereich von 1–100 μM Glucosamin eine lineare Zunahme der Fluoreszenzintensität. Die basale Fluoreszenzintensität bei 0 μM Glucosamin lag dabei in einer Größenordnung mit der minimalen Fluoreszenzintensität der vorherigen Experimente. Die Fluoreszenzintensität bei einer Glucosaminkonzentration von 25 μM , welche der maximal möglichen Produktkonzentration im Enzymassay entspricht, betrug hingegen ca. 1 400 000. Diese war um den Faktor 10 höher als die maximale Fluoreszenzintensität, die normalerweise im Assay beobachtet wurde. Unter der Annahme, dass sich Glucosamin analog zu UDP-Glucosamin (**20**) verhält, betrug der Substratumsatz nach 30 Minuten somit $<10\%$. Auch bei dem Kinetikexperiment mit höchster Enzymkonzentration (vgl. Abbildung 26) wurde ein Plateauwert der Fluoreszenzintensität erreicht, der lediglich 15% der hier erzielten maximalen Fluoreszenzintensität betrug. Da es sich bei der durch LpxC katalysierten Reaktion um eine irreversible Deacetylierung handelt und das Enzym eine ähnliche Affinität für Substrat und Produkt aufweist^[76], wurde jedoch gefolgert, dass die niedrigere Fluoreszenzintensität nicht durch eine Produktinhibition zustande kommt, sondern die aus den beiden Glucosaminderivaten gebildeten Isoindole unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften aufweisen. Als Kontrolle dazu wurde anschließend für zwei weitere primäre Amine, Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) und 2-Iodanilin, die Derivatisierung zum entsprechenden Isoindol durchgeführt und die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration bestimmt (Abb. 28).

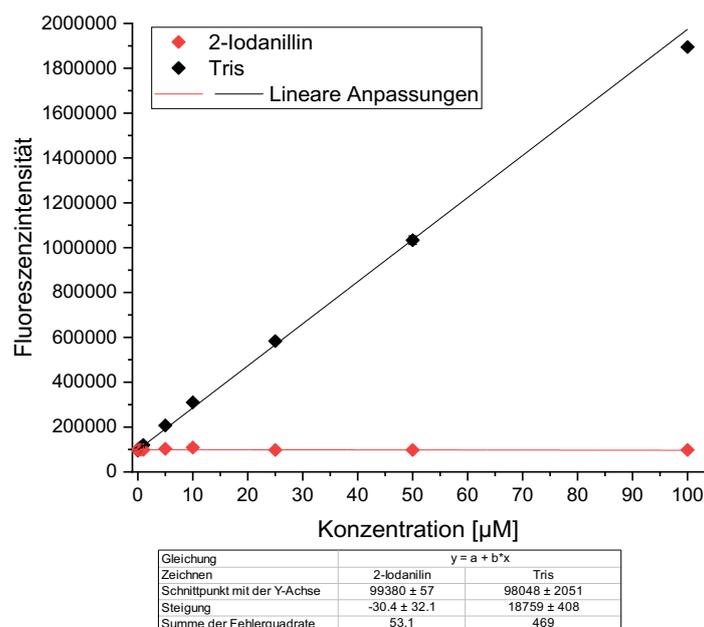


Abbildung 28: Kalibrierkurven der Fluoreszenzintensitäten der Isoindole der primären Amine 2-Iodanilin und Tris. Dabei wurden 2-Iodanilin (rot) und Tris (schwarz) analog zum fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay mithilfe von 2-Mercaptoethanol und *o*-Phthaldialdehyd in fluoreszierende Isoindole überführt und die Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des primären Amins bestimmt.

Hierbei zeigte sich bei 2-Iodanilin bei allen Konzentrationen ein konstanter Wert von 83 000. Dieser Wert lag im Bereich der basalen Hintergrundfluoreszenz und ließ darauf schließen, dass 2-Iodanilin aufgrund seiner chemischen Eigenschaften gar nicht zum Isoindol umgesetzt wurde. Auch für Tris lag die Hintergrundfluoreszenz in einer ähnlichen Größenordnung, aber es konnte analog zu der Kalibrierkurve von Glucosamin eine lineare Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Die hier erzielten Fluoreszenzintensitäten lagen jedoch deutlich niedriger und es konnte erst bei 80 µM eine Fluoreszenzintensität von 1 400 000 beobachtet werden. Dies legte ebenfalls nahe, dass jedes Isoindol aufgrund seiner spezifischen Substituenten unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften aufweist und für jedes primäre Amin eine eigene Kalibrierkurve benötigt wird. Da nur das LpxC-Substrat und nicht das LpxC-Produkt als Feststoff vorlag, war es somit nicht möglich, anhand der Fluoreszenzintensität die Produktkonzentration zu bestimmen.

Da für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) jedoch nur die Änderung der Produktkonzentration und somit die Änderung der Fluoreszenzintensität von Bedeutung ist, wurden im Folgenden ohne exakte Kenntnis der Produktkonzentrationen die Anfangsgeschwindigkeiten für sechs verschiedene Substratkonzentrationen bestimmt. In Voruntersuchungen (Daten nicht gezeigt) zeigte sich hierbei, dass sich bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 200 nM die Fluoreszenzintensität über den gesamten Reaktionsverlauf nicht von dem Grundrauschen unterschied. Aus diesem Grund wurde im Folgenden für Substratkonzentrationen von 1,0–25 µM der Umsatz über einen Zeitraum von 12 Minuten verfolgt und die Zunahme der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer aufgetragen (Abb. 29).

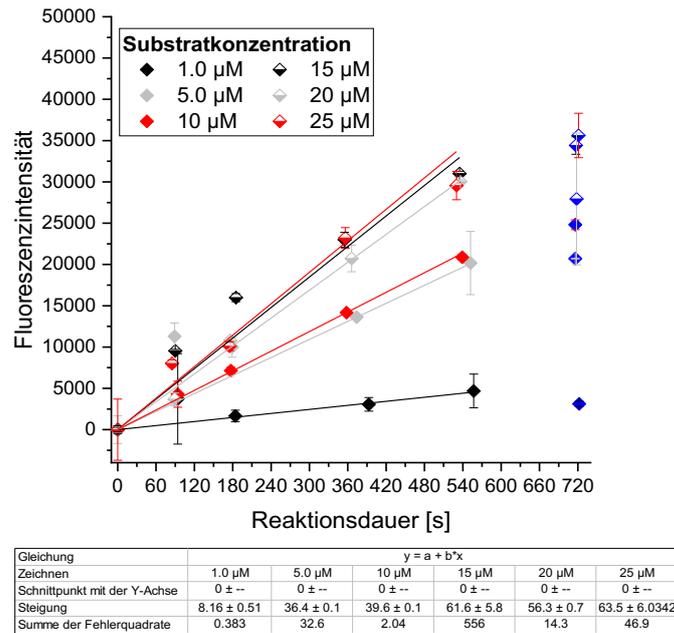


Abbildung 29: Bestimmung der Initialgeschwindigkeiten von *E. coli* LpxC C63A zur Bestimmung des K_M -Wertes. Dazu wurde der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay bei 37 °C bei sechs Substratkonzentrationen (1.0–25 µM) durchgeführt und die Zunahme der Fluoreszenzintensität als Maß für die Zunahme der Produktkonzentration über einen Zeitraum von 7 min verfolgt. Die Bestimmung der Initialgeschwindigkeiten erfolgte mithilfe von linearen Regressionen (blau = maskierte Werte).

Dabei konnte bei allen Substratkonzentrationen eine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Der Wert dieser lag in allen Experimenten nach 12 Minuten außerhalb des linearen Bereiches, sodass diese Werte für die weitere Analyse nicht betrachtet wurden. Durch eine lineare Regression konnte anschließend für alle Konzentrationen die Anfangsgeschwindigkeit, welche der Steigung der Regressionsgeraden entspricht, bestimmt werden. Mit Ausnahme der Ausgangssubstratkonzentration von 15 µM konnte dabei eine Zunahme der Anfangsgeschwindigkeit mit steigender Konzentration beobachtet werden. Hierbei zeigte sich bereits zwischen den beiden niedrigsten untersuchten Konzentrationen (1.0 µM und 5.0 µM) ein starker Sprung in der Reaktionsgeschwindigkeit, während diese zwischen einer Ausgangssubstratkonzentration von 5.0–25 µM lediglich geringfügig zunahm. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass sich der K_M -Wert von *E. coli* LpxC C63A zwischen 1.0–5.0 µM befand. Zur Bestimmung des exakten K_M -Wertes wurde anschließend gemäß LINEWEAVER und BURK die reziproke Steigung gegen die reziproke Substratkonzentration aufgetragen (Abb. 30).

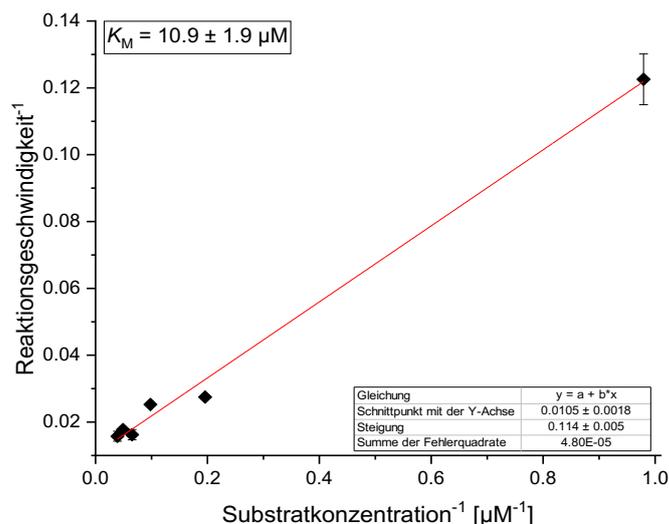


Abbildung 30: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_M -Wertes von *E. coli* LpxC C63A für das natürliche Substrat bei 37 °C. Dabei wurden die mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays ermittelten reziproken Initialgeschwindigkeiten gegen die jeweilige reziproke Substratkonzentration aufgetragen. Nach linearer Regression lieferte die Nullstelle $-K_M^{-1}$.

Nach linearer Regression lieferte die Nullstelle $-K_M^{-1}$. Der entsprechende K_M -Wert beträgt $10.9 \pm 1.9 \mu\text{M}$ und liegt somit sowohl oberhalb des zuvor erwarteten Wertes als auch oberhalb der Literaturwerte für *E. coli* LpxC.^[38,57] Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass insbesondere bei den hohen Substratkonzentrationen (15–25 μM) die beobachteten Messwerte innerhalb der ersten drei Minuten oberhalb der Regressionsgeraden lagen und nicht nur der initiale Reaktionsbereich bei der Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten berücksichtigt wurde. Zur Verifizierung der Annahme, dass sich der K_M -Wert von *E. coli* LpxC C63A zwischen 1.0–5.0 μM befand, sollte die Bestimmung des K_M -Wertes sowohl unter Verwendung niedrigerer Substratkonzentrationen als auch unter Verwendung eines kürzeren Reaktionszeitraumes wiederholt werden. Hierfür sollte jedoch ein alternativer Enzymassay verwendet werden, da sich der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay aufgrund der Problematik der hohen basalen Hintergrundfluoreszenz als ungeeignet erwies.

5.1.3 Entwicklung eines massenbasierten LpxC-Enzymassays

Ein LC-MS/MS-basierter LpxC-Enzymassay stellt eine alternative Untersuchungsmethode für Substanzen dar, für die der fluoreszenzbasierte Enzymassay nicht anwendbar ist. Ausschlusskriterien für eine Untersuchung im fluoreszenzbasierten Enzymassay stellen beispielsweise ein primäres Amin in der chemischen Struktur oder intrinsische Fluoreszenzeigenschaften des potentiellen Inhibitors dar. Des Weiteren sollte ein LC-MS/MS-basierter Assay den Einsatz einer niedrigeren Substratkonzentration ermöglichen, da die Problematik der hohen basalen Hintergrundfluoreszenz entfällt.

Der zu entwickelnde massenbasierte LpxC-Enzymassay stellt ebenfalls einen Assay im Bereich der Inhibitionskinetik dar, wobei die durch einen Inhibitor bedingte Reduktion der katalytischen Aktivität von *E. coli* LpxC C63A untersucht werden sollte (Abb. 31).

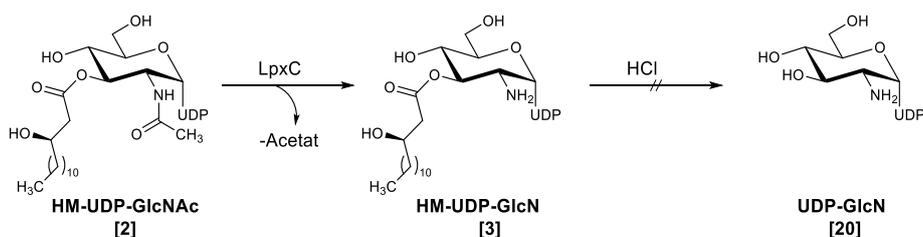


Abbildung 31: Durchführung des massenbasierten LpxC-Enzymassays in Abwesenheit eines LpxC-Inhibitors. Die enzymatische Reaktion, die Deacetylierung des natürlichen Substrates **2** von *E. coli*, erfolgte über einen Zeitraum von 30 min bei 37 °C. Der Abbruch der Reaktion erfolgte durch eine saure Inaktivierung des Enzyms, dabei erfolgte keine zusätzliche Abspaltung der Fettsäureseitenkette.

Die enzymatische Reaktion wurde in Analogie zum fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay nach 30 Minuten bei 37 °C abgebrochen. Der Unterschied lag sowohl in den verwendeten Reagenzien zum Abbruch der Reaktion als auch in der Detektion des Produktes. Da beobachtet wurde, dass unter basischen Bedingungen eine unvollständige Abspaltung der Fettsäureseitenkette erfolgte und entsprechend vier statt zwei Substanzen hätten detektiert werden müssen, wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von Salzsäure gestoppt. Der Wechsel von basischen zu sauren Reaktionsbedingungen bewirkte ebenfalls eine Inaktivierung des Enzyms, die Fettsäureesterstruktur blieb jedoch intakt. Im zweiten Schritt erfolgte die chromatographische Trennung des Reaktionsgemisches. Der Unterschied der Retentionszeiten von Substrat und Produkt betrug dabei ca. eine Minute, sodass eine Basislinientrennung beider Verbindungen vorlag. Im Anschluss an die chromatographische Trennung erfolgte die Ionisierung der Substanzen mittels Elektrosprayionisation. Diese weiche Ionisierungsmethode ermöglichte die Detektion von nicht-fragmentiertem Substrat **2** (m/z 832 Da) und nicht-fragmentiertem Produkt **3** (m/z 790 Da) im negativen Ionenmodus. Anschließend erfolgte die Fragmentierung der beiden Vorläuferionen in der Kollisionszelle, gefolgt von der Detektion der Produktionen. Danach wurde eine Methode unter Verwendung der jeweils drei intensivsten Massenübergänge erstellt (Tab. 2).

Tabelle 2: Beobachtete Massenübergänge mit höchster Intensität bei der massenspektrometrischen Analyse des *E. coli*-Substrates **2 sowie des *E. coli*-Produktes **3**.** Nach Ionisierung mittels ESI sowie der Detektion des nicht-fragmentierten Substrates **2** (m/z 832) sowie des nicht-fragmentierten Produktes **3** (m/z 790) im negativen Ionenmodus wurden die Vorläuferionen in der Kollisionszelle fragmentiert. Anschließend wurden jeweils drei charakteristische Massenübergänge detektiert.

	Q1 m/z	Q3 m/z
Substrat 2	832	79
		159
		385
Produkt 3	790	79
		159
		385

Die beobachteten Massenübergänge zeigten, dass die Fragmentierung am für Substrat und Produkt identischen UDP-Rest stattfand. Dabei zeigten die beiden Massenübergänge, in denen das Phosphatfragment **22** (m/z 79) entstand, die höchste Intensität und dienten für die Auswertung der folgenden Experimente als „Quantifier“. Zur Bestimmung des prozentualen Anteils von Substrat und Produkt in der jeweiligen Probe wurden die Peakflächen dieser beiden Massenübergänge miteinander verglichen. Die beobachteten Massenübergänge waren dabei in Übereinstimmung mit der Literatur (Abb. 32).^[79]

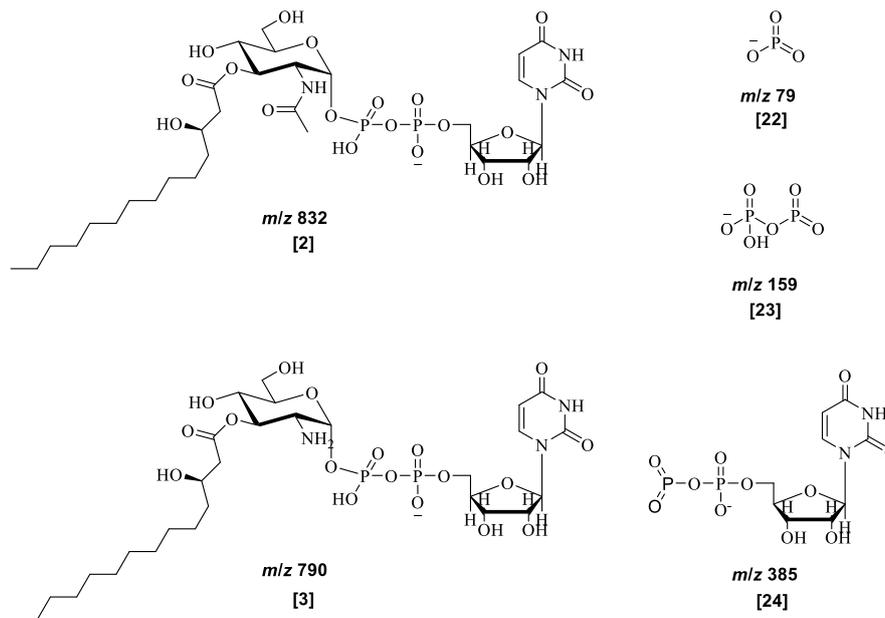


Abbildung 32: Beobachtete Fragmente von Substrat 2 und Produkt 3 nach LC-MS/MS-Analyse. Nach Ionisierung mittels ESI wurde zunächst das nicht-fragmentierte Substrat **2** (m/z 832) sowie das nicht-fragmentierte Produkt **3** (m/z 790) im negativen Ionenmodus detektiert. Nach Fragmentierung beider Vorläuferionen in der Kollisionszelle wurden jeweils drei Produktionen, die für **2** und **3** identisch waren, detektiert. Dabei handelte es sich um ein Phosphat- (**22**, m/z 79) und ein Diphosphatfragment (**23**, m/z 159) sowie ein UDP-Fragment (**24**, m/z 385). Die Massenübergänge 832 \rightarrow 79 sowie 790 \rightarrow 79 dienten bei der folgenden Auswertung als „Quantifier“, die anderen Massenübergänge als „Qualifier“.

Die Versuche zur Etablierung des massenbasierten LpxC-Enzymassays gliederten sich in die erneute Bestimmung des K_M -Wertes von *E. coli* LpxC C63A für den Umsatz des natürlichen Substrates und in die Ermittlung standardisierter Assaybedingungen. Zusätzlich dazu wurden Voruntersuchungen durchgeführt, in denen limitierende Faktoren wie eine minimale Ausgangssubstratkonzentration sowie eine maximale Reaktionsdauer ermittelt werden sollten.

Zur Überprüfung dieser limitierenden Reaktionsbedingungen wurde der massenbasierte LpxC-Enzymassay bei drei verschiedenen Substratkonzentrationen (0.25 μ M, 1.0 μ M, 25 μ M) durchgeführt und die Substrat- und Produktkonzentrationen abweichend von der 30-minütigen Inkubationsdauer zu drei verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert (0 s, 90 s, 7 min). Die Enzymkonzentration von *E. coli* LpxC C63A betrug dabei 74 nM (Abb. 33).

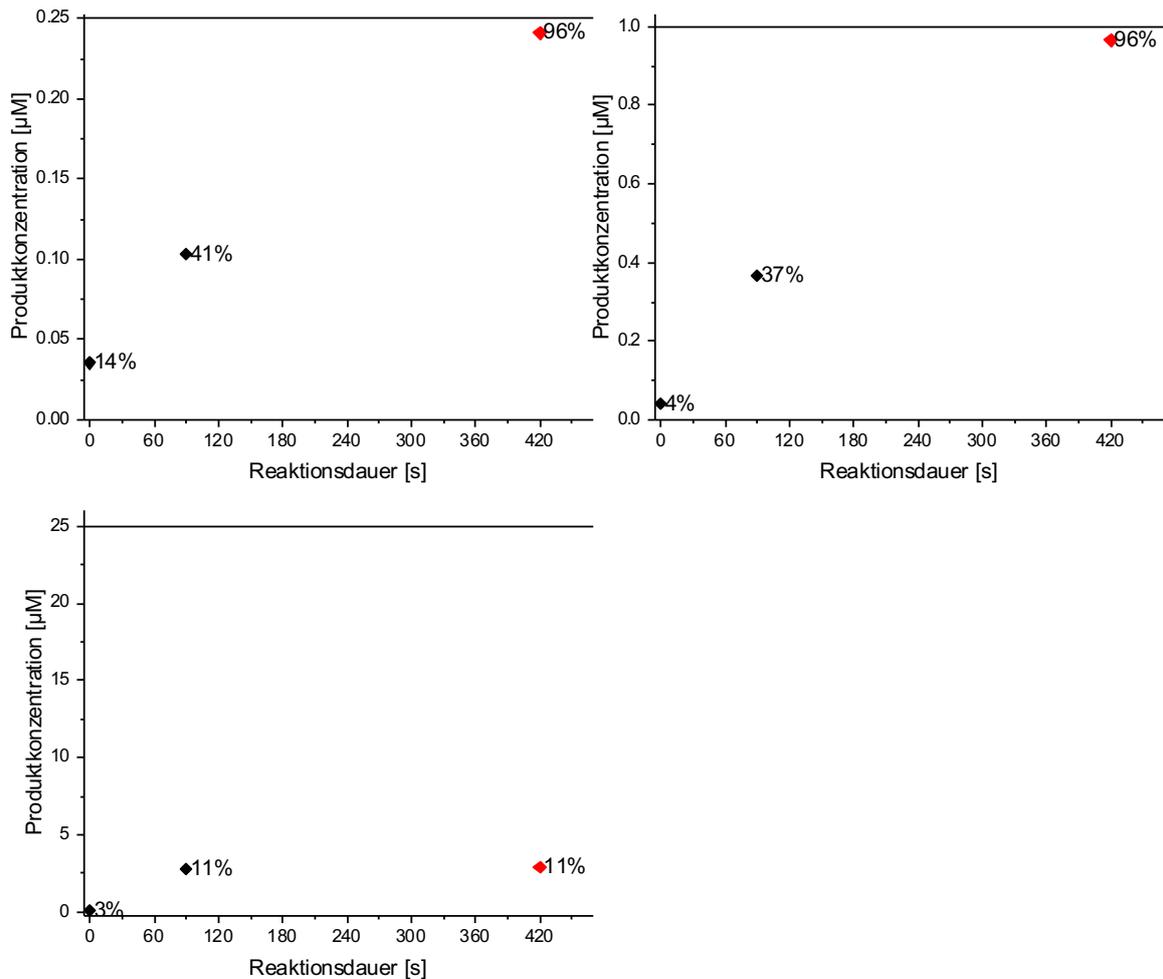


Abbildung 33: Initiale Voruntersuchungen zur Durchführung des massenbasierten *E. coli* LpxC-Enzymassays. Dabei wurde die niedrigste (0.25 µM, oben links) sowie die höchste Konzentration (25 µM, unten links), die zur Bestimmung des K_M -Wertes verwendet werden sollten, sowie eine Zwischenkonzentration (1.0 µM, oben rechts) durch 74 nM *E. coli* LpxC C63A bei 37 °C umgesetzt. Basierend auf der Bestimmung des K_M -Wertes mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays betrug die minimale Reaktionsdauer 90 s, die längste 420 s. Die Quantifizierung der Substrat- und Produktkonzentrationen erfolgte durch den Vergleich der Peakflächen der *Quantifier*.

Sowohl bei der niedrigsten als auch bei der höchsten Substratkonzentration gepaart mit der kürzesten Reaktionsdauer (0.25 µM bzw. 25 µM, 90 s) konnten Substrat und Produkt eindeutig detektiert und quantifiziert werden. Weder die niedrigste Gesamtkonzentration von Substrat und Produkt noch die geringste prozentuale Produktkonzentration zeigte sich problematisch in Bezug auf das Detektionslimit beider Substanzen. Im Gegenteil: aufgrund von über 30% Reaktionsumsatz nach 90 Sekunden sowie quasi vollständigem Reaktionsumsatz nach 420 Sekunden bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 0.25 µM und 1.0 µM wurde für die folgende Bestimmung von Initialgeschwindigkeiten sowohl die Reaktionsdauer weiter verkürzt als auch das Enzym noch einmal zusätzlich um den Faktor 10 verdünnt. Insgesamt wurde somit der massenbasierte Enzymassay zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bei sechs verschiedenen Substratkonzentrationen (0.25–25 µM) in Anwesenheit von 2% DMSO durchgeführt. Die Enzymkonzentration von *E. coli* LpxC betrug 7.4 nM und es wurde die Produktbildung über einen Zeitraum von 90 Sekunden verfolgt (Abb. 34).

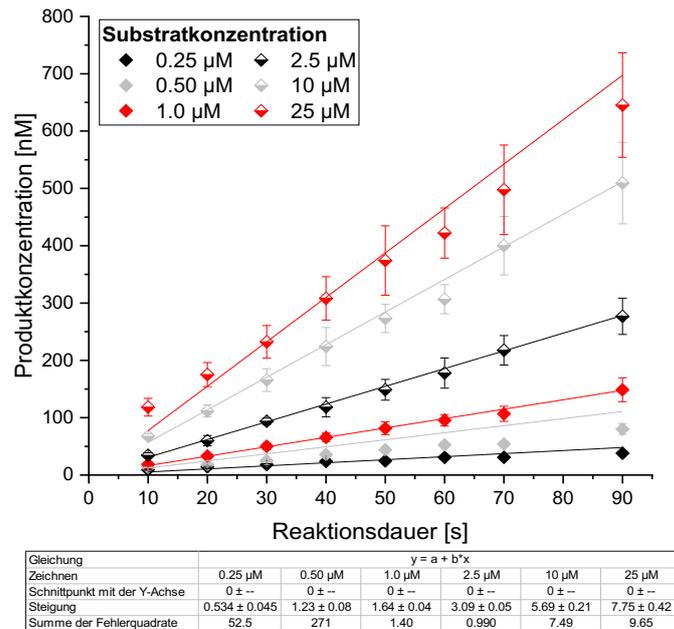


Abbildung 34: Bestimmung der Initialgeschwindigkeiten von *E. coli* LpxC C63A beim Umsatz des natürlichen Substrates 2 zur Bestimmung des K_M -Wertes. Dazu wurde der massenbasierte LpxC-Enzymassay bei 37 °C bei sechs Substratkonzentrationen (0,25–25 µM) durchgeführt und die Zunahme der Produktkonzentration über einen Zeitraum von 90 s verfolgt. Die Quantifizierung der Substrat- und Produktkonzentrationen erfolgte durch den Vergleich der Peakflächen der *Quantifier*. Durch lineare Regression erfolgte die Bestimmung der Initialgeschwindigkeiten.

Hierbei zeigte sich bei allen Substratkonzentrationen eine lineare Zunahme der Produktkonzentration im untersuchten Zeitraum. Die Berechnung der Initialgeschwindigkeiten erfolgte durch lineare Regression. Dabei zeigte sich eine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Substratkonzentration. Anschließend wurde analog zum fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay die jeweilige reziproke Reaktionsgeschwindigkeit gegen die reziproke Substratkonzentration aufgetragen (Abb. 35).

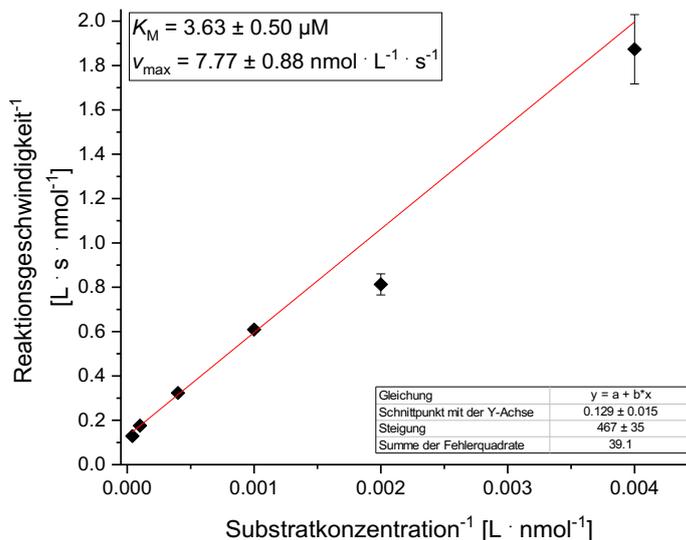


Abbildung 35: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_M -Wertes von *E. coli* LpxC C63A für das natürliche Substrat bei 37 °C. Dabei wurden die mittels LC-MS/MS ermittelten reziproken Initialgeschwindigkeiten gegen die jeweilige reziproke Substratkonzentration aufgetragen. Nach linearer Regression lieferte die Nullstelle $-K_M^{-1}$. Zusätzlich dazu konnte die Maximalgeschwindigkeit v_{max} bestimmt werden, der y-Achsenabschnitt lieferte dabei v_{max}^{-1} .

Nach linearer Regression lieferte die Nullstelle $-K_M^{-1}$. Der entsprechende K_M -Wert für dieses Experiment betrug $3.63 \pm 0.50 \mu\text{M}$. Dieser Wert lag um den Faktor 3 niedriger als der zuvor mittels Fluoreszenz bestimmte K_M -Wert und somit in einer Größenordnung mit den Literaturwerten für *E. coli* LpxC.^[38,57] Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug $7.77 \pm 0.88 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Verglichen mit dem fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay ermöglichte der massenbasierte Enzymassay eine präzisere Bestimmung des K_M -Wertes. Dies lag daran, dass das Detektionslimit deutlich niedriger lag, sodass auch bei einer Substratkonzentration von $0.25 \mu\text{M}$ der Verlauf der Produktbildung verfolgt werden konnte. Verglichen mit dem fluoreszenzbasierten Enzymassay lag die niedrigste untersuchte Konzentration um den Faktor 4 niedriger und somit deutlich unterhalb des ermittelten K_M -Wertes. Zusätzlich dazu ermöglichte die Verwendung des massenbasierten Enzymassays eine Verkürzung des Reaktionszeitraumes von 420 Sekunden auf 90 Sekunden und stellte so sicher, dass es sich bei den ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten um Initialgeschwindigkeiten handelte. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit lediglich der mittels LC-MS/MS bestimmte K_M -Wert ($K_M = 3.63 \pm 0.50 \mu\text{M}$) zur Berechnung von Inhibitionskonstanten herangezogen.

Als nächstes sollten standardisierte Reaktionsbedingungen bei verschiedenen Substratkonzentrationen etabliert werden. Als Nachweis für die Skalierbarkeit dienten sowohl der exakte Reaktionsumsatz als auch die Inhibitionskonstanten von drei ausgewählten LpxC-Inhibitoren: Als erster Referenzinhibitor wurde die literaturbekannte *N*-Aroyl-L-threonylhydroxamsäure CHIR-090 (**12**) ausgewählt, um die Skalierbarkeit des LC-MS/MS-basierten Enzymassays für Inhibitoren mit *tight-binding*-Eigenschaften nachzuweisen. Zusätzlich dazu wurden zwei im Arbeitskreis Holl synthetisierte Verbindungen mit unterschiedlicher Affinität für *E. coli* LpxC C63A ausgewählt. Dabei handelte es sich um Phenylethylglycoliderivat **18** ($K_i = 2.76 \pm 0.71 \mu\text{M}$) und Amid **19** ($K_i = 10.7 \pm 1.2 \text{ nM}$). Zunächst wurde in Abwesenheit eines Inhibitors ausgehend von $25 \mu\text{M}$ Substratkonzentration und 74 nM Enzymkonzentration eine serielle 1:10-Verdünnung beider Komponenten durchgeführt (Tab. 3).

Tabelle 3: Linearer Scale-Down der Enzym- und Substratkonzentration im massenbasierten *E. coli* LpxC-Enzymassay. Ausgehend von $25 \mu\text{M}$ Substrat und 74 nM Enzym erfolgte eine zweifache serielle 1:10-Verdünnung beider Komponenten. Die Quantifizierung der Substrat- und Produktkonzentrationen erfolgte nach 30-minütigem Umsatz bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ mittels LC-MS/MS durch den Vergleich der Peakflächen der *Quantifier*.

		1:10	1:100
Substratkonzentration [μM]	25	2.5	0.25
Enzymkonzentration [nM]	74	7.4	0.74
Reaktionsumsatz [%]	95	75	18

Hierbei zeigte sich, dass die Durchführung des Enzymassays nicht linear skalierbar war. Während $25 \mu\text{M}$ Substrat durch 74 nM *E. coli* LpxC C63A innerhalb von 30 Minuten nahezu vollständig umgesetzt wurden (95%), wurden bei einer 1:10-Verdünnung von Substrat und Enzym nur 75% und bei einer 1:100-Verdünnung sogar lediglich 18% umgesetzt.

Zusätzlich dazu wurde, basierend auf den Bedingungen des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays, ausgehend von $25 \mu\text{M}$ Substratkonzentration und 15 nM Enzymkonzentration eine einfache 1:10-Verdünnung durchgeführt. Des Weiteren wurde der Enzymassay zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit bei 7.4 nM Enzym- und $2.5 \mu\text{M}$ Substratkonzentration wiederholt (Tab. 4).

Tabelle 4: Nicht-linearer Scale-Down der Enzym- und Substratkonzentration im massenbasierten *E. coli* LpxC-Enzymassay. Ausgehend von 25 μM Substrat und 15 nM Enzym (\cong Bedingungen des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays) erfolgte eine einfache 1:10-Verdünnung beider Komponenten. Zusätzlich dazu erfolgte ausgehend von den Bedingungen des Fluoreszenzassays eine 1:10-Verdünnung der Substrat- und eine 1:2-Verdünnung der Enzymkonzentration. Die Quantifizierung der Substrat- und Produktkonzentrationen erfolgte nach 30-minütigem Umsatz bei 37 °C mittels LC-MS/MS durch den Vergleich der Peakflächen der *Quantifier*.

		1:10 / 1:2	1:10
Substratkonzentration [μM]	25	2.5	2.5
Enzymkonzentration [nM]	15	7.4	1.5
Reaktionsumsatz [%]	50	67	18

Auch hier zeigte sich, dass der Reaktionsumsatz nicht linear skalierbar war. Während 25 μM Substrat durch 15 nM Enzym innerhalb von 30 Minuten zur Hälfte umgesetzt wurden, betrug der Umsatz bei einer 1:10-Verdünnung lediglich 18%. Der Reaktionsumsatz von 2.5 μM Substrat durch 7.4 nM Enzym betrug 67%. Dies war in einer Größenordnung mit dem Umsatz aus dem vorherigen Assay bei identischer Durchführung (75%) und zeigte die Reproduzierbarkeit der Durchführbarkeit bei einer verminderten Substratkonzentration, die nahe des K_M -Wertes lag.

Neben dem Reaktionsumsatz wurden auch die IC_{50} -Werte von **12**, **18** und **19** bei allen sechs Bedingungen bestimmt (Tab. 5).

Tabelle 5: Bestimmung der IC_{50} -Werte von 12, 18 und 19 mithilfe des massenbasierten *E. coli* LpxC-Enzymassays bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Ausgehend von 25 μM Substrat und 74 nM Enzym erfolgte eine zweifache serielle 1:10-Verdünnung beider Komponenten. Zusätzlich dazu erfolgte ausgehend von 25 μM Substrat und 15 nM Enzym eine einfache 1:10-Verdünnung beider Komponenten. Die Quantifizierung der Substrat- und Produktkonzentrationen erfolgte nach 30 min durch den Vergleich der Peakflächen der *Quantifier*.

Substratkonzentration [μM]	25		2.5			0.25	
Enzymkonzentration [nM]	74	15	7.4	7.4	1.5	0.74	
Reaktionsumsatz [%]	95	50	75	67	18	18	
IC_{50}-Wert	12 [nM]	460	98.8	22.0	32.7	14.3	9.37
	18 [μM]	166	27.6	5.65	9.93	4.58	1.38
	19 [nM]	852	79.1	14.7	22.5	8.68	1.72

Anschließend wurden die IC_{50} -Werte mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung unter Verwendung des zuvor bestimmten K_M -Wertes in K_i -Werte umgerechnet (Gleichung 4).

$$K_i = \frac{IC_{50}}{\left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right)}$$

Gleichung 4: Cheng-Prusoff-Gleichung. Diese dient zur Umwandlung eines IC_{50} -Wertes in einen K_i -Wert. Dabei gilt: K_i = Inhibitionskonstante, IC_{50} = Inhibitorkonzentration, die das Enzym bei der eingesetzten Substratkonzentration ([S]) zu 50% inhibiert, K_M = Michaelis-Menten-Konstante, die die Affinität des Enzyms für das eingesetzte Substrat widerspiegelt.

Die so bestimmten Inhibitionskonstanten waren im Gegensatz zu den IC_{50} -Werten unabhängig von der Substratkonzentration und direkt miteinander vergleichbar (Tab. 6).

Tabelle 6: Bestimmung der K_i -Werte von 12, 18 und 19 mithilfe des massenbasierten *E. coli* LpxC-Enzymassays bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Ausgehend von 25 μM Substrat und 74 nM Enzym erfolgte eine zweifache serielle 1:10-Verdünnung beider Komponenten. Zusätzlich dazu erfolgte ausgehend von 25 μM Substrat und 15 nM Enzym eine einfache 1:10-Verdünnung beider Komponenten. Die Berechnung der K_i -Werte erfolgte mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung unter Verwendung des zuvor experimentell bestimmten K_M -Wertes ($K_M = 3.63 \pm 0.50 \mu\text{M}$).

Substratkonzentration [μM]		25		2.5			0.25
Enzymkonzentration [nM]		74	15	7.4	7.4	1.5	0.74
Reaktionsumsatz [%]		95	50	75	67	18	18
K_i -Wert	12 [nM]	58.3	12.5	13.1	19.4	8.45	8.77
	18 [μM]	21.0	3.49	3.35	5.88	2.71	1.29
	19 [nM]	108	10.0	8.73	13.3	5.14	1.61

Analog zu der Bestimmung von IC_{50} -Werten mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays (vgl. Tabelle 1) zeigte sich, dass bei (nahezu) vollständigem Substratumsatz eine Verlangsamung der Reaktion durch Inhibitoren nicht vollständig erkannt wurde. Dies resultierte in höheren K_i -Werten für alle drei getesteten Inhibitoren im Vergleich zu den unter den anderen fünf Reaktionsbedingungen ermittelten Werten. Diese lieferten Inhibitionskonstanten in einer ähnlichen Größenordnung, wobei zu beachten war, dass die Inhibitionskonstanten aus den beiden Experimenten mit 18% Reaktionsumsatz etwas niedrigere Inhibitionskonstanten lieferten als die mit 50–75% Reaktionsumsatz. Zur Quantifizierung der Unterschiede erfolgte die Bestimmung der Mittelwerte sowie der (prozentualen) Standardabweichungen (Tab. 7).

Tabelle 7: Quantifizierung der Abweichungen der unter verschiedenen Reaktionsbedingungen ermittelten K_i -Werte. Dazu wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der K_i -Werte von 12, 18 und 19 ermittelt und anschließend die prozentuale Standardabweichung für die jeweilige Substanz berechnet. Dabei wurden die Experimente mit einem Reaktionsumsatz von 50–75% den Experimenten mit einem Reaktionsumsatz von 18–75% gegenübergestellt.

	50–75% Reaktionsumsatz		18–75% Reaktionsumsatz	
	K_i -Wert	Standardabw.	K_i -Wert	Standardabw.
12	15.0 \pm 3.83 nM	26%	12.4 \pm 4.43 nM	36%
18	4.24 \pm 1.43 μM	34%	3.34 \pm 1.67 μM	50%
19	10.7 \pm 2.36 nM	23%	7.76 \pm 4.51 nM	59%

Trotz verschiedener Substratkonzentrationen zeigte sich bei den drei Experimenten mit einem Substratumsatz von 50–75% eine hohe Reproduzierbarkeit der Inhibitionskonstanten. Dies zeigte einen erfolgreichen Scale-Down der Assaybedingungen und ermöglichte die biologische Testung unter Verwendung einer niedrigeren Substratkonzentration. Auch die Inhibitionskonstanten aus den Experimenten mit lediglich 18% Reaktionsumsatz lagen in derselben Größenordnung. Trotz niedrigerer K_i -Werte (bezogen auf die Einzelerperimente) lag der Faktor der prozentualen Standardabweichung unter den Werten, die in der biologischen Testung unter Verwendung des fluoreszenzbasierten Enzymassays standardmäßig beobachtet wurden.^[80,81]

Im Folgenden wurden für die biologische Testung zur Bestimmung von Struktur-Wirkungsbeziehungen (vgl. Kapitel 5.1.5) die Inhibitionsexperimente mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Substratkonzentration von 2.5 μM und einer Enzymkonzentration von 7.4 nM durchgeführt. Als maximaler Reaktionsumsatz wurde 80% definiert. Ein minimaler Umsatz wurde aufgrund der zuvor diskutierten Inhibitionskonstanten nicht definiert.

5.1.4 Entwicklung eines SPR-basierten LpxC-Enzymassays

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie bietet eine alternative Methode zur Inhibitionskinetik bei der Identifikation von LpxC-Inhibitoren. Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Assays wird hierbei ein reines Bindungsgeschehen untersucht, der enzymkinetische Parameter ist im Gegensatz zur Inhibitionskonstante K_i die Bindungskonstante K_D . Ebenso wie der massenbasierte Enzymassay ist dieser Assay auch für Substanzen, die ein primäres Amin oder eine intrinsische Fluoreszenz aufweisen, anwendbar. Dabei wird in Abwesenheit des natürlichen Substrates die Bindung des potentiellen Inhibitors an das Enzym verfolgt. Des Weiteren können neben der Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D auch die kinetischen Parameter k_{on} und k_{off} bestimmt werden. Diese liefern erste Hinweise auf die kinetischen Eigenschaften der Substanzen, die das LpxC-Enzym hemmen.

In initialen Versuchen zur Entwicklung des SPR-basierten LpxC-Enzymassays wurde ein pH-Scouting durchgeführt. Dieses diente dazu, das Enzym im Vorfeld der Immobilisierung aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen in der Nähe der Chipoberfläche zu konzentrieren, ohne das Enzym zu denaturieren. Dafür wurde das Enzym in verschiedenen Acetatpuffern (10 mM; pH = 4.0, 4.5, 5.0 und 5.5) gelöst. Der Laufpuffer (LP₁; 40 mM MES (pH = 6.0), 0.05% Triton X-100) basierte auf den Bedingungen des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays (Abb. 36).

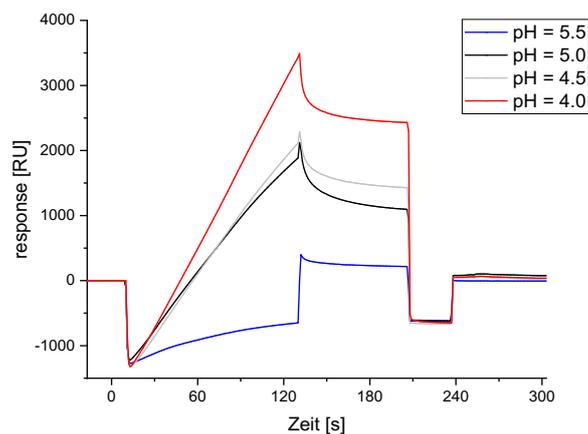


Abbildung 36: Initiales pH-Scouting von *E. coli* LpxC C63A unter Verwendung von Laufpuffer 1. Zur Konzentrierung des Enzyms mittels elektrostatischer Wechselwirkungen in der Nähe der Sensorchipoberfläche wurde das Enzym in vier verschiedenen Acetatpuffern (10 mM; pH = 4.0, 4.5, 5.0, 5.5) gelöst und über einen CM5-Sensorchip geleitet. Als Laufpuffer wurde Laufpuffer 1 (40 mM MES (pH = 6.0), 0.05% Triton X-100) verwendet.

Hierbei zeigte sich, dass bei pH = 5.5 nahezu keine elektrostatische Anlagerung von *E. coli* LpxC C63A stattfand, bei pH = 4.0 die höchste Anlagerung, aber auch die höchste Restbindung in der Dissoziationsphase vorlag. Dies sprach dafür, dass pH = 5.5 zu nahe am isoelektrischen Punkt (IEP = 5.54) des Enzyms lag, sodass überwiegend keine positive Ladung des Enzyms vorlag, bei pH = 4.0 hingegen das Enzym denaturierte, sodass es zu einer unspezifischen Anlagerung kam. Bei pH = 4.5 und pH = 5.0 zeigte sich ein ähnliches Verhalten des Enzyms, allerdings waren auch hier beide Male noch über 50% unspezifische Restbindung zu beobachten, sodass im Folgenden die Bedingungen optimiert werden sollten. Hierfür wurden sowohl dem Acetat- als auch dem Laufpuffer der Cofaktor des Enzyms (Zn^{2+}) und das Reduktionsmittel DTT in verschiedenen Verhältnissen hinzugefügt (Tab. 8).

Tabelle 8: Übersicht der auf Basis von Laufpuffer 1 optimierten Laufpuffer 1a–1i. Diese enthielten neben dem Pufferreagenz MES (40 mM) und dem Detergens Triton X-100 (0.05%) eine Kombination der Additive DTT und ZnCl₂ in verschiedenen Verhältnissen. DTT (0–5 mM) diente dabei als Reduktionsmittel, ZnCl₂ (0–1 mM) als Donor des Cofaktors (Zn²⁺) von *E. coli* LpxC C63A.

	LP _{1a}	LP _{1b}	LP _{1c}	LP _{1d}	LP _{1e}	LP _{1f}	LP _{1g}	LP _{1h}	LP _{1i}
DTT [mM]	0.08	1	5	1	1	5	5	-	-
ZnCl₂ [mM]	-	-	-	0.1	1	0.1	1	0.1	1

LP₁ beschreibt dabei den ursprünglich verwendeten Laufpuffer, LP_{1a} enthielt zusätzlich DTT in derselben Konzentration, in der es auch im fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay vorliegt. LP_{1b} und LP_{1c} zeigten eine deutlich höhere Konzentration von DTT in Abwesenheit von Zinkchlorid. LP_{1h–i} dienen dazu, den Einfluss des Cofaktors Zn²⁺ in Abwesenheit von DTT zu untersuchen. LP_{1d–g} wiesen verschiedene Kombinationen von DTT und Zinkchlorid auf. Aufgrund der Bildung von unlöslichen DTT-Komplexen^[82] und einer damit einhergehenden unbekanntem Konzentration der Additive wurden LP_{1e} sowie LP_{1g} für die weitere Analyse verworfen. Analog dem vorherigen pH-Scouting wurde die elektrostatische Anlagerung bei vier pH-Werten untersucht (Abb. 37).

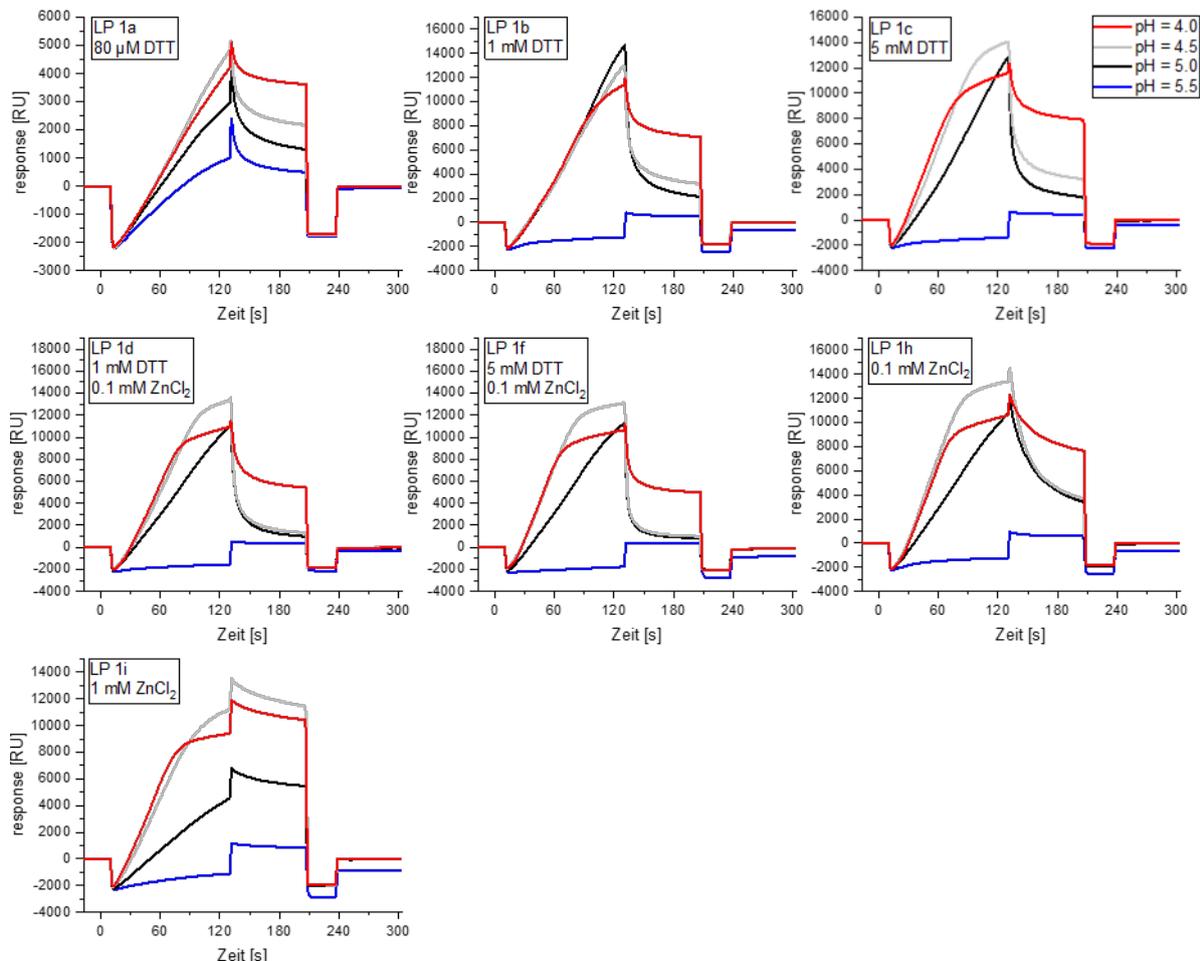


Abbildung 37: Optimierung des pH-Scoutings von *E. coli* LpxC C63A unter Verwendung der Laufpuffer 1a–1i. Zur Konzentrierung des Enzyms mittels elektrostatischer Wechselwirkungen in der Nähe der Sensorchipoberfläche wurde das Enzym in vier verschiedenen Acetatpuffern (10 mM; pH = 4.0, 4.5, 5.0, 5.5) gelöst und über einen CM5-Sensorchip geleitet. Als Laufpuffer wurden die Laufpuffer 1a–1i (40 mM MES (pH = 6.0), 0–5 mM DTT, 0–1 mM ZnCl₂, 0.05% Triton X-100) verwendet. Den Acetatpuffern wurden zusätzlich dazu ebenfalls die DTT- und ZnCl₂-Konzentrationen des entsprechenden Laufpuffers hinzugefügt. Die Zuordnung der exakten Konzentrationen ist in Tabelle 8 dargestellt.

Erneut zeigte sich für pH = 4.0 bei allen untersuchten Bedingungen eine sehr hohe unspezifische Wechselwirkung mit dem Sensorchip, bei pH = 5.5 hingegen fast keine Wechselwirkung.

Durch Zugabe von 80 µM DTT zu dem Laufpuffer konnte nahezu keine Veränderung zum ersten pH-Scouting beobachtet werden. Auch die alleinige Zugabe des Cofaktors ohne Reduktionsmittel resultierte in einer hohen unspezifischen Restbindung. Die Zugabe des Reduktionsmittels allein sowie in Kombination mit dem Cofaktor zeigte hingegen einen deutlichen Unterschied in Bezug auf die unspezifische Restbindung. Hier konnte insbesondere bei pH = 4.5 und pH = 5.0 eine deutliche Reduktion dieser beobachtet werden (Abb. 38).

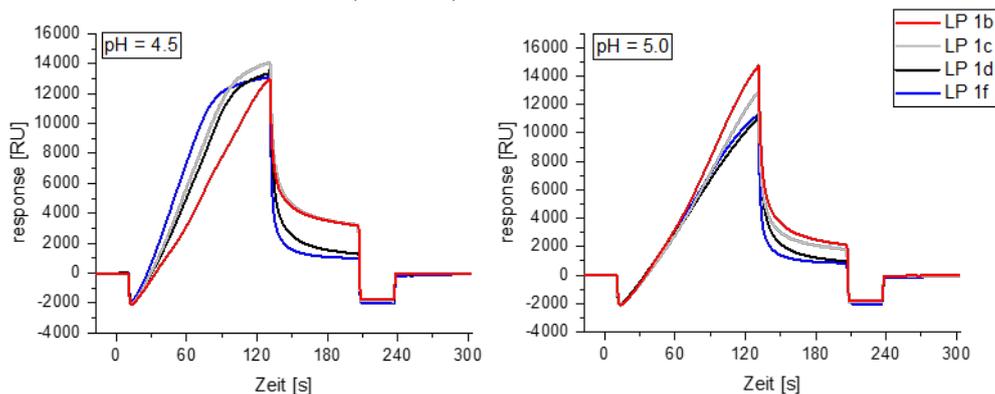


Abbildung 38: Vergleich der pH-Scoutings von *E. coli* LpxC C63A bei pH = 4.5 und pH = 5.0 unter Verwendung von ≥ 1 mM DTT. Gegenüberegestellt sind die auf Basis von Laufpuffer 1 (40 mM MES (pH = 6.0), 0.05% Triton X-100) erstellten Laufpuffer, denen verschiedene Kombinationen von DTT und ZnCl₂ hinzugefügt wurden: Laufpuffer 1b (rot, 1 mM DTT), 1c (grau, 5 mM DTT), 1d (schwarz, 1 mM DTT, 0.1 mM ZnCl₂) 1f (blau, 5 mM DTT, 0.1 mM ZnCl₂).

Die Zugabe von DTT allein (LP_{1b} und LP_{1c}) reduzierte die unspezifische Restbindung bei pH = 4.5 auf ca. 25%, bei pH = 5.0 auf ca. 15%. Die Kombination von DTT und Zinkchlorid (LP_{1d} und LP_{1f}) bewirkte eine weitere Reduktion auf <10% unspezifischer Restbindung. Während bei pH = 4.5 ein bogenförmiger Verlauf der Anlagerung beobachtet werden konnte, verlief dieser bei pH = 5.0 linear. Dies deutete darauf hin, dass bei pH = 4.5 keine homogene Ladungsverteilung des Proteins vorlag. Die Kombination dieser Ergebnisse zeigte, dass eine Immobilisierung bei pH = 5.0 unter Verwendung von 1 mM DTT und 0.1 mM Zinkchlorid (LP_{1d}) die am besten geeigneten Bedingungen bot. Die maximale *response* im pH-Scouting lag hierbei bei ca. 11 000 RU.

Zusätzlich dazu wurde 2-Mercaptoethanol (βME) als alternatives Reduktionsmittel in Kombination mit verschiedenen Cofaktor-Donoren getestet (Tab. 9).

Tabelle 9: Übersicht der auf Basis von Laufpuffer 1 optimierten Laufpuffer 1j–1m. Diese enthielten neben dem Pufferreagenz MES (40 mM, pH = 6.0) und dem Detergens Triton X-100 (0.05%) eine Kombination der Additive βME und ZnCl₂ oder ZnSO₄ in verschiedenen Verhältnissen. βME (1–2 mM) diente dabei als Reduktionsmittel, ZnCl₂ bzw. ZnSO₄ (0–0.1 mM) als Donor des Cofaktors (Zn²⁺) von *E. coli* LpxC C63A.

		LP _{1j}	LP _{1k}	LP _{1l}	LP _{1m}
Reduktionsmittel	βME [mM]	1	1	1	2
Cofaktor-Donor	ZnCl₂ [mM]	-	0.1	-	-
	ZnSO₄ [mM]	-	-	0.1	0.1

Das pH-Scouting wurde analog zu den vorherigen Experimenten von pH = 4.0 bis pH = 5.5 durchgeführt (Abb. 39).

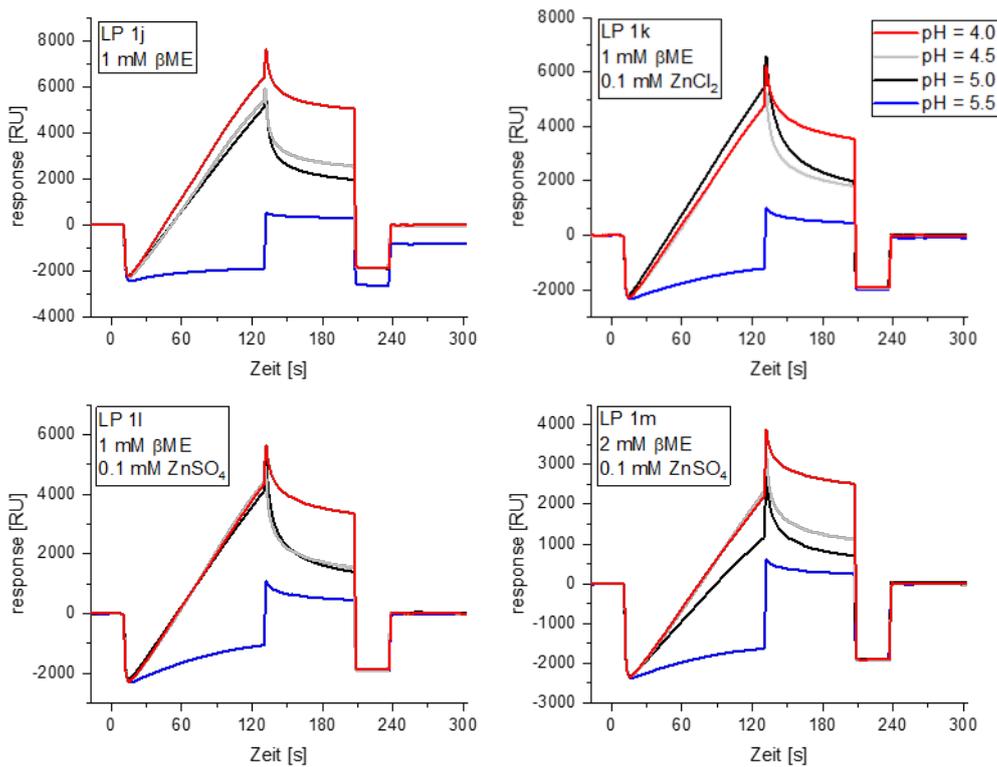


Abbildung 39: Optimierung des pH-Scoutings von *E. coli* LpxC C63A unter Verwendung der Laufpuffer 1j–1m. Zur Konzentrierung des Enzyms mittels elektrostatischer Wechselwirkungen in der Nähe der Sensorchipoberfläche wurde das Enzym in vier verschiedenen Acetatpuffern (10 mM; pH = 4.0, 4.5, 5.0, 5.5) gelöst und über einen CM5-Sensorchip geleitet. Als Laufpuffer wurden Laufpuffer 1j–1m (40 mM MES (pH = 6.0), 1–2 mM β ME, 0–0.1 mM ZnCl_2 bzw. ZnSO_4 , 0.05% Triton X-100) verwendet. Den Acetatpuffern wurden ebenfalls β ME und ZnCl_2 bzw. ZnSO_4 in den angegebenen Konzentrationen hinzugefügt (vgl. Tabelle 9).

Wie bei den vorherigen Experimenten zeigte sich für pH = 4.0 unter allen Bedingungen eine hohe unspezifische Wechselwirkung mit dem Sensorchip, bei pH = 5.5 nahezu keine Wechselwirkung. Verglichen mit den vorherigen Experimenten zeigte sich bei deutlich niedrigerer maximaler *response* eine deutlich höhere unspezifische Restbindung, sodass im Folgenden bei pH = 5.0 unter Verwendung von 1 mM DTT und 0.1 mM Zinkchlorid immobilisiert werden sollte.

Bei dieser anschließenden Immobilisierung von *E. coli* LpxC C63A unter diesen Bedingungen auf einem CM5-Chip zeigte sich jedoch trotz einer Anlagerung im Sättigungsbereich nur ein sehr niedriges Immobilisierungslevel (Daten nicht gezeigt), sodass im Folgenden die Immobilisierung auf einem CM7-Chip versucht wurde. Dieser zeichnet sich im Gegensatz zum CM5-Chip durch eine höhere Dichte der Dextranmatrix auf der Chipoberfläche aus. Ein erneutes pH-Scouting unter den optimierten Bedingungen zeigte jedoch aufgrund der höheren Anzahl an Interaktionen auf dem CM7-Chip auch eine deutlich höhere Restbindung im Vergleich zum CM5-Chip. Zur Reduktion dieser wurde ein weiteres pH-Scouting durchgeführt. Hierbei wurden der Salzgehalt, das Pufferreagenz sowie der pH-Wert des Laufpuffers variiert (Tab. 10).

Tabelle 10: Übersicht der Laufpuffer 2(a)–4(a) zur Variation des Pufferreagenzes inklusive des pH-Wertes sowie zur Variation der Salzkonzentration. Alle Puffer enthielten 50 mM eines Pufferreagenzes sowie 0.05% Triton X-100 als Detergens. Die untersuchte Spanne des pH-Wertes betrug pH = 6.0–7.0. Zusätzlich dazu wurde der Zusatz von 150 mM Natriumchlorid (gekennzeichnet als a) untersucht.

		LP ₂	LP _{2a}	LP ₃	LP _{3a}	LP ₄	LP _{4a}	
Basis	Puffer	50 mM MES		50 mM Bis-Tris				
	pH	6.0			7.0			
	Detergens	0.05% Triton X-100						
Additiv	NaCl [mM]	-	150	-	150	-	150	

Unabhängig von dieser weiteren Untersuchung der Laufpuffer wurden den Acetatpuffern aufgrund der vorherigen Ergebnisse die Additive DTT und Zinkchlorid hinzugefügt. Analog zu den vorherigen Experimenten wurde das pH-Scouting von pH = 4.0 bis pH = 5.5 durchgeführt (Abb. 40).

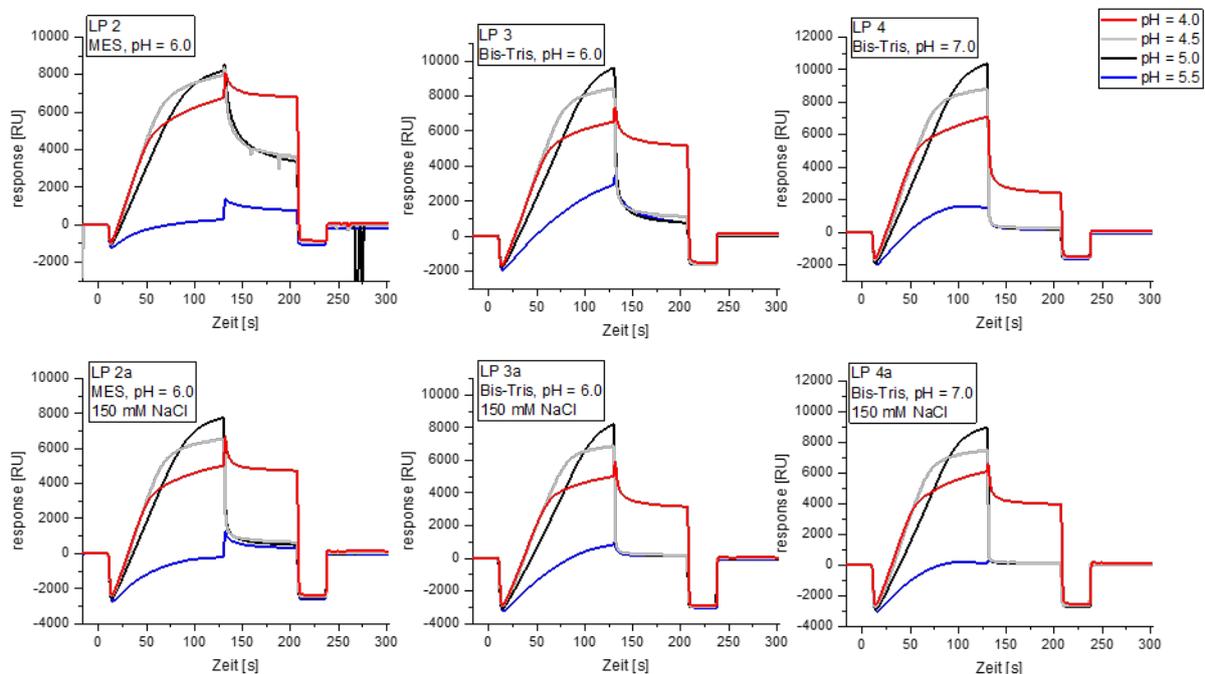


Abbildung 40: Optimierung des pH-Scoutings von *E. coli* LpxC C63A unter Verwendung der Laufpuffer 2(a)–4(a). Zur Konzentrierung des Enzyms mittels elektrostatischer Wechselwirkungen in der Nähe der Sensorchipoberfläche wurde das Enzym in vier verschiedenen Acetatpuffern (10 mM (pH = 4.0, 4.5, 5.0, 5.5), 1 mM DTT, 0.1 mM ZnCl₂) gelöst und über einen CM5-Sensorchip geleitet. Als Laufpuffer wurden die Laufpuffer 2–4, bei denen das Pufferreagenz sowie der pH-Wert variiert wurde, verwendet. Zusätzlich dazu wurde den drei Puffern jeweils 150 mM NaCl hinzugefügt (gekennzeichnet als a). Die exakte Zusammensetzung der Puffer ist in Tabelle 10 dargestellt.

Für den zuvor verwendeten MES-Puffer konnte durch Zugabe von 150 mM Natriumchlorid eine deutliche Reduktion der unspezifischen Restbindung beobachtet werden. Unter Verwendung von Bis-Tris als Laufpuffer zeigte sich unabhängig vom pH-Wert generell eine niedrigere Restbindung. Auch bei diesem Pufferreagenz konnte durch Zugabe von Natriumchlorid eine zusätzliche Reduktion dieser bewirkt werden. Da im Gegensatz zu der vorherigen Optimierung des pH-Scoutings (vgl. Abbildung 38) der Verlauf der Anlagerung für pH = 4.5 und pH = 5.0 identisch war, wurden beide Bedingungen bei der Immobilisierung zur Durchführung der Affinitätsmessungen untersucht. Des Weiteren wurde dem Laufpuffer 150 mM Natriumchlorid hinzugefügt.

Die Immobilisierung erfolgte durch eine Amidkupplung. Im ersten Schritt wurde die Chipoberfläche durch Zugabe von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) unter Bildung von Aktivestern aktiviert. Diese NHS-Ester reagierten anschließend mit freien Aminen des Enzyms (*N*-Termini sowie Lysinseitenketten), sodass das Enzym kovalent an die Chipoberfläche gebunden wurde. Zuletzt wurden nach der chemischen Kupplung noch unbesetzte Bindungsstellen durch Zugabe von Ethanolamin blockiert (Abb. 41).

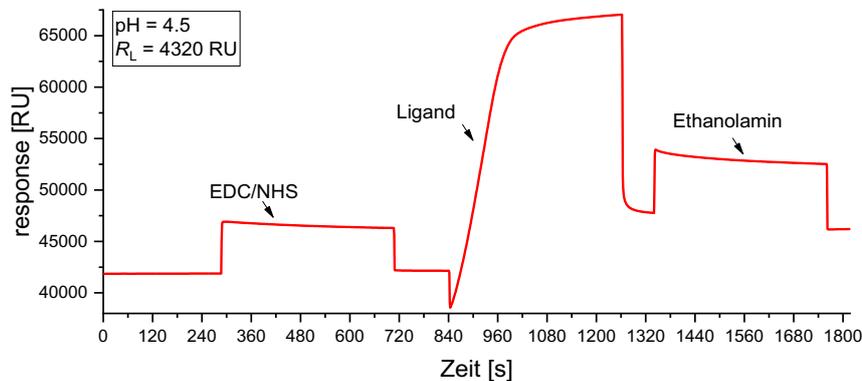


Abbildung 41: Immobilisierung von *E. coli* LpxC C63A auf einem CM7-Sensorchip. Dazu wurde das Enzym in einem Acetatpuffer (10 mM (pH = 4.5), 1 mM DTT, 0.1 mM ZnCl₂) gelöst. Nach Aktivierung der Chipoberfläche mithilfe von EDC/NHS erfolgte die Amidkupplung für 420 s. Zuletzt wurden unbesetzte Bindungsstellen durch Ethanolamin (50% in Laufpuffer) blockiert. Der Laufpuffer basierte auf Laufpuffer 1 unter Verwendung aller Optimierungen (40 mM MES (pH = 6.0), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM ZnCl₂, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100).

Das dabei erzielte Immobilisierungslevel (R_L) betrug 4320 RU. Allerdings zeigte sich, dass ein Großteil der elektrostatisch angelagerten Liganden (*E. coli* LpxC C63A-Enzyme) nicht chemisch gekuppelt wurde. Um die Kupplungseffizienz zu verbessern, wurde im nächsten Schritt zu einem leicht basischen Laufpuffer gewechselt (50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100). Die Immobilisierung erfolgte anschließend in zwei Flusszellen (FC, *flowcell*) parallel: für pH = 4.5 bei einer Kontaktzeit von 300 s und für pH = 5.0 bei einer Kontaktzeit von 420 s (Tab.11).

Tabelle 11: Optimierung der Immobilisierungsbedingungen von *E. coli* LpxC C63A auf einem CM7-Sensorchip zur Durchführung von SPR-Experimenten. Dazu wurde das Enzym in verschiedenen Acetatpuffern (10 mM (pH-Wert s. Tabelle), 1 mM DTT, 0.1 mM ZnCl₂) gelöst und über einen CM7-Sensorchip geleitet. Dabei wurden sowohl der pH-Wert des Acetatpuffers und die Kontaktzeit des Enzyms mit der Chipoberfläche als auch der Laufpuffer variiert. Alle Immobilisierungsexperimente wurden mithilfe einer Amidkupplung durchgeführt.

	Laufpuffer	pH-Wert des Acetatpuffers	Kontaktzeit [s]	Immobilisierungslevel [RU]
FC2	40 mM MES, pH = 6.0 150 mM NaCl 1 mM DTT 100 μM ZnCl ₂ 1% DMSO 0.05% Triton X-100	4.5	420	4320
FC3	50 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ pH = 7.5 150 mM NaCl	4.5	300	6443
FC4	1% DMSO 0.05% Triton X-100	5.0	420	9779

Trotz kürzerer Kontaktzeit (300 s) konnte bei pH = 4.5 (FC3) eine Erhöhung des Immobilisierungslevels um den Faktor 1.5 erzielt werden. Bei pH = 5.0 (FC4) konnte bei identischer Kontaktzeit (420 s) eine Verdopplung des Immobilisierungslevels erzielt werden.

Bei der anschließenden Optimierung der Bedingungen zur Durchführung der Affinitätsmessungen wurden in beiden Flusszellen parallel K_D -Werte bestimmt. Dadurch sollte ein potentieller Einfluss des pH-Wertes des Acetatpuffers, in dem das Enzym bei der Immobilisierung gelöst wurde, auf die Aktivität des Enzyms und somit auf den K_D -Wert überprüft werden. Zur Identifizierung geeigneter Assaybedingungen wurden exemplarisch drei LpxC-Inhibitoren ausgewählt. Dabei handelte es sich bei zwei Analyten, Phenylethylenglycolderivat **18** und Indol **19**, um Verbindungen, die bereits als Referenzsubstanzen bei der Etablierung des massenbasierten LpxC-Enzymassays verwendet wurden. Zusätzlich dazu wurde C-Furanosid **17** anstelle des *tight-binding inhibitors* CHIR-090 (**12**) ausgewählt, da bei **12** keine vollständige Dissoziation des Analyten gewährleistet werden konnte. Für jeden Analyten wurden zwei Konzentrationsbereiche getestet. Diese Konzentrationsbereiche orientierten sich an den mithilfe des Fluoreszenzassays bestimmten K_i -Werten (Tab. 12).

Tabelle 12: Übersicht der untersuchten Konzentrationsbereiche von 17, 18 und 19 bei den initialen Affinitätsmessungen mittels SPR. Für jeden Analyten wurden zwei Konzentrationsbereiche, die sich an den mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays bestimmten K_i -Werten orientierten, untersucht. Zusätzlich dazu wurde für jeden Analyten durch Anwendung von Gleichung 5 die maximal zu erwartende *response* pro Flusszelle berechnet.

	17	18	19
K_i-Wert	411 ± 121 nM	2.76 ± 0.71 µM	10.7 ± 1.2 nM
Konzentrationsbereich 1	78.1 nM – 10.0 µM	78.1 nM – 10.0 µM	781 pM – 100 nM
Konzentrationsbereich 2	781 nM – 100 µM	781 nM – 100 µM	7.81 nM – 1.00 µM
R_{max} berechnet FC3	83.3 RU	78.0 RU	105 RU
R_{max} berechnet FC4	126 RU	118 RU	159 RU

Zusätzlich dazu wurde für die Analyten die maximale *response* (R_{max}) in der jeweiligen Flusszelle berechnet. Diese ist abhängig vom Immobilisierungslevel, dem Molekulargewicht des Liganden und dem Molekulargewicht des Analyten (Gleichung 5).

$$R_{max} = R_L \cdot \frac{MW_{Analyt}}{MW_{Ligand}}$$

Gleichung 5: Berechnung der maximalen *response* eines SPR-Experimentes. Diese gibt die höchste zu erreichende *response* bei vollständiger Ligandsättigung an und gilt als Indikator für die Aktivität des immobilisierten Liganden. Dabei gilt: R_{max} = maximale *response*, R_L = Immobilisierungslevel, MW = Molekulargewicht.

Die maximale *response* gibt das höchstmögliche Signal bei einer unimolekularen Interaktion an. Dieses wird erreicht, wenn 100% der immobilisierten Liganden aktiv, frei zugänglich und durch einen Analyten besetzt sind.

Bei den ersten Affinitätsmessungen wurde der leicht basische Phosphatpuffer, der bereits bei der Immobilisierung verwendet wurde, als Laufpuffer genutzt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 180 s. Durch Verwendung einer seriellen 1:2-Verdünnung für die Analyten in je zwei Konzentrationsbereichen wurden vier Sensorgramme pro Analyt erhalten (Abb. 42–44).

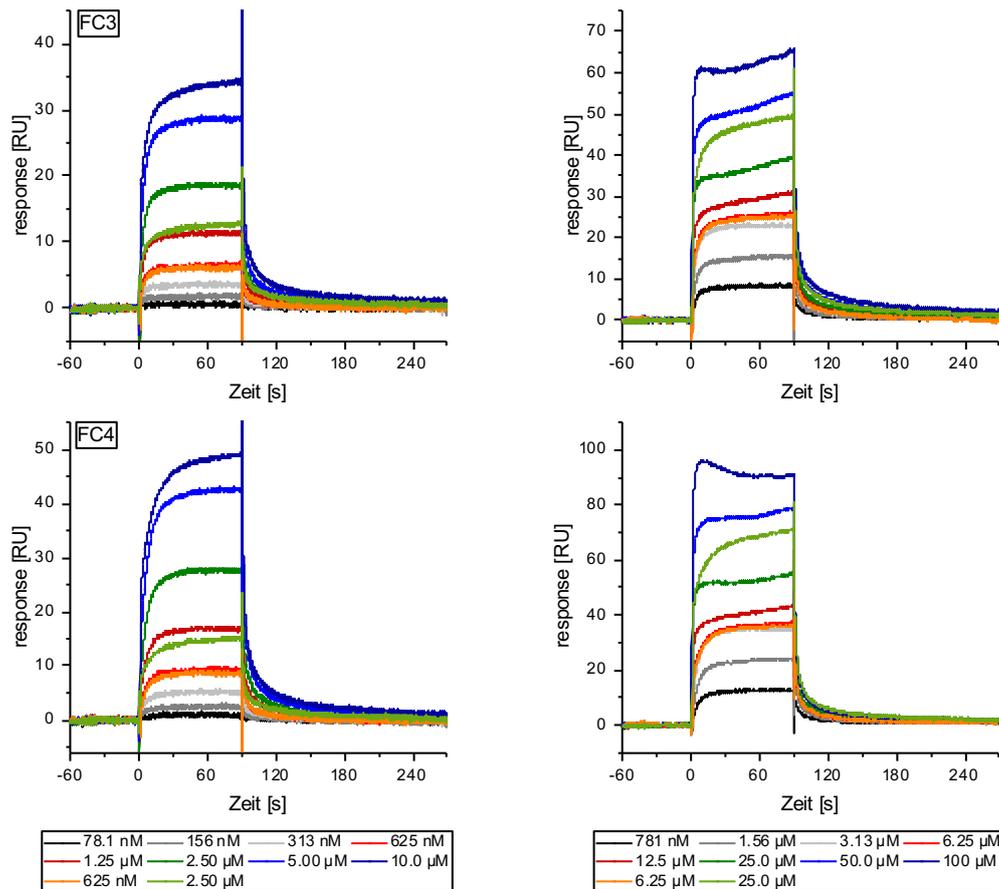


Abbildung 42: Sensorgramme der Affinitätsmessungen von 17 für *E. coli* LpxC C63A bei 20 °C und pH = 7.5 mittels SPR. Oben: Flusszelle 3 (Immobilisierung bei pH = 4.5), unten: Flusszelle 4 (Immobilisierung bei pH = 5.0). Links: niedriger Konzentrationsbereich ($c_{\max} = 10.0 \mu\text{M}$), rechts: hoher Konzentrationsbereich ($c_{\max} = 100 \mu\text{M}$). Ausgehend von der maximalen Analytkonzentration erfolgte jeweils eine serielle 1:2-Verdünnung des Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die Dauer der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde der leicht basische Phosphatpuffer (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100), der bereits bei der Immobilisierung genutzt wurde, verwendet.

Unabhängig von dem pH-Wert, bei dem der Ligand immobilisiert wurde, wurden für 17 zwei ähnliche Sensorgramme pro Konzentrationsbereich erhalten. Dabei war die *response* in FC4 etwas höher als in FC3. Dies war in Übereinstimmung mit dem in FC4 vorliegenden höheren Immobilisierungslevel. Während im hohen Konzentrationsbereich des Analyten die beiden doppelt getesteten Konzentrationen stärker voneinander abwichen, zeigte sich eine hohe Reproduzierbarkeit der Affinitätsmessungen im niedrigen Konzentrationsbereich. Für den niedrigen Konzentrationsbereich (78.1 nM – 10.0 μM) konnte außerdem eine konzentrationsabhängige Zunahme der Assoziationsgeschwindigkeit, gefolgt von der Einstellung eines Fließgleichgewichtes, beobachtet werden. Dabei wurde bei den beiden höchsten Analytkonzentrationen eine ähnliche *response* beobachtet. Dies sprach dafür, dass in dem getesteten Konzentrationsbereich bereits die maximale Sättigung des Liganden erreicht wurde. Auffällig war jedoch, dass bei der höchsten Analytkonzentration (10.0 μM) keine konstante maximale *response* erreicht wurde, sondern diese bis zum Ende der Assoziationsphase kontinuierlich anstieg.

Unter Verwendung des höheren Konzentrationsbereiches zeigte sich unerwarteterweise eine deutlich höhere maximale *response*. Des Weiteren wich hier die Form der Assoziationskurven von der Form der vorherigen ab. Bis zu einer Konzentration von 6.25 μM konnte eine schnelle Assoziation, gefolgt von einem anschließenden Fließgleichgewicht mit konstanter *response* beobachtet werden. Oberhalb dieser Konzentration konnte jedoch, analog zu der Maximalkonzentration des vorherigen Experimentes, keine

Sättigung beobachtet werden, sondern es zeigte sich ein langsamer, kontinuierlicher linearer Anstieg bis zum Ende der Assoziationsphase. Dies ließ eine unspezifische Interaktion mit dem Sensorchip oder dem Liganden vermuten.

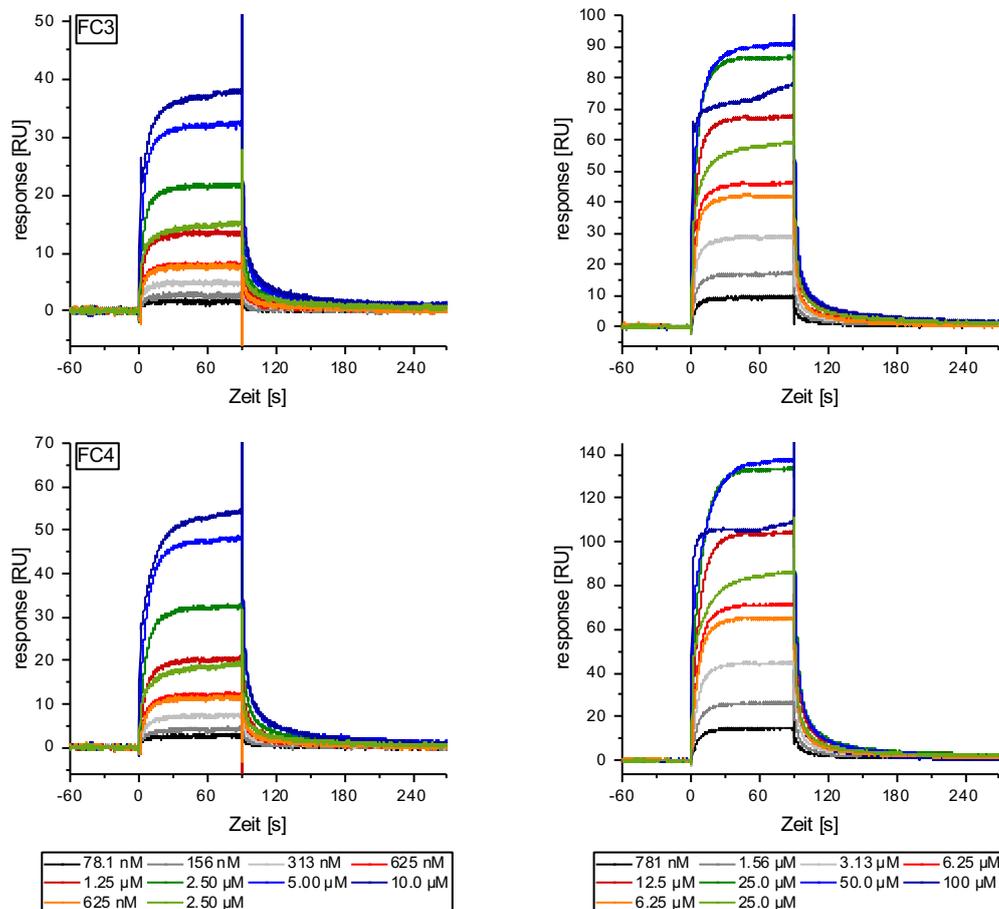


Abbildung 43: Sensorgramme der Affinitätsmessungen von 18 für *E. coli* LpxC C63A bei 20 °C und pH = 7.5 mittels SPR. Oben: Flusszelle 3 (Immobilisierung bei pH = 4.5), unten: Flusszelle 4 (Immobilisierung bei pH = 5.0). Links: niedriger Konzentrationsbereich ($c_{\max} = 10.0 \mu\text{M}$), rechts: hoher Konzentrationsbereich ($c_{\max} = 100 \mu\text{M}$). Ausgehend von der maximalen Analytkonzentration erfolgte jeweils eine serielle 1:2-Verdünnung des Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die Dauer der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde der leicht basische Phosphatpuffer (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100), der bereits bei der Immobilisierung genutzt wurde, verwendet.

Für 18 zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie für 17. Auch hier zeigte sich innerhalb eines Konzentrationsbereiches eine ähnliche Form der Sensorgramme, unabhängig von dem pH-Wert, bei dem der Ligand immobilisiert wurde. Die *response* war dabei ebenfalls in Einklang mit dem höheren Immobilisierungslevel in FC4. Im niedrigen Konzentrationsbereich zeigte sich eine hohe Reproduzierbarkeit der *response* für die Doppelbestimmung bei der niedrigeren Konzentration (625 nM). Bei der höheren Konzentration (2.50 μM) konnte hingegen ein Abfall der *response* in der Doppelbestimmung beobachtet werden. Die hier ermittelte entsprach ungefähr der *response*, die zuvor bei der halben Analytkonzentration beobachtet werden konnte. Des Weiteren zeigte sich analog zu 17 auch hier eine Sättigung der maximalen *response* bei den beiden höchsten Analytkonzentrationen (5.00 μM , 10.0 μM).

Im höheren Konzentrationsbereich hingegen zeigte sich zwar ebenfalls eine Sättigung der maximalen *response*, allerdings war diese *response* deutlich höher und wurde auch erst bei höheren Analytkonzentrationen erreicht, als das vorausgegangene Experiment vermuten ließ.

Auffällig war auch hier die Doppelbestimmung bei der höheren Analytkonzentration (25.0 μM). Analog zum niedrigen Konzentrationsbereich konnte auch hier ein Abfall der *response* beobachtet werden. Des Weiteren zeigte auch die maximale Analytkonzentration (100 μM) eine deutlich niedrigere *response*. Dies ließ sich einerseits mit einem konzentrationsabhängigen Ausfällen des Analyten **18** erklären. Im Gegensatz zu **17** zeigte sich jedoch keine lineare Zunahme der *response* bei höheren Analytkonzentrationen, sondern eine zweite Sättigungskonzentration. Dies war andererseits ein Hinweis auf eine spezifische Interaktion, möglicherweise mit einer zweiten Bindungsstelle. Ein weiterer Hinweis auf eine zweite Bindungsstelle war, dass die beobachtete maximale *response* höher war als zuvor für die vollständige Sättigung des Liganden bei einer unimolekularen Interaktion errechnet wurde.

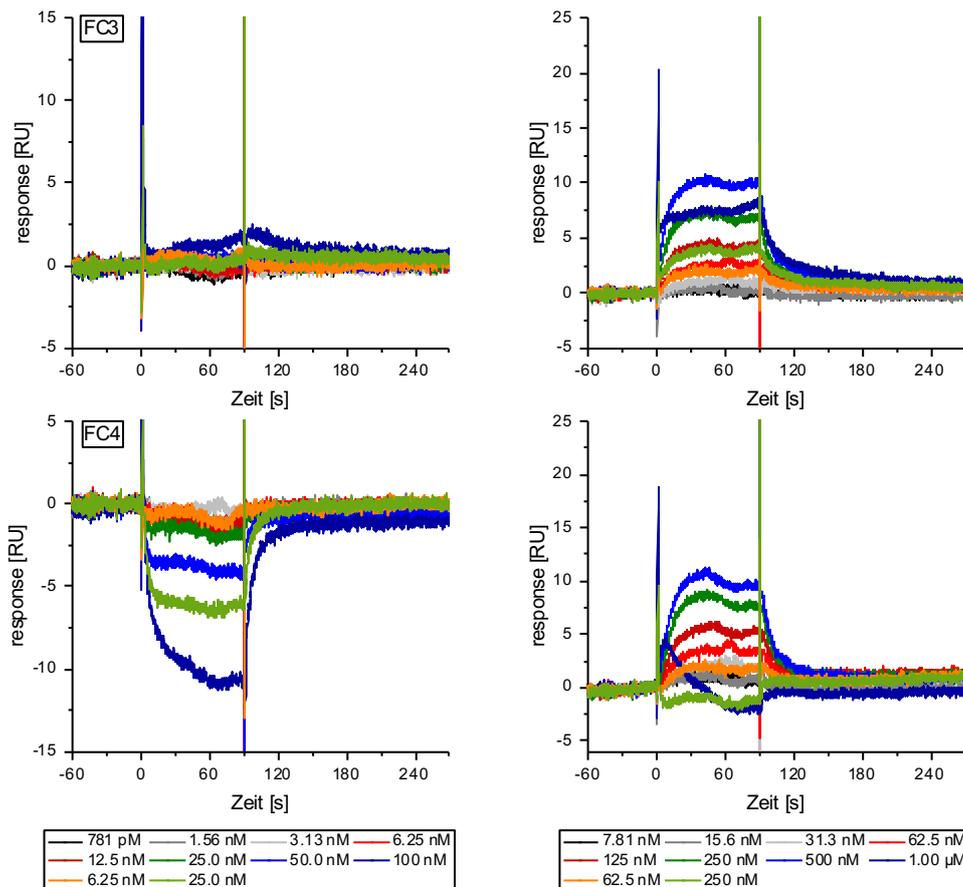


Abbildung 44: Sensorgramme der Affinitätsmessungen von **19 für *E. coli* LpxC C63A bei 20 °C und pH = 7.5 mittels SPR.** Oben: Flusszelle 3 (Immobilisierung bei pH = 4.5), unten: Flusszelle 4 (Immobilisierung bei pH = 5.0). Links: niedriger Konzentrationsbereich ($c_{\text{max}} = 100 \text{ nM}$), rechts: hoher Konzentrationsbereich ($c_{\text{max}} = 1.00 \mu\text{M}$). Ausgehend von der maximalen Analytkonzentration erfolgte jeweils eine serielle 1:2-Verdünnung der Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die Dauer der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde der leicht basische Phosphatpuffer (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100), der bereits bei der Immobilisierung genutzt wurde, verwendet.

Die Sensorgramme von **19** zeigten eine starke Abweichung zu denen der vorherigen Analyten. Am deutlichsten zeigt sich dieses zunächst in einer sehr niedrigen *response* für die einzelnen Analytkonzentrationen. Des Weiteren konnte hier ein Unterschied der Sensorgramme für die beiden Flusszellen beobachtet werden. Im niedrigen Konzentrationsbereich zeigte sich in FC3 eine positive Interaktion ($R_{\text{max}} = 4 \text{ RU}$), in FC4 hingegen eine negative Interaktion ($R_{\text{max}} = -8 \text{ RU}$). Diese maximale Differenz zur Referenzzelle konnte jeweils für die höchste Analytkonzentration beobachtet werden. Abgesehen davon zeigten sich jedoch konzentrationsunabhängige Schwankungen in der *response*,

welche auf das Ausbleiben einer spezifischen Interaktion mit dem Liganden in diesem Konzentrationsbereich schließen ließen.

Im höheren Konzentrationsbereich zeigte sich hingegen für beide Flusszellen eine maximale *response* von ca. 10 RU. Des Weiteren konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme der *response* beobachtet werden. Im Gegensatz zu **17** und **18** konnte dabei jedoch keine Sättigung erreicht werden. In Anbetracht der generell niedrigen *response* lag dies möglicherweise daran, dass der getestete Konzentrationsbereich zu niedrig gewählt war. Allerdings zeigte sich bei der höchsten Analytkonzentration (1.00 μM) in beiden Flusszellen eine niedrigere *response* als für die vorherigen Konzentrationen. Dies deutete möglicherweise auf ein konzentrationsabhängiges Ausfallen des Analyten hin.

Durch Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase (90 s) gegen die Analytkonzentration konnten mithilfe des OneSite-Binding-Modells K_D -Werte errechnet werden (Abb. 45, Tab. 13).

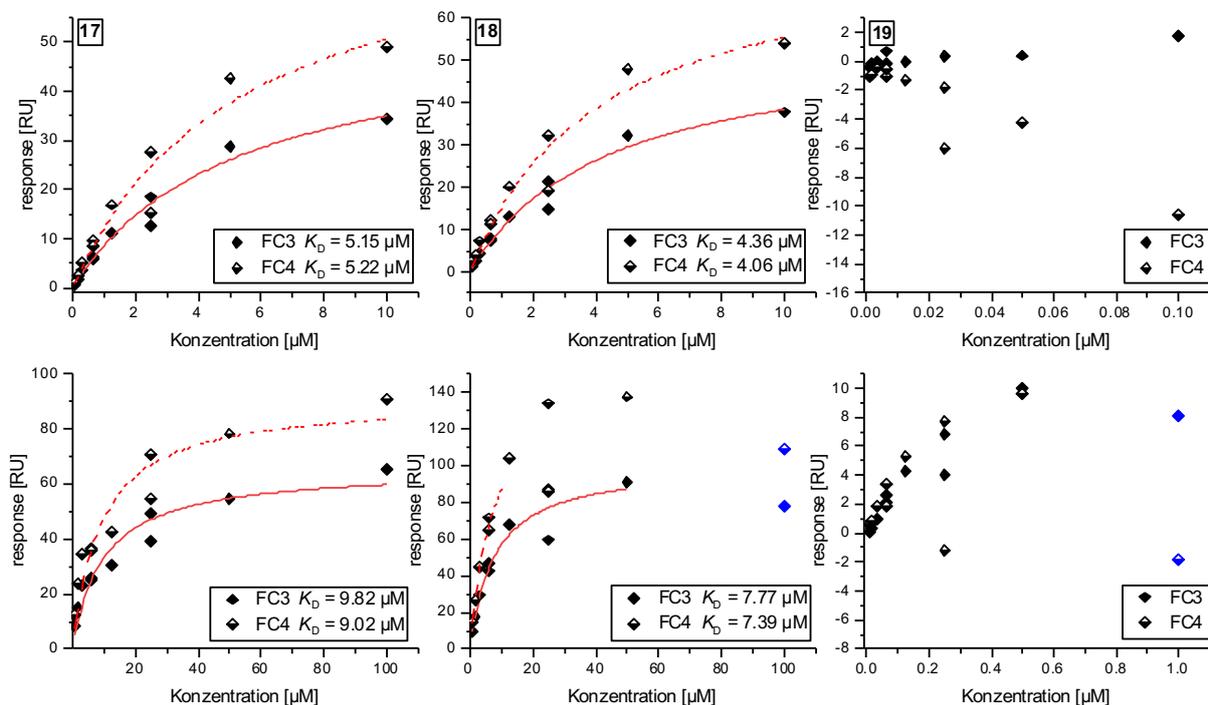


Abbildung 45: Analyse der Sensorgramme von **17**, **18** und **19** für *E. coli* LpxC C63A bei 20 °C und pH = 7.5 mittels SPR. Oben: niedriger Konzentrationsbereich, unten: hoher Konzentrationsbereich. Links: **17**, mitte: **18**, rechts: **19**. Dabei gilt: FC3 = Immobilisierung bei pH = 4.5, FC4 = Immobilisierung bei pH = 5.0. Ausgehend von der maximalen Analytkonzentration erfolgte jeweils eine serielle 1:2-Verdünnung des Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die Dauer der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde der leicht basische Phosphatpuffer (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100), der bereits bei der Immobilisierung genutzt wurde, verwendet. Nach Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die jeweilige Analytkonzentration wurden mithilfe des OneSite-Binding-Modells für **17** und **18** die K_D -Werte berechnet (blau = maskierte Werte).

Tabelle 13: Übersicht der K_D -Werte von 17, 18 und 19 für *E. coli* LpxC C63A bei 20 °C und pH = 7.5 mittels SPR. Durch Verwendung einer seriellen 1:2-Verdünnung für alle drei Analyten in zwei verschiedenen Konzentrationsbereichen wurde die Affinität bei jeweils vier verschiedenen Bedingungen ermittelt. Dabei gilt: FC3 = Immobilisierung bei pH = 4.5, FC4 = Immobilisierung bei pH = 5.0. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die Dauer der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde der leicht basische Phosphatpuffer (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100), der bereits bei der Immobilisierung genutzt wurde, verwendet. Die Berechnung der K_D -Werte erfolgte mithilfe des OneSite-Binding-Modells.

	K_D Konzentrationsbereich 1		K_D Konzentrationsbereich 2	
	FC3	FC4	FC3	FC4
17	5.15 μM	5.22 μM	9.82 μM	9.02 μM
18	4.36 μM	4.06 μM	7.77 μM	7.39 μM
19	-	-	-	-

Sowohl für **17** als auch für **18** konnte für alle untersuchten Bedingungen eine sigmoidale Bindungskurve detektiert sowie ein K_D -Wert berechnet werden. Dabei zeigten sich innerhalb einer Konzentrationsreihe sehr ähnliche Ergebnisse. Dies ließ darauf schließen, dass pH = 4.5 sowie pH = 5.0 gleichermaßen für die Immobilisierung geeignet waren. Bei einem Vergleich der beiden getesteten Konzentrationsbereiche lieferten die höheren Analytkonzentrationen auch höhere Dissoziationskonstanten. Dennoch lagen diese bei beiden Substanzen und auch für beide Substanzen in einer Größenordnung. Während die Analytkonzentrationen in den einzelnen Experimenten um den Faktor 10 voneinander abwichen, betrug die Abweichung der K_D -Werte weniger als Faktor 2.

Für **19** konnten hingegen keine Bindungskurven detektiert werden. Während im niedrigen Konzentrationsbereich keine Interaktion beobachtet werden konnte, zeigte sich im hohen Konzentrationsbereich zunächst eine lineare Zunahme der *response*, gefolgt von einem Abfall dieser bei der höchsten Analytkonzentration.

Aufgrund der negativen Interaktion von **19** in der Flusszelle 4 wurde im Folgenden der *volume exclusion effect* (VEE) mithilfe von verschiedenen DMSO-Konzentrationen überprüft. Der VEE beschreibt dabei die Beobachtung, dass bei dem Fehlen einer spezifischen Interaktion der Analyt scheinbar stärker an die Referenzzelle als an die aktive Zelle bindet. Dieses liegt daran, dass je nach Immobilisierungsdichte der Ligand ein unterschiedliches Volumen oberhalb der Chipoberfläche besetzt. Von besonderer Bedeutung ist dies, wenn der Laufpuffer Substanzen mit hohem Brechungsindex wie beispielsweise Glycerol oder DMSO enthält. Hier führen bereits geringe Unterschiede in der DMSO-Konzentration (0.1% ~ 100 RU) nahe der Chipoberfläche zu unterschiedlichen Signalen in der aktiven Zelle und der Referenzzelle.

Sobald in den SPR-Experimenten zur Bestimmung der Affinität eines Analyten, der in einem DMSO-haltigen Laufpuffer gelöst wurde, dieser in der Assoziationsphase über die Chipoberfläche geleitet wird, befindet sich in der aktiven Zelle aufgrund der immobilisierten Liganden weniger DMSO nahe der Chipoberfläche als in der Referenzzelle. Dies führt somit auch ohne spezifische Interaktion zu einem unterschiedlichen Signal. Um den VEE in Abhängigkeit von dem Immobilisierungslevel zu überprüfen, wurde zeitgleich Enzym in zwei Flusszellen immobilisiert. Das Immobilisierungslevel in FC2 betrug dabei ca. 3000 RU, das Immobilisierungslevel in FC3 ca. 9000 RU. Anschließend wurde eine serielle 1:2-Verdünnung einer 2%igen DMSO-Lösung mit dem Laufpuffer (1% DMSO) erstellt und über die Chipoberfläche geleitet (Abb. 46).

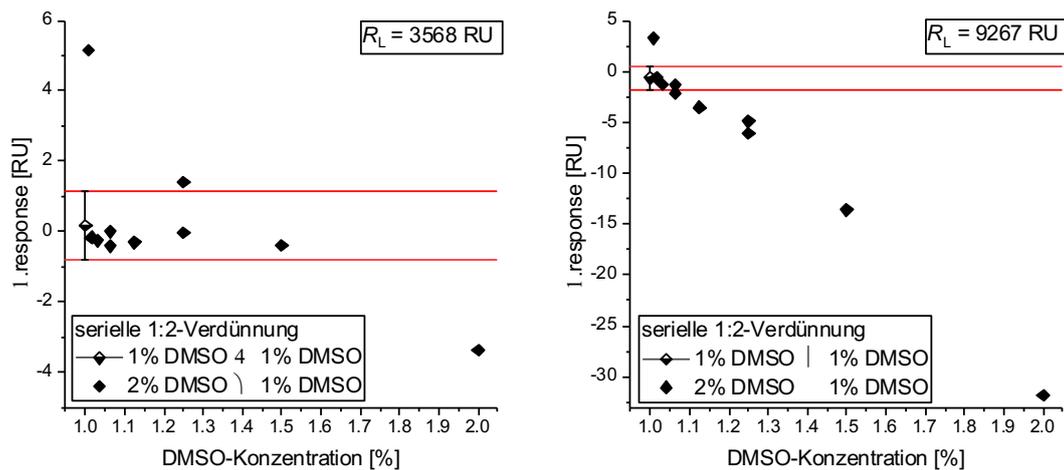


Abbildung 46: Überprüfung des *volume exclusion effects* (VEE) in SPR-Experimenten in Abhängigkeit von dem Immobilisierungslevel. Der VEE beschreibt dabei das Auftreten eines unterschiedlichen Signals in der aktiven Zelle und der Referenzzelle ohne spezifische Interaktion zwischen dem Analyten und dem Liganden. Zur Überprüfung dessen wurde zunächst in zwei verschiedenen Flusszellen eine unterschiedliche Menge an Ligand immobilisiert. Anschließend wurde jeweils eine 1%ige DMSO-Lösung mit sich selber „verdünnt“ und die Standardabweichung des gemessenen Signals ermittelt. Zusätzlich dazu wurde eine 2%ige DMSO-Lösung in einer seriellen 1:2-Verdünnungsreihe mit einer 1%igen DMSO-Lösung verdünnt und der Unterschied des gemessenen Signals zwischen aktiver Zelle und Referenzzelle in Abhängigkeit von der DMSO-Konzentration aufgetragen.

Bei einem niedrigen Immobilisierungslevel zeigte sich trotz des hohen Unterschiedes in der DMSO-Konzentration nur eine geringe Differenz zwischen dem Signal in der aktiven Zelle und der Referenzzelle. Während eine 1%ige DMSO-Lösung ein Signal mit einer Standardabweichung von ± 1 RU lieferte, lieferte eine 2%ige DMSO-Lösung ein Signal, das um -2 RU von diesem Bereich abwich. Eine 1:2-Verdünnung mit dem Laufpuffer (eine 1%ige DMSO-Lösung) lieferte eine 1.5%ige DMSO-Lösung. Bereits diese einfache Verdünnung führte zu einem Signal, das innerhalb der Standardabweichung einer 1%igen Lösung lag.

Bei einem hohen Immobilisierungslevel zeigte sich hingegen ein deutlicher Unterschied zwischen dem Signal in der aktiven und der Referenzzelle. Auch hier lieferte die 1%ige DMSO-Lösung ein Signal mit einer Standardabweichung von ± 1 RU. Die 2%ige DMSO-Lösung lieferte hingegen ein Signal, das um -30 RU von diesem Bereich abwich. Eine Erhöhung der Belegungsdichte um den Faktor 3 lieferte somit eine Erhöhung des VEE um den Faktor 10.

Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Analytkonzentration, die durch 1:100-Verdünnung aus dem DMSO-Stock mit DMSO-freiem Laufpuffer zubereitet wurde, nicht als höchste Analytkonzentration verwendet. Stattdessen wurde diese Probe ein weiteres Mal 1:10 mit dem Laufpuffer (1% DMSO) verdünnt. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass das Immobilisierungslevel 10 000 RU nicht überstieg. Dies stellte sicher, dass auch bei der höchsten Analytkonzentration die *response* nicht durch den VEE beeinflusst wurde.

Anschließend erfolgte eine Wiederholung der Affinitätsmessungen mit einem anderen Laufpuffer (50 mM MES (pH = 6.0), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100). Dieser Laufpuffer enthielt dieselben Additive wie der vorherige Laufpuffer, entsprach allerdings dem pH-Optimum von *E. coli* LpxC C63A. Dabei wurden die identischen Konzentrationsbereiche für **17** und **18** verwendet, **19** wurde um den Faktor 10 höher konzentriert (Abb. 47).

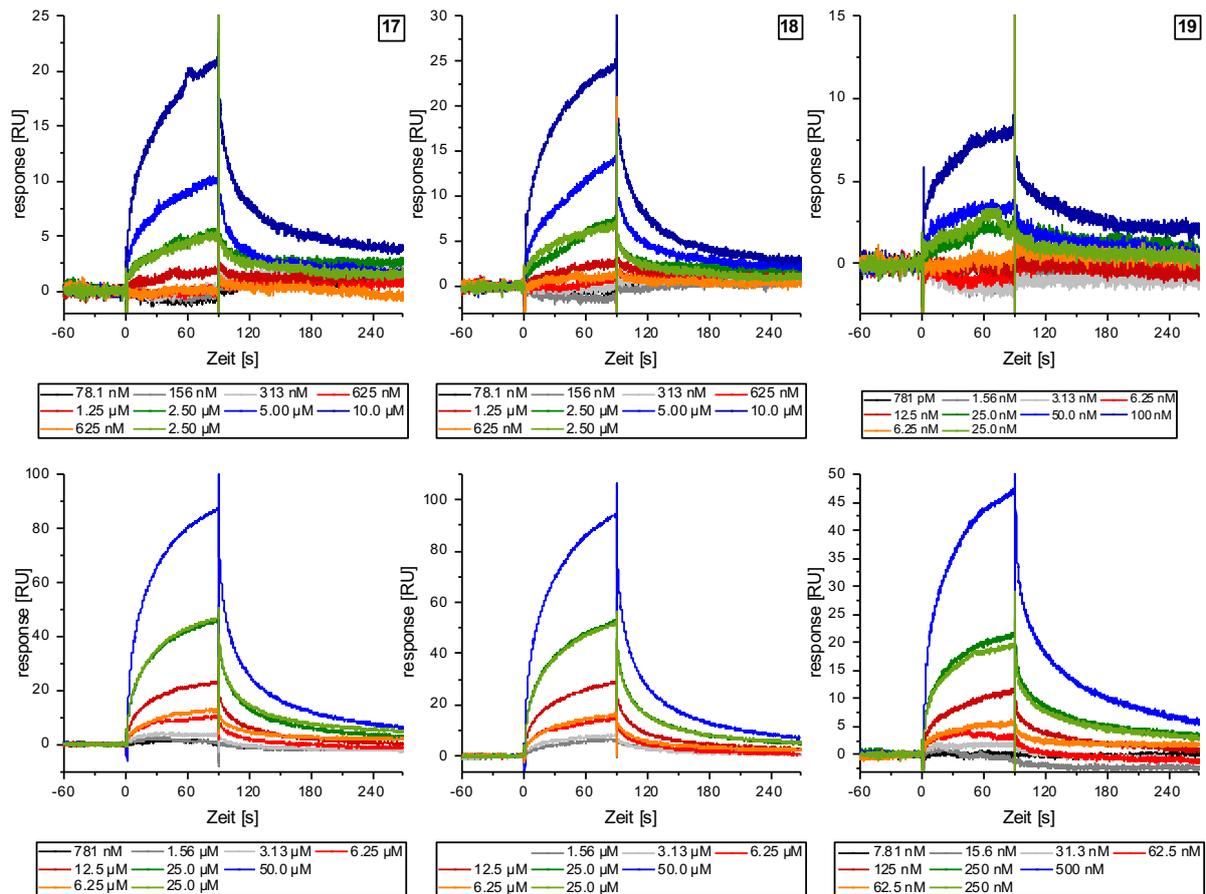


Abbildung 47: Sensorgramme der Affinitätsmessungen von 17, 18 und 19 für *E. coli* LpxC C63A bei 20 °C und pH = 6.0 mittels SPR. Die Bestimmung der Affinität erfolgte für das in FC4 immobilisierte Enzym (pH = 5.0). Alle Analyten wurden in zwei verschiedenen Konzentrationsbereichen untersucht. Oben: niedriger Konzentrationsbereich, unten: hoher Konzentrationsbereich. Links: 17, mitte: 18, rechts: 19. Ausgehend von der maximalen Analytkonzentration erfolgte jeweils eine serielle 1:2-Verdünnung des Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die Dauer der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde ein leicht saurer MES-Puffer (50 mM MES (pH = 6.0), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100), der dem pH-Optimum von *E. coli* LpxC C63A entsprach und der dieselben Additive wie der vorherige Laufpuffer enthielt, verwendet.

Analog zum vorherigen Experiment konnte für alle drei Analyten im höheren Konzentrationsbereich eine höhere *response* beobachtet werden. Des Weiteren zeigten auch hier 17 und 18, unabhängig vom Konzentrationsbereich des Analyten, grundsätzlich eine höhere *response* als 19. Im Gegensatz zu dem vorherigen Experiment zeigte sich jedoch für alle Analyten ein konstanter Anstieg der *response* mit steigender Analytkonzentration. Eine Sättigung der Liganden konnte nicht beobachtet werden. Zur Bewertung der *response*-Zunahme wurde anschließend die *response* am Ende der Assoziationsphase (90 s) gegen die Analytkonzentration aufgetragen (Abb. 48).

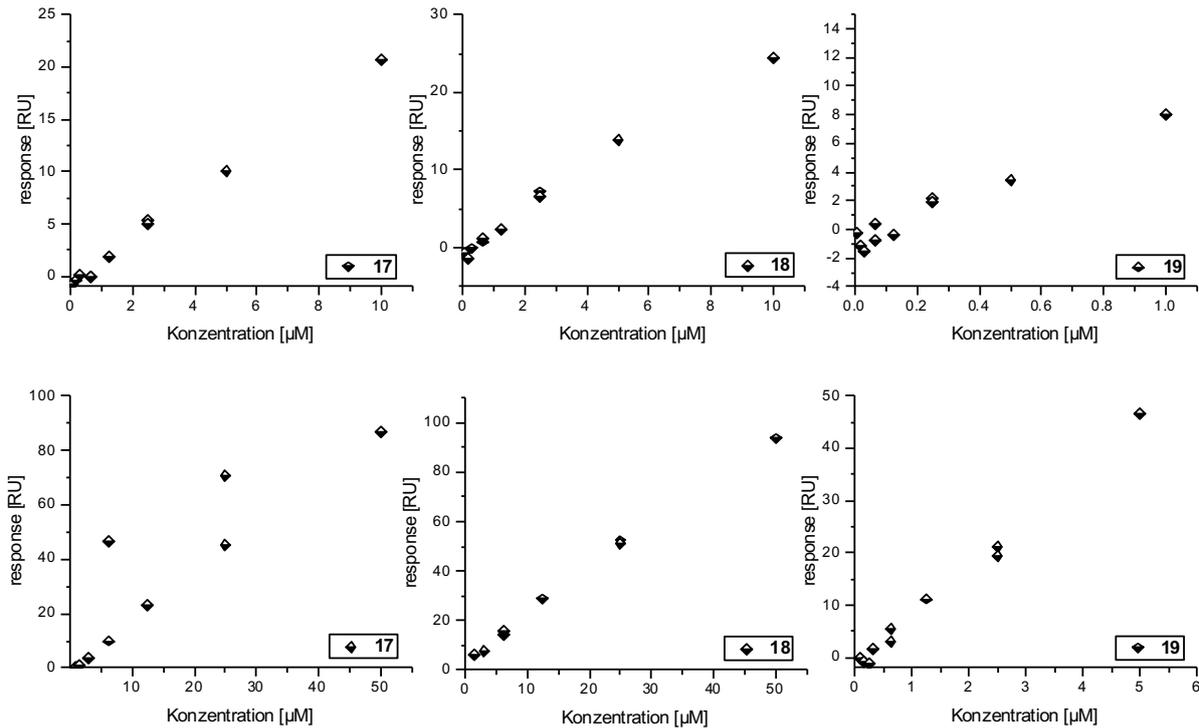


Abbildung 48: Analyse der Sensorgramme von 17, 18 und 19 für *E. coli* LpxC C63A bei 20 °C und pH = 6.0 mittels SPR. Die Bestimmung der Affinität erfolgte für das in FC4 immobilisierte Enzym (pH = 5.0). Alle Analyten wurden in zwei verschiedenen Konzentrationsbereichen untersucht. Oben: niedriger Konzentrationsbereich, unten: hoher Konzentrationsbereich. Links: 17, mitte: 18, rechts: 19. Ausgehend von der maximalen Analytkonzentration erfolgte jeweils eine serielle 1:2-Verdünnung des Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die Dauer der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde ein leicht saurer MES-Puffer (50 mM MES (pH = 6.0), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100), der dem pH-Optimum von *E. coli* LpxC C63A entsprach und der dieselben Additive wie der vorherige Laufpuffer enthielt, verwendet. Nach Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration konnten keine K_D -Werte der Substanzen mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechnet werden.

Für alle drei Analyten zeigte sich eine konzentrationsabhängige lineare Zunahme der *response*. Aus diesem Grund konnte keine Bestimmung des K_D -Wertes mithilfe des OneSite-Binding-Modells erfolgen. Da sich die Bedingungen dieses Experimentes für 17 und 18 lediglich im pH-Wert von denen des vorherigen unterschieden, erfolgte als drittes eine Untersuchung der pH-Abhängigkeit für diese beiden Analyten. Dabei wurden zwei weitere Phosphatpuffer (pH = 6.5, 7.0) verwendet. Des Weiteren wurde anstelle der beiden Konzentrationsbereiche lediglich eine serielle 1:3-Verdünnung erstellt, die den gesamten vorherigen Bereich abdeckte (Abb. 49).

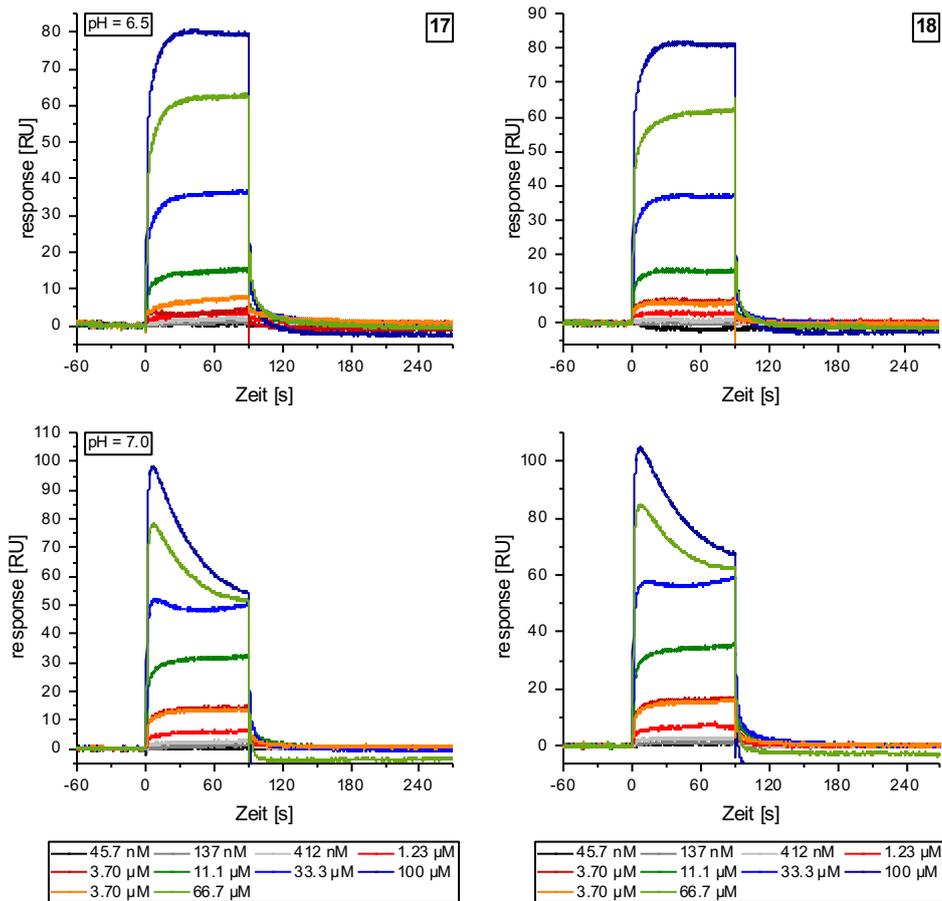


Abbildung 49: Sensorgramme der pH-abhängigen Affinitätsmessungen von 17 und 18 für *E. coli* LpxC C63A mittels SPR. Oben: pH = 6.5, unten: pH = 7.0. Links: 17, rechts: 18. Ausgehend von der maximalen Analytkonzentration (100 μM) erfolgte jeweils eine serielle 1:3-Verdünnung des Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine 2:3-Verdünnung der höchsten Analytkonzentration sowie eine Doppelbestimmung der 1:27-Verdünnung erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die Dauer der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde ein Phosphatpuffer (50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH = 6.5 bzw. 7.0), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100) verwendet.

Wie zuvor zeigten sich auch hier bei identischen Bedingungen für beide Analyten prinzipiell ähnliche Sensorgramme. Bezogen auf den pH-Wert des Laufpuffers zeigten sich jedoch erneut große Unterschiede. Während es bei pH = 6.5 analog zu dem Experiment bei pH = 6.0 eine konstante Zunahme der *response* bei steigender Analytkonzentration gab, wurde für pH = 7.0 analog zu dem Experiment bei pH = 7.5 eine Sättigungskonzentration erreicht. Zur Bestimmung des K_D -Wertes wurde anschließend die *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration aufgetragen (Abb. 50).

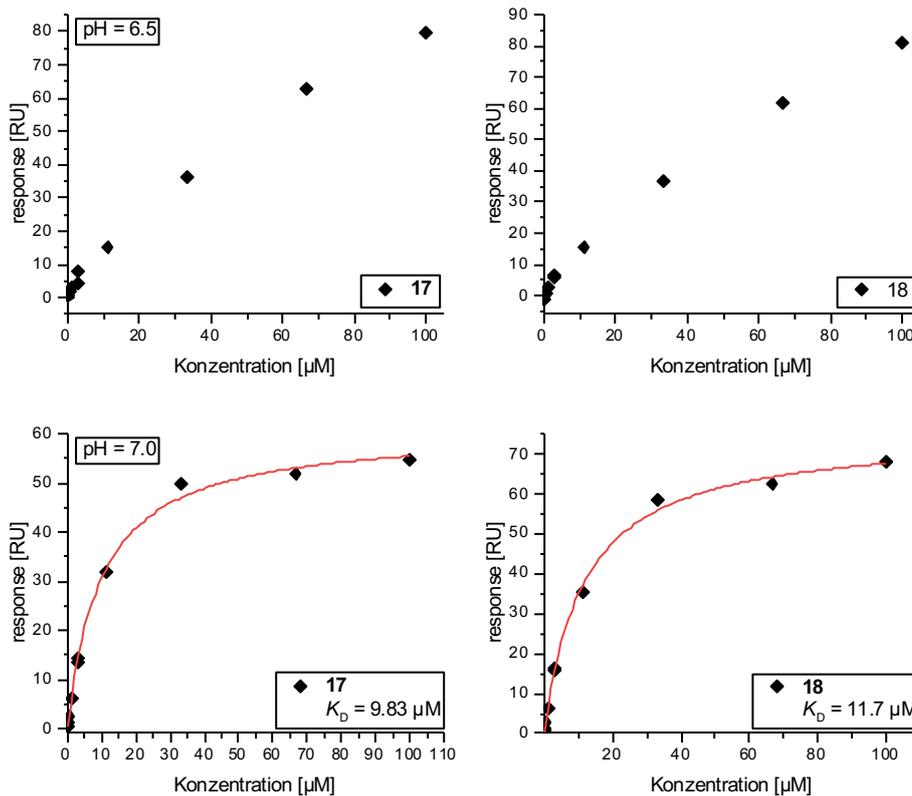


Abbildung 50: Analyse der Sensorgramme von 17 und 18 für *E. coli* LpxC C63A in Abhängigkeit vom pH-Wert mittels SPR. Oben: pH = 6.5, unten: pH = 7.0. Links: 17, rechts: 18. Ausgehend von der maximalen Analytkonzentration (100 µM) erfolgte jeweils eine serielle 1:3-Verdünnung des Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine 2:3-Verdünnung der höchsten Analytkonzentration sowie eine Doppelbestimmung der 1:27-Verdünnung erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die Dauer der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde ein Phosphatpuffer (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH = 6.5 bzw. 7.0), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100) verwendet. Nach Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die jeweilige Analytkonzentration konnten mithilfe des OneSite-Binding-Modells K_D -Werte für 17 und 18 bei pH = 7.0 berechnet werden.

Wie bereits die Sensorgramme vermuten ließen, zeigte sich bei pH = 6.5 für beide Analyten eine lineare Zunahme der *response*. Wie zuvor für pH = 6.0 konnte unter diesen Bedingungen kein K_D -Wert berechnet werden. Für pH = 7.0 hingegen zeigte sich eine Sättigungskurve. Die mithilfe des OneSite-Binding-Modells bestimmten K_D -Werte lagen für 17 ($K_D = 9.83 \mu\text{M}$) und 18 ($K_D = 11.7 \mu\text{M}$) in einer Größenordnung.

Für die Bestimmung der finalen Assaybedingungen wurden anschließend die K_D -Werte von 17 und 18 in Abhängigkeit von dem pH-Wert des Laufpuffers verglichen (Tab. 14).

Tabelle 14: Vergleich der K_D -Werte von 17 und 18 in Abhängigkeit von dem pH-Wert des Laufpuffers. Die Durchführung der SPR-Experimente erfolgte für beide Analyten bei vier verschiedenen pH-Werten (pH = 6.0, 6.5, 7.0, 7.5). Die Bestimmung der Affinität erfolgte jeweils ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 100 µM.

Substanz	K_D -Wert [µM]			
	pH = 6.0	6.5	7.0	7.5
17	-	-	9.83	9.02
18	-	-	11.7	7.39

Trotz ihrer Nähe zum pH-Optimum erwiesen sich die beiden Laufpuffer mit pH = 6.0 sowie pH = 6.5 als ungeeignet für die SPR-Messungen. Dies lag vermutlich daran, dass die unspezifische Interaktion des Analyten mit dem Sensorchip höher als die spezifische Interaktion mit dem Liganden war. Die

Laufpuffer mit pH = 7.0 sowie pH = 7.5 lieferten hingegen ähnliche K_D -Werte und schienen gleichermaßen geeignet für die Affinitätsmessungen.

Für die routinemäßige Messung wurden im Folgenden alle Experimente bei pH = 7.5 durchgeführt. Dies ist zwar weiter vom pH-Optimum von *E. coli* LpxC C63A entfernt, bot jedoch die Möglichkeit, die Immobilisierung sowie die Affinitätsmessungen mit demselben Laufpuffer durchzuführen.

5.1.5 Struktur-Wirkungsbeziehungen von LpxC-Inhibitoren

Zur Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen in Bezug auf die inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A wurden potentielle LpxC-Inhibitoren standardmäßig mithilfe des fluoreszenz-basierten LpxC-Enzymassays untersucht. War dieser aufgrund zuvor diskutierter Ausschlusskriterien nicht anwendbar, wurde in Einzelfällen der LC-MS/MS-basierte LpxC-Enzymassay verwendet. Des Weiteren wurden die antibakteriellen Eigenschaften dieser Verbindungen gegen *E. coli* BL21(DE3) (*lpxc*⁺), einen Expressionsstamm, der im Folgenden als Wildtyp bezeichnet wird, sowie *E. coli* D22 (*lpxc101*), einer Mutante mit erniedrigter LpxC-Aktivität, bestimmt. Hierfür wurden Agardiffusionstests durchgeführt, sowie die minimalen Hemmkonzentrationen dieser Verbindungen bestimmt.

Die Entwicklung potentieller LpxC-Inhibitoren im Arbeitskreis Holl erfolgte ausgehend von der literaturbekannten *N*-Aroyl-L-threoninhydroxamsäure CHIR-090 (**12**) (Abb. 51, Tab. 15).

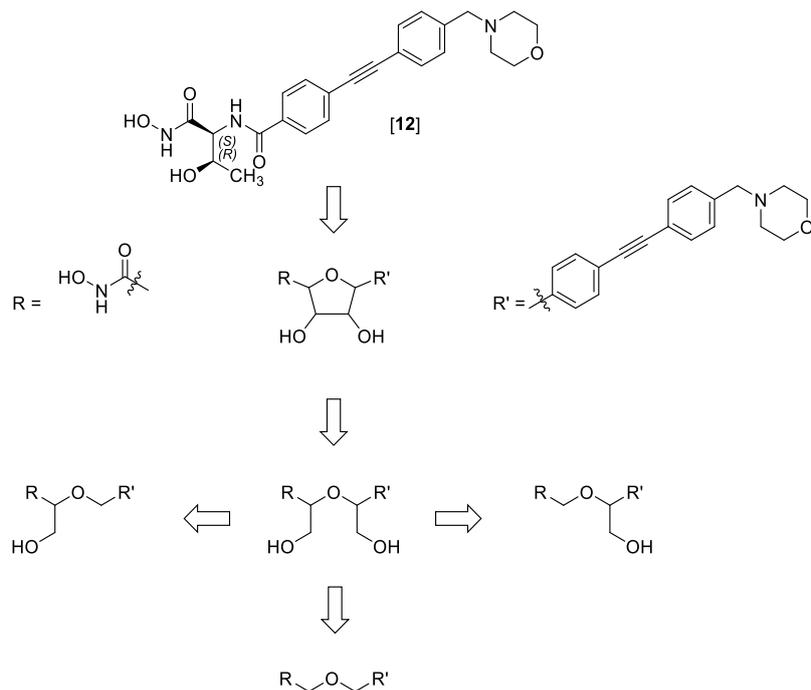
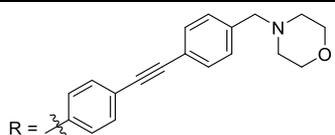
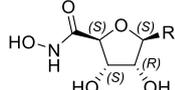
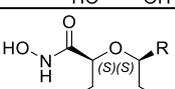
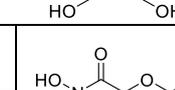
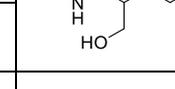
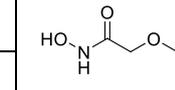
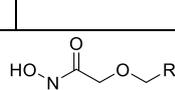
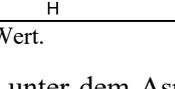


Abbildung 51: Übersicht über die Entwicklung im Arbeitskreis Holl hergestellter LpxC-Inhibitoren. Ausgehend von der *N*-Aroyl-L-threoninhydroxamsäure CHIR-090 (**12**) erfolgte zunächst die Verknüpfung der pharmakophoren Elemente der LpxC-Inhibitoren über ein C-furanosidisches Grundgerüst. Anschließend erfolgte die Spaltung des Tetrahydrofuranrings, gefolgt von der systematischen, schrittweisen Entfernung der Hydroxymethylgruppen.

Tabelle 15: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten bereits publizierter LpxC-Inhibitoren. Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten erfolgte mithilfe von Agardiffusionstests und MHK-Experimenten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) (*lpxC*⁺) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 (*lpxC101*). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays. Aufgrund der Neubestimmung des K_M -Wertes im Rahmen dieser Arbeit erfolgte für alle Substanzen eine Neuberechnung des K_i -Wertes auf Basis der in der Literatur angegebenen IC_{50} -Werte.

 R = 		Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		K_i [μM]
		<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A
	Konfig. R					
17 [83]		22.3 ± 1.4	28.3 ± 1.4	8	0.5	0.411 ± 0.121
25 [83,84]		9.0 ± 0.5	20.8 ± 0.6	>64	2	0.33 ± 0.07
26 [85]	(S) 	15.7 ± 0.6	25.8 ± 1.9	32	1	0.356 ± 0.07
<i>ent</i> - 26 [85]	(R) 	12.3 ± 0.6	22.0 ± 1.3	64	2	0.210 ± 0.040
18 [85,86]	(S) 	20.5 ± 0.7*	>30*	32	0.25	2.76 ± 0.71*
<i>ent</i> - 18 [85,86]	(R) 	8.7 ± 0.7	12.3 ± 1.6	>64	2	25.1 ± 1.6
27 [85,86]		16.5 ± 0.4	20.3 ± 1.0	32	0.5	1.33 ± 0.32

*selbst bestimmter Wert.

Zunächst wurde unter dem Aspekt der konformativen Restriktion ein furanosidisches C-Glycosid als Linkerelement zwischen dem Hydroxamsäuremotiv, das die zinkbindende Funktion darstellt, sowie der Diphenylacetyleneinheit, die den hydrophoben Tunnel adressiert, eingefügt. Anschließend erfolgte ausgehend von dem aktivsten C-Glycosid **17**, welches sowohl in α -Position zur Hydroxamsäurefunktion als auch in Benzylposition (*S*)-Konfiguration aufweist, eine Spaltung des Tetrahydrofuranrings. Dies führte unter Beibehaltung der Stereochemie in den genannten Positionen zu dem offenkettigen Diol **25**. Diese Spaltung erniedrigte zwar die antibakterielle Aktivität der Verbindung, hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die inhibitorische Potenz gegenüber dem Target *E. coli* LpxC C63A. Weitere Dekonstruktion von **25** lieferte die Glycerinsäure-basierten Hydroxamsäuren **26** und *ent*-**26**, bei denen die Hydroxymethylgruppe in Benzylposition entfernt wurde. Unabhängig von der Stereochemie wiesen beide Enantiomere eine ähnliche inhibitorische Aktivität wie das (*S,S*)-konfigurierte Diol **25** auf. Verglichen mit dem Diol **25** bewirkte die Entfernung der Hydroxymethylgruppe jedoch eine Erhöhung der antibakteriellen Aktivität. Ebenfalls durch Dekonstruktion von **25** wurden die Phenylethylglycol-basierten Hydroxamsäuren **18** und *ent*-**18**, bei denen die Hydroxymethylgruppe in α -Position entfernt wurde, erhalten. Dies führte vor allem zu einer deutlichen Reduktion der inhibitorischen Aktivität. Dabei zeigten die Phenylethylglycol-basierten Enantiomere **18** und *ent*-**18** im Gegensatz zu den Glycerinsäure-basierten Enantiomeren **26** und *ent*-**26** ein hohes eudismisches Verhältnis. Während die Entfernung der Hydroxymethylgruppe von **25**, die zum (*S*)-konfigurierten Enantiomer **18** führte, einen Verlust der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 10 bedeutete, bewirkte die Inversion der Konfiguration, die zum (*R*)-konfigurierten Enantiomer *ent*-**18** führte, einen weiteren Aktivitätsverlust um den Faktor 10.

Die Entfernung beider Hydroxymethylgruppen führte zu **27**. Verglichen mit der Leitstruktur **25** bewirkte dies eine leichte Erhöhung der antibakteriellen Aktivität. Diese ging jedoch gleichzeitig mit einer Erniedrigung der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 10 einher. Dies deutete darauf hin, dass ein Substituent in α -Position des Hydroxamsäuremotivs essentiell für inhibitorische Aktivität gegenüber dem Target *E. coli* LpxC C63A ist. Im Gegensatz dazu schien ein Substituent in Benzylposition nicht notwendig für die inhibitorische Aktivität zu sein. Das Vorhandensein eines Substituenten in Benzylposition mit (*R*)-Konfiguration wirkte sich stattdessen sogar negativ auf die inhibitorische Aktivität aus.

Die Weiterentwicklung neuer LpxC-Inhibitoren gliederte sich in zwei verschiedene Bereiche. Zum einen wurden mittels *Molecular Modelling* neue Leitstrukturen mit alternativer zinkbindender Gruppe erhalten. Diese umfassten sowohl Peptidderivate von CHIR-090 (**12**) als auch Morpholinderivate auf Basis von **27**. Zum anderen wurde, basierend auf den bisherigen LpxC-Inhibitoren aus dem Arbeitskreis, eine Variation des zentralen Bausteins sowie eine systematische Untersuchung von Substituenten, die die UDP-bindende Tasche adressieren sollten, vorgenommen (Abb. 52).

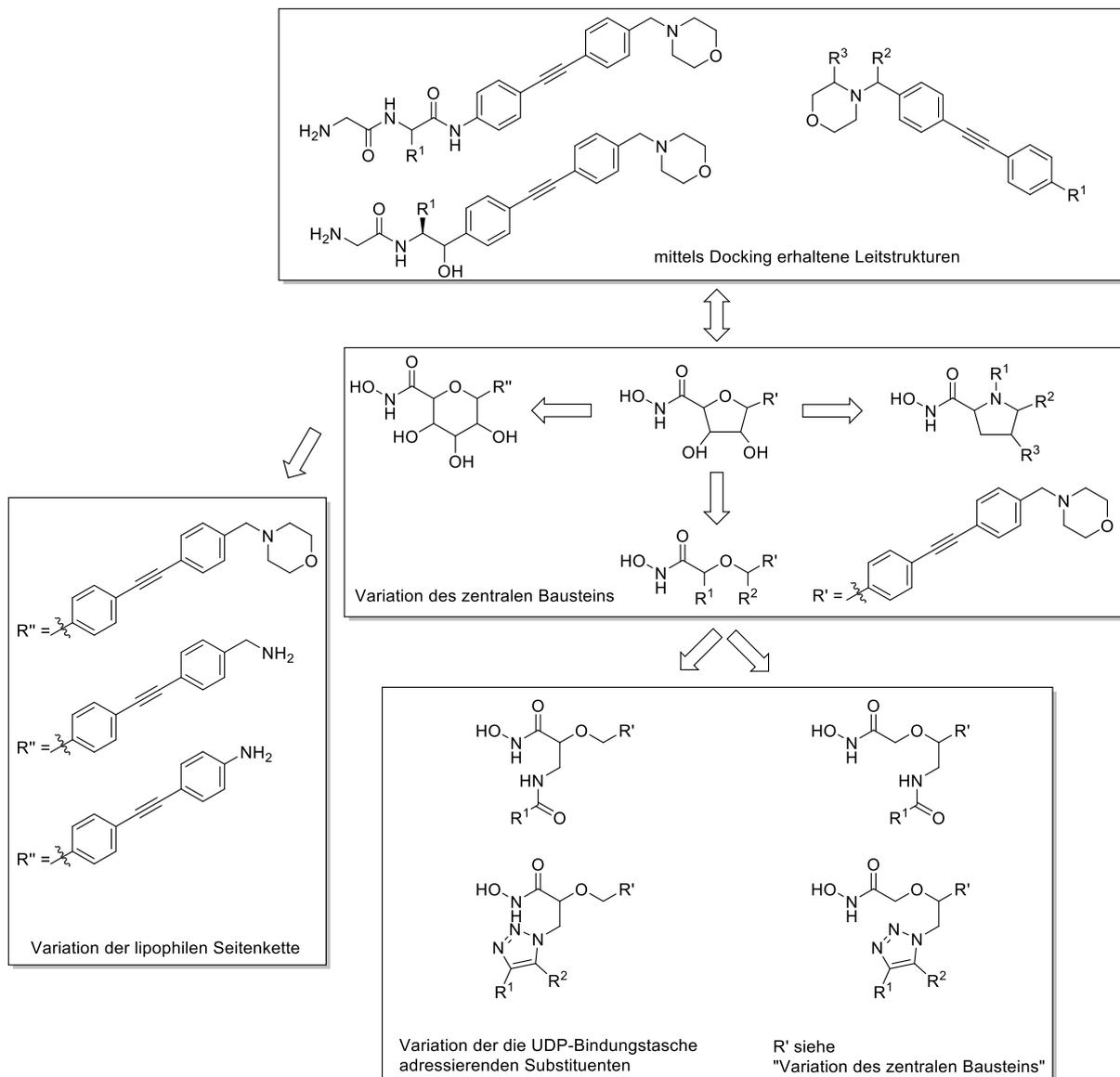
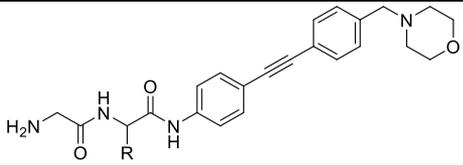
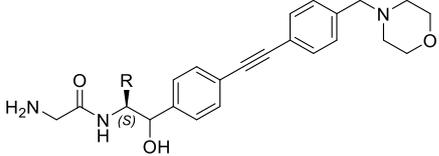


Abbildung 52: Übersicht über die Entwicklung neuer LpxC-Inhibitoren. Diese umfassen auf der einen Seite Peptidderivate und Morpholinderivate, die durch *Molecular Modelling* als Leitstrukturen identifiziert wurden. Auf der anderen Seite wurde, basierend auf C-Furanosid **17**, sowohl eine Variation des zentralen Bausteins als auch eine systematische Untersuchung verschiedener Substituenten zur Adressierung der UDP-bindenden Tasche vorgenommen.

Bei den ersten mittels *Molecular Modelling* erhaltenen neuen Strukturen handelte es sich um Peptid-derivate. Diese zeichnen sich durch ein zum Hydroxamsäuremotiv alternatives zinkbindendes Motiv aus, das sich aus der Aminofunktion des Glycins und seiner Carbonylgruppe zusammensetzt (Tab. 16).

Tabelle 16: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Peptidderivaten. Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten erfolgte mithilfe von Agardiffusionstests und MHK-Experimenten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) (*lpxC*⁺) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 (*lpxC101*). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays.

			Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		K_i [μM]
			<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A
	Konfig.	R					
28	(S)		≤ 6	≤ 6	> 64	> 64	> 29.6
29	(S)		≤ 6	≤ 6	> 64	> 64	> 29.6
30	-	H	≤ 6	9.3 ± 1.0	> 64	> 64	> 29.6
31	(S)	CH ₃	≤ 6	≤ 6	> 64	> 64	> 29.6
<i>ent</i> - 31	(R)		≤ 6	≤ 6	> 64	> 64	> 29.6
32	(S)		7.7 ± 0.6	9.0 ± 1.0	64	64	> 29.6
<i>ent</i> - 32	(R)		8.0 ± 1.0	8.0 ± 1.0	64	64	> 29.6
			Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		K_i [μM]
			<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A
33		H	≤ 6	9.0 ± 1.0	> 64	> 64	> 29.6
34		CH ₃	7.0 ± 1.2	17.5 ± 1.3	> 64	16	22.2 ± 15.0

Von allen untersuchten Dipeptid-Inhibitoren wies keiner inhibitorische Aktivität gegenüber *E. coli* LpxC C63A auf. Lediglich das verkürzte Peptidomimetikum **34** ($K_i = 22.2 \mu\text{M}$) zeigte eine Inhibition von *E. coli* LpxC C63A am oberen Ende des untersuchten Konzentrationsbereiches.

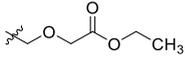
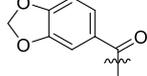
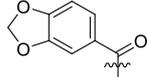
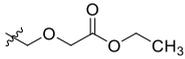
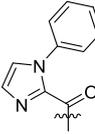
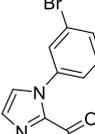
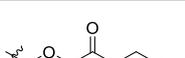
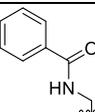
Die erste Serie der Peptidderivate umfasste Dipeptide, die aus Glycin sowie einer weiteren Aminosäure aufgebaut waren. Hierbei war auffällig, dass mit Ausnahme des ansonsten unsubstituierten Gly-Gly-Dipeptids **30** alle Substanzen entweder gegen beide Bakterienstämme oder gegen keinen Stamm antibakterielle Aktivität aufwiesen. Dies deutete in Kombination mit der Inaktivität im Enzymassay darauf hin, dass die antibakterielle Aktivität nicht auf einer Inhibition des LpxC-Enzyms beruhen konnte. Das Dipeptid **28** (Gly-Thr), welches aufgrund der Threonylseitenkette die höchste Ähnlichkeit zur Leitstruktur **12** aufwies, war dabei vollkommen inaktiv. Auch die Gly-Ala-Dipeptide **31** und *ent*-**31** sowie das Gly-Ser-basierte Dipeptid **29** wiesen keine antibakterielle Aktivität auf. Die Entfernung der Seitenkette führte zum Gly-Gly-Dipeptid **30**. Dieses wies leichte antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* D22 im Agardiffusionstest auf. Die Einführung eines Benzylsubstituenten führte zu den Gly-Phe-Dipeptiden **32** und *ent*-**32**. Diese beiden Stereoisomere hemmten als einzige Verbindungen in MHK-Experimenten das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* D22 bei einer Konzentration von $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Durch Verkürzung des Rückgrats zwischen zinkbindender Gruppe und Diphenylacetyleneinheit wurden die Peptidomimetika **33** und **34** erhalten. Hierbei wurde das der Diphenylacetyleneinheit benachbarte Stickstoffatom entfernt und die Carbonylfunktion zum Alkohol reduziert. Im Gegensatz zu den vorherigen Substanzen wiesen diese analog zu allen anderen untersuchten LpxC-Inhibitoren unterschiedliche antibakterielle Aktivitäten gegenüber den verschiedenen Bakterienstämmen auf. Dabei zeigte das unsubstituierte Peptidomimetikum **33** wie zuvor das unsubstituierte Gly-Gly-Dipeptid **30** lediglich gegen *E. coli* D22 leichte antibakterielle Aktivität. Die methylsubstituierte Verbindung **34** hingegen zeigte auch gegen *E. coli* BL21(DE3) leichte antibakterielle Aktivität im Agardiffusionstest sowie den größten Hemmhof und die niedrigste MHK gegen *E. coli* D22. Außerdem inhibierte **34** als einziges Peptidderivat *E. coli* LpxC C63A.

NOESY (*Nuclear Overhauser Enhanced Spectroscopy*)-Experimente mit **27** zeigten, dass diese Verbindung auf zwei Arten das LpxC-Enzym binden kann. Einerseits wurde ein Bindungsmodus beobachtet, der analog zu dem bei CHIR-090 (**12**) beobachtet war. Dabei band das Hydroxamsäuremotiv als Zink-chelatisierendes Element im aktiven Zentrum, die Diphenylacetyleneinheit im hydrophoben Tunnel und der Morpholinring am äußeren Ende des hydrophoben Tunnels. Andererseits wurde auch ein alternativer Bindungsmodus beobachtet, bei dem sich der Morpholinring von **27** im aktiven Zentrum nahe der UDP-Bindungs tasche befand. Die Diphenylacetyleneinheit befand sich im hydrophoben Tunnel und das Hydroxamsäuremotiv am äußeren Ende des hydrophoben Tunnels. Aus diesem Grund wurde eine Serie von Verbindungen, die einen 3,4-disubstituierten Morpholinring als zentrales Element aufwiesen, designed. Nachdem *Molecular Modelling*-Studien günstige Docking-Posen ergaben, wurden die Verbindungen hergestellt und auf ihre biologischen Aktivitäten untersucht. Dabei wurde sowohl der Substituent in Position 3 als auch der Linker zwischen dem Morpholinring und dem Diphenylacetylen substituenten in Position 4 variiert. Des Weiteren wurden verschiedene Substituenten am Ende des lipophilen Tails untersucht (Tab. 17).

Tabelle 17: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Morpholinderivaten. Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten erfolgte mithilfe von Agardiffusionstests und MHK-Experimenten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) (*lpxC*⁺) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 (*lpxC101*). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays.

				Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		K_i [μM]
				<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A
	R ¹	X	R ²					
35		C=O	H	8.3 ± 0.6	20.0 ± 1.0	>64	16	>6.34
36		C=O	H	≤6	6.8 ± 1.0	>64	>64	>6.34
37	H	CH ₂		≤6	≤6	>32	>32	>6.34
38	H	CH ₂		≤6	9.0 ± 0.0	>64	32	>6.34
39	H	CH ₂		≤6	7.7 ± 0.6	>32	16	>6.34
40		CH ₂		≤6	≤6	>64	32	>6.34

41		CH ₂		≤6	≤6	>16	>16	>6.34
42		CH ₂		≤6	≤6	>16	>16	>6.34
43		C=O		≤6	≤6	>16	>16	>6.34
44		C=O		≤6	≤6	>16	>16	>6.34
45		CH ₂		≤6	≤6	>16	>16	>6.34
46		CH ₂		≤6	≤6	>16	>16	>6.34
47		C=O		≤6	≤6	>64	>64	>6.34
48		CH ₂		≤6	≤6	>16	>16	>6.34
49		CH ₂		≤6	≤6	>16	>16	>6.34
50		CH ₂		≤6	≤6	>16	>16	>6.34
51		CH ₂		≤6	≤6	>16	>16	>6.34
52		CH ₂		≤6	≤6	>64	>64	>6.34
53		CH ₂		≤6	≤6	>32	>32	>6.34
54		CH ₂		≤6	≤6	>32	>32	>6.34
55		C=O		≤6	≤6	>64	>64	>6.34
56		C=O		≤6	11.3 ± 1.2	>32	32	>6.34

Von allen untersuchten Morpholinderivaten zeigte keines inhibitorische Aktivität gegenüber *E. coli* LpxC C63A ($K_i > 6.34 \mu\text{M}$). Diese Konzentration wurde aufgrund der geringen Löslichkeit der meisten Verbindungen zur besseren Vergleichbarkeit als einheitlich höchste getestete Konzentration gewählt. Auch gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) zeigte von allen untersuchten Morpholinderivaten lediglich

Hydroxamsäure **35** antibakterielle Aktivität, der Hemmhofdurchmesser betrug dabei 8.3 mm. Der Ersatz des Hydroxamsäuresubstituenten durch eine Hydroxymethylgruppe (**36**) bewirkte eine deutliche Reduktion der biologischen Aktivität, der Hemmhofdurchmesser betrug gegen *E. coli* D22 lediglich 6.8 mm (**35**: 20.0 mm). Dies ließ darauf schließen, dass die Aktivität von **35** auf den zinkbindenden Eigenschaften des Hydroxamsäuresubstituenten beruht und der Morpholinring deutlich schlechter an das Zinkion bindet.

Zur Untersuchung des Morpholinrings als zinkbindendem Element wurde im Folgenden systematisch eine Serie von Verbindungen, die auf 4-[4-(Phenylethynyl)benzyl]morpholin basieren, untersucht. Dabei wurde der Substituent am Ende der Diphenylacetyleneinheit, der Linker zwischen dem Morpholinring und dem Diphenylacetylenesubstituenten in Position 4 sowie der Substituent in Position 3 variiert.

Ausgehend von dem lediglich 4-substituierten Morpholinring mit einer Methylengruppe als Linkerelement wurden zunächst drei verschiedene Substituenten am Ende des lipophilen Tails untersucht. Weder Carbonsäure **37** noch Carbonsäureester **38** noch Alkohol **39** wiesen biologische Aktivität gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) auf. Carbonsäure **37** war zusätzlich dazu auch gegen den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 inaktiv. Anschließend wurde eine Reihe von Substituenten in 4-Position des Morpholinrings eingeführt. Hierbei handelte es sich zunächst um einen Benzylrest, welcher ebenfalls mit allen drei Tails untersucht wurde. Dieser Substituent führte sowohl bei Carbonsäure **40** als auch bei Ester **41** als auch bei Alkohol **42** zu einer Reduktion der Diffusionseigenschaften sowie der Löslichkeit. Keine der Substanzen wies einen Hemmhof gegen den defizienten *E. coli* D22-Stamm auf. In MHK-Experimenten konnte lediglich Carbonsäurederivat **40** das Wachstum von *E. coli* D22 inhibieren (MHK = 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Die niedrigste MHK dieser sechs untersuchten Verbindungen wies jedoch Alkohol **39** auf (MHK = 16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), sodass im Folgenden vorrangig dieser Substituent (R^2) bei den weiteren Derivatisierungen verwendet wurde. Hierbei handelte es sich zunächst um eine Änderung der Linker in Position 3 zum Phenylrest und in Position 4 zur Diphenylacetyleneinheit.

Zunächst erfolgte eine Wiedereinführung der Carbonylgruppe in Position 4 (**43**). Dies bewirkte jedoch weder eine Verbesserung der Löslichkeit, noch zeigte **43** antibakterielle Aktivität. Auch die Einführung einer zweiten Carbonylfunktion (**44**) zwischen dem Morpholinring und dem Phenylrest in Position 3 sowie der erneute Wechsel zum Methylenlinker in Position 4 (**45**) bewirkten weder eine Verbesserung der Löslichkeit der Verbindungen, noch zeigten **44** und **45** antibakterielle Aktivität. Die Reduktion der Carbonylfunktion in Position 3 zum Alkohol führte zu **46** und unter Verwendung des Carbonyllinkers in Position 4 zu **47**. Auch diese Verbindungen zeigten keine biologische Aktivität, allerdings bewirkte die Kombination von Carbonyllinker und Hydroxyfunktion eine Erhöhung der Löslichkeit von **47**.

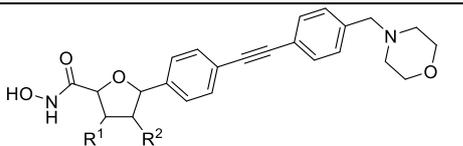
Des Weiteren wurde basierend auf **45** unter Verwendung des Methylenlinkers in Position 4 und der Carbonylfunktion in Position 3 der Phenylrest durch alternative Substituenten ersetzt. Hierbei handelte es sich um 1-Phenylimidazol (**50**), 1-(3-Bromphenyl)imidazol (**51**) und 1,3-Benzodioxol (**48**). Letzterer wurde exemplarisch ebenfalls mit dem Estersubstituenten am hydrophoben Tail untersucht (**49**). Auch diese vier Verbindungen wiesen weder eine verbesserte Löslichkeit noch antibakterielle Aktivität auf.

Anschließend wurde unter Beibehaltung des Methylenlinkers in Position 4 der Substituent in Position 3 weiter variiert. Hierfür wurden Benzamid **54** und Essigsäureester **52** hergestellt. Während beide Verbindungen keine antibakterielle Aktivität aufwiesen, wurde die Löslichkeit des Benzamids **54** um den Faktor 2 und die Löslichkeit des Esters **52** sogar um den Faktor 4 erhöht. Der Alkylierung des Alkohols am hydrophoben Tail von **52** zum Alkyloxyester **53** bewirkte eine erneute Erniedrigung der Löslichkeit dieser Verbindung.

Zuletzt wurden basierend auf der Ausgangsstruktur **35** unter Verwendung des Carbonyllinkers in Position 4 zwei alternative Substituenten zum Hydroxamsäuremotiv in Position 3 untersucht. Während das tertiäre Amin **55** einen Verlust der antibakteriellen Aktivität aufwies, zeigte Indol **56** den nach Hydroxamsäure **35** zweitgrößten Hemmhofdurchmesser gegen *E. coli* D22 und inhibierte das Wachstum dieses Bakterienstammes mit einer minimalen Hemmkonzentration von $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Da beide Serien der durch *Molecular Modelling* erhaltenen potentiellen LpxC-Inhibitoren kaum Aktivität gegenüber *E. coli* LpxC C63A aufwiesen, erfolgte zur weiteren Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen von LpxC-Inhibitoren eine Weiterentwicklung der zuvor im Arbeitskreis Holl synthetisierten Verbindungen. Dabei wurden zunächst noch fehlende Stereoisomere der C-furanosidischen Inhibitoren hergestellt und auf ihre biologische Aktivität untersucht. Anschließend wurden, basierend auf den offenkettigen Glycerinsäure- sowie Phenylethylenglycol-basierten Verbindungen, ausgewählte desoxygenierte C-Furanoside untersucht (Tab. 18).

Tabelle 18: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten C-furanosidischer LpxC-Inhibitoren. Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten erfolgte mithilfe von Agardiffusionstests und MHK-Experimenten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) (*lpxC*⁺) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 (*lpxC101*). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays. Für alle bereits publizierten Verbindungen erfolgte aufgrund der Neubestimmung des K_M -Wertes im Rahmen dieser Arbeit eine Neuberechnung der K_i -Werte auf Basis der in der Literatur angegebenen IC_{50} -Werte.

				Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		K_i [μM]
				<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A
	Konfig.	R ¹	R ²					
57 [83,87]	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	OH	OH	≤6	13.4 ± 1.8	>64	8	>25.4
<i>ent</i> - 57 [83]	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)	OH	OH	≤6	≤6	>64	>64	>25.4
58	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	OH	OH	15.5 ± 1.8	>30	64	2	3.55 ± 1.11
59	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)	OH	OH	15.0 ± 1.5	22.3 ± 2.1	>64	8	4.89 ± 2.47
<i>ent</i> - 59	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	OH	OH	≤6	10.5 ± 1.2	>64	64	19.1 ± 4.65
17 [83]	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)	OH	OH	22.3 ± 1.4	28.3 ± 1.4	8	0.5	0.411 ± 0.121
<i>ent</i> - 17 [83,88]	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	OH	OH	15.1 ± 1.5	25.7 ± 2.0	>64	2	3.58 ± 1.2
60 [83,88]	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	OH	OH	9.7 ± 0.5	21.4 ± 2.3	>64	8	4.3 ± 1.3
<i>ent</i> - 60 [83]	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)	OH	OH	11.0 ± 0.8	19.7 ± 1.3	>64	>64	11.4 ± 4.6
61	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)	OH	OH	13.3 ± 1.9	26.7 ± 1.6	64	4	9.94 ± 5.74
62	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)	OH	OH	11.0 ± 2.4	17.5 ± 3.0	>64	32	19.0 ± 3.9
<i>ent</i> - 62	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	OH	OH	10.0 ± 1.8	18.8 ± 2.1	>64	32	23.5 ± 6.6
63 [83]	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)	OH	OH	14.0 ± 1.0	21.0 ± 0.5	>64	32	16.2 ± 1.9*
<i>ent</i> - 63 [83,88]	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	OH	OH	6.8 ± 1.0	22.8 ± 2.2	>64	4	1.3 ± 0.2

64 [88]	(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	H	OH	≤6*	8.7 ± 1.6*	>64*	8*	24.6 ± 9.0*
<i>ent</i> - 64	(2 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)	H	OH	≤6	14.7 ± 0.6	>64	32	>25.4
65	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)	OH	H	18.0 ± 1.0	25.3 ± 1.6	64	2	3.01 ± 2.14
<i>ent</i> - 65	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	OH	H	10.3 ± 1.0	20.0 ± 1.5	>64	32	7.14 ± 2.10
66	(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)	H	OH	10.3 ± 0.6	19.0 ± 0.9	>64	16	>25.4
<i>ent</i> - 66	(2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	H	OH	≤6	19.7 ± 1.2	>64	32	>25.4

*selbst bestimmter Wert.

Für eine vollständige Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen erfolgte der Vergleich der neu untersuchten *C*-Furanoside mit bereits zuvor veröffentlichten Verbindungen. Hierbei handelte es sich bei den Dihydroxyverbindungen um 14 von insgesamt 16 möglichen Stereoisomeren sowie sechs ausgewählte Monohydroxyverbindungen. Dabei wurden jeweils die (2*S*)-konfigurierten *C*-Glycoside ihren (2*R*)-konfigurierten Enantiomeren gegenübergestellt. Hierbei zeigte sich, dass bis auf eine Ausnahme (*ent*-**63**) jeweils das (2*S*)-konfigurierte Stereoisomer eine deutlich höhere biologische Aktivität als das (2*R*)-konfigurierte Enantiomer aufwies. Um einen systematischen Vergleich zu ermöglichen, wurden die Stereoisomere in zwei Serien unterteilt. Die erste Serie enthielt dabei alle 2,5-*cis*-konfigurierten Stereoisomere, die zweite Serie alle 2,5-*trans*-konfigurierten Stereoisomere. Ausgehend von der all-*cis*-konfigurierten Verbindung **57** erfolgte zunächst die Inversion des Stereozentrums in Position 3, gefolgt von der Inversion des Stereozentrums in Position 4. Zuletzt erfolgte die Inversion beider Stereozentren.

Das all-*cis*-konfigurierte Stereoisomer **57** wies weder antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* BL21(DE3) noch inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A auf. Lediglich gegen den defizienten Stamm *E. coli* D22 zeigte **57** mittlere Aktivität mit einer MHK von 8 µg · mL⁻¹. Das Enantiomer *ent*-**57** hingegen zeigte auch gegen *E. coli* D22 keine antibakterielle Aktivität. Die Inversion in Position 3 führte zu **58**. Dies führte zu einer deutlichen Erhöhung der biologischen Aktivität und äußerte sich darin, dass **58** als eines von vier *C*-Glycosiden in der Lage war, das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) in MHK-Experimenten zu inhibieren. Des Weiteren inhibierte **58** *E. coli* LpxC C63A mit einem K_i -Wert von 3.55 µM. Die Inversion in Position 4 (**59**) führte vor allem zu einer Erhöhung der inhibitorischen Aktivität. Während die antibakterielle Aktivität, mit Ausnahme eines deutlichen Hemmhofes gegen *E. coli* BL21(DE3), in einer Größenordnung mit der von **57** lag, lag die inhibitorische Aktivität von **59** ($K_i = 4.89$ µM) gegen *E. coli* LpxC C63A in einer Größenordnung mit der von **58**. Das Enantiomer *ent*-**59** hingegen zeigte lediglich schwache Aktivität gegen *E. coli* D22 sowie *E. coli* LpxC C63A. Die Inversion beider Stereozentren lieferte das aktivste Stereoisomer aller untersuchten *C*-Glycoside (**17**). Verglichen mit **58** konnte durch Verwendung von **17** sowohl die MHK gegen *E. coli* BL21(DE3) als auch der K_i -Wert nahezu um den Faktor 10 gesenkt werden. Auch das Enantiomer *ent*-**17** zeigte eine hohe biologische Aktivität. Diese war vergleichbar mit der von **58**.

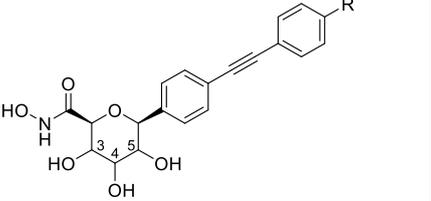
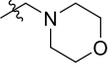
Bei der Untersuchung der 2,5-*trans*-konfigurierten Stereoisomere führte, ausgehend von der all-*cis*-konfigurierten Verbindung **57**, die Inversion in Position 5 zu Stereoisomer **60**. Auch dies bewirkte verglichen mit **57** bei gleichbleibender antibakterieller Aktivität eine deutliche Erhöhung der inhibitorischen Aktivität. Der K_i -Wert von **60** ($K_i = 4.3$ µM) lag dabei in einer Größenordnung mit denen von **58** und **59**. Das Enantiomer *ent*-**60** zeigte hingegen eine deutlich geringere biologische Aktivität. Dennoch inhibierte *ent*-**60** bemerkenswerterweise *E. coli* LpxC C63A mit einem K_i -Wert von 11.4 µM trotz fehlender Inhibition des Wachstums des defizienten Stammes *E. coli* D22 in MHK-Experimenten. Die Inversion der Konfiguration in Position 3 ergab **61**. Dies führte zu einer leichten Erhöhung der

antibakteriellen Aktivität. Analog zur 2,5-*cis*-ständigen Verbindung **58** war **61** ebenfalls als eines von lediglich vier Stereoisomeren in der Lage, das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) in den MHK-Experimenten zu inhibieren. Zeitgleich zeigte **61** jedoch sowohl verglichen mit **60** als auch mit **58** eine reduzierte inhibitorische Aktivität gegenüber *E. coli* LpxC C63A. Die Inversion in Position 4 (**62**) hingegen führte zu einer Erniedrigung der biologischen Aktivität. **62** zeigte lediglich geringe Aktivität gegen den defizienten Stamm *E. coli* D22 mit einer MHK von $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ sowie schwache Inhibition von *E. coli* LpxC C63A. Die biologische Aktivität des Enantiomers *ent*-**62** war noch niedriger als von **62**, allerdings zeigte sich bei diesem Enantiomerenpaar ein geringerer Unterschied als bei anderen. Die zeitgleiche Inversion in Position 3 und in Position 4 lieferte **63**. Auch **63** zeigte eine deutlich niedrigere Aktivität als **60** und **17**. Das Enantiomer *ent*-**63** hingegen war nicht nur das einzige (2*R*)-konfigurierte Stereoisomer mit einer höheren biologischen Aktivität als das jeweilige Enantiomer, sondern generell das zweitaktivste C-Glycosid, bezogen auf die inhibitorische Aktivität gegenüber *E. coli* LpxC C63A. Bei der Untersuchung der desoxygenierten C-Glycoside führte, ausgehend von dem all-*cis*-konfigurierten Stereoisomer **57**, die Entfernung der Hydroxygruppe in Position 3 zu **64**. Dies hatte keinen Einfluss auf die biologische Aktivität, **64** sowie das Enantiomer *ent*-**64** wiesen lediglich gegen den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 leichte antibakterielle Aktivität auf. Die Entfernung der Hydroxygruppe in Position 4 hingegen (**65**) führte zu einer deutlichen Erhöhung der biologischen Aktivität. **65** inhibierte das Wachstum des Wildtyps *E. coli* BL21(DE3) in MHK-Experimenten bei einer Konzentration von $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, der K_i -Wert gegen *E. coli* LpxC C63A betrug $3.01 \mu\text{M}$. Auch das Enantiomer *ent*-**65** zeigte inhibitorische Aktivität gegenüber *E. coli* LpxC C63A mit einem K_i -Wert von $7.14 \mu\text{M}$. Ausgehend von dem 2,5-*trans*-konfigurierten Stereoisomer **62** bewirkte die Entfernung der Hydroxygruppe in Position 3 (**66**) wie zuvor bei den 2,5-*cis*-konfigurierten Stereoisomeren einen nahezu vollständigen Verlust der inhibitorischen Aktivität.

Der Vergleich aller untersuchten C-Glycoside zeigte, dass bis auf eine Ausnahme das (2*S*)-konfigurierte Stereoisomer die aktivere Verbindung der jeweiligen Enantiomerenpaare darstellt. Ausgehend vom all-*cis*-konfigurierten Stereoisomer **57**, welches keine Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A aufwies, führte die Inversion jeweils eines Stereozentrums zu vier Stereoisomeren (**58**, **59**, **60**, *ent*-**63**), welche unabhängig von der Position des invertierten Stereozentrums eine ähnliche Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A aufwiesen. Die Inversion beider Stereozentren in Position 3 und 4 lieferte das aktivste Stereoisomer **17** ($K_i = 411 \text{ nM}$). Verglichen mit den vorherigen vier Substanzen konnte eine Erhöhung der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 10 beobachtet werden. Auch das (2*R*)-konfigurierte Enantiomer dieser Verbindung (*ent*-**17**) zeigte biologische Aktivität. Der K_i -Wert dieser Verbindung lag in einer Größenordnung mit denen von **58**, **59**, **60** und *ent*-**63**. Des Weiteren konnte ausgehend vom all-*cis*-konfigurierten Stereoisomer **57** gezeigt werden, dass sowohl die Inversion des Stereozentrums in Position 4 (**59**) als auch die Entfernung der Hydroxygruppe in dieser Position (**65**) eine deutliche Erhöhung der inhibitorischen Aktivität zur Folge hatte. In Position 3 hingegen hatte lediglich die Inversion des Stereozentrums (**58**) eine Erhöhung der inhibitorischen Aktivität zur Folge. Die Entfernung der Hydroxygruppe (**64**) lieferte ebenfalls eine Verbindung ohne biologische Aktivität. Dies konnte auch anhand der 2,5-*trans*-konfigurierten Verbindungen gezeigt werden und ließ darauf schließen, dass die Hydroxygruppe in Position 3 von essentieller Bedeutung für die Inhibition von *E. coli* LpxC C63A ist. Dies ist auch in Übereinstimmung mit den Dekonstruktionsexperimenten von Diol **25**, welche zeigten, dass ein Substituent in α -Position des Hydroxamsäuremotivs für die Inhibition von *E. coli* LpxC C63A notwendig ist.

Anschließend wurde eine Variation des zentralen Zuckerbausteins der C-Furanoside vorgenommen. Hierbei führte eine Ringerweiterung zu C-pyranosidischen LpxC-Inhibitoren, bei welchen zusätzlich der lipophile Tail variiert wurde (Tab. 19).

Tabelle 19: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten C-pyranosidischer LpxC-Inhibitoren. Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten erfolgte mithilfe von Agardiffusionstests und MHK-Experimenten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) (*lpxC*⁺) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 (*lpxC101*). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte in Abhängigkeit von der Struktur des Inhibitors entweder mithilfe des fluoreszenzbasierten oder mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays.

			Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		K_i [μM]
			<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A
	Konfig.	R					
67	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)		22.4 ± 0.6	>30	8	1	0.125 ± 0.003
68	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)		19.0 ± 2.6	>30	16	1	0.138 ± 0.052
69	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)		≤6	21.0 ± 2.0	>64	16	>25.4
70	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)		12.7 ± 1.6	26.3 ± 1.2	64	8	0.192 ± 0.053
71	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)		≤6	9.0 ± 1.0	>64	>64	20.2 ± 3.4
72	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)		≤6	17.3 ± 2.1	>64	32	0.683 ± 0.089
73	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)		≤6	17.0 ± 1.0	>64	32	2.67 ± 0.23

Bei den untersuchten C-pyranosidischen Inhibitoren handelte es sich um Glucose-, Mannose- und Galactose-basierte Hydroxamsäuren, die am anomeren Zentrum β -Konfiguration aufwiesen. Der lipophile Tail bestand aus einer Diphenylacetyleneinheit, die am terminalen Phenylring unterschiedliche Substituenten aufwies: Amino-, Aminomethyl- und Morpholinomethylgruppen. Ausgehend von Glucose, Mannose und Galactose konnten die morpholinomethylsubstituierten C-Pyranoside **67**, **68** und **69** gewonnen werden. Während sowohl Glucosederivat **67** als auch Mannosederivat **68** antibakterielle Aktivität gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) aufwiesen, zeigte Galactopyranosid **69** lediglich gegen den defizienten Stamm *E. coli* D22 schwache antibakterielle Aktivität. Die MHK von **67** lag dabei um den Faktor 2 niedriger (MHK = 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) als die MHK von **68**. Zusätzlich dazu zeigten beide Substanzen inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A. Diese war sogar höher als die des aktivsten C-Furanosides **17**. Hierbei lag der K_i -Wert von **67** ($K_i = 125 \text{ nM}$) etwas niedriger als der von **68**. Galactosederivat **69** war gegen *E. coli* LpxC C63A inaktiv.

In der Folge wurde sowohl für das aktive Glucosederivat **67** als auch für das nahezu inaktive Galactosederivat **69** der Substituent am terminalen Phenylring variiert. Der Austausch der Morpholinomethyl- durch Aminosubstituenten führte zu den Anilinderivaten **70** und **71**. Diese Stereoisomere zeigten einen ähnlichen Aktivitätsunterschied wie die Morpholinderivate. Im direkten Vergleich mit den Morpholinderivaten wiesen beide jedoch eine geringere antibakterielle Aktivität auf. Die Glucose-basierte Verbindung **70** inhibierte analog zu **67** das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) in MHK-Experimenten, die MHK lag dabei jedoch um den Faktor 8 höher (MHK = 64 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Die Galactose-basierte Verbindung **71** zeigte analog zu **69** nur gegen den defizienten Stamm *E. coli* D22 schwache antibakterielle Aktivität, diese äußerte sich lediglich in einem kleinen Hemmhof im Agardiffusionstest. Auf inhibitorischer Ebene war der K_i -Wert von **70** hingegen nur geringfügig höher als der von **67**. Die

inhibitorische Aktivität des Galactosederivates **71** war, wie die antibakterielle Aktivität bereits vermuten ließ, um den Faktor 100 niedriger als die des entsprechenden Glucosederivates **70**.

Der Austausch der Morpholinomethylgruppe durch einen Aminomethylsubstituenten hatte gegensätzliche Effekte auf die untersuchten Stereoisomere. Dies zeigte sich zunächst auf antibakterieller Ebene darin, dass sowohl Glucosederivat **72** als auch Galactosederivat **73** in gleichem Maße lediglich das Wachstum des defizienten Bakterienstammes *E. coli* D22 schwach inhibierten (MHK = 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Auf inhibitorischer Ebene zeigte **72** verglichen mit den zuvor untersuchten Glucosederivaten eine Reduktion der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 10. Zeitgleich dazu zeigte **73** verglichen mit den zuvor untersuchten Galactosederivaten eine Erhöhung der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 10.

Die Untersuchung der C-pyranosidischen Inhibitoren zeigte ebenso wie die Dekonstruktionsexperimente und die Untersuchung der C-furanosidischen Inhibitoren, dass die Hydroxygruppe in Position 3 von essentieller Bedeutung ist. Ausgehend vom Glucose-basierten Derivat **67** führte eine Inversion des Stereozentrums in Position 5 des Tetrahydropyranrings zu dem Mannose-basierten Derivat **68**. Beide Substanzen wiesen sowohl ähnliche antibakterielle als auch ähnliche inhibitorische Eigenschaften auf. Die Inversion des Stereozentrums in Position 3 hingegen führte zu dem Galactose-basierten Derivat **69**. Dies bewirkte einen nahezu vollständigen Verlust der antibakteriellen sowie der inhibitorischen Aktivität. Anschließend erfolgte bei den Glucose- und Galactosederivaten eine Variation des lipophilen Tails. Dabei bewirkte der Ersatz des Morpholinomethyl- durch einen Aminosubstituenten eine leichte Reduktion der antibakteriellen Eigenschaften bei gleichbleibender inhibitorischer Aktivität. Der Ersatz des Morpholinomethyl- durch einen Aminomethylsubstituenten hatte gegensätzliche Effekte auf die untersuchten Stereoisomere. So führte der Austausch bei den Glucosederivaten zu einer Erniedrigung der biologischen Aktivität, bei den Galactosederivaten jedoch zu einer Erhöhung, sodass die beiden aminomethylsubstituierten Diastereomere ähnliche Aktivität zeigten.

Ebenfalls im Kontext der Variation des zentralen Bausteins wurde das Sauerstoffatom des Tetrahydrofuranrings durch ein Stickstoffatom ersetzt und eine Serie von Prolinderivaten hergestellt, bei denen u.a. die Position des lipophilen Tails variiert wurde (Tab. 20).

einem K_i -Wert von 1.33 μM . Dieser Wert liegt in einer Größenordnung mit dem des zweitaktivsten C-Furanosides **ent-63** und somit ist **74** ca. um den Faktor 10 weniger potent als das aktivste C-Furanosid **17** und das aktivste C-Pyranosid **67**. Die Einführung einer Carbonylgruppe als Linkerelement zwischen Pyrrolidinring und hydrophobem Tail führte zu **75**. Bei dieser Verbindung war die lipophile Seitenkette wie bei der Leitstruktur CHIR-090 (**12**) über eine Amidbindung mit dem Pyrrolidinring verknüpft. Dies führte bei ähnlicher antibakterieller Aktivität gegen den Wildtyp im Vergleich zu **74** sowohl zu einer Reduktion der antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli* D22 als auch zu einer Reduktion der inhibitorischen Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A um den Faktor 4.

Das Verschieben der lipophilen Seitenkette in die Position 5 des Heterocyclus, über die sie auch bei den C-Glycosiden mit dem Tetrahydrofuranring verknüpft ist, führte zu den Stereoisomeren **76** und **77**. Hierbei zeigte das 2,5-*cis*-konfigurierte Stereoisomer **76** eine höhere biologische Aktivität als das 2,5-*trans*-konfigurierte Diastereomer **77**. Verglichen mit **74** bewirkte das Verschieben des hydrophoben Tails in die Position 5 für das aktivere Stereoisomer **76** eine Reduktion der MHK um den Faktor 4 bei gleichbleibender inhibitorischer Aktivität. Die inhibitorische Aktivität des weniger aktiven Stereoisomers **77** lag in einer Größenordnung mit der von **75**.

Die Einführung eines zusätzlichen Substituenten in Position 4 in Form einer Hydroxygruppe führte ausgehend von **74** zum (4*R*)-konfigurierten Hydroxyprolinderivat **78**. Dies bewirkte sowohl eine leichte Abnahme der antibakteriellen Aktivität als auch eine Verringerung der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 5. Die Einführung einer Carbonylgruppe als Linkerelement zwischen Pyrrolidinring und hydrophobem Tail, analog zu **75**, führte zu **79**. Verglichen mit Amin **78** hatte dies jedoch kaum einen Einfluss auf die antibakterielle sowie inhibitorische Aktivität dieser Verbindung. Die Inversion der Konfiguration in Position 4 (**80**) hatte ebenfalls kaum Einfluss auf die biologische Aktivität, lediglich der K_i -Wert des (4*S*)-konfigurierten Stereoisomers **80** war etwas niedriger als der von **79**. Der Austausch des Carbonyllinkers durch eine Sulfonylgruppe führte zu den stereoisomeren Sulfonamiden **81** und **82**. Diese zeigten sowohl leicht erhöhte antibakterielle Aktivität als auch eine Zunahme der inhibitorischen Aktivität. Auch hier zeigte das (4*S*)-konfigurierte Stereoisomer **82** eine etwas höhere biologische Aktivität und inhibierte sogar das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) in den MHK-Experimenten bei einer Konzentration von 16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Der K_i -Wert von **82** betrug 620 nM und lag somit lediglich geringfügig höher als der des aktivsten C-Furanosides **17**.

Im Folgenden wurde der hydrophobe Tail in Position 4 des Pyrrolidinrings verschoben. Mit Ausnahme einer Verbindung zeigte hierbei, wie bei den zuvor untersuchten Diastereomerenpaaren, bei allen untersuchten Prolinderivaten das (4*S*)-konfigurierte Stereoisomer die höhere biologische Aktivität. Das bis auf den lipophilen Tail in Position 4 unsubstituierte Prolinderivat **84** zeigte sowohl in Bezug auf die antibakteriellen als auch in Bezug auf die inhibitorischen Eigenschaften vergleichbare Aktivität mit den Prolinderivaten **74** und **77**, die ebenfalls als einzigen Substituenten den lipophilen Tail am Pyrrolidinring trugen.

Die Einführung eines zusätzlichen Benzylsubstituenten am Pyrrolidin-Stickstoffatom (**86**) führte zu einer weiteren Erniedrigung des K_i -Wertes auf 502 nM sowie zu einer Erniedrigung der MHK gegen *E. coli* D22 um den Faktor 2 auf 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Trotzdem zeigte **86** verglichen mit **84** in den Agardiffusionstests kleinere Hemmhofdurchmesser gegen *E. coli* D22 und einen Verlust der antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli* BL21(DE3), was auf eine Reduktion der Diffusionseigenschaften bedingt durch den unpolaren Benzylsubstituenten zurückzuführen ist. Der Austausch des Benzylsubstituenten durch einen Benzoylrest, analog zu der vorherigen Einführung einer Carbonylgruppe als Linkerelement zwischen Pyrrolidinring und hydrophobem Tail, führte zu **88**. Dies bewirkte eine leichte Verbesserung

der Diffusionseigenschaften und **88** zeigte sogar gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) einen kleinen Hemmhof. Allerdings zeigte sich in den MHK-Experimenten insgesamt eine Reduktion der antibakteriellen Aktivität. Der K_i -Wert von **88** lag in einer Größenordnung mit dem von der in Position 1 unsubstituierten Verbindung **84**. Der Austausch des Etherlinkers zwischen Pyrrolidinring und hydrophobem Tail in Position 4 durch ein Amin führte unter Verwendung des Benzylsubstituenten in Position 1 zu dem sekundären Amin **89**. **89** zeigte lediglich gegen den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 schwache antibakterielle Aktivität sowie einen vollständigen Verlust der inhibitorischen Aktivität. Der Austausch des Benzyl- durch einen Benzoylsubstituenten führte zu dem sekundären Amin **90**. Auch dieses zeigte lediglich gegen den defizienten Bakterienstamm schwache antibakterielle Aktivität, die MHK gegen *E. coli* D22 betrug $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Der K_i -Wert lag hingegen in einer Größenordnung mit dem des Prolinderivates mit Etherlinker **88**. Der Austausch des Linkers in Position 4 durch einen 1,4-disubstituierten Triazolring führte unter Verwendung des Benzylsubstituenten in Position 1 zu **92** und unter Verwendung des Benzoylsubstituenten in Position 1 zu **94**. Analog zu Amin **89** zeigte auch Triazol **92** bei schwacher antibakterieller Aktivität gegen den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 keine inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A. Triazol **94** hingegen zeigte trotz eines vollständigen Verlustes der antibakteriellen Aktivität eine Inhibition von *E. coli* LpxC C63A, die in einer Größenordnung mit der des sekundärenamins **90** lag.

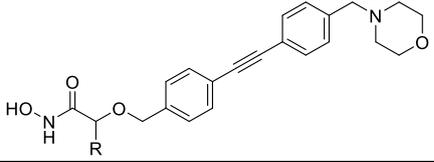
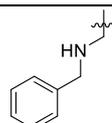
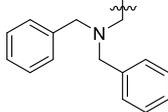
Unter Verwendung des Benzoylsubstituenten führte die Inversion in Position 4 (**93**) zu schwacher antibakterieller Aktivität gegen *E. coli* D22 (MHK = $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) bei gleichbleibender inhibitorischer Aktivität. Ausgehend vom Triazol mit Benzylsubstituenten in Position 1 (**92**) führte die Inversion in Position 4 zu dem einzigen (4*R*)-konfigurierten Prolinderivat, welches eine höhere inhibitorische Aktivität als das jeweilige (4*S*)-konfigurierte Stereoisomer zeigte. Während Triazolderivat **91** ebenfalls weder gegen den Wildtyp noch gegen den defizienten Stamm antibakterielle Aktivität zeigte, lag sein K_i -Wert im niedrigen mikromolaren Bereich und in einer Größenordnung mit dem des entsprechenden Prolinderivates mit Etherlinker **85**.

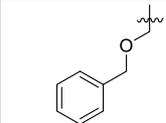
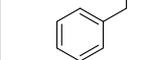
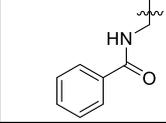
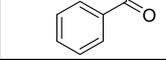
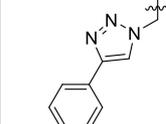
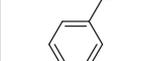
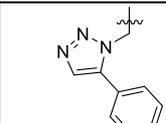
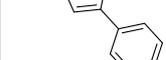
Der Vergleich aller Prolinderivate zeigte, dass unabhängig von der Position des hydrophoben Tails alle Verbindungen bzw. die jeweils aktiveren Stereoisomere, die lediglich den hydrophoben Tail als Substituenten trugen, eine ähnliche inhibitorische Aktivität gegenüber dem Target *E. coli* LpxC C63A aufwiesen ($K_i \approx 1.3 \mu\text{M}$). Ausgehend vom 1,2-disubstituierten Pyrrolidinderivat **74** führte sowohl die Einführung eines Carbonyllinkers in Position 1 als auch die Einführung einer Hydroxygruppe in Position 4 jeweils zu einer Reduktion der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 5. Unter Beibehaltung der Hydroxygruppe führte sowohl die Verwendung eines Carbonyl- als auch die eines Sulfonyllinkers zwischen Pyrrolidinring und hydrophobem Rest zu einer Verbesserung der inhibitorischen Aktivität. Dabei zeigten beide (4*S*)-konfigurierten Verbindungen eine höhere biologische Aktivität als das jeweilige (4*R*)-konfigurierte Stereoisomer. Zusätzlich zu der Verbesserung der inhibitorischen Aktivität führte die Einführung eines Sulfonyllinkers auch zu einer Verbesserung der antibakteriellen Eigenschaften. Beide Stereoisomere inhibierten das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) in MHK-Experimenten. **82** zeigte des Weiteren sowohl die niedrigste MHK aller untersuchten Prolinderivate gegen beide Bakterienstämme als auch den zweitniedrigsten K_i -Wert ($K_i = 620 \text{ nM}$) gegen *E. coli* LpxC C63A. Das Verschieben des hydrophoben Tails in die Position 4 des Pyrrolidinrings lieferte unabhängig von dem Substituenten in Position 1 sowie dem verwendeten Linker jeweils zwei Stereoisomere mit unterschiedlicher biologischer Aktivität. Hierbei war ebenfalls bis auf eine Ausnahme das (4*S*)-konfigurierte Stereoisomer das aktivere. Allerdings zeigte keines dieser Prolin-

derivate antibakterielle Aktivität gegen den Wildtyp. Die zusätzliche Einführung eines Benzyl- sowie eines Benzoylsubstituenten am Pyrrolidinstickstoff bewirkte eine Reduktion der Diffusionseigenschaften der jeweiligen Verbindungen. Dennoch lieferte die Einführung eines Benzylsubstituenten in Position 1 mit Ether **86** die aktivste Verbindung dieser Serie. Dies äußerte sich in einer Reduktion des K_i -Wertes auf 502 nM. Die Einführung eines Benzoylsubstituenten hingegen bewirkte analog zu dem Carbonyllinker bei den 1,2-disubstituierten Pyrrolidinderivaten eine Reduktion der antibakteriellen Aktivität bei gleichbleibender inhibitorischer Aktivität. Der Austausch des Ethersauerstoffes durch ein Stickstoffatom führte zu den entsprechenden sekundären Aminen und die Einführung eines Triazolrings zu den entsprechenden Triazolen. Unter Verwendung des Benzoylsubstituenten in Position 1 zeigten beide (4*S*)-konfigurierten Prolinderivate eine vergleichbare inhibitorische Aktivität wie das entsprechende Prolinderivat mit Etherlinker. Der Austausch des Benzoyl- durch einen Benzylsubstituenten bewirkte im Gegensatz zu dem Etherderivat jedoch keine Erhöhung der inhibitorischen Aktivität, sondern einen vollständigen Verlust dieser. Die Inversion der Konfiguration in Position 4 (**91**) führte hingegen zu einer Wiederherstellung der inhibitorischen Aktivität. Somit handelte es sich bei **91** um die einzige (4*R*)-konfigurierte Verbindung, die eine höhere inhibitorische Aktivität als das (4*S*)-konfigurierte Stereoisomer aufwies.

Zuletzt erfolgte basierend auf Verbindung **27** eine systematische Untersuchung neuer Leitstrukturen, die zusätzlich zum hydrophoben Tunnel und dem katalytischen Zn^{2+} -Ion auch die UDP-Bindungstasche adressieren sollten. Dabei wurde aufgrund der Dekonstruktionsexperimente von **25** sowie der Ergebnisse der Untersuchung der *C*-Glycoside die α -Position des Hydroxamsäuremotivs untersucht. Hierbei wurde zunächst als kleinstmöglicher hydrophober Substituent eine Methylgruppe eingeführt. Anschließend wurde als Verlängerung dieses Substituenten ein Phenylrest mithilfe verschiedener Linker eingeführt. Als Linker wurden Ether, Amine, Triazole und Amide verwendet (Tab. 21).

Tabelle 21: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von LpxC-Inhibitoren, die die UDP-Bindungstasche adressieren sollten. Dazu wurde in α -Position des Hydroxamsäuremotivs eine Methylgruppe sowie über verschiedene Linker ein Phenylring eingeführt. Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten erfolgte mithilfe von Agardiffusionstests und MHK-Experimenten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) (*lpxc*⁺) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 (*lpxc101*). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays.

			Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		K_i [μM]
			<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A
	Konfig.	R					
95	(2 <i>S</i>)	CH ₃	20.0 ± 1.0	28.8 ± 1.8	8	0.25	2.61 ± 2.04
<i>ent</i> - 95	(2 <i>R</i>)	CH ₃	25.3 ± 1.5	>30	2	0.063	0.427 ± 0.186
96	(2 <i>S</i>)		13.0 ± 1.0	24.3 ± 2.1	16	0.5	4.59 ± 1.26
<i>ent</i> - 96	(2 <i>R</i>)		10.7 ± 1.2	20.0 ± 1.8	32	4	5.90 ± 2.02
97	(2 <i>S</i>)		≤6	7.7 ± 1.2	>16	16	>2.54
<i>ent</i> - 97	(2 <i>R</i>)		≤6	≤6	>16	>16	>2.54

98	(2 <i>S</i>)		≤6	15.4 ± 2.4	>32	0.5	0.606 ± 0.356
<i>ent</i> - 98	(2 <i>R</i>)		≤6	15.7 ± 1.2	>32	2	3.62 ± 0.64
99	(2 <i>S</i>)		15.7 ± 1.6	26.3 ± 1.5	8	0.125	0.149 ± 0.056
<i>ent</i> - 99	(2 <i>R</i>)		9.7 ± 0.6	18.0 ± 2.0	>64	4	2.56 ± 1.08
100	(2 <i>S</i>)		9.0 ± 1.0	20.4 ± 2.2	16	0.125	0.0246 ± 0.0036
<i>ent</i> - 100	(2 <i>R</i>)		≤6	19.3 ± 1.6	32	0.25	0.143 ± 0.069
101	(2 <i>S</i>)		≤6	12.0 ± 0.0	>64	2	8.34 ± 3.74
<i>ent</i> - 101	(2 <i>R</i>)		≤6	10.3 ± 0.6	>64	4	16.1 ± 8.4

Für alle untersuchten Substituenten wurde jeweils das (2*S*)-konfigurierte Stereoisomer dem entsprechenden (2*R*)-konfigurierten Enantiomer gegenübergestellt. Die durch Einführung einer Methylgruppe in α -Position des Hydroxamsäuremotivs von **27** erhaltenen Enantiomere **95** und *ent*-**95** zeigten von allen untersuchten Verbindungen die höchste antibakterielle Aktivität. Dies äußerte sich sowohl im Agardiffusionstest als auch in den durchgeführten MHK-Experimenten. Beide Enantiomere zeigten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) einen Hemmhofdurchmesser ≥ 20 mm. Die minimale Hemmkonzentration des (2*R*)-konfigurierten Stereoisomers *ent*-**95** betrug $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ gegen *E. coli* BL21(DE3) und der K_i -Wert gegen *E. coli* LpxC C63A betrug 427 nM. Beide Werte waren ca. um den Faktor 5 niedriger als die des Enantiomers **95**.

Im Gegensatz dazu zeigte bei allen anderen Enantiomerenpaaren mit größerem Substituenten das (2*S*)-konfigurierte Stereoisomer eine höhere biologische Aktivität als das jeweilige (2*R*)-konfigurierte Enantiomer. Die Einführung eines Benzylaminosubstituenten (**96**) führte verglichen mit **95** zu einer leichten Reduktion der antibakteriellen sowie der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 2. Das entsprechende Enantiomer *ent*-**96** zeigte eine weitere Reduktion der biologischen Aktivität um den Faktor 2. Die Einführung eines zweiten Benzylsubstituenten führte zu den tertiären Aminen **97** und *ent*-**97**, welche neben einer Reduktion der Löslichkeit einen nahezu kompletten Verlust der biologischen Aktivität zeigten. Lediglich **97** zeigte bei der höchstmöglichen löslichen Konzentration ($16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) eine Inhibition des defizienten Bakterienstammes *E. coli* D22 in MHK-Experimenten.

Die Einführung eines Benzylloxysubstituenten führte zu Ether **98**. Dieser zeigte verglichen mit dem sekundären Amin **96** ebenfalls einen Verlust der antibakteriellen Aktivität gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3). Die MHK gegen den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 war hingegen identisch mit der von **96**. Die inhibitorischen Eigenschaften von Ether **98** lagen sogar um den Faktor 10 niedriger als die des entsprechenden sekundären Amins und somit in einer Größenordnung mit *ent*-**95** ($K_i = 427$ nM). Die Einführung einer Phenylgruppe über einen Amidlinker, d.h. die Einführung eines Benzoylamino-substituenten, hatte eine deutliche Erhöhung der biologischen Aktivität zur Folge. Benzamid **99** inhibierte das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) mit einer MHK von $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Dies ist abgesehen von den beiden methylsubstituierten Verbindungen **95** und *ent*-**95** die niedrigste gemessene MHK gegen den Wildtyp. Des Weiteren inhibierte **99** *E. coli* LpxC C63A mit einem K_i -Wert von 149 nM. Auch das Enantiomer *ent*-**99** war in der Lage, *E. coli* LpxC C63A zu inhibieren. Der K_i -Wert betrug $2.56 \mu\text{M}$.

Zuletzt erfolgte die Verknüpfung des Phenylsubstituenten über einen Triazolring. Das 1,4-substituierte Triazol **100** zeigte ebenfalls antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* BL21(DE3), allerdings war die MHK um den Faktor 2 höher als beim Amid **99**. Das entsprechende Enantiomer *ent*-**100** zeigte eine weitere Reduktion der biologischen Aktivität um den Faktor 2, jedoch war es im Gegensatz zu dem entsprechenden Amid *ent*-**99** gegen den Wildtyp aktiv. In Bezug auf die inhibitorische Aktivität führte die Einführung einer Phenylgruppe über ein 1,4-substituiertes Triazol zu einer deutlichen Erhöhung dieser. Von allen untersuchten Verbindungen zeigte **100** den niedrigsten K_i -Wert ($K_i = 24.6$ nM). Auch das Enantiomer *ent*-**100** inhibierte *E. coli* LpxC C63A in derselben Größenordnung wie der (2*S*)-konfigurierte Ether **98** sowie das (2*S*)-konfigurierte Amid **99**. Das 1,5-substituierte Triazol **101** hingegen inhibierte lediglich den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22. Des Weiteren war die inhibitorische Aktivität der 1,5-substituierten Triazole **101** und *ent*-**101** jeweils um mehr als den Faktor 100 schlechter als die der entsprechenden 1,4-substituierten Triazole **100** bzw. *ent*-**100**.

Mit Ausnahme der methylsubstituierten Enantiomere **95** und *ent*-**95** war jeweils das (2*S*)-konfigurierte Stereoisomer das mit der höheren biologischen Aktivität. Von allen Verbindungen, die einen Phenylsubstituenten trugen, zeigte das Amid **99** die höchste antibakterielle Aktivität gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) (MHK = $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Der K_i -Wert dieser Verbindung lag in einer Größenordnung mit dem von Ether **98**. Den niedrigsten K_i -Wert und damit die höchste inhibitorische Aktivität wies das 1,4-substituierte Triazol **100** auf ($K_i = 24.6$ nM). Aus diesem Grund wurden im Folgenden sowohl über einen Ether- als auch über einen Triazol- sowie einen Amidlinker weitere Substituenten zur Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen eingeführt. Die höchste untersuchte Konzentration in den MHK-Experimenten orientierte sich dabei an der Löslichkeit des Phenylderivates mit dem entsprechenden Linkerelement.

Zunächst erfolgte die Untersuchung weiterer Etherderivate, bei denen stereoisomere Threonsäurederivate als Grundstrukturen genutzt wurden (Abb. 53).

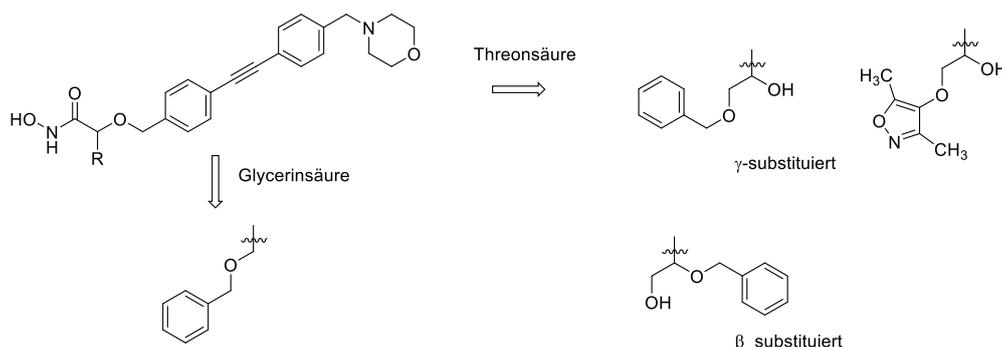
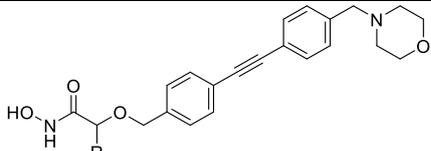
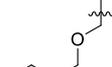
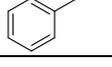
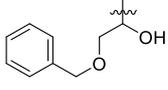
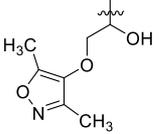
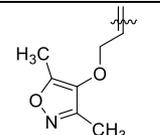
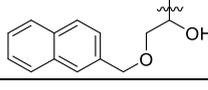
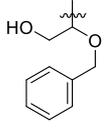


Abbildung 53: Übersicht über die untersuchten Hydroxamsäuren mit Etherfunktion in α -Position. Ausgehend von **27** erfolgte zunächst die Veretherung von Glycerinsäurederivaten. Bei weiteren Untersuchungen wurden Threonsäurederivate verethert. Dabei wurde sowohl der Substituent als auch die Position des Substituenten variiert.

Verglichen mit den Glycerinsäurederivaten **98** und *ent*-**98** zeichneten die Threonsäurederivate sich durch eine Verlängerung der Seitenkette um ein C-Atom sowie eine zusätzliche Hydroxygruppe aus. Zunächst wurde ein Benzylsubstituent über die γ -Hydroxygruppe verknüpft. Anschließend erfolgte sowohl die Untersuchung weiterer Substituenten in γ -Position als auch das Verschieben des Benzylsubstituenten auf die β -Hydroxygruppe (Tab. 22).

Tabelle 22: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem Substituenten mit Etherfunktion in α -Position. Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten erfolgte mithilfe von Agardiffusionstests und MHK-Experimenten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) (*lpxc*⁺) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 (*lpxc101*). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays.

			Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		K_i [μM]
			<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A
	Konfig.	R					
98	(2 <i>S</i>)		≤6	15.4 ± 2.4	>32	0.5	0.606 ± 0.356
<i>ent</i> -98	(2 <i>R</i>)		≤6	15.7 ± 1.2	>32	2	3.62 ± 0.64
102	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)		11.2 ± 0.8	19.5 ± 1.6	4	0.125	0.235 ± 0.179
103	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)		7.7 ± 0.6	17.8 ± 0.3	>64	1	5.01 ± 4.74
<i>ent</i> -103	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)		8.5 ± 0.6	13.3 ± 1.8	>64	4	0.745 ± 0.258
<i>ent</i> -102	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)		7.7 ± 1.2	14.0 ± 1.0	>64	2	1.16 ± 0.12
104	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)		14.9 ± 1.3	26.2 ± 1.6	16	1	0.87 ± 1.25
105	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)		7.0 ± 0.9	20.2 ± 0.8	>64	8	13.8 ± 7.0
<i>ent</i> -105	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)		≤6	19.0 ± 1.0	>64	16	3.43 ± 1.28
<i>ent</i> -104	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)		≤6	19.7 ± 0.6	>64	8	5.52 ± 1.33
106	-		≤6	15.0 ± 2.0	>64	1	4.53 ± 3.21
107	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)		≤6	12.3 ± 0.6	64	0.25	0.0549 ± 0.0184
108	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)		11.3 ± 1.6	25.7 ± 0.6	16	0.125	1.59 ± 0.62
109	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)		11.7 ± 1.6	25.0 ± 2.0	32	0.25	0.225 ± 0.046
<i>ent</i> -109	(2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)		≤6	12.3 ± 0.6	>64	4	2.84 ± 1.41
<i>ent</i> -108	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)		9.3 ± 1.6	14.3 ± 1.2	>64	1	0.664 ± 0.369

Da für die Glycerinsäurederivate **98** und *ent*-**98** eine unterschiedliche Aktivität in Abhängigkeit von der Stereochemie beobachtet werden konnte, wurden auch alle möglichen Stereoisomere der Threonsäurederivate untersucht. Als maximale Konzentration in den MHK-Experimenten wurde 64 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ gewählt, da alle Threonsäurederivate eine höhere Löslichkeit als die Glycerinsäurederivate aufwiesen. Die Untersuchung der Stereochemie erfolgte zunächst anhand von Benzylethern, welche in γ -Position eingebracht wurden. Die aktivste Verbindung war dabei das (2*S*,3*S*)-konfigurierte Stereoisomer **102**. Dieses inhibierte als einzige Verbindung das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) in MHK-Experimenten. Die minimale Hemmkonzentration gegenüber dem Wildtyp betrug 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Der K_i -Wert gegen *E. coli* LpxC C63A betrug 235 nM. Die Inversion der Konfiguration in Position 3 lieferte das am wenigsten aktive Stereoisomer **103**. Dies ging mit einer Erhöhung der MHK gegen *E. coli* D22 um den

Faktor 8 sowie einer Erhöhung des K_i -Wertes gegen *E. coli* LpxC C63A um den Faktor 20 einher. Die Inversion der Konfiguration in Position 2 lieferte die (2*R*)-konfigurierten Diastereomere *ent*-**102** und *ent*-**103**, welche unabhängig von der Stereochemie in Position 3 ähnliche biologische Aktivität zeigten. Beide Verbindungen lieferten vergleichbare Hemmhöfe gegen beide Bakterienstämme. Während die MHK des (2*R*,3*R*)-konfigurierten Stereoisomers *ent*-**102** gegen *E. coli* D22 um den Faktor 2 niedriger war als die von *ent*-**103**, war der K_i -Wert gegen *E. coli* LpxC C63A um den Faktor 2 höher.

Anschließend wurde ein Dimethylisoxazolylmethylrest als alternativer Substituent zum Benzylrest untersucht. Auch bei den Dimethylisoxazolylmethylethern inhibierte das (2*S*,3*S*)-konfigurierte Stereoisomer **104** als einziges Stereoisomer das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) in MHK-Experimenten. Im Vergleich zu den Benzylethern lag die MHK von **104** jedoch um den Faktor 4 höher als die MHK von **102**. Auch die inhibitorische Aktivität von **104** war etwas geringer ($K_i = 871$ nM) als die des Benzylethers **102**. Die Inversion der Konfiguration in Position 3 lieferte **105**. Wie zuvor **103** zeigte auch der (2*S*,3*R*)-konfigurierte Dimethylisoxazolylmethylether **105** die geringste biologische Aktivität. Dies ging ebenfalls mit einer Erhöhung der MHK gegen *E. coli* D22 um den Faktor 8 sowie einer Erhöhung des K_i -Wertes gegenüber *E. coli* LpxC C63A um den Faktor 15 einher. Die Inversion der Konfiguration in Position 2 führte wie zuvor unabhängig von der Stereochemie in Position 3 zu zwei Stereoisomeren mit einer ähnlichen biologischen Aktivität. Auch hier war die MHK des (2*R*,3*R*)-konfigurierten Stereoisomers *ent*-**104** gegen *E. coli* D22 um den Faktor 2 niedriger als die des (2*R*,3*S*)-konfigurierten Diastereomers *ent*-**105**, während zeitgleich der K_i -Wert gegen *E. coli* LpxC C63A um den Faktor 2 höher lag. Das Eliminierungsprodukt **106** wies eine biologische Aktivität auf, die mit der beider (2*R*)-konfigurierten Stereoisomere *ent*-**104** und *ent*-**105** vergleichbar war.

Ausgehend vom aktivsten Stereoisomer lieferte der Ersatz des Benzylsubstituenten durch einen 2-Naphthylmethylrest das (2*S*,3*S*)-konfigurierte Stereoisomer **107**. Dieses zeigte schwache Aktivität gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) in MHK-Experimenten ($64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Zusätzlich dazu zeigte **107** die höchste inhibitorische Aktivität aller untersuchten Threonsäurederivate ($K_i = 54.9$ nM). Der Austausch des Benzyl- durch einen 2-Naphthylmethylsubstituenten bewirkte somit eine weitere Reduktion des K_i -Wertes um den Faktor 4.

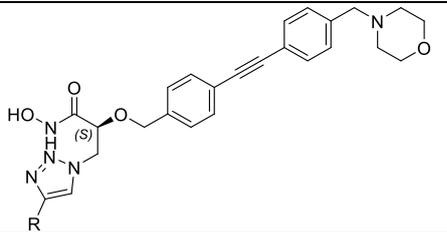
Außerdem wurde die Benzylgruppe auf die OH-Gruppe in β -Position verschoben. Dies hatte eine Änderung der biologischen Aktivität in Abhängigkeit von der Stereochemie zur Folge. Das (2*S*,3*S*)-konfigurierte Stereoisomer **108** inhibierte analog zum (2*S*,3*S*)-konfigurierten Regioisomer **102** das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3). Die MHK von **108** war jedoch um den Faktor 4 ($16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) höher. In Bezug auf die inhibitorische Aktivität bewirkte das Verschieben des Benzylethers in die β -Position bei gleichbleibender Konfiguration sogar eine Reduktion um nahezu den Faktor 10. Die Inversion der Konfiguration in Position 3, welche zuvor einen deutlichen Aktivitätsverlust zur Folge hatte, lieferte in dieser Serie von Verbindungen hingegen das aktivste Stereoisomer **109**. Während die antibakterielle Aktivität von **109** in einer Größenordnung mit der von **108** lag, bewirkte die Inversion der Konfiguration in Position 3 eine Erhöhung der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 10. Auch die Inversion der Konfiguration in Position 2, welche zuvor unabhängig von der Stereochemie in Position 3 ähnlich aktive Stereoisomere lieferte, brachte zwei Diastereomere mit unterschiedlicher Aktivität hervor. Beide (2*R*)-konfigurierten Stereoisomere zeigten keine Inhibition des Wachstums von *E. coli* BL21(DE3) in MHK-Experimenten. Sowohl die MHK gegen den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 als auch der K_i -Wert gegen *E. coli* LpxC C63A des (2*R*,3*S*)-konfigurierten Stereoisomers *ent*-**109** lagen jedoch um den Faktor 4 höher als für das (2*R*,3*R*)-konfigurierte Diastereomer *ent*-**108**. Verglichen

mit dem aktivsten Stereoisomer **109** zeigte *ent*-**109** eine Erniedrigung der inhibitorischen Aktivität um mehr als den Faktor 10.

Der Vergleich aller untersuchten Ether zeigte, dass das (2*S*,3*S*)-konfigurierte Threonsäurederivat **102** sowohl eine höhere antibakterielle als auch eine höhere inhibitorische Aktivität als das entsprechende (2*S*)-konfigurierte Glycerinsäurederivat **98** aufwies. Ausgehend vom (2*S*,3*S*)-konfigurierten Benzylether **102** führte die Inversion der Konfiguration in Position 3 zu dem am wenigsten aktiven Stereoisomer **103**. Die (2*R*)-konfigurierten Stereoisomere lieferten hingegen unabhängig von der Konfiguration in Position 3 eine ähnliche biologische Aktivität. Der Austausch des Benzyl- durch einen Dimethylisoxazolylmethylsubstituenten bewirkte eine Verbesserung der Diffusionseigenschaften, was sich in größeren Hemmhofdurchmessern im Agardiffusionstest widerspiegelte. Dennoch zeigten alle Dimethylisoxazolylmethylether sowohl niedrigere antibakterielle Aktivitäten (MHK-Experimente) als auch niedrigere inhibitorische Aktivitäten gegenüber *E. coli* LpxC C63A. Der Einfluss der Stereochemie verhielt sich dabei analog zu den Benzylethern. Das Verschieben des Substituenten von der Hydroxygruppe in γ -Position auf die Hydroxygruppe in β -Position hatte eine Änderung der biologischen Aktivität in Abhängigkeit von der Stereochemie zur Folge. Während beide (2*S*)-konfigurierten Benzylether antibakterielle Aktivität gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) aufwiesen, waren beide (2*R*)-konfigurierten Stereoisomere gegen den Wildtyp inaktiv. Ausgehend vom (2*S*,3*S*)-konfigurierten Stereoisomer führte eine Inversion der Konfiguration in Position 3 jedoch im Gegensatz zu den beiden vorherigen Serien nicht zu dem am wenigsten aktiven, sondern zu dem aktivsten Stereoisomer **109**. Der K_i -Wert dieser Verbindung lag in einer Größenordnung mit dem des aktivsten Benzylethers der ersten Serie **102**. Ebenfalls im Unterschied zur ersten Benzylether-Serie zeigten beide (2*R*)-konfigurierten Stereoisomere eine unterschiedliche biologische Aktivität. Dabei zeigte *ent*-**109** die niedrigste Aktivität und verglichen mit dem aktivsten Stereoisomer eine Erhöhung des K_i -Wertes um mehr als den Faktor 10.

Anschließend erfolgte die Untersuchung einiger 1,4-substituierter Triazole (Tab. 23).

Tabelle 23: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem 1,4-substituierten Triazolmotiv in α -Position. Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten erfolgte mithilfe von Agardiffusionstests und MHK-Experimenten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) (*lpxC*⁺) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 (*lpxC101*). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays.

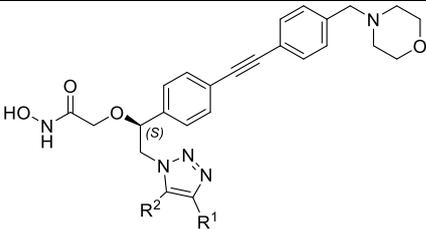
		Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		K_i [nM]
		<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A
100		9.0 ± 1.0	20.4 ± 2.2	16	0.125	24.6 ± 3.6
110	H	20.8 ± 1.8	>30	4	0.125	221 ± 54
111	CH ₃	23.7 ± 1.2	>30	4	0.063	55.2 ± 6.0
112		18.0 ± 1.0	27.3 ± 1.6	32	0.5	64.7 ± 2.8
113		12.7 ± 0.6	24.3 ± 1.2	1	0.063	3.02 ± 0.40

Ausgehend von der Leitstruktur **100** führte die Entfernung des Phenylsubstituenten zu dem in Position 4 unsubstituierten Triazol **110**. Dies hatte eine deutliche Verbesserung der Diffusionseigenschaften zur Folge, was sich in größeren Hemmhofdurchmessern äußerte. Auch die MHK gegen *E. coli* BL21(DE3) wurde um den Faktor 4 erniedrigt, die MHK gegen *E. coli* D22 war davon unbeeinflusst. Zeitgleich war die Erhöhung der antibakteriellen Aktivität jedoch mit einer Reduktion der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 10 verbunden. Die Einführung einer Methylgruppe als kleinstmöglichem Substituenten (**111**) hatte ebenfalls eine Verbesserung der Diffusions- sowie der antibakteriellen Eigenschaften zur Folge. Diese lagen in einer Größenordnung mit denen des monosubstituierten Triazols **110**. Im Gegensatz dazu bewirkte der Ersatz des Phenyl- durch einen Methylsubstituenten nur eine leichte Reduktion der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 2. Der Ersatz des Phenyl- durch einen 3-Pyridylsubstituenten lieferte **112**. Dies bewirkte verglichen mit **100** trotz besserer Diffusionseigenschaften, die in größeren Hemmhöfen resultierten, sowohl eine Reduktion der antibakteriellen als auch eine Reduktion der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 2. Der Austausch des Phenylsubstituenten durch einen Indol-3-yl-Rest lieferte die aktivste Verbindung **113**. Diese inhibierte das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) mit einer MHK von $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Auch die inhibitorische Aktivität wurde nahezu um den Faktor 10 erhöht ($K_i = 3.02 \text{ nM}$).

Der Vergleich aller untersuchten Triazole zeigte, dass alle 1,4-substituierten Triazole einen niedrigeren K_i -Wert als **110** aufwiesen. Unabhängig von der Art des Substituenten wirkte sich somit das alleinige Vorhandensein eines zusätzlichen Substituenten positiv auf die inhibitorischen Eigenschaften der Verbindung aus. Die Einführung des Methylsubstituenten bewirkte bei gleicher antibakterieller Aktivität eine Erhöhung der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 4. Die Einführung des sterisch anspruchsvolleren Phenylsubstituenten bewirkte eine Reduktion der antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli* BL21(DE3) um den Faktor 4. Zeitgleich bewirkte dies auf enzymatischer Ebene jedoch eine Erhöhung der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 10. Verglichen mit dem Phenylsubstituenten bewirkte bei gleicher sterischer Komplexität die Einführung eines Heteroatoms in Form eines Pyridinsubstituenten sowohl eine Reduktion der antibakteriellen als auch eine Reduktion der inhibitorischen Eigenschaften. Die Einführung eines Indolsubstituenten lieferte das aktivste 1,4-substituierte Triazol **113**. Dies inhibierte das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) mit einer MHK von $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ und die Aktivität von *E. coli* LpxC C63A mit einem K_i -Wert von 3.02 nM .

Zusätzlich zu den 1,4-substituierten Triazolen in α -Position zur Hydroxamsäurefunktion wurden auch (*S*)-konfigurierte Hydroxamsäuren mit Triazolmotiv in Benzylposition untersucht. Eine Untersuchung der entsprechenden (*R*)-konfigurierten Stereoisomere wurde aufgrund der Aktivitätsunterschiede zwischen **18** und *ent*-**18** nicht vorgenommen. Auch bei diesen Derivaten wurde zunächst, analog zu den phenylsubstituierten Triazolen **100** und **101**, exemplarisch das 1,4-hydroxymethylsubstituierte Triazol **114** dem 1,5-hydroxymethylsubstituierten Regioisomer **115** gegenübergestellt (Tab. 24).

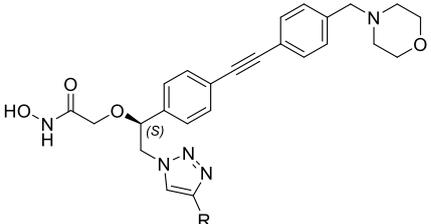
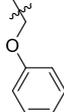
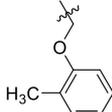
Tabelle 24: Vergleich der antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem 1,4- und 1,5-substituierten Triazolmotiv in Benzylposition. Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten erfolgte mithilfe von Agardiffusionstests und MHK-Experimenten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) (*lpxC*⁺) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 (*lpxC101*). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays.

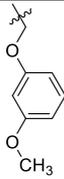
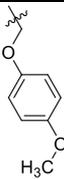
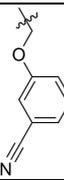
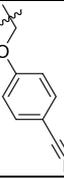
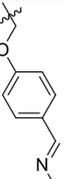
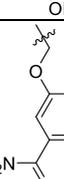
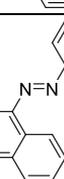
	Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		K_i [μM]		
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A		
	R ¹	R ²					
114		H	22.0 ± 0.0	>30	32	0.5	1.41 ± 0.37
115	H		19.0 ± 1.8	29.0 ± 1.0	32	0.5	1.95 ± 0.55

Sowohl das 1,4-substituierte Triazol **114** als auch sein 1,5-substituiertes Regioisomer **115** inhibierten das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) in MHK-Experimenten mit einer minimalen Hemmkonzentration von 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ und das Wachstum des defizienten Stammes *E. coli* D22 mit einer MHK von 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Auch die inhibitorische Aktivität der Regioisomere lag in einer Größenordnung ($K_i \approx 1.5 \mu\text{M}$). Somit zeigte sich im Gegensatz zu den Triazolen in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv bei den Triazolen in benzylischer Position kein Aktivitätsunterschied der Regioisomere. Beide inhibierten sowohl das Wachstum des Wildtyps als auch das Enzym *E. coli* LpxC C63A.

Anschließend erfolgte ausgehend von der 1,4-substituierten Verbindung **114** die Variation des Substituenten am Triazolring (Tab. 25).

Tabelle 25: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem 1,4-substituiertem Triazolmotiv in Benzylposition. Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten erfolgte mithilfe von Agardiffusionstests und MHK-Experimenten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) (*lpxC*⁺) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 (*lpxC101*). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten erfolgte gegen *E. coli* LpxC C63A mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays.

	Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		K_i [μM]	
	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A	
	R					
114		22.0 ± 0.0	>30	32	0.5	1.41 ± 0.37
116	CH ₃	16.7 ± 1.2	28.7 ± 1.2	16	0.25	2.49 ± 0.78
117		8.0 ± 1.0	22.0 ± 1.7	32	0.25	1.00 ± 0.16
118		≤6	16.7 ± 0.6	>16	0.25	1.54 ± 0.59

119		≤ 6	19.7 ± 1.6	> 16	0.25	0.983 ± 0.285
120		≤ 6	20.7 ± 0.6	> 16	0.125	0.519 ± 0.039
121		≤ 6	19.3 ± 0.6	> 16	0.125	0.887 ± 0.034
122		7.0 ± 1.0	20.2 ± 1.0	> 16	0.25	0.945 ± 0.254
123		≤ 6	19.0 ± 1.0	> 16	0.25	0.605 ± 0.010
124		≤ 6	20.3 ± 0.6	> 16	0.5	1.23 ± 0.16
125		8.3 ± 1.6	25.0 ± 1.8	> 16	1	1.21 ± 0.25
126		≤ 6	19.0 ± 0.9	> 16	0.125	0.856 ± 0.298
127		≤ 6	12.2 ± 1.8	> 16	0.25	0.879 ± 0.237
128		≤ 6	≤ 6	> 16	> 16	> 6.34

129		≤6	≤6	>16	>16	>6.34
130		≤6	≤6	>16	>16	>6.34
131		6.7 ± 0.6	15.3 ± 1.2	>64	4	0.442 ± 0.086
132		≤6	18.3 ± 0.6	>64	1	2.24 ± 0.50
133		7.0 ± 1.0	19.3 ± 0.6	>64	0.5	2.05 ± 0.53

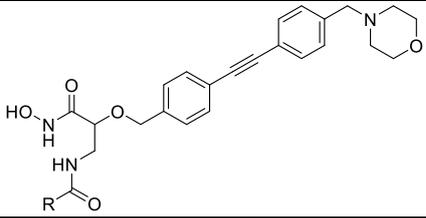
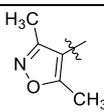
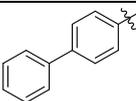
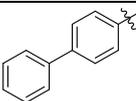
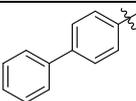
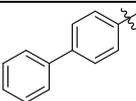
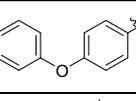
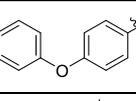
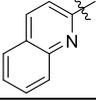
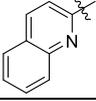
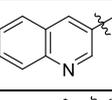
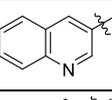
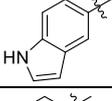
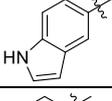
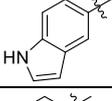
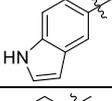
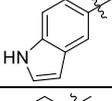
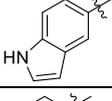
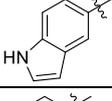
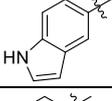
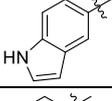
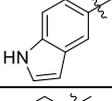
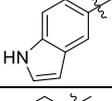
Ausgehend von **114** bewirkte der Ersatz der Hydroxymethylgruppe durch eine Methylgruppe (**116**) eine leichte Verbesserung der antibakteriellen Aktivität um den Faktor 2. **116** inhibierte das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) mit einer MHK von $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Zeitgleich bewirkte dies jedoch auch eine Reduktion der inhibitorischen Aktivität um ebenfalls den Faktor 2 ($K_i = 2.49 \mu\text{M}$). Insgesamt lag die biologische Aktivität von **114** und **116** somit in einer Größenordnung. Die Einführung eines Phenylsubstituenten über die Hydroxygruppe von **114** führte zu Phenylether **117**. Auch dieser zeigte schwache Inhibition des Wachstums von *E. coli* BL21(DE3), die inhibitorische Aktivität lag in einer Größenordnung mit der der vorherigen Verbindungen. Anschließend erfolgte die Einführung weiterer kleiner Substituenten am Phenylring von **117**. Unabhängig von der Art und der Position des Substituenten bewirkte dies eine Reduktion der Löslichkeit, sodass die maximale Konzentration in den MHK-Experimenten $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ betrug. Die Einführung eines Methylsubstituenten in *o*-Position führte zu **118**, die eines Methoxysubstituenten in *m*-Position zu **119** und die eines Methoxysubstituenten in *p*-Position zu **120**. Keine der drei Verbindungen zeigte antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* BL21(DE3). Die antibakteriellen Aktivitäten gegen *E. coli* D22 sowie die inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A lagen in einer Größenordnung mit denen des unsubstituierten Phenylethers **117**. Der Ersatz des Methoxysubstituenten durch eine Cyanogruppe lieferte das *m*-substituierte Nitril **121** sowie das *p*-substituierte Nitril **122**. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die biologische Aktivität. Anschließend erfolgte eine weitere Derivatisierung der Cyanogruppe. Dabei wurden durch Derivatisierungsreaktionen das Oxim **123** sowie die Amidoxime **124** und **125** erhalten. Auch diese Modifikationen hatten keinen Einfluss auf die biologische Aktivität. Auch der Austausch des Substituenten durch eine Nitrogruppe in *p*-Position (**126**) hatte keinen Einfluss auf die biologische Aktivität. Anschließend wurde ein größerer Substituent eingeführt, indem der Phenylring durch einen Naphthylrest ausgetauscht wurde (**127**). Verglichen mit dem unsubstituierten Phenylether **117** bewirkte

dies eine Reduktion der Löslichkeit, gepaart mit einem Verlust der antibakteriellen Aktivität, gegen *E. coli* BL21(DE3). Die antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* D22 sowie die inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A wurde davon jedoch nicht beeinflusst. Die zusätzliche Einführung photoaktivierbarer Gruppen führte zu den Azo-Verbindungen **128**, **129** und **130**. Dies bewirkte bei allen Verbindungen einen vollständigen Verlust der antibakteriellen sowie der inhibitorischen Aktivität. Zuletzt wurden 3-Thienylether untersucht. Der Austausch des Phenylrings durch einen Thienylrest bewirkte eine erneute Erhöhung der Löslichkeit, sodass die maximale Konzentration in den MHK-Experimenten $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ betrug. Die Einführung einer Carboxygruppe lieferte dabei Carbonsäure **131**, die einer Methoxycarbonylgruppe Ester **132** und die einer Hydroxamsäuregruppe Verbindung **133**. Alle drei Verbindungen wiesen tendenziell eine höhere MHK als die Phenylether gegen *E. coli* D22 auf. Carbonsäure **131** zeigte dabei unter Vernachlässigung der inaktiven Azo-Verbindungen die höchste MHK aller 1,4-substituierten Triazole in Benzylposition ($4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Zeitgleich wies **131** jedoch auch den niedrigsten K_i -Wert dieser Serie auf ($K_i = 442 \text{ nM}$). Der Austausch der Carboxygruppe durch eine Esterfunktion bzw. durch eine Hydroxamsäure führte sowohl zu einer Erhöhung der antibakteriellen als auch zu einer Erniedrigung der inhibitorischen Aktivität.

Der Vergleich aller Benzyloxyessigsäurederivate mit 1,4-substituiertem Triazolmotiv in Benzylposition zeigte, dass abgesehen von **114** und **116** lediglich der unsubstituierte Phenylether **117** antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* BL21(DE3) aufwies. Im Agardiffusionstest war der Hemmhofdurchmesser von **117** jedoch deutlich geringer als die von **114** und **116**. Dies lässt sich vermutlich durch bessere Diffusionseigenschaften dieser Verbindungen begründen. Die Einführung weiterer Substituenten am Phenylring von Phenylether **117** führte unabhängig von der Art und der Position des Substituenten zu einer Reduktion der Löslichkeit, gepaart mit Inaktivität gegen *E. coli* BL21(DE3) bei der maximal erreichbaren Konzentration ($16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Sowohl die MHK gegen den defizienten Stamm *E. coli* D22 als auch die inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A ($K_i \approx 1.0 \mu\text{M}$) lagen jedoch in einer Größenordnung mit denen des unsubstituierten Phenylethers **117** sowie der Leitstruktur **114**. Der Ersatz des Phenyl- durch einen Naphthylsubstituenten (**127**) bewirkte ebenfalls eine Reduktion der Löslichkeit in Kombination mit Inaktivität gegen *E. coli* BL21(DE3) bei der maximal löslichen Konzentration ($16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Die MHK gegen *E. coli* D22 sowie der K_i -Wert gegen *E. coli* LpxC C63A lag in einer Größenordnung mit den vorherigen Verbindungen. Die Einführung verschiedener Azosubstituenten am Naphthylring bewirkte einen Verlust der antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli* D22 sowie der inhibitorischen Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A. Der Ersatz des Phenylsubstituenten durch einen substituierten Thienylrest bewirkte eine Erhöhung der Löslichkeit. Dennoch zeigten diese Verbindungen keine Aktivität gegen *E. coli* BL21(DE3) und tendenziell niedrigere Aktivität gegen *E. coli* D22. Auf enzymatischer Ebene lag die inhibitorische Aktivität hingegen in einer Größenordnung mit der der Phenylether. Den niedrigsten K_i -Wert aller untersuchten Verbindungen wies das Thiophenderivat **131** auf ($K_i = 442 \text{ nM}$), den höchsten K_i -Wert wies ebenfalls ein Thiophenderivat, Ester **132**, auf ($K_i = 2.24 \mu\text{M}$). Verglichen mit den Hydroxamsäuren mit Triazolmotiv in α -Position zeigten alle Derivate mit Triazolmotiv in Benzylposition eine deutlich niedrigere inhibitorische Aktivität.

Zuletzt erfolgte anhand von Amidderivaten die systematische Untersuchung einer Vielzahl von Fragmenten, die die UDP-Bindetasche adressieren sollten. Hierbei erfolgte die Einführung der Fragmente über die α -Position zum Hydroxamsäuremotiv (Tab. 26).

Tabelle 26: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem Amidmotiv in α -Position. Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten erfolgte mithilfe von Agardiffusionstests und MHK-Experimenten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3 (*lpxC*⁺) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 (*lpxC101*). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten erfolgte gegen *E. coli* LpxC C63A mithilfe des fluoreszenz-basierten LpxC-Enzymassays.

			Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		K_i [nM]
			<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A
	Konfig.	R					
99	(2 <i>S</i>)		15.7 ± 1.6	26.3 ± 1.5	8	0.125	149 ± 56
<i>ent</i> -99	(2 <i>R</i>)		9.7 ± 0.6	18.0 ± 2.0	>16	4	2560 ± 1080
134	(2 <i>S</i>)		20.8 ± 1.1	>30	16	0.125	127 ± 40
135	(2 <i>S</i>)		≤6	11.2 ± 2.9	>16	0.125	>2540
<i>ent</i> -135	(2 <i>R</i>)		≤6	≤6	>16	>16	>2540
136	(2 <i>S</i>)		≤6	19.0 ± 1.5	>16	0.125	41.5 ± 5.7
<i>ent</i> -136	(2 <i>R</i>)		≤6	≤6	>16	>16	>2540
137	(2 <i>S</i>)		≤6	9.3 ± 1.6	>16	0.25	323 ± 126
<i>ent</i> -137	(2 <i>R</i>)		≤6	≤6	>16	>16	>2540
138	(2 <i>S</i>)		≤6	16.0 ± 2.5	>16	0.25	377 ± 83
<i>ent</i> -138	(2 <i>R</i>)		≤6	12.7 ± 1.6	>16	8	>2540
139	(2 <i>S</i>)		11.5 ± 2.1	29.0 ± 1.0	>16	0.25	117 ± 21
<i>ent</i> -139	(2 <i>R</i>)		≤6	10.3 ± 1.2	>16	>16	>2540
140	(2 <i>S</i>)		20.0 ± 1.0	29.0 ± 1.6	2	0.031	9.45 ± 1.01
<i>ent</i> -140	(2 <i>R</i>)		≤6	11.7 ± 1.2	>16	16	1150 ± 317
141	(2 <i>S</i>)		20.4 ± 1.6	>30	4	0.031	15.3 ± 3.6
142	(2 <i>S</i>)		10.0 ± 1.0	23.0 ± 1.0	8	0.063	87.0 ± 58.5
<i>ent</i> -142	(2 <i>R</i>)		≤6	9.0 ± 1.0	>16	16	>2540
19	(2 <i>S</i>)		19.7 ± 1.6	29.3 ± 1.6	1	0.031	10.7 ± 1.2
<i>ent</i> -19	(2 <i>R</i>)		≤6	13.3 ± 1.0	>16	4	1580 ± 216
143	(2 <i>S</i>)		23.3 ± 0.6	>30	4	0.063	97.1 ± 9.4
144	(2 <i>S</i>)		24.7 ± 0.6	>30	4	0.063	80.9 ± 9.0
145	(2 <i>S</i>)		11.3 ± 1.6	24.5 ± 1.8	8	0.063	85.2 ± 21.7
<i>ent</i> -145	(2 <i>R</i>)		≤6	9.7 ± 1.3	>16	>16	>2540

Als maximale Konzentration in den MHK-Experimenten wurde basierend auf den Linker-untersuchungen 16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ gewählt. Hierbei wurde jeweils das (*S*)-konfigurierte Enantiomer dem (*R*)-

konfigurierten Stereoisomer gegenübergestellt. Dabei zeigte sich, dass unabhängig von dem Substituenten jeweils das (*S*)-konfigurierte Stereoisomer die höhere biologische Aktivität aufwies. Die Leitstruktur bei der Untersuchung der Amide war Benzamid **99**. Dieses inhibierte in MHK-Experimenten das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) mit einer MHK von $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ und das Wachstum des defizienten Stammes *E. coli* D22 mit einer MHK von $0.125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Der K_i -Wert betrug 149 nM . *Ent-99* zeigte zwar ebenfalls (kleinere) Hemmhöfe gegen beide Bakterienstämme, inhibierte in MHK-Experimenten jedoch lediglich das Wachstum von *E. coli* D22. Der K_i -Wert von *ent-99* lag um den Faktor 20 höher als der des entsprechenden Enantiomers **99**. Analog zur Untersuchung der Tetrosederivate, welche einen Etherlinker aufwiesen, erfolgte auch bei den Amiden ein Ersatz des Phenylrings durch einen Dimethylisoxazolylsubstituenten (**134**). Auch unter Verwendung eines Amides als Linkerelement führte dieser Austausch zu größeren Hemmhöfen aufgrund besserer Diffusionseigenschaften. Im Gegensatz zu den Tetrosederivaten konnte jedoch keine Reduktion der biologischen Aktivität beobachtet werden. Sowohl die MHK als auch der K_i -Wert von **134** lagen in einer Größenordnung mit den Werten für Benzamid **99**. Die Einführung eines Biphenylsubstituenten lieferte die Regioisomere **135** und **136**. Verglichen mit dem Benzamid **99** führte die Einführung eines weiteren Phenylsubstituenten in Position 4 zu **135**, die Einführung eines weiteren Phenylsubstituenten in Position 3 zu **136**. Während dies keinen Einfluss auf die antibakterielle Aktivität gegenüber *E. coli* D22 hatte, konnte für beide Regioisomere ein Verlust der antibakteriellen Aktivität gegenüber dem Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) beobachtet werden. Bezogen auf die inhibitorische Aktivität zeigte sich ein deutlicher Aktivitätsunterschied der Regioisomere. Während **135** keine inhibitorische Aktivität gegenüber *E. coli* LpxC C63A aufwies ($K_i > 2.54 \mu\text{M}$), konnte für **136** verglichen mit Benzamid **99** eine Erhöhung der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 3 ($K_i = 41.5 \text{ nM}$) beobachtet werden. Beide Enantiomere *ent-135* und *ent-136* zeigten weder antibakterielle Aktivität gegen den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 noch inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A. Die Einführung eines weiteren Phenylsubstituenten in Position 3 über einen Etherlinker (**137**) bewirkte zwar ebenfalls einen vollständigen Verlust der antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli* BL21(DE3), jedoch nur einen leichten Aktivitätsverlust gegen *E. coli* D22 sowie gegen *E. coli* LpxC C63A. Sowohl die MHK als auch der K_i -Wert lagen, verglichen mit dem Benzamid **99**, um den Faktor 2 höher. *Ent-137* zeigte ebenfalls weder inhibitorische noch antibakterielle Aktivität. Auch bei der Einführung eines Chinolin-substituenten konnte ein leichter Aktivitätsunterschied der Regioisomere beobachtet werden. Dabei lieferte die Verknüpfung zum Amid über Position 2 des Chinolinrestes **138** und die Verknüpfung über Position 3 **139**. Während in MHK-Experimenten weder **138** noch **139** das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) inhibieren konnte, zeigte **139** einen kleinen Hemmhof gegen den Wildtyp im Agar-diffusionstest. Bezogen auf die inhibitorische Aktivität lagen beide Regioisomere in einer Größenordnung mit dem Benzamid **99**. Analog zur antibakteriellen Aktivität lag auch hier der K_i -Wert von **139** etwas niedriger als der von **138**. Beide Enantiomere *ent-138* und *ent-139* zeigten keine inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A. Auch die Einführung eines Indolsubstituenten lieferte mehrere Regioisomere. Alle vier inhibierten auf antibakterieller Ebene das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) in MHK-Experimenten sowie auf enzymatischer Ebene *E. coli* LpxC C63A. Auch hier konnte ein leichter Aktivitätsunterschied der Regioisomere beobachtet werden. Bezogen auf die MHK gegen *E. coli* BL21(DE3) betrug dieser je eine Verdünnungsstufe (Faktor 2; Indol-3-carboxamid **19** < Indol-5-carboxamid **140** < Indol-4-carboxamid **141** < Indol-2-carboxamid **142**). Auch in Bezug auf die inhibitorische Aktivität zeigten **19** und **140** die höchste Aktivität. Der K_i -Wert dieser beiden Indole lag dabei in einer Größenordnung ($K_i \approx 10 \text{ nM}$). Auch die Enantiomere *ent-19* und *ent-140* zeigten trotz

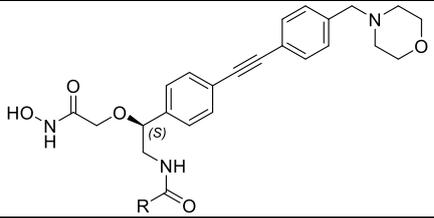
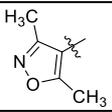
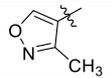
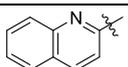
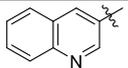
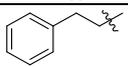
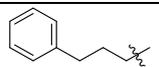
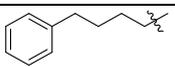
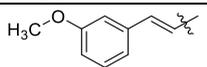
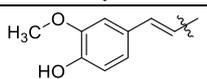
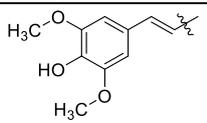
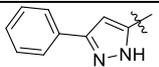
fehlender antibakterieller Aktivität gegen den Wildtyp inhibitorische Aktivität gegenüber *E. coli* LpxC C63A, diese war jedoch um den Faktor 100 geringer als die der Enantiomere. Ebenfalls analog zur antibakteriellen Aktivität zeigte **142** die niedrigste inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A. Der K_i -Wert dieses Indols lag wie die MHK gegen *E. coli* BL21(DE3) um den Faktor 8 höher als der von **19**. Im Gegensatz dazu zeigte *ent*-**142** keine inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A. Die Einführung eines Pyrrolsubstituenten (**143**) sowie die Einführung eines Pyrazolsubstituenten (**144**) lieferte zwei Verbindungen mit ähnlicher biologischer Aktivität. Beide inhibierten das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) mit einer minimalen Hemmkonzentration von $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Der K_i -Wert beider Substanzen lag in einer Größenordnung mit dem des am wenigsten aktiven Indols **142**. Die Einführung eines zusätzlichen Phenylrings am Pyrazolsubstituenten (**145**) bewirkte eine leichte Reduktion der antibakteriellen Aktivität bei gleichbleibender inhibitorischer Aktivität. Das Enantiomer *ent*-**145** hingegen zeigte weder antibakterielle Aktivität gegen den defizienten Stamm *E. coli* D22 noch inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A.

Der Vergleich aller untersuchten Amide zeigte, dass es sich bei den (*S*)-konfigurierten Enantiomeren um die Eutomere handelt. Keines der untersuchten (*R*)-konfigurierten Stereoisomere war in der Lage, das Wachstum des Wildtyps *E. coli* BL21(DE3) in MHK-Experimenten zu inhibieren. Auch in Bezug auf die inhibitorische Aktivität war der K_i -Wert der (*S*)-konfigurierten Verbindungen mindestens um den Faktor 10 niedriger als der des jeweiligen Enantiomers.

Ausgehend von Benzamid **99** wurden sowohl für Biphenyl- als auch für Chinolin- und Indolsubstituenten verschieden Regioisomere untersucht. Dabei konnte für alle Substituenten ein deutlicher Aktivitätsunterschied der Regioisomere gezeigt werden. Dies zeigte, dass für die Weiterentwicklung von LpxC-Inhibitoren in Richtung UDP-Bindetasche die Identifikation eines geeigneten Fragmentes nicht ausreicht, sondern auch die Position der Verknüpfung dieses Fragmentes von essentieller Bedeutung ist. Bei den aktivsten Verbindungen dieses Screenings handelte es sich um zwei Indole, Indol-3-carboxamid **19** und Indol-5-carboxamid **140**. Beide inhibierten das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) mit einer MHK von $1\text{--}2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ und *E. coli* LpxC C63A mit einem K_i -Wert von ca. 10 nM. Indol-4-carboxamid **141** zeigte sowohl eine niedrigere antibakterielle als auch eine niedrigere inhibitorische Aktivität. Trotzdem war dies die drittaktivste Verbindung aller untersuchten Amide. Auf antibakterieller Ebene waren neben den Indolen das Pyrrol **143** sowie das Pyrazol **144** die aktivsten Verbindungen. Die MHK dieser Verbindungen lag dabei in einer Größenordnung mit der der drittaktivsten Verbindung **141**. Auf enzymatischer Ebene hingegen zeigte Biphenylderivat **136** eine hohe inhibitorische Aktivität. Der K_i -Wert dieser Verbindung war ebenfalls vergleichbar mit dem der drittaktivsten Verbindung **141**.

Analog zu den 1,4-substituierten Triazolen erfolgte auch für die Amide die Untersuchung von Verbindungen mit einer Acylaminomethylgruppe in Benzylposition. Auch hier wurden aufgrund der Aktivitätsunterschiede von **18** und *ent*-**18** lediglich die (*S*)-konfigurierten Enantiomere untersucht (Tab. 27).

Tabelle 27: Übersicht über die antibakteriellen sowie inhibitorischen Eigenschaften von Hydroxamsäuren mit einem Amidmotiv in Benzylposition. Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten erfolgte mithilfe von Agardiffusionstests und MHK-Experimenten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3 (*lpxC*⁺) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 (*lpxC101*). Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten erfolgte gegen *E. coli* LpxC C63A mithilfe des fluoreszenz-basierten LpxC-Enzymassays.

		Hemmhof [mm]		MHK [µg · mL ⁻¹]		K _i [nM]
		<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A
	R					
146 [90]		12.0 ± 0.0	24.5 ± 0.6	16	0.25	393 ± 140
147 [90]		16.5 ± 0.9	27.3 ± 1.2	32	0.5	989 ± 317
148		13.0 ± 1.0	27.2 ± 1.9	64	0.5	2.77 ± 1.32
149	CH ₃	18.0 ± 2.2	>30	32	0.25	3880 ± 319
150		7.3 ± 0.6	16.0 ± 1.0	>16	0.063	401 ± 113
151		≤6	18.0 ± 1.7	>16	0.25	623 ± 3
152		9.3 ± 1.8	24.3 ± 1.2	>16	0.063	360 ± 164
153		≤6	20.7 ± 0.6	>16	0.125	763 ± 266
154		≤6	18.3 ± 1.2	>16	0.125	801 ± 18
155		8.7 ± 1.6	18.3 ± 0.6	8	0.031	70.2 ± 54.2
156		8.3 ± 1.6	21.8 ± 1.8	16	0.25	86.8 ± 17.0
157		≤6	19.3 ± 1.2	>16	1	198 ± 51
158		≤6	16.7 ± 1.6	16	0.063	150 ± 34

Analog zu den Amidin in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv war auch in Benzylposition die Leitstruktur das entsprechende Benzamid **146**. Dieses zeigte sowohl in Bezug auf die antibakteriellen als auch in Bezug auf die inhibitorischen Eigenschaften eine ähnliche Aktivität wie das in α -Position substituierte Regioisomer **99**. Dabei inhibierte es das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) mit einer MHK von 16 µg · mL⁻¹ und *E. coli* LpxC C63A mit einem K_i-Wert von 393 nM. Der Austausch des Phenylsubstituenten durch einen Dimethylisoxazolylsubstituenten lieferte **147**. Dies führte zwar aufgrund besserer Diffusionseigenschaften zu größeren Hemmhöfen im Agardiffusionstest, allerdings zeigte sich wie bei den Tetrosederivaten mit Etherlinker sowohl eine Reduktion der antibakteriellen als auch eine Reduktion der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 2. Die Entfernung einer Methylgruppe am Isoxazolylrest lieferte **148**. Auch dies bewirkte eine weitere Reduktion der antibakteriellen sowie der

inhibitorischen Aktivität um den Faktor 2. Der Austausch des Phenylrings durch einen Methylrest (**149**) bewirkte ebenfalls eine Verbesserung der Diffusionseigenschaften. **149** zeigte bei nahezu gleicher antibakterieller Aktivität im MHK-Experiment deutlich größere Hemmhöfe im Agardiffusionstest als **146**. Auf enzymatischer Ebene führte der Austausch des Phenylsubstituenten durch einen Methylsubstituenten jedoch zu einer Reduktion der inhibitorischen Aktivität um den Faktor 10. Die Einführung des sterisch anspruchsvolleren Chinolinsubstituenten führte zu einer Reduktion der Löslichkeit, gepaart mit einem Verlust der antibakteriellen Aktivität bei der höchstmöglichen zu testenden Konzentration. Dabei lieferte die Verknüpfung zur Amidgruppe über Position 2 des Chinolinrestes **50** und die Verknüpfung über Position 3 **51**. Analog zu den in α -Position substituierten Regioisomeren konnte auch bei den in Benzylposition substituierten Verbindungen ein leichter Aktivitätsunterschied der Regioisomere beobachtet werden. Während in α -Position des Hydroxamsäuremotivs lediglich das über Position 3 verknüpfte Amid **139** schwache Aktivität gegen *E. coli* BL21(DE3) zeigte, zeigte in benzyli-scher Position lediglich das über Position 2 verknüpfte Amid **150** schwache antibakterielle Aktivität. Bezogen auf die inhibitorische Aktivität lagen beide Regioisomere in einer Größenordnung mit Benzamid **146**. Analog zur antibakteriellen Aktivität lag auch hier der K_i -Wert von **150** etwas niedriger als der von **151**. Anschließend erfolgte unter Beibehaltung des Phenylrings die Einführung einer Alkylkette zwischen der Amidgruppe und dem Aromaten. Dabei lieferte die Verwendung eines Phenylethylsubstituenten **152**, die Einführung eines Phenylpropylsubstituenten **153** und die Verwendung eines Phenylbutylsubstituenten **154**. Während **152** leichte Aktivität gegen *E. coli* BL21(DE3) zeigte, waren sowohl **153** als auch **154** gegen den Wildtyp inaktiv. Verglichen mit dem Benzamid **146** war die minimale Hemmkonzentration gegen *E. coli* D22 von **152** um den Faktor 4, die MHK von **153** und **154** je um den Faktor 2 niedriger. In Bezug auf die inhibitorische Aktivität lag **152** in einer Größenordnung mit Benzamid **146**. Analog zur antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli* D22 war auch hier der K_i -Wert von **153** und **154** jeweils ca. um den Faktor 2 höher. Ausgehend von **153** wurden durch Einführung einer Doppelbindung verschiedene Zimtsäurederivate erhalten. Diese unterschieden sich durch ihre zusätzlichen Substituenten am Phenylring in ihrer sterischen Komplexität. Die Einführung einer Methoxygruppe in *m*-Position lieferte **155**, die zusätzliche Einführung einer Hydroxygruppe in *p*-Position **156** und die zusätzliche Einführung einer weiteren Methoxygruppe in der zweiten *m*-Position **157**. Sowohl **155** als auch **156** zeigten antibakterielle Aktivität gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3). Auch die inhibitorische Aktivität beider Substanzen war ca. um den Faktor 5 höher als die der Leitstruktur **146**. Dabei war **155** die aktivste Substanz dieser Serie von Amid- und inhibierte das Wachstum des Wildtyps mit einer MHK von $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ sowie *E. coli* LpxC C63A mit einem K_i -Wert von 70.2 nM. Die Einführung der zweiten Methoxygruppe (**157**) hingegen bewirkte einen Verlust der antibakteriellen Aktivität gegen den Wildtyp sowie eine Reduktion der antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli* D22. Auch die inhibitorische Aktivität von **157** war etwas niedriger als die von **155** und **156**, lag jedoch in einer Größenordnung mit der von Benzamid **146**. Die Einführung eines Phenylpyrazolylsubstituenten lieferte **158**, welches sowohl vergleichbare antibakterielle als auch vergleichbare inhibitorische Eigenschaften wie Benzamid **146** aufwies.

Verglichen mit den in α -Position substituierten Verbindungen zeigte Benzamid **146** ähnliche antibakterielle und inhibitorische Aktivität wie das Regioisomer **99**. Dies konnte auch für das Dimethylisoxazolylderivat **147** (vgl. **134**) sowie das Phenylpyrazolderivat **158** (vgl. **145**) beobachtet werden. Dabei lag jedoch die MHK des Amides in benzyli-scher Position gegen *E. coli* BL21(DE3) jeweils um den Faktor 2 höher als für das Amid in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv. Auch die

K_i -Werte der Amide in benzylicher Position lagen etwas höher. Die Einführung des sterisch anspruchsvollen Chinolinsubstituenten lieferte gegenläufige Ergebnisse. Während bei den in α -Position substituierten Verbindungen lediglich das über Position 3 verknüpfte Amid **139** antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* BL21(DE3) aufwies, zeigte bei Substitution in Benzylposition lediglich das über Position 2 verknüpfte Chinolinderivat **150** antibakterielle Aktivität gegen den Wildtyp. Auch die K_i -Werte dieser Verbindungen lagen niedriger als die der Regioisomere **135** und **151**. Von den neu eingeführten Substituenten zeigte keiner eine höhere biologische Aktivität als die Indole in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv.

5.2 Übertragung der entwickelten Testsysteme auf weitere Enzyme der Lipid A-Biosynthese

Nach der Entwicklung verschiedener LpxC-Enzymassays anhand von *E. coli* LpxC C63A sollte die Untersuchung potentieller LpxC-Inhibitoren auf das Enzym einer weiteren Bakterienart ausgedehnt werden. Hierfür wurde *P. aeruginosa* ausgewählt, da diese Bakterien zu den Keimen gehören, gegen die laut WHO Antibiotika mit höchster Priorität neu entwickelt werden müssen. Des Weiteren sollte die Acyltransferase LpxA aus *E. coli* als alternatives Target in Bezug auf die Inhibition der Lipid A-Biosynthese in einem SPR-basierten Assay untersucht werden. Zusätzlich dazu wurden die verschiedenen Enzymassays hinsichtlich ihrer Eignung zur Identifizierung von Inhibitoren der Lipid A-Biosynthese evaluiert.

5.2.1 Die bakterielle Deacetylase *P. aeruginosa* LpxC

Auch die bakterielle Deacetylase LpxC von *P. aeruginosa* katalysiert den Schlüsselschritt der Lipid A-Biosynthese in dieser Bakterienart: die irreversible Deacetylierung von UDP-3-O-[(R)-3-Hydroxydecanoyl]-N-acetylglucosamin (**159**). Verglichen mit *E. coli* LpxC (C63A) weist das natürliche Substrat von *P. aeruginosa* LpxC eine um vier C-Atome verkürzte Fettsäurekette auf. Des Weiteren weist *P. aeruginosa* LpxC keine Bindungsstelle für ein inhibitorisches Zn²⁺-Ion auf. Dies ermöglichte es, das Wildtypenzym im Enzymassay auch bei hohen Zinkkonzentrationen zu verwenden.

I. Proteinexpression und -aufreinigung

Zur Expression von *P. aeruginosa* LpxC wurde das Plasmid pWY427 mittels Hitzeschocktransformation in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Anschließend wurden aufgrund der für *E. coli* LpxC C63A beobachteten Toxizität auf die Bakterienzellen verschiedene Testexpressionen durchgeführt. Hierbei wurde zum einen der Einfluss von Glucose, zum anderen der Einfluss der zur Induktion verwendeten IPTG-Konzentration auf die Expression überprüft (Abb. 54).

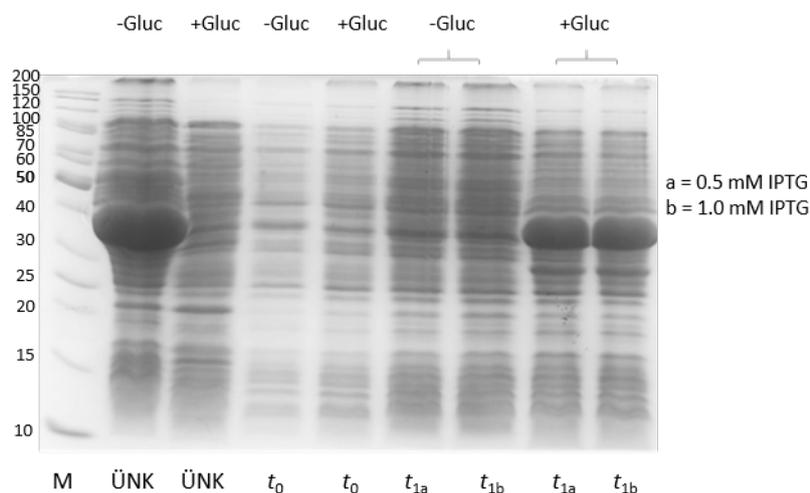


Abbildung 54: Analyse der Testexpressionen von *P. aeruginosa* LpxC mithilfe von 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgelen. Die Proteinexpression erfolgte jeweils für 2.5 h bei 37 °C, die Induktion erfolgte jeweils bei $OD_{600} = 0.6$. Dabei wurde sowohl der Glucosegehalt in den Expressionsansätzen als auch die zur Induktion verwendete IPTG-Konzentration variiert. Bahn 1 = Marker (M), Bahn 2–3 = Übernachtskulturen in An- bzw. Abwesenheit von 0.5% Glucose, Bahn 4–5 = t_0 in An- bzw. Abwesenheit von Glucose, Bahn 6–9 = t_1 in An- bzw. Abwesenheit von Glucose. a = Induktion durch 0.5 mM IPTG, b = Induktion durch 1 mM IPTG.

Die Übernachtskultur, die in Abwesenheit von Glucose kultiviert wurde, zeigte eine hohe basale LpxC-Expression. Dies konnte durch das Vorhandensein einer intensiven Bande zwischen 30–40 kDa nachgewiesen werden. In der Hauptkultur konnte jedoch weder durch Zugabe von 0.5 mM IPTG noch durch

Zugabe von 1 mM IPTG eine LpxC-Überexpression induziert werden. Beide Bahnen auf dem SDS-Gel zeigten keine Bande auf der für LpxC erwarteten Höhe (MW: 33.4 kDa). Die Übernachtskultur, die in Anwesenheit von 0.5% Glucose kultiviert wurde, zeigte hingegen keine basale LpxC-Expression und stattdessen eine starke LpxC-Überexpression in der Hauptkultur. Diese Überexpression war unabhängig von der IPTG-Konzentration, die zur Induktion verwendet wurde. Dies zeigte, dass auch für die Expression von *P. aeruginosa* LpxC eine Katabolitrepession erforderlich ist. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss aller Testexpressionen unter Verwendung von zwei verschiedenen Bedingungen, die auf Literaturbedingungen basierten (Abb. 55).^[91]

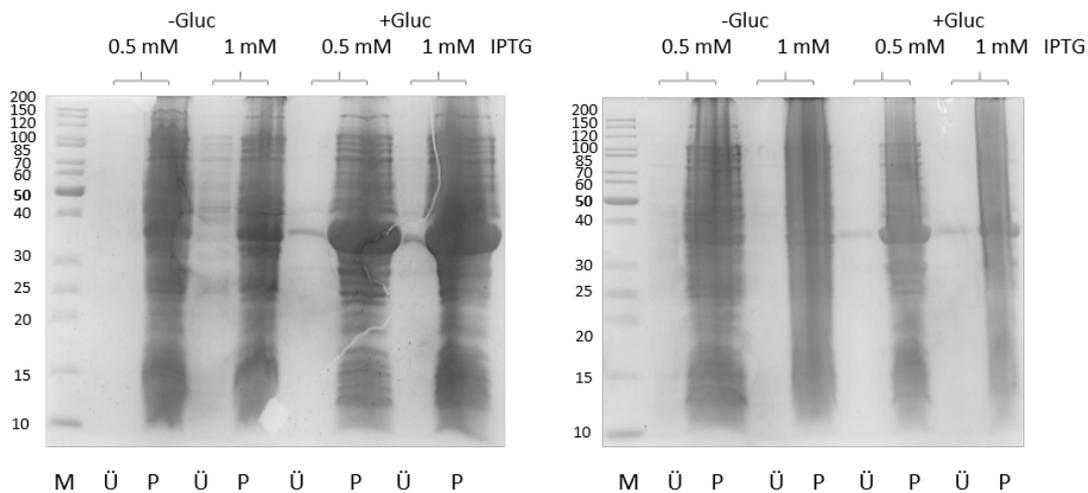


Abbildung 55: Analyse der Zellaufschlüsse der zuvor durchgeführten Testexpressionen von *P. aeruginosa* LpxC mithilfe von 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgelen. Links: Verwendung eines 20 mM Phosphatpuffers (pH = 7.0), rechts: Verwendung eines 10 mM Phosphatpuffers (pH = 7.0), dem zusätzlich noch 1 mM EDTA hinzugefügt wurde. Gezeigt sind paarweise der Überstand (Ü) sowie das Zellpellet (P) nach dem Zellaufschluss in Abhängigkeit von der IPTG-Konzentration, mit der die jeweilige Proteinexpression durchgeführt wurde. Des Weiteren zeigt auf beiden Gelen jeweils Bahn 1 den Marker (M), Bahn 2–5 die Proben der Durchführung der Proteinexpressionen in Abwesenheit von Glucose und Bahn 6–9 die Proben der Proteinexpressionen in Anwesenheit von 0.5% Glucose.

Unabhängig von dem für den Zellaufschluss gewählten Puffer zeigte sich auf beiden SDS-Gelen ein identisches Bild. In Abwesenheit von Glucose war, wie anhand des vorherigen SDS-Gels zu erwarten war, weder im Überstand noch im Pellet eine Bande zwischen 30–40 kDa zu beobachten. In Anwesenheit von Glucose zeigte sich hingegen eine deutliche Bande auf der für LpxC erwarteten Höhe. Allerdings war im Überstand kaum lösliches Enzym zu beobachten. Nahezu das gesamte Enzym befand sich im Zellpellet. Aus diesem Grund wurde im Folgenden eine Optimierung der Expressionsbedingungen durchgeführt, um die Löslichkeit des LpxC-Enzyms zu erhöhen. Dabei wurden folgende Parameter variiert: die optische Dichte der Bakterienkultur zum Zeitpunkt der Induktion, die Temperatur während der Expression sowie in Abhängigkeit von der Temperatur die Dauer der Expression, die zur Induktion verwendete IPTG-Konzentration sowie die Konzentration des Cofaktors Zn^{2+} . Zunächst wurde unter Durchführung einer Katabolitrepession die Proteinexpression für 17 Stunden bei 25 °C durchgeführt. Die Induktion erfolgte dabei durch Zugabe von 0.5 mM IPTG bei einer optischen Dichte von 0.3–0.6 (Abb. 56).

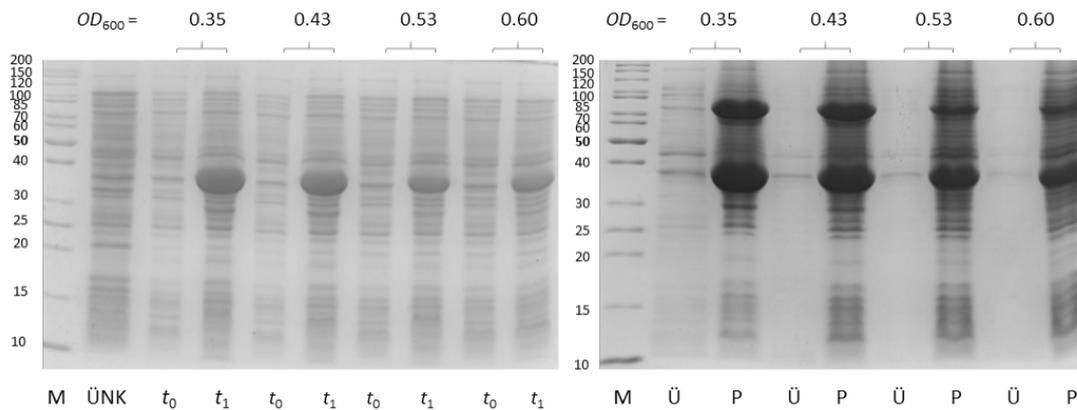


Abbildung 56: Analyse der Variation der OD_{600} während der Induktion bei der Expression von *P. aeruginosa* LpxC mithilfe von 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgelen. Die Proteinexpression erfolgte bei allen Ansätzen in Anwesenheit von Glucose (0.5%) für 17 h bei 25 °C. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG (0.5 mM) und $ZnCl_2$ (0.1 mM). Links: Testexpressionen, rechts: Testaufschlüsse. Gezeigt sind auf beiden Gelen je paarweise t_0 und t_1 bzw. der Überstand (Ü) und das Pellet (P) in Abhängigkeit von der OD_{600} zum Induktionszeitpunkt. Links: Bahn 1 = Marker (M), Bahn 2 = ÜNK, Bahn 3–4, Bahn 5–6, Bahn 7–8 und Bahn 9–10 = paarweise t_0 und t_1 mit zunehmender OD_{600} zum Induktionszeitpunkt. Rechts: Bahn 1 = Marker (M), Bahn 2–3, Bahn 4–5, Bahn 6–7, Bahn 8–9 = paarweise Ü und P mit zunehmender OD_{600} zum Induktionszeitpunkt.

Unabhängig von der OD_{600} , bei der die Proteinexpression induziert wurde, zeigten alle Bedingungen eine erfolgreiche Überexpression des LpxC-Enzyms. Bei einer optischen Dichte von 0.35–0.45 schien die Bande des LpxC-Enzyms leicht stärker ausgeprägt als bei den höheren optischen Dichten. Auch nach dem Zellaufschluss schien in diesen beiden Ansätzen die Bande zwischen 30–40 kDa stärker ausgeprägt als in den anderen Ansätzen. Analog zum vorherigen Experiment war jedoch auch hier nahezu das gesamte Enzym im Zellpellet lokalisiert und der Anteil von löslichem LpxC-Enzym im Überstand kaum höher als der Anteil weiterer Proteine. In Anbetracht der geringen Unterschiede bei der Ausprägung der Banden war unklar, ob die Induktion bei einer niedrigeren OD_{600} einen signifikanten Effekt auf die Löslichkeit des Enzyms hatte. Da der Anteil an löslichem Enzym jedoch durch die Erniedrigung der OD_{600} zum Induktionszeitpunkt keine Erniedrigung des Anteils an löslichem Enzym zur Folge hatte, wurde die Expression von *P. aeruginosa* LpxC bei einer niedrigeren optischen Dichte als bei der Expression von *E. coli* LpxC C63A induziert. Als nächstes wurde die Expressionsdauer sowie die -temperatur variiert. Zusätzlich wurde eine niedrigere IPTG-Konzentration untersucht (Abb. 57).

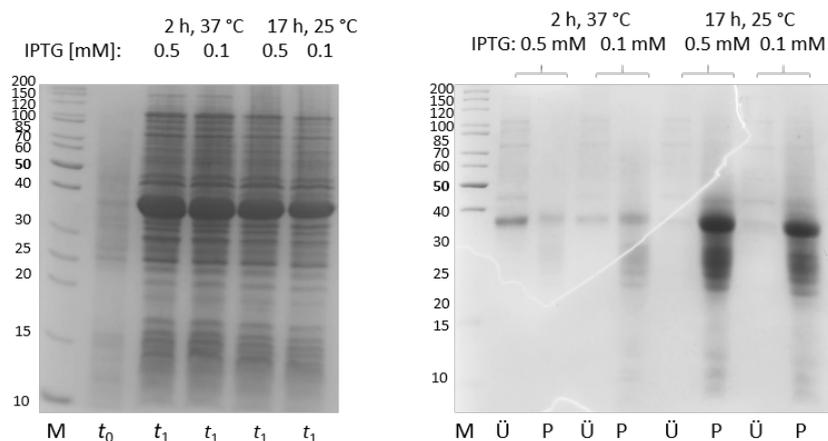


Abbildung 57: Analyse der Variation der Dauer und Temperatur bei der Expression von *P. aeruginosa* LpxC mithilfe von 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgelen. Die Proteinexpression erfolgte bei allen Ansätzen in Anwesenheit von Glucose (0.5%) bei einer OD_{600} von 0.4–0.5. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG (0.5 mM) und $ZnCl_2$ (0.1 mM). Links = Testexpressionen, rechts = Testaufschlüsse. Gegenübergestellt sind eine Proteinexpression für 2 h bei 37 °C (a, b) und eine Proteinexpression für 17 h bei 25 °C (c, d). Dabei wurde die Proteinexpression mit 0.5 mM IPTG (a, c) bzw. 0.1 mM IPTG (b, d) induziert. Links: Bahn 1 = Marker (M), Bahn 2 = t_0 , Bahn 3–6 = t_1 . Rechts: Bahn 1 = Marker (M), Bahn 2–3, Bahn 4–5, Bahn 6–7 und Bahn 8–9 = paarweise Überstand (Ü) und Pellet (P) in Abhängigkeit der Expressionsbedingungen.

Auch hier wurde bei allen untersuchten Bedingungen eine erfolgreiche Überexpression des LpxC-Enzyms beobachtet. Im Gegensatz zu dem vorherigen Experiment, bei dem die OD_{600} zum Zeitpunkt der Induktion variiert wurde, war jedoch ein deutlicher Unterschied nach dem Zellaufschluss zu beobachten. Unabhängig von der eingesetzten IPTG-Konzentration war bei einer Expressionsdauer von 17 Stunden bei Raumtemperatur der Großteil des Enzyms im Zellpellet lokalisiert (P_c , P_d). Eine Verkürzung der Expression auf zwei Stunden bei höherer Temperatur (37 °C) hingegen erhöhte den Anteil an löslichem Enzym deutlich. Während im Überstand (\ddot{U}_a , \ddot{U}_b) eine deutliche Bande zwischen 30–40 kDa sichtbar war, war diese im Pellet (P_a , P_b) nicht stärker ausgeprägt als die der anderen Proteinbanden. Dabei war die Intensität der Bande im Überstand bei einer IPTG-Konzentration von 0.5 mM (\ddot{U}_a) stärker ausgeprägt als bei einer IPTG-Konzentration von 0.1 mM (\ddot{U}_b).

Zuletzt erfolgte basierend auf den zuvor optimierten Parametern eine Untersuchung des Einflusses der Konzentration des Cofaktors Zn^{2+} (in Form von $ZnCl_2$) bei der Enzymexpression sowie eine Variation des Zellaufschlusspuffers^[92] (Abb. 58).

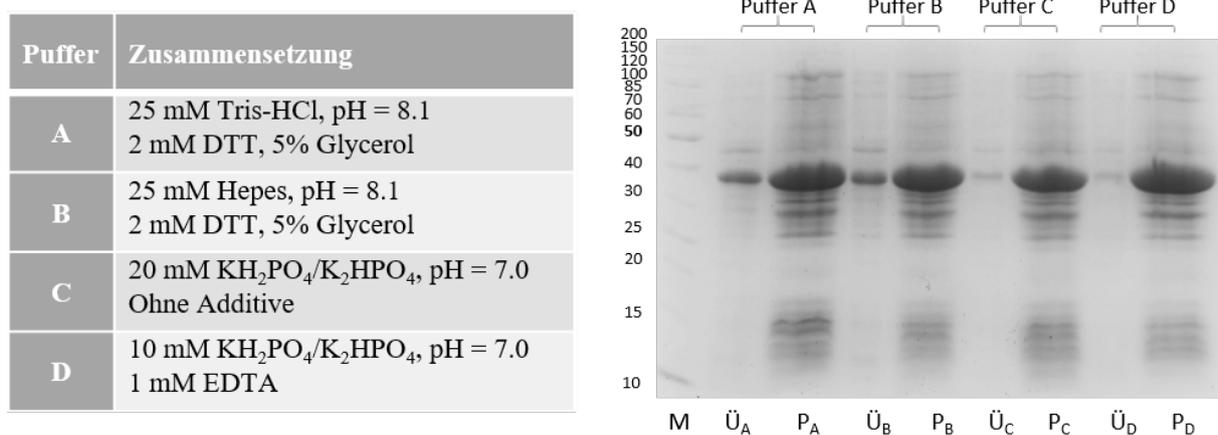


Abbildung 58: Analyse der Variation der Zellaufschlussbedingungen nach der Expression von *P. aeruginosa* LpxC mithilfe eines 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgels. Die Proteineexpression erfolgte für 2 h bei 37 °C , die Proteineexpression wurde bei $OD_{600} = 0.3$ durch Zugabe von IPTG (0.5 mM) sowie $ZnCl_2$ (0.1 mM) induziert. Bahn 1 = Marker (M), Bahn 2–3, Bahn 4–5, Bahn 6–7 und Bahn 8–9 = paarweise Überstand (\ddot{U}) und Pellet (P) in Abhängigkeit vom Zellaufschlusspuffer.

Unabhängig von der verwendeten Zinkchloridkonzentration bei der Enzymexpression (0.1 mM sowie 0.5 mM) zeigte der Testaufschluss für beide Ansätze dieselben Ergebnisse (0.5 mM $ZnCl_2$ nicht gezeigt). Bei allen vier untersuchten Zellaufschlusspuffern befand sich der größte Teil des Enzyms im Zellpellet. Der Vergleich der Überstände untereinander zeigte jedoch unter Verwendung von Puffer A und Puffer B eine deutlich ausgeprägtere Bande für das LpxC-Enzym als unter Verwendung von Puffer C und Puffer D. Sowohl der leicht basische Tris- als auch der Hepes-Puffer ($pH \approx 8$) lieferten in Anwesenheit des Reduktionsmittels DTT sowie in Anwesenheit von 5% Glycerol einen höheren Anteil an löslichem Enzym als die pH-neutralen literaturbekannten Phosphatpuffer ($pH = 7.0$).

Anschließend erfolgte die Expression von *P. aeruginosa* LpxC unter Verwendung der optimierten Expressionsbedingungen. Dabei erfolgte die Kultivierung der Bakterien bei 37 °C in Anwesenheit von 0.5% Glucose bis zu einer optischen Dichte von ca. 0.3. Anschließend wurde die Proteineexpression durch Zugabe von IPTG (0.5 mM) induziert sowie der Cofaktor des Enzyms Zn^{2+} (0.1 mM) hinzugegeben. Die Proteineexpression erfolgte für eine Dauer von zwei Stunden bei 37 °C . Nach dem Zellaufschluss mittels Sonifikation unter Verwendung von Puffer B (25 mM Tris-HCl ($pH = 8.0$), 2 mM

DTT, 5% Glycerol) wurde die Reinigung des Enzyms in zwei Schritten durchgeführt. Die Überprüfung fand durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese statt (Abb. 59–60).

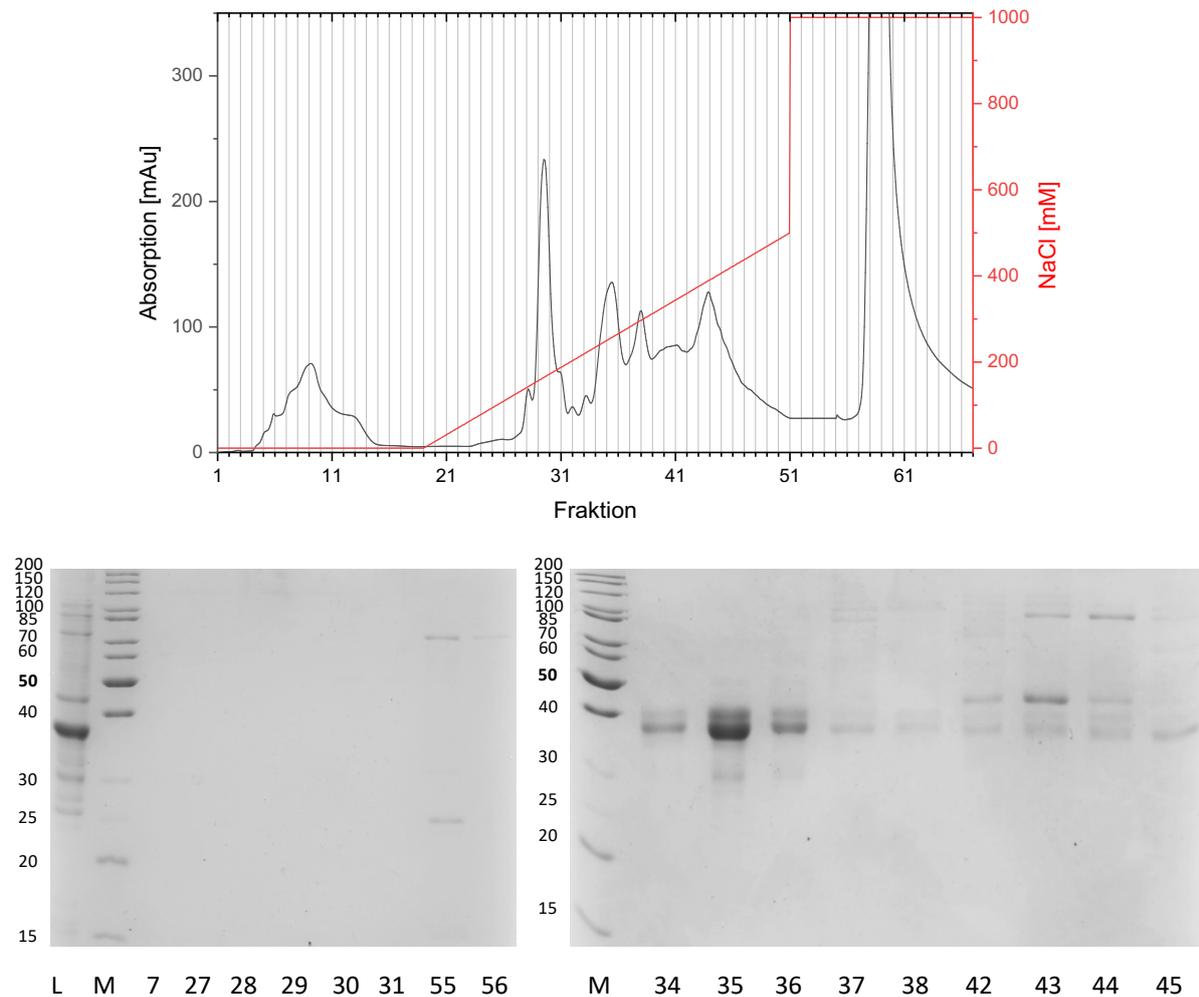


Abbildung 59: Reinigung von *P. aeruginosa* LpxC mittels Anionenaustauschchromatographie (AEX). Oben: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie, unten: 12.5%ige SDS-Polyacrylamidgele zur Analyse der Fraktionen der AEX. Links: Bahn 1 = Lysat (L), Bahn 2 = Marker (M), Bahn 3–10 = Fraktionen der AEX. Rechts: Bahn 1 = Marker (M), Bahn 2–10 = Fraktionen der AEX. Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte auf Basis von Puffer B (25 mM Tris-HCl (pH = 8.0), 2 mM DTT, 5% Glycerol). Die Elution der Proteine erfolgte durch einen linearen Natriumchloridgradienten (0 → 500 mM). *P. aeruginosa* LpxC eluierte bei einer Natriumchloridkonzentration von ca. 300 mM, die Fraktionen F34–36 zeigten eine deutliche Bande zwischen 30–40 kDa (MW (*P. aeruginosa* LpxC): 33.4 kDa).

Zunächst wurde das Zelllysat, welches im SDS-Gel eine intensive Bande bei 30–40 kDa zeigte und insofern eine Überexpression von *P. aeruginosa* LpxC aufwies, auf eine starke Anionenaustauschsäule aufgetragen. Neben der Löslichkeit des Enzyms beim Zellaufschluss garantierte Puffer B, dass das Enzym negativ geladen vorlag (IEP = 5.21) und unter initialen Bedingungen an die stationäre Phase der Säule band. Anschließend wurden, analog zur Reinigung von *E. coli* LpxC C63A, die an die Säule gebundenen Proteine nacheinander durch Erhöhung der Anionenstärke im Laufpuffer eluiert. Dies erfolgte durch einen linearen Gradienten von 0 → 500 mM Natriumchlorid. *P. aeruginosa* LpxC eluierte dabei in einem scharfen Peak bei einer Natriumchloridkonzentration von ca. 300 mM. Auf dem SDS-Gel zeigte insbesondere Fraktion F35 eine deutliche Bande zwischen 30–40 kDa. Auch F34 sowie F36 zeigten das Vorhandensein des Enzyms. Aus diesem Grund wurden die drei Fraktionen F34–36 vereinigt, auf ca. 3 mL eingengt und mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt. Diese Reinigung erfolgte unter Verwendung von Puffer A anstelle von Puffer B, da das Enzym ebenfalls im zuvor beschriebenen fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay verwendet werden sollte. Analog zur

Anionenaustauschchromatographie wurde auch die Größenausschlusschromatographie mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese überprüft (Abb. 60).

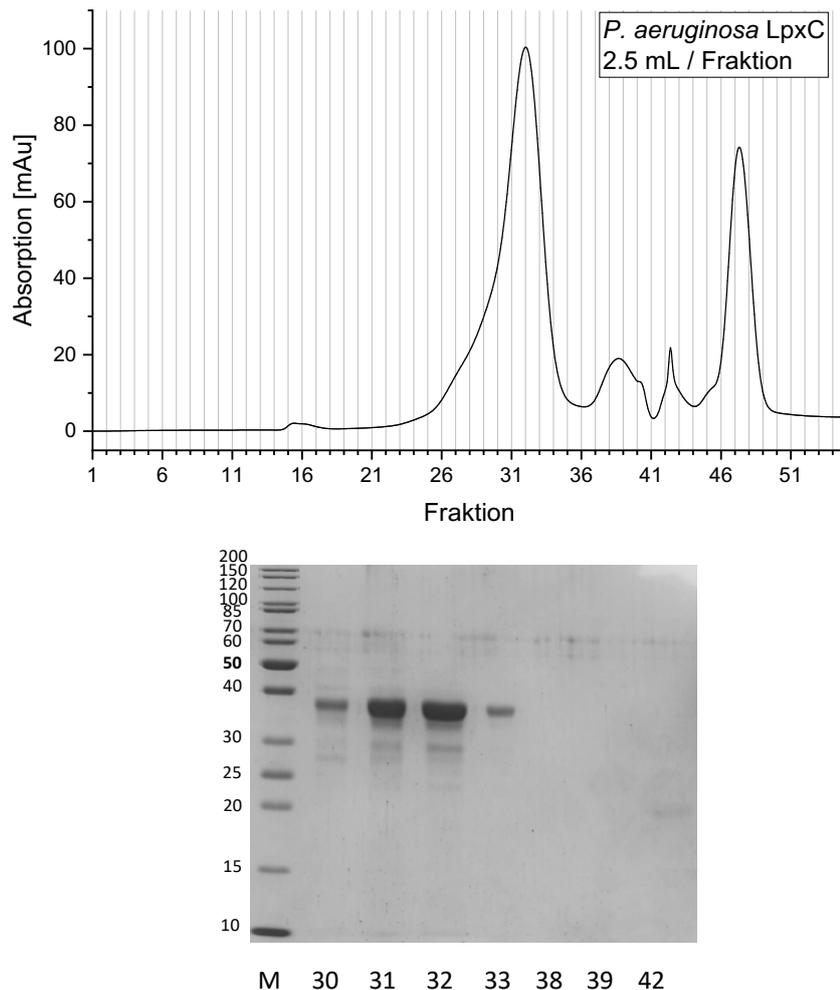


Abbildung 60: Reinigung von *P. aeruginosa* LpxC mittels Größenausschlusschromatographie (SEC). Oben: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie, unten: 12.5%iges SDS-Polyacrylamidgel zur Analyse der Fraktionen der SEC. Bahn 1 = Marker (M), Bahn 2–8 = Fraktionen der SEC. Die Größenausschlusschromatographie erfolgte mithilfe von Puffer A (25 mM Hepes (pH = 8.0), 2 mM DTT, 5% Glycerol). *P. aeruginosa* LpxC eluierte nach ca. 75–80 mL, die Fraktionen F30–34 zeigten eine deutliche Bande zwischen 30–40 kDa (MW (*P. aeruginosa* LpxC): 33.4 kDa).

Auch in der Größenausschlusschromatographie eluierte *P. aeruginosa* LpxC in einem scharfen Peak (F30–34). Zusätzlich dazu konnten fluoreszierende Nicht-Proteinbestandteile (F38–42) abgetrennt werden. Die Kombination der Reinigungsschritte lieferte reines *P. aeruginosa* LpxC. Die Ausbeute betrug dabei 9.2 mg pro Liter Zellkultur.

II. Der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay

Im nächsten Schritt sollte die Aktivität des isolierten *P. aeruginosa* LpxC mithilfe des für *E. coli* LpxC C63A routinemäßig verwendeten fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays überprüft werden. Das hierzu verwendete Substrat HM-UDP-GlcNAc (**2**) zeichnete sich dabei verglichen mit dem natürlichen Substrat von *P. aeruginosa* LpxC durch eine um vier C-Atome verlängerte Fettsäureseitenkette aus. Des Weiteren wurde dieser Assay standardmäßig in MES-Puffer bei pH = 6.0 durchgeführt, das pH-Optimum von *P. aeruginosa* LpxC liegt jedoch deutlich oberhalb dieser Assaybedingungen bei pH = 8.0. Bei der Überprüfung der Aktivität des isolierten *P. aeruginosa* LpxC wurde somit weder das natürliche Substrat des Enzyms eingesetzt, noch erfolgte sie unter physiologischen

Bedingungen. Aus diesem Grund wurde zusätzlich dazu das *E. coli* LpxC-Substrat in dem Größenausschlusspuffer gelöst, welcher dem pH-Optimum von *P. aeruginosa* LpxC entsprach. Anschließend wurde der Umsatz für 30 Minuten bei 37 °C verfolgt. Dabei diente der Umsatz von **2** durch *E. coli* LpxC C63A in MES-Puffer als Kontrolle (Tab. 28).

Tabelle 28: Initiale Überprüfung der Aktivität des isolierten *P. aeruginosa* LpxC. Dabei wurde der Umsatz des *E. coli*-Substrates **2** (25 µM) durch *P. aeruginosa* LpxC verfolgt. Die enzymatische Reaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C. Als Reaktionsumgebung dienten der für *E. coli* LpxC C63A standardmäßig verwendete MES-Puffer (40 mM MES (pH = 6.0), 80 µM DTT, 0.02% Brij35) sowie der für *P. aeruginosa* LpxC verwendete Größenausschlusspuffer (25 mM Hepes (pH = 8.0), 2 mM DTT, 5% Glycerol). Die Detektion des Reaktionsproduktes erfolgte fluorimetrisch nach Umwandlung in das entsprechende Isoindol.

Enzym	Reaktionsumgebung	F_{\min}	F_{\max}	ΔF
<i>P. aeruginosa</i> LpxC (75 nM)	MES-Puffer (pH = 6.0) Additive: DTT, Brij 35	43 000	48 000	5000
	SEC-Puffer (pH = 8.0) Additive: DTT, Glycerol	40 000	44 000	4000
<i>E. coli</i> LpxC C63A (15 nM)	MES-Puffer (pH = 6.0) Additive: DTT, Brij 35	35 000	89 000	54 000

Hierbei zeigte sich für beide Reaktionsumgebungen eine niedrige Differenz zwischen minimaler und maximaler Fluoreszenzintensität. Die minimale Fluoreszenzintensität lag dabei etwas oberhalb der basalen Fluoreszenzintensität, die für *E. coli* LpxC C63A beobachtet wurde. Dies ließ sich durch die höhere Enzymkonzentration und die damit verbundene höhere Anzahl primärer Amine, bedingt durch *N*-Termini sowie Lysinseitenketten, erklären. Die minimale Fluoreszenzintensität des Größenausschlusspuffers war etwas niedriger als beim MES-Puffer. Dennoch lag die Differenz zwischen minimaler und maximaler Fluoreszenzintensität ca. um den Faktor 10 niedriger als bei *E. coli* LpxC C63A. Dies ließ sich sowohl mit der Aktivität des Enzyms selbst als auch mit einer geringeren Affinität des Enzyms für das nicht-natürliche *E. coli*-Substrat **2** oder mit den untersuchten Reaktionsumgebungen erklären. Aus diesem Grund wurde zunächst eine alternative Reaktionsumgebung in Form eines leicht basischen Phosphatpuffers (pH = 7.5) erstellt, dem dieselben Additive wie dem MES-Puffer hinzugefügt wurden. Als Kontrolle diente der vorherige Umsatz von *E. coli* LpxC C63A in MES-Puffer (Tab. 29).

Tabelle 29: Variation des Assaypuffers zur Überprüfung der Aktivität des isolierten *P. aeruginosa* LpxC. Dabei wurde der Umsatz des *E. coli*-Substrates **2** (25 µM) durch *P. aeruginosa* LpxC verfolgt. Die enzymatische Reaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C. Als Reaktionsumgebung dienten der für *E. coli* LpxC C63A standardmäßig verwendete MES-Puffer (40 mM MES (pH = 6.0), 80 µM DTT, 0.02% Brij35) sowie ein leicht basischer Phosphatpuffer, dem dieselben Additive hinzugefügt wurden (50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH = 7.5), 80 µM DTT, 0.02% Brij35). Die Detektion des Reaktionsproduktes erfolgte fluorimetrisch nach Umwandlung in das entsprechende Isoindol.

Enzym	Reaktionsumgebung	F_{\min}	F_{\max}	ΔF
<i>P. aeruginosa</i> LpxC (75 nM)	MES-Puffer (pH = 6.0) Additive: DTT, Brij 35	40 000	42 000	2000
	Phosphat-Puffer (pH = 7.5) Additive: DTT, Brij 35	61 000	74 000	13 000
<i>E. coli</i> LpxC C63A (15 nM)	MES-Puffer (pH = 6.0) Additive: DTT, Brij 35	35 000	89 000	54 000

Unter Verwendung des MES-Puffers (pH = 6.0) zeigte sich erneut eine sehr niedrige Differenz der Fluoreszenzintensitäten. Die Verwendung des Phosphatpuffers, der näher dem pH-Optimum von *P. aeruginosa* LpxC lag und dem die Additive aus dem fluoreszenzbasierten *E. coli* LpxC C63A-

Enzymassay hinzugefügt wurden, bewirkte sowohl eine Erhöhung der basalen Hintergrundfluoreszenz als auch eine höhere maximale Fluoreszenzintensität. Die Differenz der Fluoreszenzintensitäten lag dabei um den Faktor 3 höher als unter Verwendung des Größenausschlusspuffers (pH = 8.0). Dies zeigte, dass prinzipiell Enzymaktivität von *P. aeruginosa* LpxC vorhanden war. Dennoch war die Differenz der Fluoreszenzintensitäten um den Faktor 4 und somit deutlich niedriger als zuvor für *E. coli* LpxC C63A beobachtet werden konnte. Dies ließ sich sowohl mit dem Anteil an aktivem Enzym in der Charge als auch mit weiteren Assayvariablen zusätzlich zu dem verwendeten Puffer erklären. Dies war auf der einen Seite die Affinität von *P. aeruginosa* LpxC für das *E. coli*-Substrat. Dabei war weder ein K_M -Wert für das eigene Substrat noch ein K_M -Wert für das fremde *E. coli*-Substrat **2** literaturbekannt. Auf der anderen Seite wurde 20 μM CHIR-090 (**12**) zur Bestimmung der minimalen Fluoreszenzintensität verwendet. Auch hier ist jedoch keine Affinität für *P. aeruginosa* LpxC literaturbekannt. Aus diesem Grund erfolgte zunächst eine Bestimmung des IC_{50} -Wertes von **12** bei zwei verschiedenen Enzymkonzentrationen (Abb. 61).

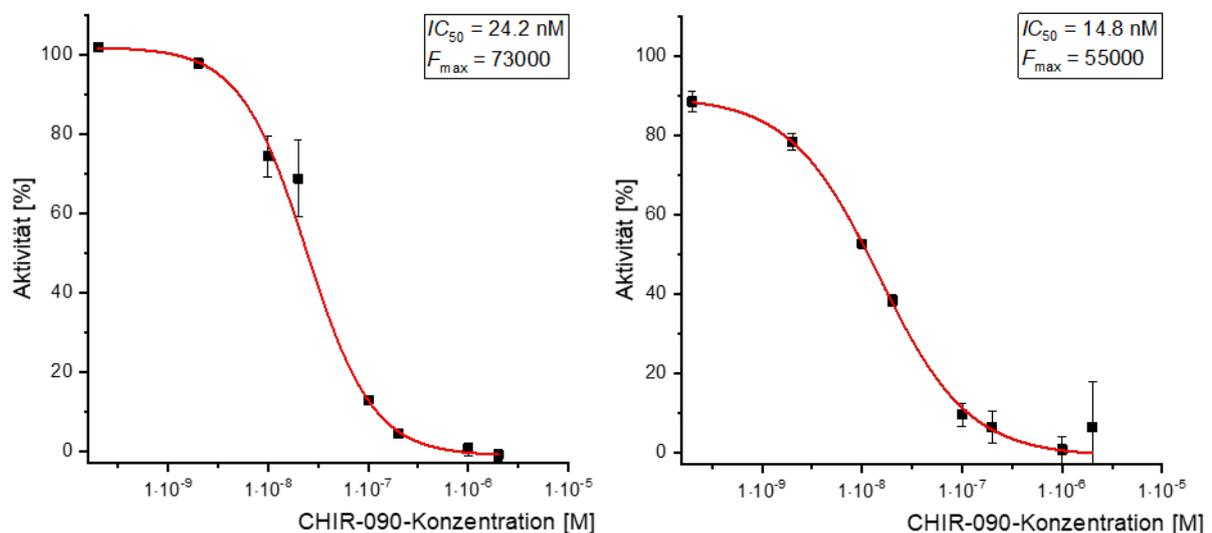


Abbildung 61: Bestimmung des IC_{50} -Wertes von CHIR-090 (12**) gegen *P. aeruginosa* LpxC in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.** Dabei wurde die Aktivität des Enzyms bei Inhibitorkonzentrationen von 200 pM bis 20 μM untersucht. Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes von **12** erfolgte dabei sowohl für eine Enzymkonzentration von 75.0 nM (links) als auch für eine Enzymkonzentration von 37.5 nM (rechts). Die enzymatische Reaktion, die Deacetylierung des natürlichen Substrates **2** von *E. coli*, erfolgte über einen Zeitraum von 30 min bei 37 °C. Die Detektion des Reaktionsproduktes erfolgte fluorimetrisch nach Umwandlung in das entsprechende Isoindol.

Für beide Enzymkonzentrationen zeigte sich eine Inhibitionskurve in Abhängigkeit von der eingesetzten CHIR-090 (**12**)-Konzentration. Hierbei zeigte sich zunächst, dass die Verwendung von 20 μM **12** zur Bestimmung der minimalen Fluoreszenzintensität geeignet war, da das Enzym bei dieser Konzentration vollständig inhibiert wurde. Der IC_{50} -Wert bei einer Enzymkonzentration von 75 nM betrug 24.2 nM. Dieser war gepaart mit einer maximalen Fluoreszenzintensität von ca. 73 000. Eine 1:2-Verdünnung des Enzyms lieferte einen IC_{50} -Wert von 14.8 nM. Dieser war gepaart mit einer maximalen Fluoreszenzintensität von ca. 55 000. Während beide IC_{50} -Werte in einer Größenordnung lagen, zeigte sich somit ein deutlicher Unterschied bei der maximalen Fluoreszenzintensität. Aus diesem Grund sollte für die folgenden Experimente eine Enzymkonzentration von 75 nM verwendet werden. Zusätzlich dazu wurde als Kontrollexperiment der Reaktionsumsatz bei dieser Enzymkonzentration über einen Zeitraum von 70 Minuten verfolgt, um einen vollständigen Umsatz des Substrates nach 30 Minuten auszuschließen (Abb. 62).

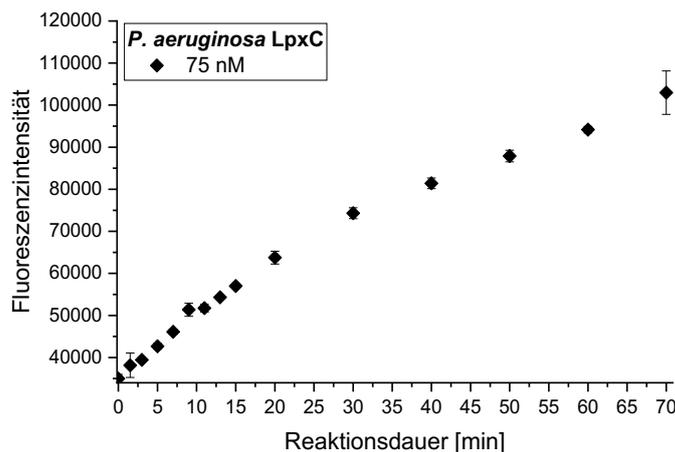


Abbildung 62: Verfolgung des Umsatzes des *E. coli*-Substrates **2** durch *P. aeruginosa* LpxC über einen Zeitraum von **70 min**. Dabei wurde eine Ausgangssubstratkonzentration von $25 \mu\text{M}$ und eine Enzymkonzentration von 75 nM eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei 37°C . Die Detektion des Reaktionsproduktes erfolgte fluorimetrisch nach Umwandlung in das entsprechende Isoindol.

Hierbei zeigte sich über den gesamten Zeitraum von 70 Minuten eine Zunahme der Fluoreszenzintensität. Die Zunahme innerhalb der ersten 20 Minuten war dabei nahezu linear, anschließend erfolgte eine langsame Annäherung an einen Sättigungswert. Auch dieses Kontrollexperiment zeigte somit, dass eine Enzymkonzentration von 75 nM *P. aeruginosa* LpxC zur biologischen Testung geeignet war.

Anschließend erfolgte die biologische Testung von Substanzen, die zuvor gegen *E. coli* LpxC C63A inhibitorische Aktivität gezeigt hatten. Die getesteten Konzentrationen orientierten sich dabei an den jeweiligen IC_{50} -Werten gegen *E. coli* LpxC C63A (Tab. 30).

Tabelle 30: Biologische Testung potentieller LpxC-Inhibitoren gegen *P. aeruginosa* LpxC mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays. Dabei wurde die prozentuale Inhibition des Substratumsatzes durch die getesteten Substanzen bei Konzentrationen nahe ihres jeweiligen IC_{50} -wertes gegen *E. coli* LpxC C63A bestimmt. Zusätzlich dazu erfolgte exemplarisch die Bestimmung des IC_{50} -wertes von **19**. Die Ausgangssubstratkonzentration betrug $25 \mu\text{M}$, die Enzymkonzentration 75 nM . Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37°C .

	<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>P. aeruginosa</i> LpxC		
	IC_{50} [μM]	Inhibitorkonz. [μM]	Inhibition [%]	IC_{50} [μM]
L-161,240 (10)	1.11 ± 0.19	20	30	n.b.
17	3.24 ± 0.96	20 2.0	90 75	n.b.
18	21.8 ± 5.56	20 2.0	90 60	n.b.
19	0.0841 ± 0.0090	0.002–0.20		0.0426
<i>ent-100</i>	1.13 ± 0.55	2.0	75	n.b.
143	0.766 ± 0.074	2.0	89	n.b.
144	0.638 ± 0.071	2.0	85	n.b.

Bei den untersuchten LpxC-Inhibitoren handelte es sich um den literaturbekannten LpxC-Inhibitor L-161,240 (**10**) sowie die drei Modellanalyten aus den SPR-Experimenten: C-Furanosid **17**, Phenylethylenglycolderivat **18** und Indolderivat **19** aus der Serie von Verbindungen mit Amidlinker in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv. Zusätzlich dazu wurden zwei weitere Verbindungen mit

Amidlinker in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv, Pyrrol **143** und Pyrazol **144**, sowie Hydroxamsäure *ent*-**100** mit einem 1,4-substituierten Triazolmotiv in α -Position untersucht.

Mit Ausnahme von L-161,240 (**10**) zeigten alle untersuchten Substanzen vielversprechende inhibitorische Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC. Die Inaktivität von **10** entsprach dabei literaturbekannten Ergebnissen.^[37] Für alle anderen untersuchten Substanzen ließ die jeweilige prozentuale Inhibition einen niedrigeren IC_{50} -Wert gegen *P. aeruginosa* LpxC als gegen *E. coli* LpxC C63A vermuten. Dies war anhand der untersuchten Konzentrationen insbesondere für **18** deutlich, welche auch bei einer Konzentration von 2 μ M und somit um den Faktor 10 unterhalb des IC_{50} -Wertes gegen *E. coli* LpxC C63A immer noch über 50% Inhibition zeigte. Der für **19** bestimmte IC_{50} -Wert lag ca. um den Faktor 2 niedriger als der gegen *E. coli* LpxC C63A. Ein niedrigerer IC_{50} -Wert konnte dabei sowohl auf eine höhere Affinität des Inhibitors für das *P. aeruginosa* LpxC hindeuten als auch durch eine niedrigere Affinität des Enzyms für das Substrat **2** bei gleicher Inhibitor-Affinität erklärt werden.

Aus diesem Grund sollte im Folgenden der K_M -Wert von *P. aeruginosa* LpxC für den Umsatz des *E. coli*-Substrates **2** bestimmt werden. Mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays war dies bereits bei *E. coli* LpxC C63A aufgrund sehr niedriger Fluoreszenzintensitäten bei niedrigen Substratkonzentrationen problematisch. Da *P. aeruginosa* LpxC zuvor sogar bei der höchsten zu verwendenden Substratkonzentration (25 μ M) nur niedrige Differenzen im Enzymassay zeigte, sollte zur Bestimmung des K_M -Wertes der LC-MS/MS-basierte LpxC-Enzymassay verwendet werden.

III. Der massenbasierte LpxC-Enzymassay

Die Durchführung des massenbasierten Enzymassays basierte auf den zuvor für *E. coli* LpxC C63A entwickelten Bedingungen: Nach Abstoppen der 30-minütigen enzymatischen Reaktion durch Salzsäure erfolgte die chromatographische Trennung des Reaktionsgemisches. Anschließend wurden die Substanzen mittels ESI ionisiert, Vorläuferionen selektiert, fragmentiert und Produktionen detektiert. Die dabei beobachteten intensivsten charakteristischen Massenübergänge waren aufgrund der Verwendung desselben Substrates identisch mit denen, die bei der Verwendung von *E. coli* LpxC C63A beobachtet wurden (Tab. 31).

Tabelle 31: Beobachtete Massenübergänge mit höchster Intensität bei der massenspektrometrischen Analyse des *E. coli*-Substrates **2 sowie des *E. coli*-Produktes **3**.** Nach Ionisierung mittels ESI sowie der Detektion des nicht-fragmentierten Substrates **2** (m/z 832) sowie des nicht-fragmentierten Produktes **3** (m/z 790) im negativen Ionenmodus wurden die Vorläuferionen in der Kollisionszelle fragmentiert. Anschließend wurden jeweils drei charakteristische Massenübergänge detektiert.

	Q1 m/z	Q3 m/z
Substrat 2	832	79
		159
		385
Produkt 3	790	79
		159
		385

Erneut zeigten die beobachteten Massenübergänge, dass die Fragmentierung am für Substrat und Produkt identischen UDP-Rest stattfand. Die beiden Massenübergänge, in denen das Phosphat-

fragment **22** (m/z 79) entstand, zeigten dabei die höchste Intensität und dienten für die Auswertung der folgenden Experimente als „Quantifier“. Zur Bestimmung des prozentualen Anteils von Substrat und Produkt in der jeweiligen Probe wurden die Peakflächen dieser beiden Massenübergänge miteinander verglichen.

Die Versuche zur Etablierung des LC-MS/MS-basierten LpxC-Enzymassays unter Verwendung von *P. aeruginosa* LpxC gliederten sich in die Bestimmung des K_M -Wertes für das *E. coli*-Substrat, gefolgt von der Ermittlung standardisierter Assaybedingungen. Zusätzlich dazu wurden auch hier initiale Voruntersuchungen durchgeführt, in denen limitierende Faktoren wie eine minimale Ausgangssubstratkonzentration oder Reaktionsdauer ermittelt werden sollten. Zur Überprüfung limitierender Reaktionsbedingungen wurde der massenbasierte LpxC-Enzymassay bei drei verschiedenen Substratkonzentrationen (0.25 μM , 1.0 μM , 25 μM) durchgeführt und die Substrat- und Produktkonzentrationen abweichend von der 30-minütigen Inkubationsdauer zu drei verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert (0 s, 90 s und 7 min). Die Enzymkonzentration von *P. aeruginosa* LpxC betrug dabei analog zum fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay 75 nM (Abb. 63).

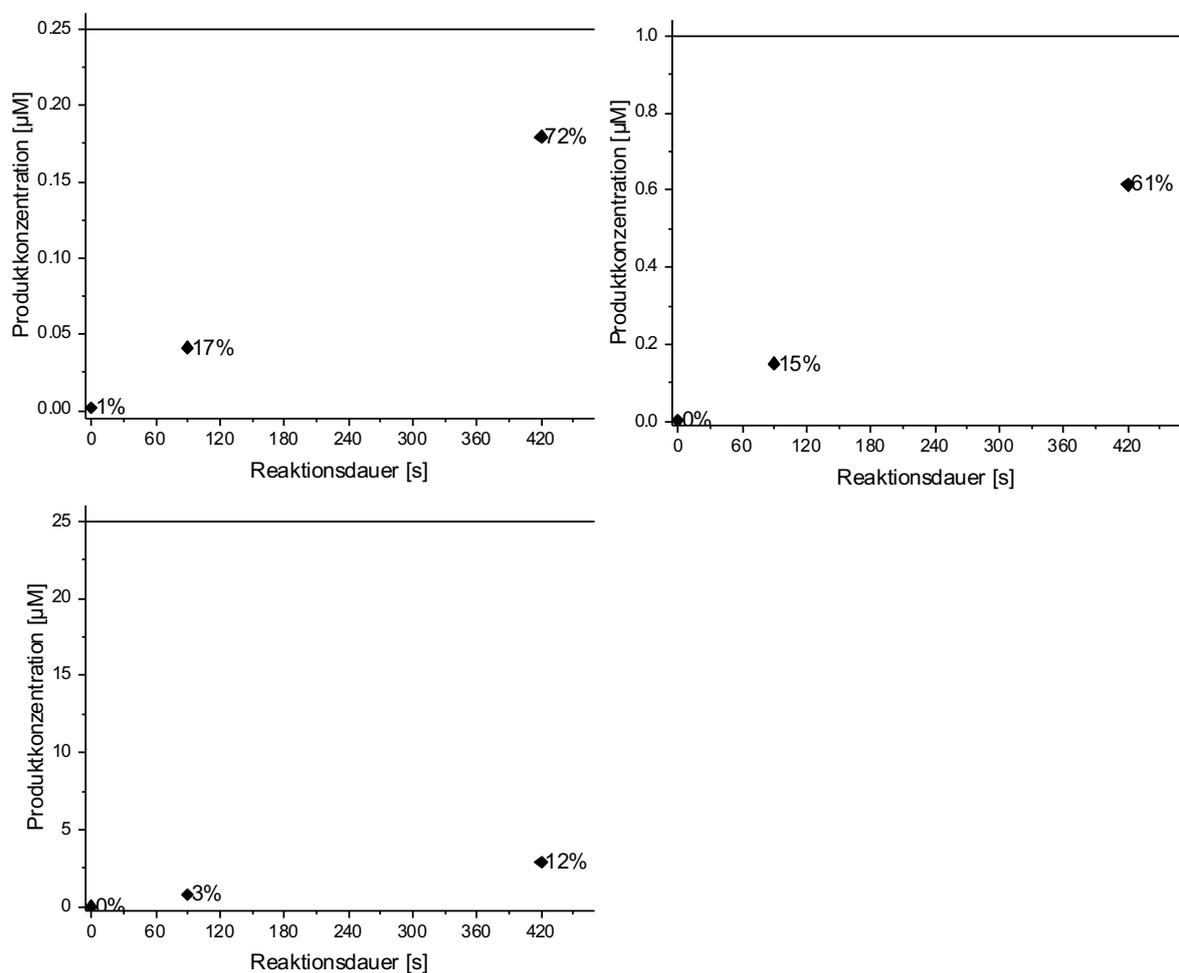


Abbildung 63: Initiale Voruntersuchungen zur Durchführung des massenbasierten *P. aeruginosa* LpxC-Enzymassays. Dabei wurde die niedrigste (0.25 μM , oben links) sowie die höchste Konzentration (25 μM , unten links), die zur Bestimmung des K_M -Wertes verwendet werden sollten, sowie eine Zwischenkonzentration (1.0 μM , oben rechts) durch 75 nM *P. aeruginosa* LpxC bei 37 °C umgesetzt. Basierend auf der Bestimmung des K_M -Wertes von *E. coli* LpxC C63A mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays betrug die minimale Reaktionsdauer 90 s, die längste 420 s. Die Quantifizierung der Substrat- und Produktkonzentrationen erfolgte durch den Vergleich der Peakflächen der *Quantifier*.

Analog zu *E. coli* LpxC C63A konnten sowohl bei der niedrigsten als auch bei der höchsten Substratkonzentration gepaart mit der kürzesten Reaktionsdauer (0.25 μM bzw. 25 μM , 90 s) Substrat

und Produkt eindeutig detektiert und quantifiziert werden. Auch hier zeigte sich weder die niedrigste Gesamtkonzentration von Substrat und Produkt noch die geringste prozentuale Produktkonzentration problematisch in Bezug auf das Detektionslimit beider Substanzen. Im Gegensatz zu *E. coli* LpxC C63A zeigte sich jedoch bei keiner Ausgangssubstratkonzentration bereits nach 420 Sekunden ein vollständiger Reaktionsumsatz. Dies ließ auf eine niedrigere Aktivität des isolierten *P. aeruginosa* LpxC schließen. Da jedoch bei allen untersuchten Ausgangssubstratkonzentrationen nach 90 Sekunden Substrat und Produkt eindeutig identifizierbar waren, wurde analog zu *E. coli* LpxC C63A die Reaktionsdauer zur Bestimmung von Initialgeschwindigkeiten weiter verkürzt.

Insgesamt wurde zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit der massenbasierte LpxC-Enzymassay bei sechs verschiedenen Substratkonzentrationen (0.25–25 μM) in Anwesenheit von 2% DMSO durchgeführt. Die Enzymkonzentration von *P. aeruginosa* LpxC betrug 75 nM und es wurde die Produktbildung über einen Zeitraum von 90 Sekunden verfolgt (Abb. 64).

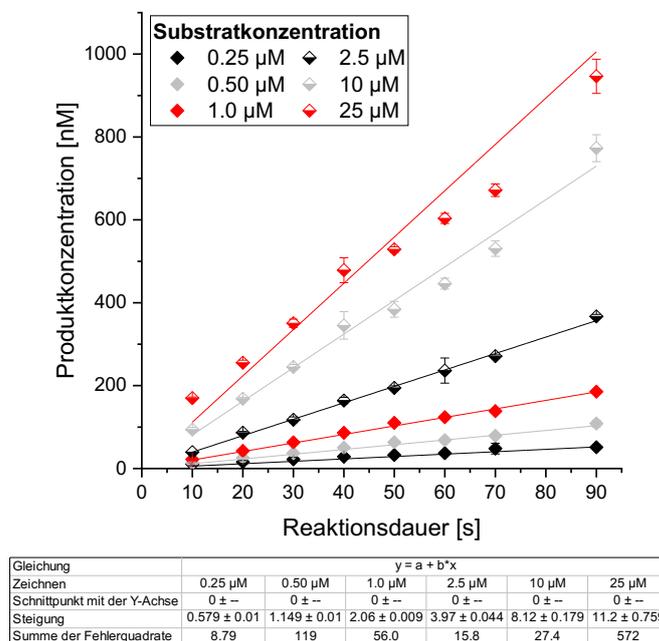


Abbildung 64: Bestimmung der Initialgeschwindigkeiten von *P. aeruginosa* LpxC beim Umsatz des *E. coli*-Substrates 2 zur Bestimmung des K_M -Wertes. Dazu wurde der massenbasierte LpxC-Enzymassay bei 37 °C bei sechs Substratkonzentrationen (0.25–25 μM) durchgeführt und die Zunahme der Produktkonzentration über einen Zeitraum von 90 s verfolgt. Die Quantifizierung der Substrat- und Produktkonzentrationen erfolgte durch den Vergleich der Peakflächen der *Quantifier*. Durch lineare Regression erfolgte die Bestimmung der Initialgeschwindigkeiten.

Anschließend wurde analog zum fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit gegen die reziproke Substratkonzentration aufgetragen (Abb. 65).

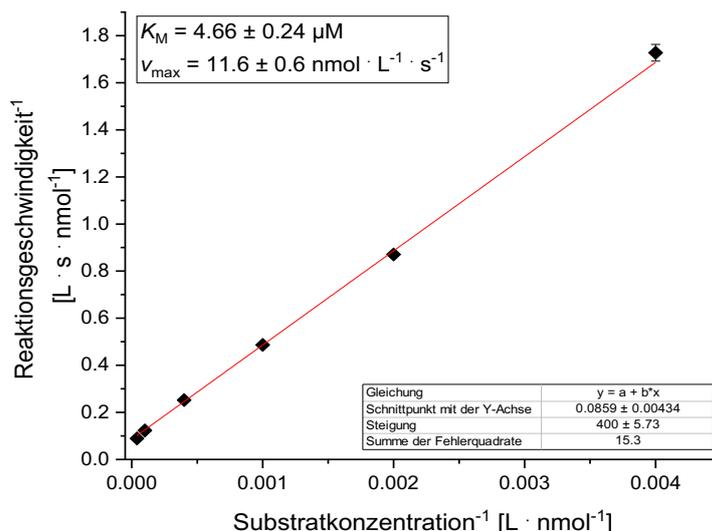


Abbildung 65: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung des K_M -Wertes von *P. aeruginosa* LpxC für das *E. coli*-Substrat bei 37 °C. Dabei wurden die mittels LC-MS/MS ermittelten reziproken Initialgeschwindigkeiten gegen die jeweilige reziproke Substratkonzentration aufgetragen. Nach linearer Regression lieferte die Nullstelle $-K_M^{-1}$. Zusätzlich dazu konnte die Maximalgeschwindigkeit v_{max} bestimmt werden, der y-Achsenabschnitt lieferte dabei v_{max}^{-1} .

Nach linearer Regression lieferten die Nullstelle $-K_M^{-1}$ und der y-Achsenabschnitt v_{max}^{-1} . Der entsprechende K_M -Wert betrug $4.66 \pm 0.24 \mu\text{M}$. Dieser Wert liegt in einer Größenordnung mit dem K_M -Wert von *E. coli* LpxC C63A. *P. aeruginosa* LpxC hat somit eine ähnliche Affinität für das *E. coli*-Substrat **2** wie *E. coli* LpxC C63A. Dies entsprach den Erwartungen, da bei der Deacetylierung durch LpxC die Fettsäureseitenkette nicht an der Reaktion beteiligt ist, sondern in dem zum aktiven Zentrum benachbarten hydrophoben Tunnel lokalisiert ist. Bei einer Verlängerung der Seitenkette ragt diese vermutlich lediglich an dessen äußeren Ende aus dem hydrophoben Tunnel heraus. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit betrug $11.6 \pm 0.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Anschließend sollten auch für *P. aeruginosa* LpxC standardisierte Reaktionsbedingungen bei verschiedenen Substratkonzentrationen etabliert werden. Als Referenz dienten dabei sowohl der exakte Reaktionsumsatz als auch die Inhibitionskonstanten von zwei LpxC-Inhibitoren. Zunächst wurde ausgehend von $25 \mu\text{M}$ Substratkonzentration und 75 nM Enzymkonzentration eine serielle 1:10-Verdünnung beider Komponenten durchgeführt (Tab. 32).

Tabelle 32: Linearer Scale-Down der Enzym- und Substratkonzentration im massenbasierten *P. aeruginosa* LpxC-Enzymassay. Ausgehend von $25 \mu\text{M}$ Substrat und 75 nM Enzym erfolgte eine zweifache serielle 1:10-Verdünnung beider Komponenten. Die Quantifizierung der Substrat- und Produktkonzentrationen erfolgte nach 30-minütigem Umsatz bei 37 °C mittels LC-MS/MS durch den Vergleich der Peakflächen der *Quantifier*.

		1:10	1:100
Substratkonzentration [μM]	25	2.5	0.25
Enzymkonzentration [nM]	75	7.5	0.75
Reaktionsumsatz [%]	71	53	25

Wie bei *E. coli* LpxC C63A zeigte sich auch für *P. aeruginosa* LpxC, dass die Durchführung des Enzymassays nicht linear skalierbar war. Dabei waren die Unterschiede jedoch weniger stark ausgeprägt. Während $25 \mu\text{M}$ Substrat durch 75 nM *P. aeruginosa* LpxC zu 71% umgesetzt wurden, zeigte sich unter identischen Bedingungen vollständiger Substratumsatz durch *E. coli* LpxC C63A. Eine

1:10-Verdünnung von Enzym und Substrat bewirkte eine Reduktion des Umsatzes auf 53%, eine 1:100-Verdünnung eine Reduktion auf 25%. Bei *E. coli* LpxC C63A betrug der Umsatz bei einer 1:100-Verdünnung hingegen lediglich 18%. Trotz der Unterschiede beim Reaktionsumsatz fand jedoch bei allen drei untersuchten Bedingungen ein eindeutig quantifizierbarer Substratumsatz statt, während die Reaktion zeitgleich bei keiner der Bedingungen nach 30 Minuten bereits vollständig abgelaufen war. Zusätzlich zu dem Reaktionsumsatz wurden die IC_{50} -Werte von CHIR-090 (**12**) und **19** bei allen drei Bedingungen bestimmt (Tab. 33).

Tabelle 33: Bestimmung der IC_{50} -Werte von CHIR-090 (12**) und **19** mithilfe des massenbasierten *P. aeruginosa* LpxC-Enzymassays bei verschiedenen Substratkonzentrationen.** Ausgehend von 25 μ M Substrat und 75 nM Enzym erfolgte eine zweifache serielle 1:10-Verdünnung beider Komponenten. Die Quantifizierung der Substrat- und Produktkonzentrationen erfolgte nach 30 min durch den Vergleich der Peakflächen der *Quantifier*.

Substratkonzentration [μM]	25	2.5	0.25
Enzymkonzentration [nM]	75	7.5	0.75
Reaktionsumsatz [%]	72	54	27
IC_{50}-Wert	12 [nM]	17.4	2.31
	19 [nM]	46.0	6.57
			8.07

Anschließend wurden die IC_{50} -Werte mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung (Gleichung 4) unter Verwendung des zuvor experimentell bestimmten K_M -Wertes in K_i -Werte umgerechnet. Die so bestimmten Inhibitionskonstanten waren im Gegensatz zu den IC_{50} -Werten unabhängig von der Substratkonzentration und direkt miteinander vergleichbar (Tab. 34).

Tabelle 34: Bestimmung der K_i -Werte von CHIR-090 (12**) und **19** mithilfe des massenbasierten *P. aeruginosa* LpxC-Enzymassays bei verschiedenen Substratkonzentrationen.** Ausgehend von 25 μ M Substrat und 75 nM Enzym erfolgte eine zweifache serielle 1:10-Verdünnung beider Komponenten. Die Berechnung der K_i -Werte aus den IC_{50} -Werten erfolgte mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung unter Verwendung des zuvor experimentell bestimmten K_M -Wertes ($K_M = 4.66 \pm 0.24 \mu$ M).

Substratkonzentration [μM]	25	2.5	0.25
Enzymkonzentration [nM]	75	7.5	0.75
Reaktionsumsatz [%]	71	53	25
K_i-Wert	12 [nM]	2.73	1.50
	19 [nM]	7.23	4.28
			7.66

Sowohl für CHIR-090 (**12**) als auch für **19** lagen die ermittelten Inhibitionskonstanten für alle drei Reaktionsbedingungen in einer Größenordnung. Die Unterschiede waren dabei unabhängig von dem exakten Substratumsatz in dem jeweiligen Experiment. Die Abweichungen zwischen dem niedrigstem und dem höchsten Substratumsatz waren geringer als jeweils diejenigen zum mittleren Reaktionsumsatz. Dies zeigte, unabhängig vom exakten Reaktionsumsatz, einen erfolgreichen Scale-Down der Assaybedingungen und ermöglichte die biologische Testung unter Verwendung einer niedrigeren Substratkonzentration als im fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay. Aus diesem Grund wurden für die Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen der LpxC-Inhibitoren gegen *P. aeruginosa* LpxC alle Inhibitionsexperimente mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays durchgeführt. Die Substratkonzentration betrug dabei 2.5 μ M, die Enzymkonzentration 7.5 nM. Analog zu *E. coli* LpxC C63A wurde 80% Umsatz als maximaler Reaktionsumsatz definiert.

IV. Der SPR-basierte LpxC-Enzymassay

Zuletzt sollte der für *E. coli* LpxC C63A entwickelte SPR-basierte Enzymassay auf *P. aeruginosa* LpxC angewandt werden. Auch hier erfolgte im ersten Schritt ein pH-Scouting, um das Enzym mithilfe elektrostatischer Wechselwirkungen nahe der Chipoberfläche zu konzentrieren, ohne das Enzym dabei zu denaturieren. Dazu wurde *P. aeruginosa* LpxC unter Verwendung der zuvor optimierten Bedingungen in verschiedenen Acetatpuffern (10 mM; pH = 4.0, 4.5, 5.0 und 5.5), denen zusätzlich das Reduktionsmittel DTT (1 mM) sowie der Cofaktor des Enzyms Zn^{2+} (0.1 mM $ZnCl_2$) hinzugefügt wurden, gelöst. Als Laufpuffer wurde der leicht basische Phosphatpuffer (50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100) verwendet, der zuvor die Kupplungseffizienz für *E. coli* LpxC C63A bei der Immobilisierung erhöht hatte (Abb. 66).

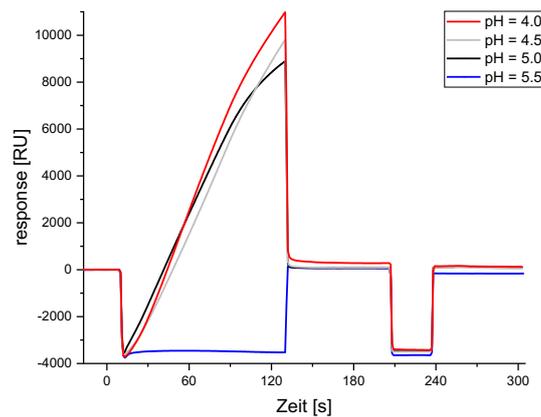


Abbildung 66: pH-Scouting von *P. aeruginosa* LpxC zur Konzentrierung des Enzyms mittels elektrostatischer Wechselwirkungen nahe der Sensorchipoberfläche. Dazu wurde das Enzym in vier verschiedenen Acetatpuffern (10 mM (pH = 4.0, 4.5, 5.0, 5.5), 1 mM DTT, 0.1 mM $ZnCl_2$) gelöst und über einen CM7-Sensorchip geleitet. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 2 (50 mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100) verwendet.

Wie zuvor bei *E. coli* beobachtet werden konnte, fand ebenfalls keine Anlagerung des *P. aeruginosa* Enzyms bei pH = 5.5 statt. In Anbetracht des noch geringeren isoelektrischen Punktes (IEP = 5.21) lag auch für *P. aeruginosa* LpxC keine positive Ladung des Enzyms bei pH = 5.5 vor. Bei den anderen drei untersuchten pH-Werten zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Assoziation sowie der Dissoziation des Enzyms. Lediglich bei pH = 4.0 zeigte sich eine geringe unspezifische Restbindung am Ende der Dissoziationsphase. Diese betrug jedoch <5% und war somit deutlich geringer als bei *E. coli* LpxC C63A. Bei pH = 4.5 und pH = 5.0 konnte eine vollständige Dissoziation des Enzyms beobachtet werden. Aufgrund des leicht bogenförmigen Verlaufes der Assoziation bei pH = 5.0, welcher in Anbetracht der Nähe zum isoelektrischen Punkt auf eine inhomogene Ladungsverteilung des Enzyms hinwies, wurde das Enzym im Folgenden bei pH = 4.5 über eine Amidkupplung immobilisiert (Abb. 67).

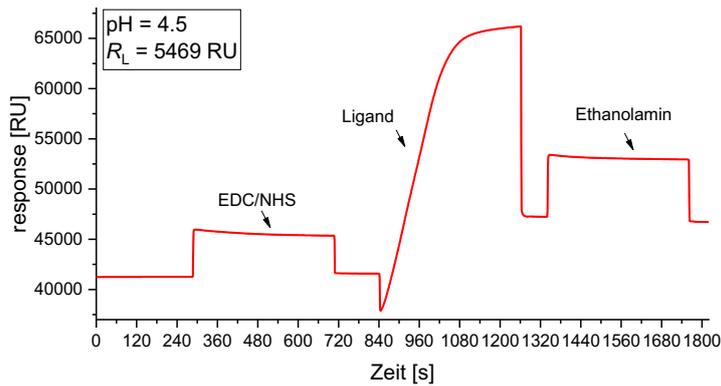


Abbildung 67: Immobilisierung von *P. aeruginosa* LpxC auf einem CM7-Sensorchip. Dazu wurde das Enzym in einem Acetatpuffer (10 mM (pH = 4.5), 1 mM DTT, 0.1 mM ZnCl₂) gelöst. Nach Aktivierung der Chipoberfläche mithilfe von EDC/NHS erfolgte die Amidkupplung für 420 s. Zuletzt wurden unbesetzte Bindungsstellen durch Ethanolamin (50% in Laufpuffer) blockiert. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 2 (50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100), der bereits im pH-Scouting genutzt wurde, verwendet.

Dabei konnte ein Immobilisierungslevel von 5469 RU erzielt werden. Anschließend wurden exemplarisch Affinitätsmessungen für die bei *E. coli* LpxC C63A verwendeten Modellanalyten, C-Furanosid **17** und Phenylethylenglycolderivat **18**, durchgeführt. Dabei wurde der leicht basische Phosphatpuffer, bei dem eine Bindung der Analyten an das *E. coli* Enzym beobachtet werden konnte, verwendet. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 Sekunden, die Dauer der Dissoziationsphase 180 Sekunden (Abb. 68).

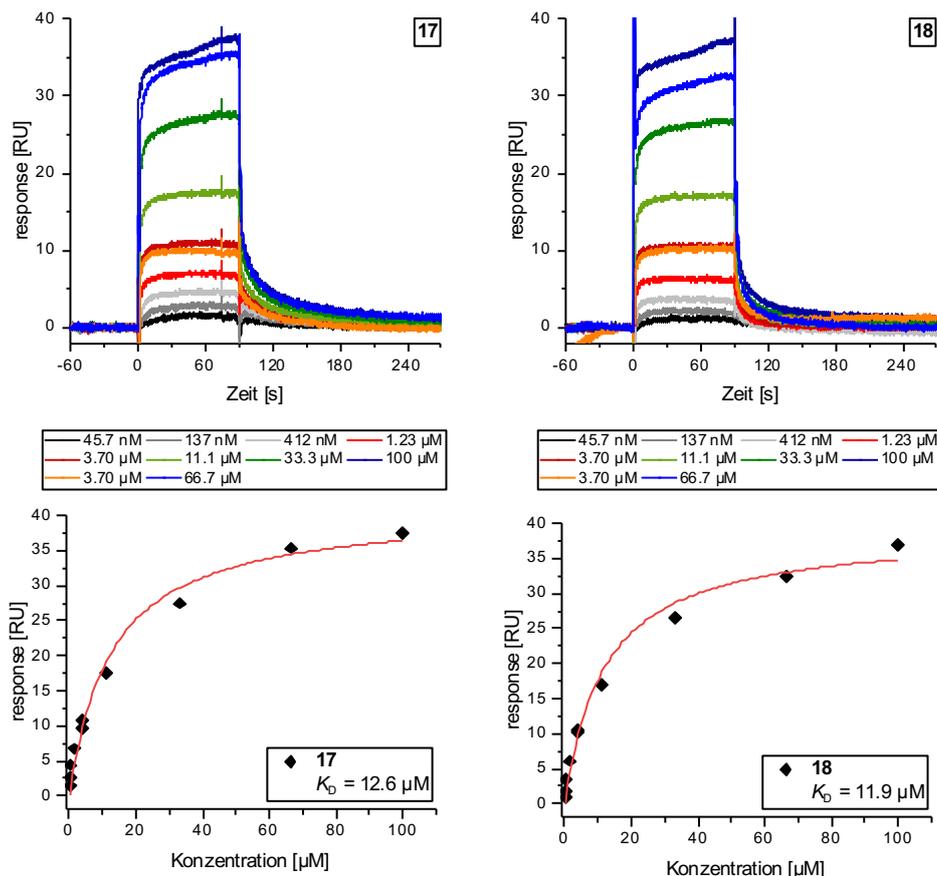


Abbildung 68: Affinitätsmessungen von **17 und **18** für *P. aeruginosa* LpxC bei 20 °C mittels SPR.** Oben: Sensorgramme, unten: Affinitätsfits. Links: **17**, rechts: **18**. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 100 µM erfolgte eine serielle 1:3-Verdünnung der Analyten, zusätzlich dazu wurde eine 2:3-Verdünnung der höchsten Analytkonzentration sowie eine Doppelbestimmung der 1:27-Verdünnung erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 2 (50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100), der bereits im pH-Scouting und bei der Immobilisierung genutzt wurde, verwendet. Durch Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration konnten mithilfe des OneSite-Binding-Modells die K_D -Werte der Substanzen berechnet werden.

Wie auch bei *E. coli* LpxC C63A beobachtet werden konnte, zeigte sich ein sehr ähnliches Verhalten der beiden Analyten. Bis zu einer Analytkonzentration von ca. 10 μM erfolgte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Assoziationsgeschwindigkeit sowie die Einstellung eines Fließgleichgewichtes mit konstanter *response*. Oberhalb dieser Konzentration zeigte sich hingegen während der gesamten Assoziationsphase ein kontinuierlicher, leichter Anstieg der *response*. Dies ließ wie zuvor bei *E. coli* LpxC C63A eine unspezifische Interaktion mit entweder dem Sensorchip oder dem Liganden vermuten. Dennoch zeigte sich durch Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration eine Sättigungskurve. Die maximale *response* betrug dabei ca. 40 RU. Der mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechnete K_D -Wert betrug für **17** 12.6 μM und für **18** 11.9 μM . Diese Werte liegen in einer Größenordnung mit den K_D -Werten von **17** und **18**, die zuvor mittels SPR für *E. coli* LpxC C63A bestimmt wurden.

Zusätzlich zu den beiden Modellanalyten wurden Affinitätsmessungen für Indolderivat **19** sowie C-Pyranosid **68** durchgeführt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug dabei ebenfalls 90 Sekunden, die der Dissoziationsphase 180 Sekunden (Abb. 69).

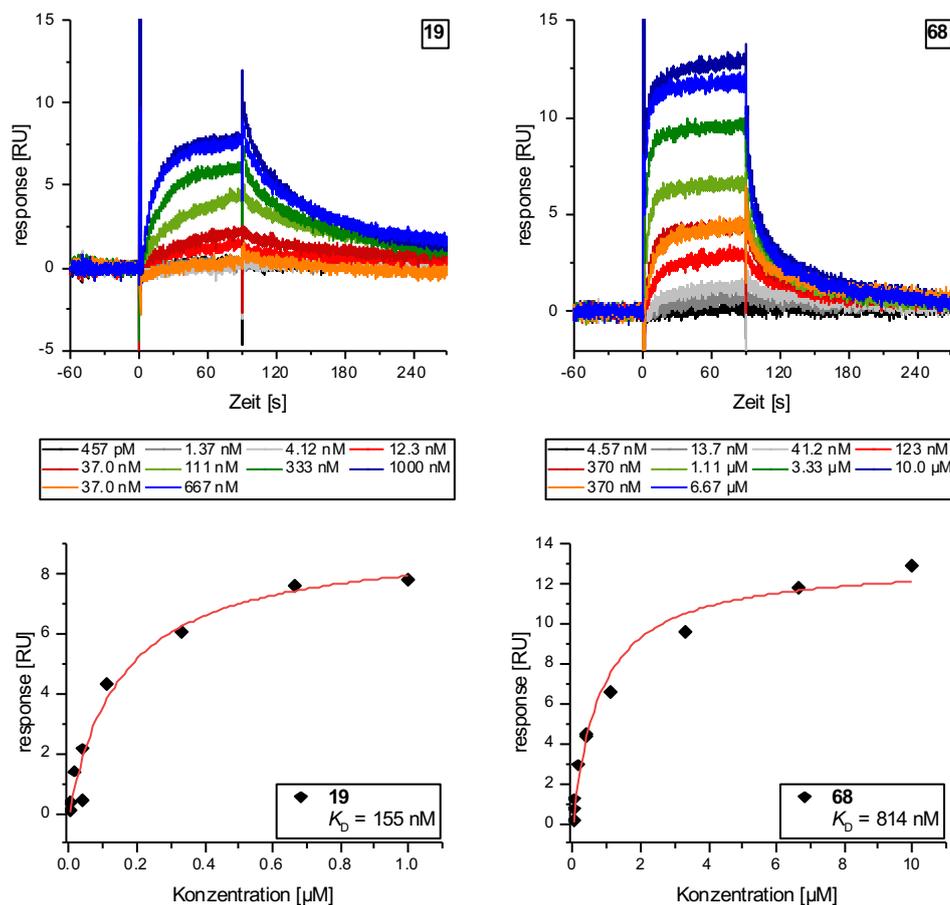


Abbildung 69: Affinitätsmessungen von **19** und **68** für *P. aeruginosa* LpxC bei 20 °C mittels SPR. Oben: Sensorgramme, unten: Affinitätsfits. Links: **19**, rechts **68**. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 1000 nM (**19**) bzw. 10.0 μM (**68**) erfolgte eine serielle 1:3-Verdünnung der Analyten, zusätzlich dazu wurde eine 2:3-Verdünnung der höchsten Analytkonzentration sowie eine Doppelbestimmung der 1:27-Verdünnung erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 2 (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100), der bereits im pH-Scouting und bei der Immobilisierung genutzt wurde, verwendet. Durch Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration konnten mithilfe des OneSite-Binding-Modells die K_D -Werte der Substanzen berechnet werden.

Verglichen mit den beiden vorherigen Analyten zeigte sich eine deutlich niedrigere maximale *response* ($R_{\max} \approx 10\text{--}15$ RU). Stattdessen zeigte sich bei beiden Substanzen bei allen untersuchten Konzentrationen die Einstellung eines Fließgleichgewichtes mit konstanter *response* und keine stetige lineare Zunahme zum Ende der Assoziationsphase bei hohen Analytkonzentrationen. Des Weiteren konnte bereits anhand der Sensorgramme ein klarer Sättigungswert der *response* beobachtet werden. Insbesondere bei **19** konnte bei einer Analytkonzentration von 667 nM sowie 1000 nM eine nahezu identische *response* nach Einstellung des Fließgleichgewichtes beobachtet werden. Dies deutete darauf hin, dass bei diesen Analytkonzentrationen die maximale Sättigung der Liganden erreicht wurde und abgesehen von dieser spezifischen Bindung keine weitere Interaktion stattfand. Auch für **68** lag bei der zweithöchsten Konzentration (6.67 μM) die *response* nahe des Plateauwertes. Durch Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration wurde für beide Substanzen eine Sättigungskurve erhalten. Die mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechneten K_D -Werte lagen für beide Substanzen im nanomolaren Bereich. Dieser betrug für **19** 155 nM und für **68** 814 nM. Beide Substanzen zeigten somit eine höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC als die Modellanalyten **17** und **18**.

Da sowohl für **19** als auch für **68** eine steigende Assoziationsgeschwindigkeit mit zunehmender Analytkonzentration beobachtet werden konnte und insbesondere für **19** auch die Dissoziation verfolgt werden konnte, wurde die Kinetik beider Analyten untersucht (Abb. 70).

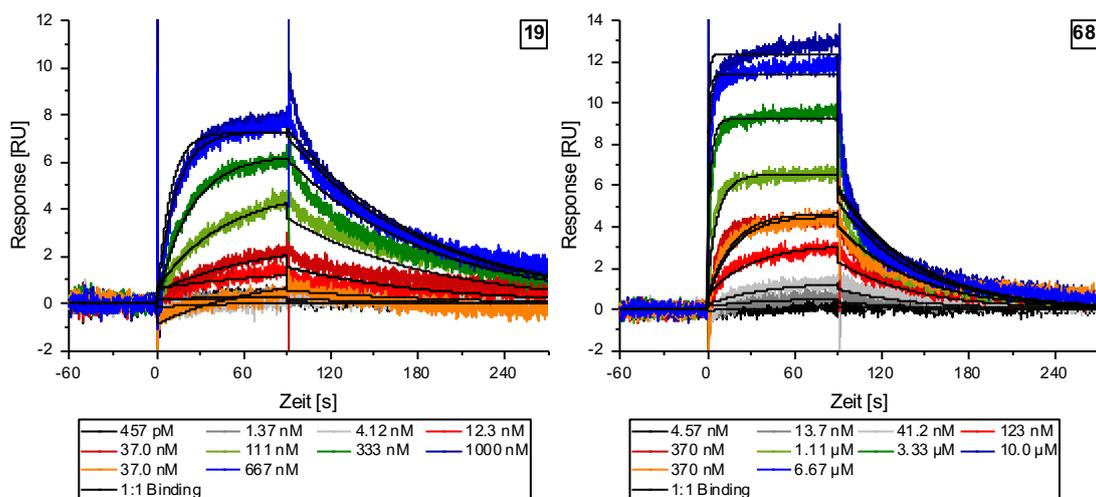


Abbildung 70: Kinetische Auswertung der Affinitätsmessungen von 19 und 68 für *P. aeruginosa* LpxC bei 20 °C mittels SPR. Links: **19**, rechts: **68**. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 1000 nM (**19**) bzw. 10.0 μM (**68**) erfolgte eine serielle 1:3-Verdünnung der Analyten, zusätzlich dazu wurde eine 2:3-Verdünnung der höchsten Analytkonzentration sowie eine Doppelbestimmung der 1:27-Verdünnung erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 2 (50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 1% DMSO, 0.05% Triton X-100), der bereits im pH-Scouting und bei der Immobilisierung genutzt wurde, verwendet. Durch Analyse nach dem 1:1-Binding-Modell konnten die kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} berechnet werden.

Zusätzlich zur Dissoziationskonstante K_D lieferte der kinetische Fit die Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} (Tab. 35).

Tabelle 35: Vergleich der K_D -Werte von 19 und 68 für *P. aeruginosa* LpxC bei 20 °C. Die Berechnung der K_D -Werte erfolgte dabei ausgehend von den vorherigen Affinitätsmessungen sowohl nach dem OneSite-Binding-Modell als auch nach einer kinetischen Analyse nach dem 1:1-Binding-Modell aus den Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} .

	OneSite-Binding	1:1-Binding		
	K_D [nM]	K_D [nM]	k_{on} [$\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]
19	155	102	10.1	0.0103
68	814	181	10.4	0.0189

Der aus dem kinetischem Fit errechnete K_D -Wert lag für beide Substanzen in einer Größenordnung mit dem Wert, der zuvor mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechnet wurde. Die Abweichung war dabei für **68** etwas höher als für **19**. Insbesondere bei hohen Substanzkonzentrationen zeigte diese Substanz auch im Fit eine höhere Abweichung von den experimentell bestimmten Werten.

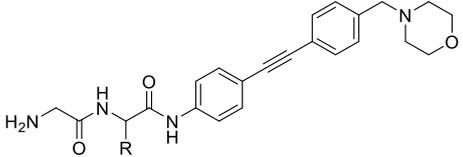
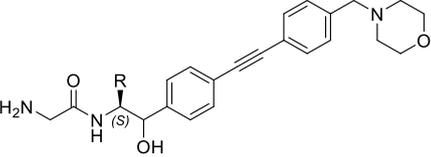
Der Vergleich der Substanzen untereinander zeigte für **19** und für **68** eine vergleichbare Geschwindigkeit bei der Komplexbildung ($k_{\text{on}} \approx 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Zeitgleich zeigte **19** jedoch eine um den Faktor 2 langsamere Komplexdissoziation ($k_{\text{off}} = 0.0103 \text{ s}^{-1}$) als **68** ($k_{\text{off}} = 0.0189 \text{ s}^{-1}$), sodass auch die Dissoziationskonstante von **19** ($K_D = 102 \text{ nM}$) um den Faktor 2 niedriger als die von **68** ($K_D = 181 \text{ nM}$) lag.

V. Struktur-Wirkungsbeziehungen

Nach Etablierung der LpxC-Assays für *P. aeruginosa* LpxC erfolgte die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten ausgewählter zuvor untersuchter Verbindungen gegen dieses Enzym mithilfe des LC-MS/MS-basierten LpxC-Enzymassays. Aus den ermittelten Inhibitionskonstanten wurden Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet. Zusätzlich dazu wurden diese mit den zuvor bestimmten inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A verglichen.

Zunächst wurden Verbindungen mit alternativer zinkbindender Gruppe, die mittels *Molecular Modelling* identifiziert worden waren, untersucht. Hierbei handelte es sich um die zuvor untersuchten Peptidderivate, die durch Kombination der Aminofunktion des Glycins mit seiner Carbonylgruppe ein zur Hydroxamsäurefunktion alternatives zinkbindendes Motiv aufwiesen (Tab. 36).

Tabelle 36: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von Peptidderivaten gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten erfolgte sowohl gegen *E. coli* LpxC C63A als auch gegen *P. aeruginosa* LpxC mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 2.5 μM .

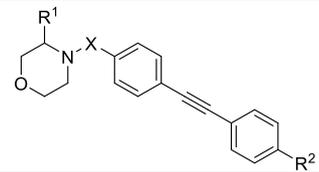
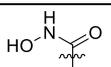
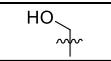
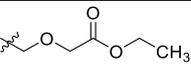
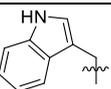
			K_i [μM]	
	Konfig.	R	<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>P. aeruginosa</i> LpxC
28	(S)		>29.6	>32.5
29	(S)		>29.6	>32.5
30	-	H	>29.6	>32.5
31	(S)	CH ₃	>29.6	>32.5
<i>ent</i> - 31	(R)		>29.6	>32.5
32	(S)		>29.6	22.2
<i>ent</i> - 32	(R)		>29.6	>32.5
			K_i [μM]	
		R	<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>P. aeruginosa</i> LpxC
33		H	>29.6	>32.5
34		CH ₃	22.2 \pm 15.0	3.23

Von allen untersuchten Dipeptid-Inhibitoren inhibierte keiner *E. coli* LpxC C63A bei einer Konzentration von 50 μM , der K_i -Wert aller Substanzen betrug >29.6 μM . Im Enzymassay gegen *P. aeruginosa* LpxC hingegen inhibierten zunächst drei Substanzen das Enzym bei einer Konzentration von 50 μM zu über 50%. Bei einer dieser Substanzen handelte es sich um das Dipeptid **28** (Gly-Thr), welches aufgrund der Threonylseitenkette die höchste Ähnlichkeit zur Leitstruktur **12** aufwies. **28** inhibierte *P. aeruginosa* LpxC bei einer Konzentration von 50 μM zu 56%. Die Dekonstruktion der Threonylseitenkette lieferte das Gly-Ser-basierte Dipeptid **29** sowie die Gly-Ala-basierten Dipeptide **31** und *ent*-**31**. Dies bewirkte einen Verlust der inhibitorischen Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC. Auch die Entfernung der Seitenkette, welche zu dem Gly-Gly-basierten Dipeptid **30** führte, bewirkte einen Verlust der inhibitorischen Aktivität. Der Austausch des Threonyl- durch einen Benzylsubstituenten führte zu den Gly-Phe-basierten Dipeptiden **32** und *ent*-**32**. Beide Stereoisomere hemmten zuvor als einzige Verbindungen in MHK-Experimenten das Wachstum des Wildtyps *E. coli* BL21(DE3). Zusätzlich dazu zeigten diese beiden Stereoisomere auch inhibitorische Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC. Dabei zeigte das (S)-konfigurierte Stereoisomer **32** eine etwas höhere Aktivität und inhibierte die enzymatische Aktivität bei einer Konzentration von 50 μM zu 64%. Das entsprechende Enantiomer *ent*-**32** inhibierte *P. aeruginosa* LpxC unter identischen Bedingungen zu 56%. Bei einer erneuten Untersuchung von **28**, **32** und *ent*-**32** zur Bestimmung des K_i -wertes zeigte jedoch lediglich die zuvor aktivste Verbindung **32** mehr als 50%ige Inhibition bei einer Konzentration von 50 μM , der K_i -Wert dieser Verbindung betrug 22.2 μM . Der K_i -Wert des (R)-konfigurierten Enantiomers *ent*-**32** war um den Faktor 2, der von **28** sogar um den Faktor 5 höher.

Die Verkürzung des Rückgrats zwischen zinkbindender Gruppe und Diphenylacetyleneinheit lieferte die Peptidomimetika **33** und **34**. Hierbei wurde das der Diphenylacetyleneinheit benachbarte Stickstoffatom entfernt und die Carbonylfunktion zum Alkohol reduziert. Wie zuvor gegen *E. coli* LpxC C63A war das unsubstituierte Peptidomimetikum **33** auf enzymatischer Ebene auch gegen *P. aeruginosa* LpxC inaktiv. Das methylsubstituierte Derivat **34** hingegen inhibierte *P. aeruginosa* LpxC mit einem K_i -Wert von 3.23 μM . Diese Verbindung inhibierte bereits zuvor als einziges Peptidderivat *E. coli* LpxC C63A. Die Affinität für *P. aeruginosa* LpxC war jedoch um den Faktor 10 höher als für *E. coli* LpxC C63A.

Anschließend erfolgte die Untersuchung ausgewählter Morpholinderivate, die ebenfalls mittels *Molecular Modelling* identifiziert worden waren (Tab. 37).

Tabelle 37: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten ausgewählter Morpholinderivate gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 25 μM . Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *P. aeruginosa* LpxC erfolgte mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 2.5 μM .

				K_i [μM]	
	R^1	X	R^2	<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>P. aeruginosa</i> LpxC
35		C=O	H	>6.34	0.875 \pm 0.189
36		C=O	H	>6.34	>8.14
38	H	CH ₂		>6.34	>8.14
39	H	CH ₂		>6.34	>8.14
56		C=O		>6.34	>8.14

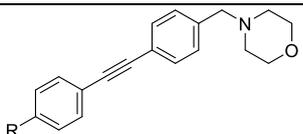
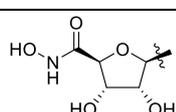
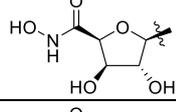
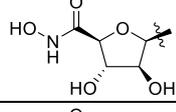
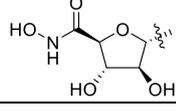
Von den untersuchten Morpholinderivaten hatte zuvor keines inhibitorische Aktivität gegenüber *E. coli* LpxC C63A ($K_i > 6.34$ μM) gezeigt. Hydroxamsäure **35**, die als einziges Morpholinderivat antibakterielle Aktivität gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) zeigte, inhibierte jedoch *P. aeruginosa* LpxC mit einem K_i -Wert von 875 nM. Der Ersatz des Hydroxamsäuresubstituenten durch eine Hydroxymethylgruppe (**36**) bewirkte einen Verlust der inhibitorischen Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC. Dies ließ, wie zuvor schon die Beobachtung des Verlustes der antibakteriellen Aktivität gegen *E. coli* BL21(DE3), darauf schließen, dass die inhibitorische Aktivität von **35** von den zinkbindenden Eigenschaften des Hydroxamsäuresubstituenten abhängt. Zur Untersuchung des Morpholinrings als möglichem zinkbindenden Element wurden zwei Verbindungen, die auf 4-[4-(Phenylethynyl)benzyl]-morpholin basieren und einen unterschiedlichen Substituenten am Ende des lipophilen Tails tragen, untersucht. Verglichen mit **35** wiesen diese beiden Verbindungen keine Hydroxamsäurefunktion und eine Methylen- anstelle einer Carbonylgruppe zwischen dem Morpholinring und dem lipophilen Tail auf. Jedoch zeigten Carbonsäureester **38** und Alkohol **39** auch gegen *P. aeruginosa* LpxC keine inhibitorische Aktivität. Zuletzt wurde, basierend auf der Ausgangsstruktur **35** unter Verwendung des Carbonyllinkers in Position 4, eine Verbindung mit einem alternativen Substituenten zum Hydroxam-

säuremotiv in Position 3 untersucht. Dabei handelte es sich um das Indol **56**, welches den nach der Hydroxamsäure **35** zweitgrößten Hemmhofdurchmesser gegen *E. coli* D22 zeigte und das Wachstum dieses Bakterienstammes mit einer minimalen Hemmkonzentration von $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ inhibierte. Auch Indol **56** zeigte jedoch keine inhibitorische Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC.

Der Vergleich aller untersuchten Verbindungen aus den mittels *Molecular Modelling* erhaltenen Serien zeigte, dass ein Großteil dieser Substanzen auch gegen *P. aeruginosa* LpxC keine inhibitorische Aktivität aufwies. Während gegen *E. coli* LpxC C63A jedoch lediglich Peptidomimetikum **34** schwache inhibitorische Aktivität aufwies, zeigte gegen *P. aeruginosa* LpxC auch die Morpholin-basierte Hydroxamsäure **35** inhibitorische Aktivität. Dabei wiesen sowohl **34** als auch **35** eine um den Faktor 10 höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC als für *E. coli* LpxC C63A auf.

Anschließend erfolgte die Untersuchung von LpxC-Inhibitoren, die ein C-Glycosid als zentrales Element zwischen dem Hydroxamsäuremotiv und dem hydrophoben Tail aufwiesen. Dabei wurden ausgewählte C-Furanoside sowie alle zuvor untersuchten C-Pyranoside untersucht (Tab. 38–39).

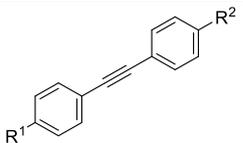
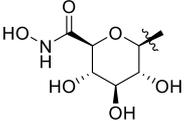
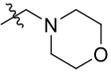
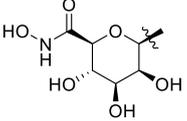
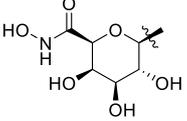
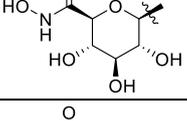
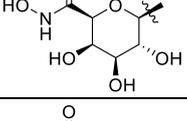
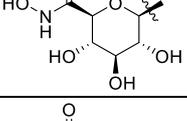
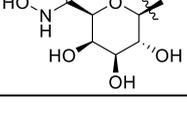
Tabelle 38: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten ausgewählter C-Furanoside gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von $25 \mu\text{M}$. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *P. aeruginosa* LpxC erfolgte mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von $2.5 \mu\text{M}$.

			K_i [μM]	
	Konfig.	R	<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>P. aeruginosa</i> LpxC
17	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)		0.411 ± 0.121	0.0954 ± 0.0644
59	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)		4.89 ± 2.47	1.13 ± 0.20
58	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)		3.55 ± 1.11	1.36 ± 0.06
61	(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)		9.94 ± 5.74	1.17 ± 0.29

Die Untersuchung der C-furanosidischen Inhibitoren gegen *P. aeruginosa* LpxC erfolgte ausgehend von der gegen *E. coli* LpxC C63A aktivsten Verbindung **17** ($K_i = 411 \text{ nM}$). Diese inhibierte *P. aeruginosa* LpxC mit einem K_i -Wert von 95.4 nM und zeigte somit eine um den Faktor 4 höhere Affinität für das Enzym von *P. aeruginosa*. Ausgehend von **17** wurden anschließend drei Stereoisomere untersucht. Dabei führte die Inversion in Position 3 zu **59** und die Inversion in Position 4 zu **58**. Beide 2,5-*cis*-konfigurierten Verbindungen wiesen eine vergleichbare inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A ($K_i \approx 4 \mu\text{M}$) auf und zeigten somit eine um den Faktor 10 geringere Affinität für *E. coli* LpxC C63A als **17**. Auch gegen *P. aeruginosa* LpxC wiesen beide Verbindungen ähnliche inhibitorische Aktivität

($K_i \approx 1 \mu\text{M}$) auf. Die Zunahme der inhibitorischen Aktivität betrug dabei analog zu **17** ungefähr den Faktor 4, sodass beide 3,4-*trans*-konfigurierten Verbindungen auch gegen *P. aeruginosa* LpxC eine zehnfach geringere Aktivität als **17** aufwiesen. Die Inversion des Stereozentrums in Position 5 von *C*-Furanosid **58** lieferte die 2,5-*trans*-konfigurierte Verbindung **61**. Diese zeigte gegen *E. coli* LpxC C63A eine um den Faktor 2 niedrigere Affinität als **58** und **59** sowie eine um den Faktor 20 niedrigere Affinität als **17**. Gegen *P. aeruginosa* LpxC lag die inhibitorische Aktivität hingegen in einer Größenordnung mit der von **58** und **59** und somit nur um den Faktor 10 niedriger als die von **17**. Alle untersuchten *C*-Glycoside zeigten eine um den Faktor 4 bis 8 höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC. Analog zu *E. coli* LpxC C63A handelte es sich auch hier bei **17** um die aktivste Verbindung ($K_i = 95.4 \text{ nM}$). Unter Beibehaltung der Konfiguration des Stereozentrums, das das pharmakophore Hydroxamsäuremotiv trug, führte die Inversion mindestens eines anderen Stereozentrums zu den Stereoisomeren **58**, **59** und **61**, die alle eine um den Faktor 10 niedrigere Affinität als **17** zeigten.

Tabelle 39: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten aller *C*-Pyranoside gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte in Abhängigkeit von der Struktur des Inhibitors entweder mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von $25 \mu\text{M}$ oder mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von $2.5 \mu\text{M}$. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *P. aeruginosa* LpxC erfolgte für alle Substanzen mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von $2.5 \mu\text{M}$.

				$K_i [\mu\text{M}]$	$K_i [\text{nM}]$
	Konfig.	R ¹	R ²	<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>P. aeruginosa</i> LpxC
67	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)			0.125 ± 0.003	17.2 ± 0.5
68	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)			0.138 ± 0.052	40.3 ± 8.4
69	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)			>25.4	2590 ± 143
70	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)			0.192 ± 0.053	88.5 ± 18.5
71	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)			20.2 ± 3.4	5130 ± 1160
72	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)			0.683 ± 0.089	219 ± 70
73	(3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)			2.67 ± 0.23	498 ± 116

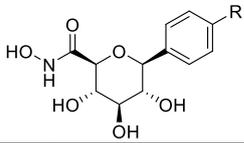
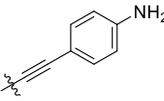
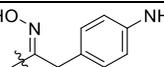
Auch bei der Untersuchung der *C*-pyranosidischen Inhibitoren konnte für alle Substanzen eine höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC als für *E. coli* LpxC C63A beobachtet werden. Bei dem Vergleich der morpholinomethylsubstituierten *C*-Pyranoside wiesen das Glucosederivat **67** sowie das Mannosederivat **68** eine ähnliche Affinität für *E. coli* LpxC C63A ($K_i \approx 130$ nM) auf. Dabei war der K_i -Wert von **67** etwas niedriger als der von **68**, beide lagen jedoch um den Faktor 3 niedriger als der des aktivsten *C*-Furanosides **17**. Im Gegensatz dazu zeigte Galactosederivat **69** keine inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A. Analog dazu zeigte **69** auch gegen *P. aeruginosa* LpxC die niedrigste Affinität mit einem K_i -Wert von 2.60 μ M. Sowohl **67** als auch **68** zeigten eine deutlich höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC. Dabei war der Unterschied zwischen den Stereoisomeren jedoch höher als bei *E. coli* LpxC C63A. Dennoch waren auch gegen *P. aeruginosa* LpxC beide Verbindungen potenter als das aktivste *C*-Furanosid **17**.

Im Folgenden wurde sowohl für Glucosederivat **67** als auch für Galactosederivat **69**, welche beide eine um den Faktor 10 höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC als für *E. coli* LpxC C63A aufwiesen, eine Variation des Substituenten am terminalen Phenylring der Diphenylacetyleneinheit durchgeführt. Bei den Anilinderivaten **70** und **71** war derselbe Trend wie bei den Morpholinomethylderivaten **67** und **69** zu beobachten. Auch hier zeigte Glucosederivat **70** eine deutlich höhere Affinität ($K_i = 88.5$ nM) als Galactosederivat **71** ($K_i = 5130$ nM). Verglichen mit der Affinität für *E. coli* LpxC C63A zeigte **70** dabei eine um den Faktor 2 und **71** eine um den Faktor 4 höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC. Zusätzlich dazu konnte jedoch auch beobachtet werden, dass der Austausch des Morpholinomethyl- durch einen Anilinsubstituenten eine Verminderung des Affinitätsunterschiedes zwischen den Diastereomeren bewirkte. Während das Glucosederivat **67** eine um den Faktor 150 höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC als das Galactosederivat **69** aufwies, wies das Glucosederivat **70** lediglich eine um den Faktor 60 höhere Affinität als das Galactosederivat **71** auf.

Der Austausch des Morpholinomethyl- durch einen Aminomethylsubstituenten lieferte das Glucosederivat **72** sowie das Galactosederivat **73**. Dies hatte wie zuvor auch bei *E. coli* LpxC C63A einen gegensätzlichen Effekt auf die Stereoisomere. Verglichen mit den beiden anderen Substituenten am lipophilen Tail führte dies einerseits zu einer Reduktion der Affinität des Glucosederivates **72** und andererseits zu einer Erhöhung der Affinität des Galactosederivates **73**. Dabei zeigten sowohl **72** als auch **73** eine um den Faktor 4 höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC als für *E. coli* LpxC C63A. Beim Vergleich der Stereoisomere untereinander zeigte **72** jedoch lediglich eine um den Faktor 2 höhere Affinität als **73**.

Zusätzlich dazu wurde basierend auf Glucosederivat **70** untersucht, welche Bedeutung die rigide Diphenylacetyleneinheit auf die inhibitorische Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC hat. Des Weiteren wurden auch die antibakteriellen Aktivitäten der entsprechenden Verbindungen gegen *E. coli* bestimmt (Tab. 40).

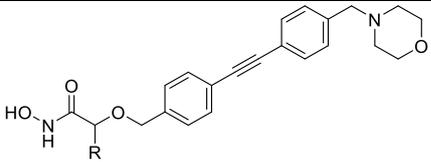
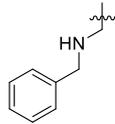
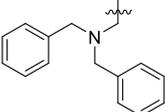
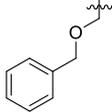
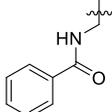
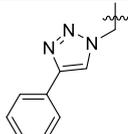
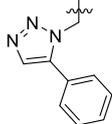
Tabelle 40: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von Glucose-basierten C-Pyranosiden, die sich in der Rigidität der Tail-Struktur unterscheiden, gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten erfolgte sowohl gegen *E. coli* LpxC C63A als auch gegen *P. aeruginosa* LpxC mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 2.5 μM . Zusätzlich dazu erfolgte die Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten mithilfe von Agardiffusionstests und MHK-Experimenten gegen den Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) (*lpxC*⁺) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22 (*lpxC101*).

		Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		K_i [μM]	K_i [nM]
	R	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>P. aeruginosa</i> LpxC
70		12.7 \pm 1.6	26.3 \pm 1.2	64	8	0.192 \pm 0.053	88.5 \pm 18.5
160		≤ 6	≤ 6	>64	>64	>25.4	3630

Die Untersuchung der biologischen Aktivität gegen *E. coli* zeigte zunächst, dass das Glucose-basierte Anilinderivat mit flexibler Tailstruktur **160** weder gegen den Wildtyp noch gegen *E. coli* D22 antibakterielle Aktivität aufwies. Zusätzlich dazu war **160** auch gegen *E. coli* LpxC C63A inaktiv. Das entsprechende C-Pyranosid mit rigider Diphenylacetyleneinheit **70** zeigte eine um mehr als den Faktor 100 höhere inhibitorische Aktivität und inhibierte *E. coli* LpxC C63A mit einem K_i -Wert von 192 nM. Dies ist in Übereinstimmung mit zuvor veröffentlichten Triazol-basierten LpxC-Inhibitoren. Hierbei zeigte sich, dass gegen *E. coli* die rigide Diphenylacetyleneinheit einer flexiblen Tail-Struktur deutlich überlegen war.^[80] Im Gegensatz dazu wurde *P. aeruginosa* LpxC jedoch sowohl durch **70** als auch durch **160** inhibiert. Der K_i -Wert von **160** betrug dabei 3.63 μM und war um den Faktor 40 höher als der von **70** sowie in einer Größenordnung mit dem von Galactosederivat **71** (vgl. Tabelle 39). Dies wies darauf hin, dass die Rigidität der Tailstruktur nicht essentiell für die Inhibition von *P. aeruginosa* LpxC ist und eine gewisse Flexibilität keinen vollständigen Aktivitätsverlust hervorruft. Bezogen auf das gesamte Inhibitor-Design schien die Stereochemie einen ähnlichen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität der Verbindung wie die Tailstruktur zu haben.

Nach der Untersuchung der rigiden C-glycosidischen Strukturen wurden verschiedene offenkettige Verbindungen auf ihre inhibitorische Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC untersucht. Hierbei handelte es sich zunächst um auf Verbindung **27** basierenden Strukturen, welche in α -Position des Hydroxamsäuremotivs einen Substituenten, der die UDP-Bindungstasche adressieren sollte, trugen. Für den Methylsubstituenten wurden dabei beide Stereoisomere untersucht. Für alle phenylsubstituierten Verbindungen, die sich im Linker zwischen Grundgerüst und Phenylring unterschieden, wurde lediglich das gegen *E. coli* LpxC C63A aktivere (*S*)-konfigurierte Stereoisomer gegen *P. aeruginosa* LpxC getestet (Tab. 41).

Tabelle 41: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von LpxC-Inhibitoren, die die UDP-Bindungstasche adressieren sollten, gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 25 μ M. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *P. aeruginosa* LpxC erfolgte mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 2.5 μ M.

			K_i [μ M]	K_i [nM]
	Konfig.	R	<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>P. aeruginosa</i> LpxC
95	(2 <i>S</i>)	CH ₃	2.61 ± 2.04	305 ± 13
<i>ent</i> - 95	(2 <i>R</i>)	CH ₃	0.427 ± 0.186	223 ± 23
96	(2 <i>S</i>)		4.59 ± 1.26	862 ± 70
97	(2 <i>S</i>)		>2.54	>3250
98	(2 <i>S</i>)		0.606 ± 0.356	725 ± 335
99	(2 <i>S</i>)		0.149 ± 0.056	58.2 ± 0.1
100	(2 <i>S</i>)		0.0246 ± 0.0036	18.6 ± 14.7
101	(2 <i>S</i>)		8.34 ± 3.74	1240 ± 189

Bei den in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv substituierten offenkettigen Verbindungen zeigten mit Ausnahme von Ether **98** und dem tertiärem Amin **97** alle Substanzen eine höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC als für *E. coli* LpxC C63A. Während das tertiäre Amin auch gegen *P. aeruginosa* LpxC inaktiv war, inhibierte Ether **98** die Enzyme beider Bakterienspezies gleichermaßen. Hierbei zeigte sich für die phenylsubstituierten Substanzen ein eindeutiger Trend bei den Affinitätsunterschieden: Je geringer die inhibitorische Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A war, desto höher war der relative Affinitätsunterschied zwischen den beiden Enzymen. Dabei unterschieden sich die Affinitäten des 1,5-substituierten Triazols **101** um den Faktor 8 und die des sekundären Amins **96** um den Faktor 5. Beide Substanzen wiesen mit einem K_i -Wert von ca. 1 μ M jedoch nach wie vor die geringste Affinität für *P. aeruginosa* LpxC auf. Im Gegensatz dazu zeigten die Substanzen, die bereits zuvor für *E. coli* LpxC C63A eine Affinitätskonstante im nanomolaren Bereich aufwiesen, geringere Affinitätsunterschiede für LpxC beider Bakterienspezies. Während Benzamid **99** eine um den Faktor 2.5 höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC aufwies, unterschieden sich die Affinitäten des

1,4-substituierten Triazols **100** lediglich um den Faktor 1.5. Demzufolge zeigte sich für *P. aeruginosa* LpxC der gleiche Trend bei den Affinitäten wie bei *E. coli* LpxC C63A: 1,4-substituiertes Triazol **100** > Amid **99** > Ether **98** > sekundäres Amin **96** > 1,5-substituiertes Triazol **101**.

Des Weiteren zeigte der Vergleich der methylsubstituierten Stereoisomere ein drastisch vermindertes eudismisches Verhältnis. Während das gegen *E. coli* LpxC C63A aktivere, (*R*)-konfigurierte Enantiomer *ent*-**95** gegen *P. aeruginosa* LpxC lediglich eine um den Faktor 2 höhere inhibitorische Aktivität zeigte, war die Affinität des (*S*)-konfigurierten Stereoisomers **95** zum Enzym von *P. aeruginosa* nahezu um den Faktor 10 höher. Verglichen mit der aktivsten Verbindung **100** zeigten beide Stereoisomere jedoch eine zehnfach geringere Aktivität für *P. aeruginosa* LpxC.

Anschließend erfolgte die Untersuchung weiterer Verbindungen mit 1,4-substituiertem Triazolmotiv in α -Position zur Hydroxamsäurefunktion (Tab. 42).

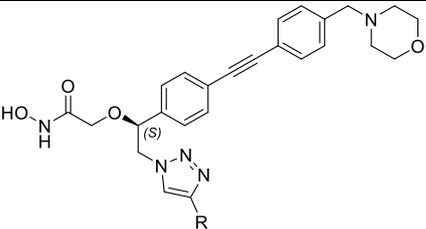
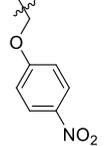
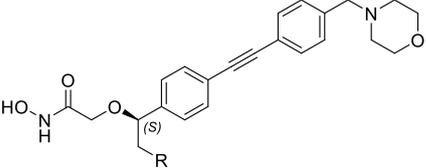
Tabelle 42: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem 1,4-substituierten Triazolmotiv in α -Position gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 25 μ M. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *P. aeruginosa* LpxC erfolgte mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 2.5 μ M.

	R	K_i [nM]	
		<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>P. aeruginosa</i> LpxC
100		24.6 \pm 3.6	18.6 \pm 14.7
110	H	221 \pm 54	64.5 \pm 17.5
111	CH ₃	55.2 \pm 6.0	9.14 \pm 0.05
112		64.7 \pm 2.8	10.6 \pm 1.0
113		3.02 \pm 0.40	1.30 \pm 0.47

Auch hierbei zeigte sich für alle Substanzen eine um den Faktor 3–8 höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC. Im Gegensatz zu den Verbindungen mit verschiedenen Linkern waren die Affinitätsunterschiede jedoch nicht daran gekoppelt, wie hoch die Affinität für *E. coli* LpxC C63A war, sondern unsystematisch. Grundsätzlich war bei den inhibitorischen Aktivitäten gegen *P. aeruginosa* LpxC der gleiche Trend wie bei denen gegen *E. coli* LpxC C63A zu beobachten. Die geringste Affinität für das Enzym zeigte das in Position 4 unsubstituierte Triazol **110**, die höchste Affinität zeigte das 1,4-substituierte Triazol mit Indol-3-yl-Rest **113** ($K_i = 1.30$ nM).

Zusätzlich zu den 1,4-substituierten Triazolen in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv wurden auch ausgewählte 1,4-substituierte Triazole in Benzylposition untersucht. Des Weiteren wurde Phenylethylenglycolderivat **18** untersucht (Tab. 43).

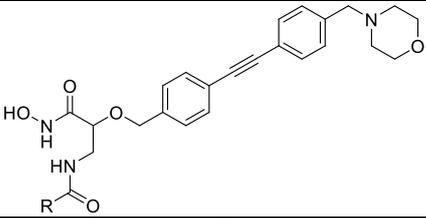
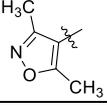
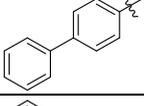
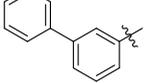
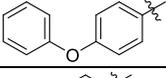
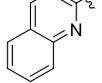
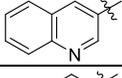
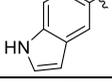
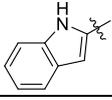
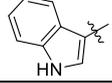
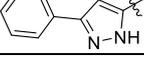
Tabelle 43: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem 1,4-substituierten Triazolmotiv in Benzylposition sowie von Modellanalyt 18 gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 25 μM . Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *P. aeruginosa* LpxC erfolgte mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 2.5 μM .

		K_i [μM]	K_i [nM]
	R	<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>P. aeruginosa</i> LpxC
114		1.41 \pm 0.37	26.3 \pm 9.0
116	CH ₃	2.49 \pm 0.78	55.1 \pm 17.9
126		0.856 \pm 0.298	58.4 \pm 5.5
		K_i [μM]	K_i [nM]
	R	<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>P. aeruginosa</i> LpxC
18	OH	2.76 \pm 0.71	313

Verglichen mit den Hydroxamsäuren mit Triazolmotiv in α -Position zeigten alle Derivate mit Triazolmotiv in Benzylposition eine deutlich höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC als für *E. coli* LpxC C63A. Sowohl **114** als auch **116** zeigten eine um den Faktor 50 höhere Affinität. Analog zu den K_i -Werten für *E. coli* LpxC C63A war dabei die Affinität von **114** um den Faktor 2 höher als von **116**. **114** inhibierte *P. aeruginosa* LpxC mit einem K_i -Wert von 26.3 nM. Der Phenylether mit Nitrogruppe in *p*-Position (**126**), welcher bereits gegen *E. coli* LpxC C63A einen K_i -Wert im nanomolaren Bereich aufwies, zeigte dagegen einen deutlich geringeren Affinitätsunterschied als **114** und **126**. Dies war in Übereinstimmung mit den Linkeruntersuchungen, bei denen ebenfalls die gegen *E. coli* LpxC C63A aktiveren Verbindungen einen geringeren Affinitätsunterschied zeigten. Der K_i -Wert von **126** lag dabei in einer Größenordnung mit dem von **116**. Bezogen auf diese drei untersuchten Hydroxamsäuren mit Triazolmotiv in Benzylposition schien die Struktur des Substituenten am Triazolrest somit gegen *P. aeruginosa* LpxC einen geringeren Einfluss auf die inhibitorische Aktivität zu haben als gegen *E. coli* LpxC C63A. Phenylethylenglycolderivat **18** zeigte ebenfalls eine höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC als für *E. coli* LpxC C63A. Der Unterschied war jedoch weniger stark ausgeprägt (Faktor 10) als bei den benzylsubstituierten Verbindungen mit größerer Seitenkette.

Anschließend erfolgte zur weiteren Untersuchung des Einflusses des Substituenten in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten von Verbindungen mit einem Amidmotiv (Acylaminoderivate), über das eine Vielzahl von Fragmenten, die die UDP-Bindetasche adressieren sollten, mit dem Grundgerüst verknüpft waren (Tab. 44).

Tabelle 44: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem Amidmotiv in α -Position gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 25 μ M. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *P. aeruginosa* LpxC erfolgte mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 2.5 μ M.

			K_i [nM]	
	Konfig.	R	<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>P. aeruginosa</i> LpxC
99	(2 <i>S</i>)		149 \pm 56	58.2 \pm 0.1
134	(2 <i>S</i>)		127 \pm 40	80.4 \pm 9.7
135	(2 <i>S</i>)		>2540	n.b.
136	(2 <i>S</i>)		41.5 \pm 5.7	149 \pm 14
137	(2 <i>S</i>)		323 \pm 126	196 \pm 18
138	(2 <i>S</i>)		377 \pm 83	168 \pm 8
139	(2 <i>S</i>)		117 \pm 21	91.1 \pm 17.5
140	(2 <i>S</i>)		9.45 \pm 1.01	5.58 \pm 0.53
141	(2 <i>S</i>)		15.3 \pm 3.6	10.3 \pm 2.0
142	(2 <i>S</i>)		87.0 \pm 58.5	46.0 \pm 16.4
19	(2 <i>S</i>)		10.7 \pm 1.2	5.91 \pm 1.47
<i>ent</i> - 19	(2 <i>R</i>)		1580 \pm 216	631 \pm 198
143	(2 <i>S</i>)		97.1 \pm 9.4	29.0 \pm 7.6
144	(2 <i>S</i>)		80.9 \pm 9.0	18.0 \pm 2.9
145	(2 <i>S</i>)		85.2 \pm 21.7	41.9 \pm 18.5

Mit Ausnahme von **136** und **139** zeigten auch bei den Amidderivaten in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv alle Substanzen eine um den Faktor 1.5 bis 4.5 höhere inhibitorische Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC als gegen *E. coli* LpxC C63A. Während Chinolinderivat **139** die niedrigste Zunahme der Affinität zeigte und beide Enzyme in derselben Größenordnung inhibierte, zeigte

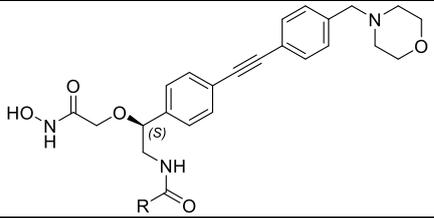
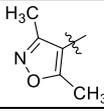
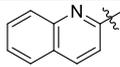
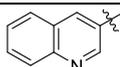
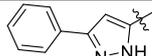
Biphenylderivat **136** sogar eine um den Faktor 3 geringere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC. Für das Regioisomer **135** war die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität nicht möglich.

Ausgehend von den Leitstrukturen, Benzamid **99** und Dimethylisoxazolylderivat **134**, konnte ein gegenläufiger Trend bei den Substituenten beobachtet werden. Während **99** eine etwas geringere Aktivität als **134** für *E. coli* LpxC C63A aufwies, wies **134** eine etwas geringere Aktivität für *P. aeruginosa* LpxC auf. Auch hier lagen beide Werte jedoch in einer Größenordnung ($K_i \approx 70$ nM). Eine geringere Aktivität als diese beiden Leitstrukturen zeigten alle Verbindungen mit zwei sechsgliedrigen Ringen als Substituenten (**135**, **136**, **137**, **138**, **139**). Dieses war unabhängig davon, ob die Ringsysteme Heteroatome enthielten sowie unabhängig davon, ob die Ringe anelliert waren. Der maximale Aktivitätsunterschied innerhalb dieser Derivate betrug für *P. aeruginosa* LpxC ungefähr den Faktor 2. Gegen *E. coli* LpxC C63A zeigte Biphenylderivat **136** zuvor hingegen eine nahezu zehnfach höhere Aktivität als Chinolinderivat **138**. Die vier (2*S*)-konfigurierten Indolderivate zeigten alle eine lediglich geringfügig höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC als für *E. coli* LpxC C63A, der Affinitätsunterschied betrug weniger als den Faktor 2. Die inhibitorische Aktivität der Regioisomere folgte dabei demselben Trend wie gegen *E. coli* LpxC C63A. Bei den aktivsten Strukturen handelte es sich um Indol-3-carboxamid **19** und Indol-5-carboxamid **140** ($K_i \approx 5$ nM). Indol-4-carboxamid **141** zeigte eine zweifach geringere Aktivität und Indol-2-carboxamid **142** sogar eine zehnfach geringere Aktivität. Den höchsten Affinitätsunterschied wiesen Pyrrolderivat **143** und Pyrazolderivat **144** auf. Während gegen *E. coli* LpxC C63A beide eine ähnliche Inhibitionskonstante wie das am wenigsten aktive Indol **142** aufwiesen, zeigten beide gegen *P. aeruginosa* LpxC eine doppelt so hohe Aktivität. Die Einführung eines zusätzlichen Phenylrings am Pyrazolsubstituenten (**145**) wirkte sich negativ auf die inhibitorische Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC aus. Während **145** gegen *E. coli* LpxC C63A eine vergleichbare Aktivität wie Pyrazol **144** aufwies, war die Aktivität von **145** gegen *P. aeruginosa* LpxC um den Faktor 2 geringer als die der unsubstituierten Verbindung.

Analog zu den beiden methylsubstituierten Verbindungen *ent*-**95** und **95** erfolgte auch für die Amidderivate in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv eine Untersuchung des eudismischen Verhältnisses. Hierfür wurde exemplarisch *ent*-**19**, das (2*R*)-konfigurierte Stereoisomer des aktivsten Indols ausgewählt. Auch diese Verbindung zeigte eine höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC als für *E. coli* LpxC C63A. Der Affinitätsunterschied war jedoch lediglich geringfügig höher als bei **19**. Demnach zeigte das (2*S*)-konfigurierte Indol-3-carboxamid **19** auch gegen *P. aeruginosa* LpxC eine um mehr als den Faktor 100 höhere Affinität als das entsprechende (2*R*)-konfigurierte Enantiomer.

Abschließend erfolgte, analog zu den 1,4-substituierten Triazolen, auch für die Amide (Acylaminoderivate) zusätzlich die Untersuchung ausgewählter (4*S*)-konfigurierter Verbindungen mit einem Substituenten in Benzylposition (Tab. 45).

Tabelle 45: Vergleich der inhibitorischen Aktivitäten von Hydroxamsäuren mit einem Amidmotiv in Benzylposition gegen LpxC verschiedener Bakterienspezies. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *E. coli* LpxC C63A erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 25 μ M. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivitäten gegen *P. aeruginosa* LpxC erfolgte mithilfe des massenbasierten LpxC-Enzymassays bei einer Ausgangssubstratkonzentration von 2.5 μ M.

		K_i [nM]	
		<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>P. aeruginosa</i> LpxC
146		393 \pm 140	46.0 \pm 8.2
147		989 \pm 317	56.1 \pm 13.7
149	CH ₃	3880 \pm 319	167 \pm 17
150		401 \pm 113	24.0 \pm 3.5
151		623 \pm 3	50.8 \pm 2.1
158		150 \pm 34	22.7 \pm 3.6

Analog zu den Hydroxamsäuren mit Triazolmotiv zeigten auch die Hydroxamsäuren mit einem Amidlinker eine deutlich höhere Affinität für *P. aeruginosa* LpxC als für *E. coli* LpxC C63A, wenn der Substituent in Benzylposition lokalisiert war. Während alle Amidderivate in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv einen Affinitätsunterschied um weniger als den Faktor 5 zeigten, wiesen alle Amidderivate in Benzylposition einen Affinitätsunterschied um mehr als den Faktor 5 auf. Analog zu den Regioisomeren zeigte auch bei den Hydroxamsäuren mit einem Acylaminomethylrest in Benzylposition das Benzamid **146** eine etwas höhere inhibitorische Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC als das Dimethylisoxazolylderivat **147**.

Insgesamt zeigte Benzamid **146** jedoch zusammen mit dem phenylsubstituierten Pyrazolderivat **158** (Faktor 8) den geringsten Aktivitätsunterschied. Im Gegensatz zur α -Position des Hydroxamsäuremotivs, wo das Vorhandensein eines Heteroatoms keinen positiven Einfluss auf die Aktivität der jeweiligen Verbindung hatte, zeigten die Chinolinderivate in Benzylposition einen deutlich höheren Affinitätsunterschied (Faktor 15). Den größten Unterschied der inhibitorischen Aktivitäten wies das Amid mit dem kleinsten Substituenten (**149**) auf. Dennoch zeigte das Acetamid auch gegen *P. aeruginosa* LpxC nach wie vor die geringste inhibitorische Aktivität. Diese war um den Faktor 2 niedriger als die aller anderen untersuchten Amide. Abgesehen davon zeigten alle Amidderivate in Benzylposition eine vergleichbare inhibitorische Aktivität ($K_i = 20\text{--}60$ nM). Dieses lässt sich möglicherweise mit der ähnlichen Struktur aller untersuchten Substituenten erklären. Eine weitere Möglichkeit ist jedoch, dass, analog zu den Ergebnissen der Triazole in Benzylposition, die Art des Substituenten einen geringeren Einfluss auf die inhibitorische Aktivität gegen *P. aeruginosa* LpxC als auf die gegen *E. coli* LpxC C63A zu haben scheint.

5.2.2 Die bakterielle Acyltransferase *E. coli* LpxA

Zur Identifizierung und Charakterisierung weiterer Inhibitoren der Lipid A-Biosynthese wurde als alternatives Target zu LpxC die bakterielle Acyltransferase *E. coli* LpxA isoliert. Diese katalysiert den ersten Schritt der Lipid A-Biosynthese: die reversible 3-Acylierung von UDP-*N*-Acetylglucosamin (1).

I. Proteinexpression und -aufreinigung

Hierfür wurde zunächst das Plasmid PJT1075 mittels Hitzeschocktransformation in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Danach erfolgte die Kultivierung der Bakterien bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von ca. 0.6. Nach Induktion durch Zugabe von IPTG (1 mM) wurde das Enzym für vier Stunden bei 30 °C exprimiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen mittels Sonifikation aufgeschlossen. Die Reinigung des Enzyms wurde in zwei Schritten durchgeführt. Die Überprüfung fand durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese statt (Abb. 71).

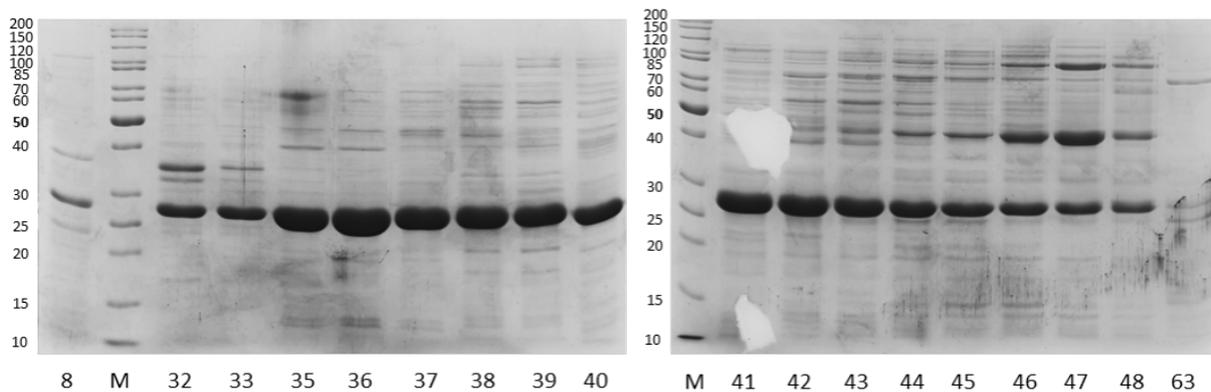
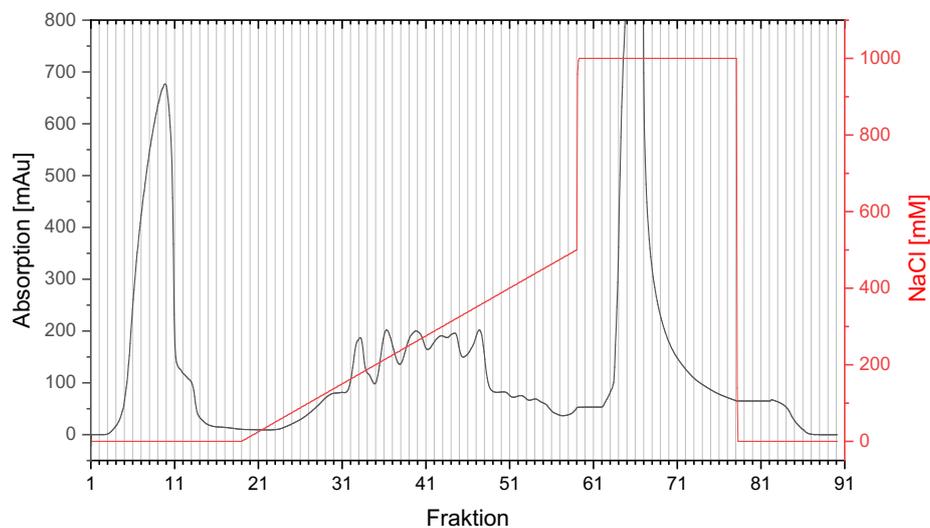


Abbildung 71: Reinigung von *E. coli* LpxA mittels Anionenaustauschchromatographie (AEX). Oben: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie, unten: 12.5%ige SDS-Polyacrylamidgele zur Analyse der Fraktionen der AEX. Links: Bahn 1 = Durchlauf der AEX, Bahn 2 = Marker (M), Bahn 3–10 = Fraktionen der AEX. Rechts: Bahn 1 = Marker (M), Bahn 2–10 = Fraktionen der AEX. Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte auf Basis von 25 mM Tris-HCl (pH = 8.0), 1 mM EDTA, 5% Glycerol. Die Elution der Proteine erfolgte durch einen linearen Natriumchloridgradienten (0 → 500 mM). *E. coli* LpxA eluierte bei einer Natriumchloridkonzentration ab 200 mM, alle untersuchten Fraktionen des Gradienten (F32–48) zeigten eine deutliche Bande zwischen 25–30 kDa (MW (*E. coli* LpxA) pro Monomer: 28.1 kDa).

Im ersten Schritt wurde das Zelllysät wie das der beiden vorherigen Enzyme auf eine starke Anionenaustauschsäule aufgetragen. Aufgrund des isoelektrischen Punktes des Enzyms (IEP = 6.63) wurde ein basischerer Puffer (25 mM Tris-HCl (pH = 8.0), 1 mM EDTA, 5% Glycerol) gewählt als bei der Reinigung von *E. coli* LpxC C63A. Dies stellte sicher, dass das Enzym negativ geladen vorlag und

unter initialen Bedingungen an die stationäre Phase der Säule band. Anschließend sollten die an die stationäre Phase gebundenen Proteine nacheinander von der Säule eluiert werden, indem die Anionenstärke im Laufpuffer erhöht wurde (linearer Gradient von 0 → 500 mM Natriumchlorid). Dabei zeigten sich mehrere breite Peaks im Chromatogramm. Das SDS-Gel zeigte, dass LpxA in allen Peaks des Gradienten (F32–48) in unterschiedlichen Intensitäten eluierte. Aus diesem Grund wurden anschließend die Fraktionen F35–45 erneut vereinig, von 55 mL auf ca. 4 mL eingengt und mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt. Die Überprüfung erfolgte wie zuvor mithilfe von SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Abb. 72).

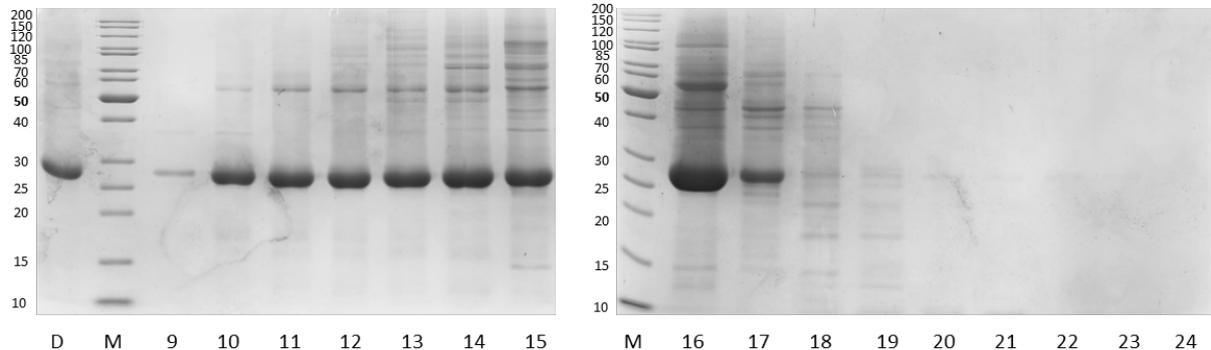
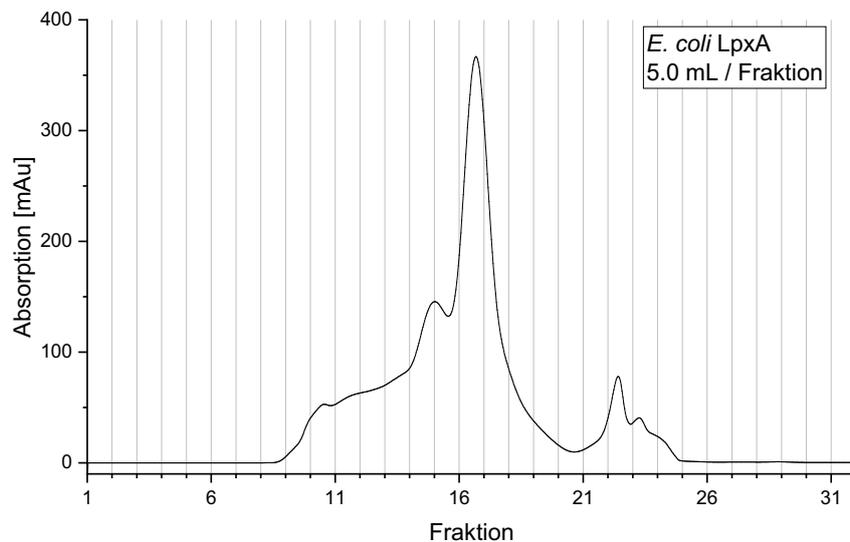


Abbildung 72: Reinigung von *E. coli* LpxA mittels Größenausschlusschromatographie (SEC). Oben: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie, unten: 12,5%ige SDS-Polyacrylamidgele zur Analyse der Fraktionen der SEC. Links: Bahn 1 = Durchlauf der eingengten Probe (D), Bahn 2 = Marker (M), Bahn 3–9 = Fraktionen der SEC. Rechts: Bahn 1 = Marker (M), Bahn 2–10 = Fraktionen der SEC. Die Größenausschlusschromatographie erfolgte mithilfe von 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH = 7,5), 150 mM NaCl. *E. coli* LpxA eluierte nach ca. 45–105 mL, die Fraktionen F10–17 zeigten eine deutliche Bande zwischen 25–30 kDa (MW (*E. coli* LpxA) pro Monomer: 28,1 kDa).

Auch hier eluierte das Enzym nicht in einem scharfen Peak, sondern über neun Fraktionen. Die SDS-Polyacrylamidgele zeigten jedoch für alle Fraktionen weitere Proteinbanden, die nicht nur durch LpxA-Dimere sowie LpxA-Trimere zu erklären waren. Des Weiteren zeigte auch der Durchlauf des Einengens eine Bande auf Höhe des LpxA-Monomers. Die hier verwendete Reinigung lieferte somit auf der einen Seite verunreinigtes Enzym, und war auf der anderen Seite zusätzlich mit einem hohen Verlust (ca. 8 mg pro Liter Zellkultur) bei der Ausbeute behaftet. Die Ausbeute an isoliertem trimerem LpxA betrug ca. 15 mg pro Liter Zellkultur.

II. SPR-Experimente

Zur Identifizierung von LpxA-Inhibitoren wurden SPR-Experimente durchgeführt. Als Laufpuffer (SPR-Puffer 1) wurde derselbe gewählt, der in einem literaturbekannten Fluoreszenzpolarisationsassay verwendet wurde (50 mM Hepes (pH = 8.0), 0.01% Triton X-100).^[64] Zunächst wurde analog zu den vorherigen Enzymen ein pH-Scouting durchgeführt. Dabei wurde *E. coli* LpxA ohne Zugabe weiterer Additive in vier verschiedenen Acetatpuffern (10 mM; pH = 4.0, 4.5, 5.0 und 5.5) gelöst (Abb. 73).

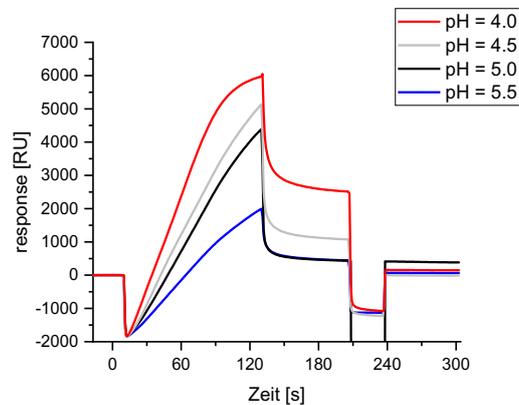


Abbildung 73: pH-Scouting von *E. coli* LpxA zur Konzentrierung des Enzyms mittels elektrostatischer Wechselwirkungen nahe der Sensorchipoberfläche. Dazu wurde das Enzym in vier verschiedenen Acetatpuffern (10 mM; pH = 4.0, 4.5, 5.0, 5.5) gelöst und über einen CM5-Sensorchip geleitet. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 1 (50 mM Hepes (pH = 8.0), 0.01% Triton X-100) verwendet.

Hierbei zeigte sich bei pH = 4.0 die höchste Anlagerung, jedoch auch die höchste unspezifische Restbindung nach Ende der Dissoziationsphase. Bei pH = 4.5 zeigte sich ebenfalls eine unspezifische Restbindung, sodass diese beiden pH-Werte verworfen wurden. Bei pH = 5.0 sowie bei pH = 5.5 zeigte sich beide Male keine unspezifische Restbindung. Die *response* bei pH = 5.0 war jedoch deutlich höher, sodass das Enzym im Folgenden ohne weitere Optimierung der Puffer bei pH = 5.0 über eine Amidkupplung auf einem CM5-Sensorchip immobilisiert wurde (Abb. 74).

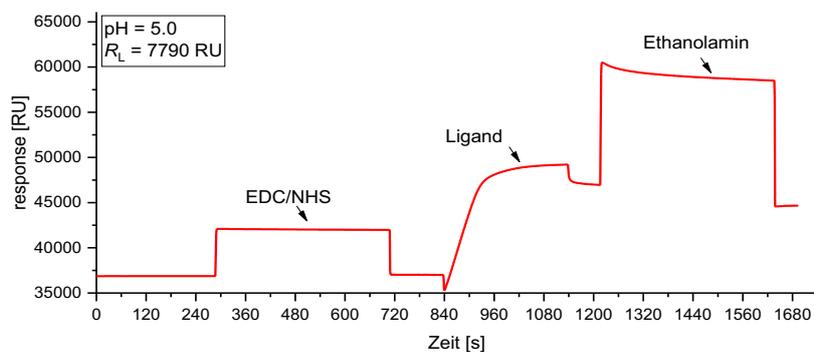


Abbildung 74: Immobilisierung von *E. coli* LpxA auf einem CM5-Sensorchip zur Durchführung von SPR-Experimenten. Dazu wurde das Enzym in einem Acetatpuffer (10 mM, pH = 5.0) gelöst. Nach Aktivierung der Chipoberfläche mithilfe von EDC/NHS erfolgte die Amidkupplung für 300 s. Zuletzt wurden unbesetzte Bindungsstellen durch Ethanolamin blockiert. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 1 (50 mM Hepes (pH = 8.0), 0.01% Triton X-100), der bereits im pH-Scouting genutzt wurde, verwendet.

Nach Aktivierung der Oberfläche mittels EDC und NHS wurde LpxA über die Chipoberfläche geleitet und auf dieser immobilisiert. Anschließend wurden potentiell unbesetzte Bindungsstellen mittels Ethanolamin blockiert. Die finale *response* betrug $R_L = 7790$ RU. Der Sättigungsbereich der Anlagerung ab $t = 1000$ s zeigte, dass die maximale Anlagerung auf einem CM5-Chip erreicht wurde. Die finale *response* zeigte des Weiteren, dass eine nahezu quantitative Kupplung erfolgte und kaum unbesetzte Bindungsstellen mit Ethanolamin blockiert wurden. Dies machte im Gegensatz zu den vorherigen

Enzymen weder die Verwendung eines CM7-Sensorchips noch eine Optimierung der Immobilisierungsbedingungen erforderlich.

Vor der Messung potentieller Inhibitoren sollte eine Validierung des Assays anhand literaturbekannter LpxA-Inhibitoren erfolgen. Die erste Affinitätsmessung erfolgte mit dem Peptidinhibitor P920 (**15**) ($K_D = 0.050\text{--}4.7\ \mu\text{M}$)^[62–64]. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 Sekunden, die Dauer der Dissoziationsphase 180 Sekunden (Abb. 75).

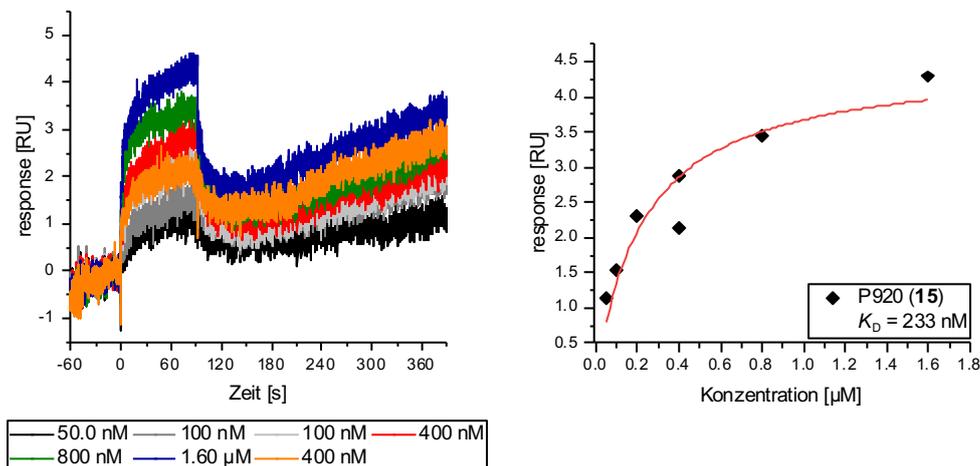


Abbildung 75: Affinitätsmessung von P920 (15) für *E. coli* LpxA bei 25 °C mittels SPR. Links: Sensorgramm, rechts: Affinitätsfit. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 1.60 μM erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung des Analyten, zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4-Verdünnung erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 1 (50 mM Hepes (pH = 8.0), 0.01% Triton X-100), der bereits im pH-Scouting und bei der Immobilisierung genutzt wurde, verwendet. Durch Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration konnte mithilfe des OneSite-Binding-Modells der K_D -Wert von **15** berechnet werden.

Das Sensorgramm zeigte für P920 (**15**) eine konzentrationsabhängige Zunahme der *response* am Ende der Assoziationsphase. Dabei war ein leichter Anstieg des Signals in der Dissoziationsphase zu beobachten, dieser war jedoch konzentrationsunabhängig. Auch die *response* vor Beginn der Assoziationsphase war für jede Messung identisch, dies sprach dafür, dass kein Analyt nach Ende der Dissoziationsphase gebunden blieb. Die maximale *response* betrug $R_{\text{max}} = 5\ \text{RU}$. Dies deutete darauf hin, dass bei einer Sättigung lediglich 5% der Liganden einfach mit dem Analyten besetzt waren.

Durch Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration zeigte sich eine Sättigungskurve. Der mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechnete K_D -Wert von **15** betrug 233 nM.

Zusätzlich dazu wurde als zweiter Analyt der literaturbekannte Peptidinhibitor RJPXD33 (**16**) ($K_D = 22\ \mu\text{M}$)^[63] getestet (Abb. 76).

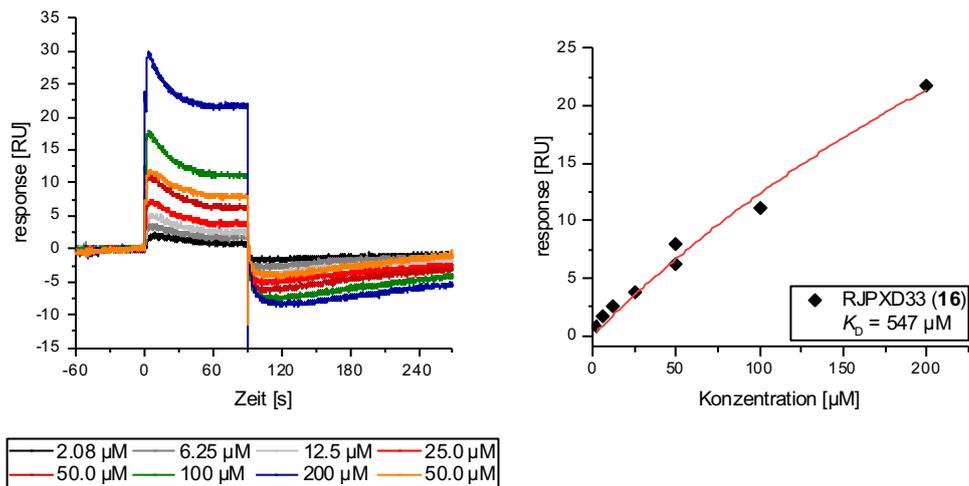


Abbildung 76: Affinitätsmessung von RJPXD33 (16) für *E. coli* LpxA bei 25 °C mittels SPR. Links: Sensorgramm, rechts: Affinitätsfit. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 200 μM erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung des Analyten, zusätzlich dazu wurde eine 1:96-Verdünnung sowie eine Doppelbestimmung der 1:4-Verdünnung erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 1 (50 mM Hepes (pH = 8.0), 0.01% Triton X-100), der bereits im pH-Scouting und bei der Immobilisierung genutzt wurde, verwendet. Durch Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration konnte mithilfe des OneSite-Binding-Modells der K_D -Wert von **16** berechnet werden.

Auch für RJPXD33 (**16**) zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der *response*, diese näherte sich jedoch keinem Sättigungswert an. Durch Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration zeigte sich eine nahezu lineare Zunahme des Signals. In Anbetracht des leicht bogenförmigen Verlaufs wurde dennoch der K_D -Wert von **16** mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechnet, dieser betrug 547 μM und lag somit außerhalb des getesteten Konzentrationsbereiches.

Zur Validierung dessen erfolgten zwei weitere Messungen des Analyten RJPXD33 (**16**). Dabei wurde sowohl ein niedrigerer als auch ein höherer Konzentrationsbereich untersucht. Der niedrigere Bereich wurde gewählt, da die maximale *response* deutlich höher war als sie zuvor bei P920 (**15**) beobachtet werden konnte. Dies ließ sich sowohl mit einer unspezifischen Interaktion mit dem Liganden oder dem Sensorchip als auch mit einer spezifischen Interaktion mit einem oder zwei weiteren aktiven Zentren des trimeren Liganden erklären. Durch Verwendung einer niedrigeren Analytkonzentration sollte sowohl eine unimolekulare Interaktion gewährleistet als auch eine unspezifische Interaktion oberhalb einer kritischen Analytkonzentration vermieden werden. Der höhere Konzentrationsbereich wurde gewählt, um aufgrund des zuvor berechneten K_D -Wertes einen Übergang der *response* in einen Sättigungswert zu überprüfen (Abb. 77).

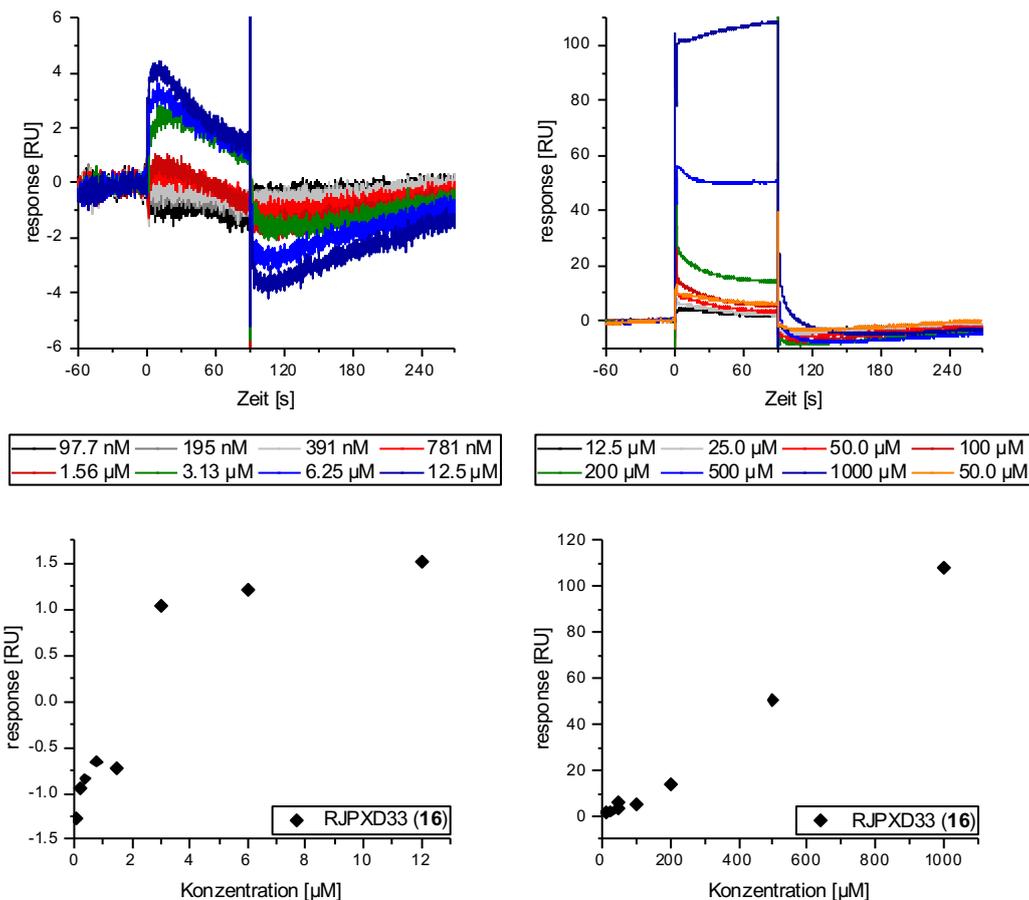


Abbildung 77: Variation des Konzentrationsbereiches von RJPXD33 (16) für *E. coli* LpxA bei 25 °C mittels SPR. Oben: Sensorgramme, unten: Analyse der Sensorgramme. Links: niedriger Konzentrationsbereich. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 12.5 μM erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung des Analyten. Rechts: hoher Konzentrationsbereich. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 1000 μM erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung des Analyten, zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:16-Konzentration erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 1 (50 mM Hepes (pH = 8.0), 0.01% Triton X-100), der bereits im pH-Scouting und bei der Immobilisierung genutzt wurde, verwendet. Nach Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration konnte kein K_D -Wert von 16 mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechnet werden.

Auch hier zeigte sich bei beiden Experimenten von RJPXD33 (16) keine Bindungskurve nach Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration. Im niedrigen Konzentrationsbereich zeigte sich bis zu einer Konzentration von 1.56 μM eine negative *response*, anschließend ein sprunghafter Anstieg um ca. 2 RU und eine nahezu identische *response* für alle untersuchten Analytkonzentrationen zwischen 3.13–12.5 μM . Im hohen Konzentrationsbereich zeigte sich hingegen eine konzentrationsabhängige Zunahme der *response*, diese ging entgegen der vorherigen Annahme jedoch nicht in einen Sättigungsbereich über. Die Validierung des Assays unter Verwendung von 16 war somit nicht erfolgreich.

Stattdessen wurde als zweiter Analyt HM-UDP-GlcNAc (2) untersucht. Hierbei handelt es sich um eines der beiden Produkte der durch LpxA katalysierten Reaktion. Ein K_D -Wert dieses Analyten ist nicht bekannt. In Konkurrenzexperimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass der IC_{50} -Wert gegen 20 nM 15 mit *N*-terminalem TAMRA-Fluorophor (TAMRA-P920) 140 nM betrug.^[64] Dies ließ darauf schließen, dass der K_D -Wert von HM-UDP-GlcNAc (2) ca. um den Faktor 10 höher liegt als der K_D -Wert von 15, sodass die Affinitätsmessungen für einen Konzentrationsbereich von 50.0 nM – 160 μM durchgeführt wurden (Abb. 78).

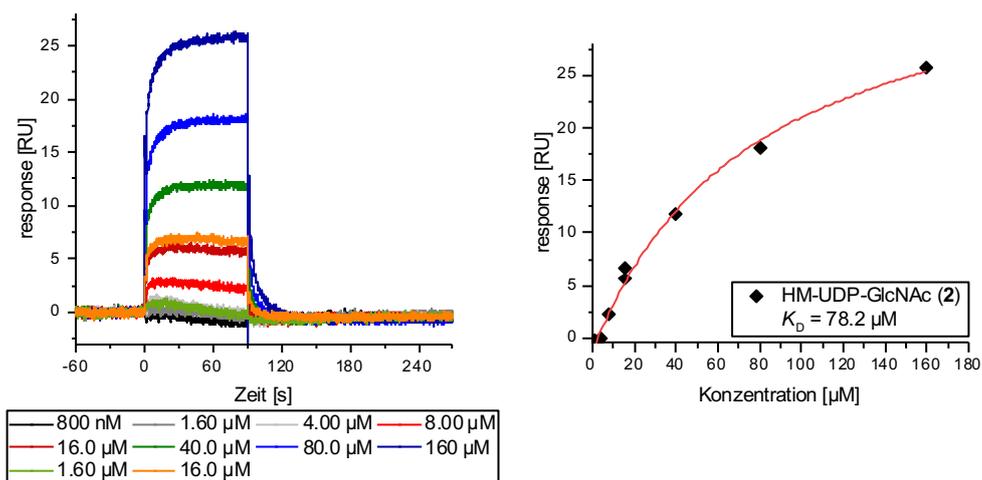


Abbildung 78: Affinitätsmessung von HM-UDP-GlcNAc (2) für *E. coli* LpxA bei 25 °C mittels SPR. Links: Sensorgramm, rechts: Affinitätsfit. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 160 µM erfolgte eine zweifache serielle 1:10-Verdünnung des Analyten. Anschließend erfolgte ausgehend von diesen drei Startkonzentrationen eine serielle 1:2-Verdünnung. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung beider 1:10-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 180 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 1 (50 mM HEPES (pH = 8.0), 0.01% Triton X-100), der bereits im pH-Scouting und bei der Immobilisierung genutzt wurde, verwendet. Durch Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration konnte mithilfe des OneSite-Binding-Modells der K_D -Wert von 2 berechnet werden.

Im Sensorgramm zeigte sich für HM-UDP-GlcNAc (2) eine konzentrationsabhängige Zunahme der *response*. Im Gegensatz zu dem Peptid RJPXD33 (16) war diese jedoch nicht linear, sondern es zeigte sich durch Auftragen der *response* gegen die Analytkonzentration ein Übergang in einen gesättigten Bereich. Ein nicht-linearer Fit mithilfe des OneSite-Binding-Modells lieferte einen K_D -Wert von 78.2 µM. Dieser war um den Faktor 300 höher als der zuvor mittels SPR bestimmte K_D -Wert für P920 (15). In Anbetracht der hohen Schwankung für den Literaturwert von 15 bis in den mikromolaren Bereich war der hier bestimmte Wert jedoch in Einklang mit der Annahme, dass der K_D -Wert von HM-UDP-GlcNAc (2) eine Zehnerpotenz höher als der von 15 ist.

Somit zeigte die Verwendung dieser beiden Analyten die prinzipielle Anwendbarkeit der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie zur Identifikation von LpxA-Inhibitoren.

5.2.3 Die bakterielle Acyltransferase *E. coli* LpxA mit *N*-terminalem Strep-Tag II

Zur Durchführung weiterer Affinitätsmessungen sollte dennoch eine alternative Kupplungsstrategie versucht werden, da bei der zuvor durchgeführten Amidkupplung die Immobilisierung prinzipiell über jedes freie Amin erfolgen kann. Dadurch können die LpxA-Monomere nicht nur über ihre *N*-Termini, sondern auch über jede ihrer zehn Lysinseitenketten an die Chipoberfläche gebunden werden. Da diese Lysinreste aufgrund ihrer Basizität primär in der UDP-Bindungstasche lokalisiert sind, wäre bei dieser unerwünschten Kupplung bereits eine potentielle Bindungstasche für LpxA-Inhibitoren besetzt. Eine Möglichkeit zur Vermeidung dieser unerwünschten Kupplung über Lysinseitenketten wäre eine Immobilisierung des Enzyms in Anwesenheit eines Analyten, der an das aktive Zentrum gebunden ist. Da es sich jedoch sowohl bei P920 (15) als auch bei RJPXD33 (16) um Peptidinhibitoren mit einem *N*-Terminus sowie einer zusätzlichen Lysinseitenkette handelt, konnte keine selektive Immobilisierung des Ligand-Analyt-Komplexes ohne zeitgleiche Immobilisierung des freien Analyten gewährleistet werden. Stattdessen sollte ein *Capture Approach* von *E. coli* LpxA mit *N*-terminalem Strep-Tag II anstelle einer direkten Immobilisierung des ungetaggten Enzyms versucht werden.

I. Proteinexpression und -aufreinigung

Dafür wurde zunächst das Plasmid pET30bEcLpxAStrepII mittels Hitzeschocktransformation in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Anschließend erfolgte eine Kultivierung der Bakterien bis zu einer optischen Dichte von ca. 0.6, gefolgt von der Induktion durch Zugabe von IPTG (1 mM). Danach wurden die Bakterienzellen für weitere vier Stunden bei 30 °C kultiviert und mittels Sonifikation aufgeschlossen. Die Reinigung wurde in zwei Schritten durchgeführt: nach einer manuellen Affinitätschromatographie wurde eine automatisierte Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Die Überprüfung der Reinigung fand durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese statt (Abb. 79).

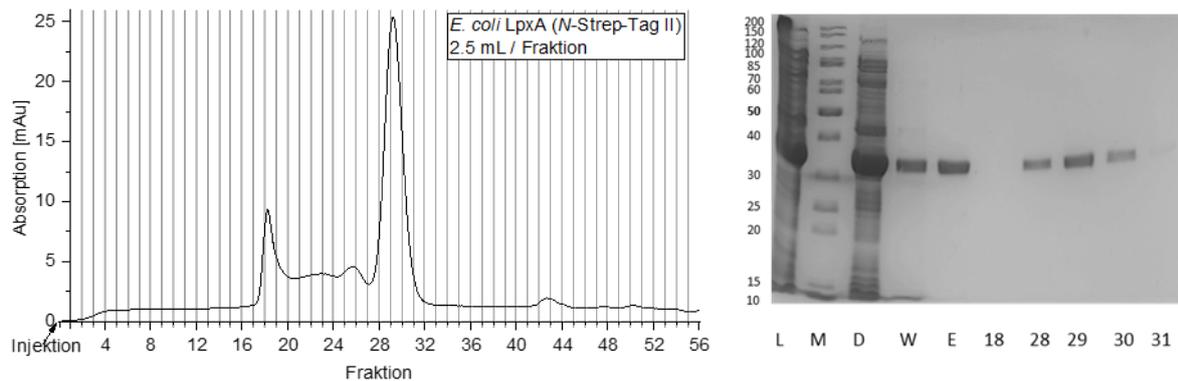


Abbildung 79: Reinigung von *E. coli* LpxA mit N-terminalem Strep-Tag II. Links: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie, rechts: 12.5%iges SDS-Polyacrylamidgel zur Analyse der Fraktionen beider Reinigungsschritte. Bahn 1 = Lysat (L), Bahn 2 = Marker (M), Bahn 3–5 = Fraktionen der Affinitätschromatographie (D = Durchlauf, W = Waschen, E = Eluat), Bahn 6–10 = Fraktionen der Größenausschlusschromatographie. Die Größenausschlusschromatographie erfolgte mithilfe von 25 mM Tris-HCl (pH = 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5% Glycerol. *E. coli* LpxA eluierte nach ca. 65–75 mL, die Fraktionen F28–30 zeigten eine deutliche Bande bei ca. 30 kDa (MW (*E. coli* LpxA) pro Monomer: 29.1 kDa).

Im ersten Schritt wurde das Zelllysat, welches im SDS-Gel eine intensive Bande bei ca. 30 kDa zeigte und somit eine Überexpression von *E. coli* LpxA mit N-terminalem Strep-Tag II aufwies, auf eine manuelle Affinitätschromatographiesäule aufgetragen. Dabei sollte das gewünschte Protein über den Affinitätstag an die streptavidinartige stationäre Phase der Säule binden. Hier zeigte sich jedoch, dass der Durchlauf neben allen unerwünschten Proteinbestandteilen auch einen überproportionalen Anteil LpxA enthielt. Dies äußerte sich auf dem SDS-Gel darin, dass der Durchlauf (D) der Affinitätschromatographie dem Zelllysat (L) ähnelte. Anschließend sollten durch einen Waschdurchlauf unter Verwendung initialer Bedingungen alle schwach bzw. nicht-bindenden Proteine ohne N-terminalen Strep-Tag II eluiert werden. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch kompetitive Verdrängung des Affinitätstags durch Zugabe von Biotin. Auch hier zeigte jedoch neben dem Eluat (E) auch die Waschfraktion (W) einen hohen Anteil des Zielproteins. Allerdings zeigten diese Fraktionen im Gegensatz zu dem Durchlauf keine weiteren unerwünschten Proteine. In der darauf folgenden Größenausschlusschromatographie eluierte *E. coli* LpxA in einem scharfen Peak (F28–30). Zusätzlich dazu konnten fluoreszierende Nicht-Proteinbestandteile abgetrennt werden (F18). Die Kombination beider Reinigungsschritte lieferte reines *E. coli* LpxA mit N-terminalem Strep-Tag II. Die Ausbeute betrug dabei 0.45 mg pro Liter Zellkultur.

Verglichen mit der Reinigung des ungetaggtten Enzyms konnte eine deutlich geringere Ausbeute an *E. coli* LpxA isoliert werden. Hierbei zeigte sich insbesondere bei der Affinitätschromatographie ein hoher Verlust, da der Großteil des Enzyms nicht an die stationäre Phase der Säule band, sondern bereits im Durchlauf eluierte. Bei der anschließenden Größenausschlusschromatographie eluierte das getaggte

LpxA jedoch im Gegensatz zu dem ungetaggtten Enzym in einem scharfen Peak. Des Weiteren zeigten die Fraktionen auf dem SDS-Polyacrylamidgel keine weiteren Banden als das LpxA-Monomer.

II. SPR-Experimente

Für die folgenden SPR-Experimente erfolgte die Immobilisierung von *E. coli* LpxA mithilfe des CAPture Kits. Der Laufpuffer basierte auf dem, der zuvor für das ungetaggte Enzym verwendet wurde. Zusätzlich dazu beinhaltete dieser, analog zu den LpxC-Experimenten, eine physiologische Salzkonzentration (150 mM NaCl). Des Weiteren wurden das Reduktionsmittel TCEP (1 mM) sowie EDTA (2 mM) hinzugefügt und der Anteil des Detergens Tween 20 (0.05%) erhöht. Bei der Immobilisierung wurde das Enzym über seinen *N*-terminalen Strep-Tag II an die streptavidinartige Chipoberfläche gebunden (Abb. 80).

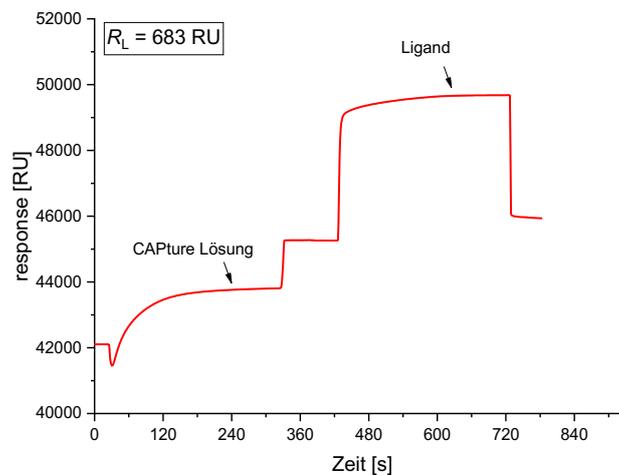


Abbildung 80: Immobilisierung von *E. coli* LpxA über seinen *N*-terminalen Strep-Tag II zur Durchführung von SPR-Experimenten. Nach Aktivierung der Chipoberfläche mithilfe der CAPture-Lösung erfolgte die Immobilisierung von *E. coli* LpxA über einen Zeitraum von 300 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 3 (50 mM HEPES (pH = 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20) verwendet.

Dabei konnte ein Immobilisierungslevel (R_L) von 683 RU erzielt werden. Anschließend wurden analog zu dem ungetaggtten Enzym, welches über eine Amidkupplung immobilisiert wurde, Affinitätsmessungen der beiden zuvor verwendeten literaturbekannten peptidischen LpxA-Inhibitoren P920 (**15**) und RJPXD33 (**16**) durchgeführt. Zusätzlich dazu wurde das Substrat der durch LpxA katalysierten Reaktion UDP-GlcNAc (**1**) untersucht. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 Sekunden, die Dauer der Dissoziationsphase 300 Sekunden (Abb. 81).

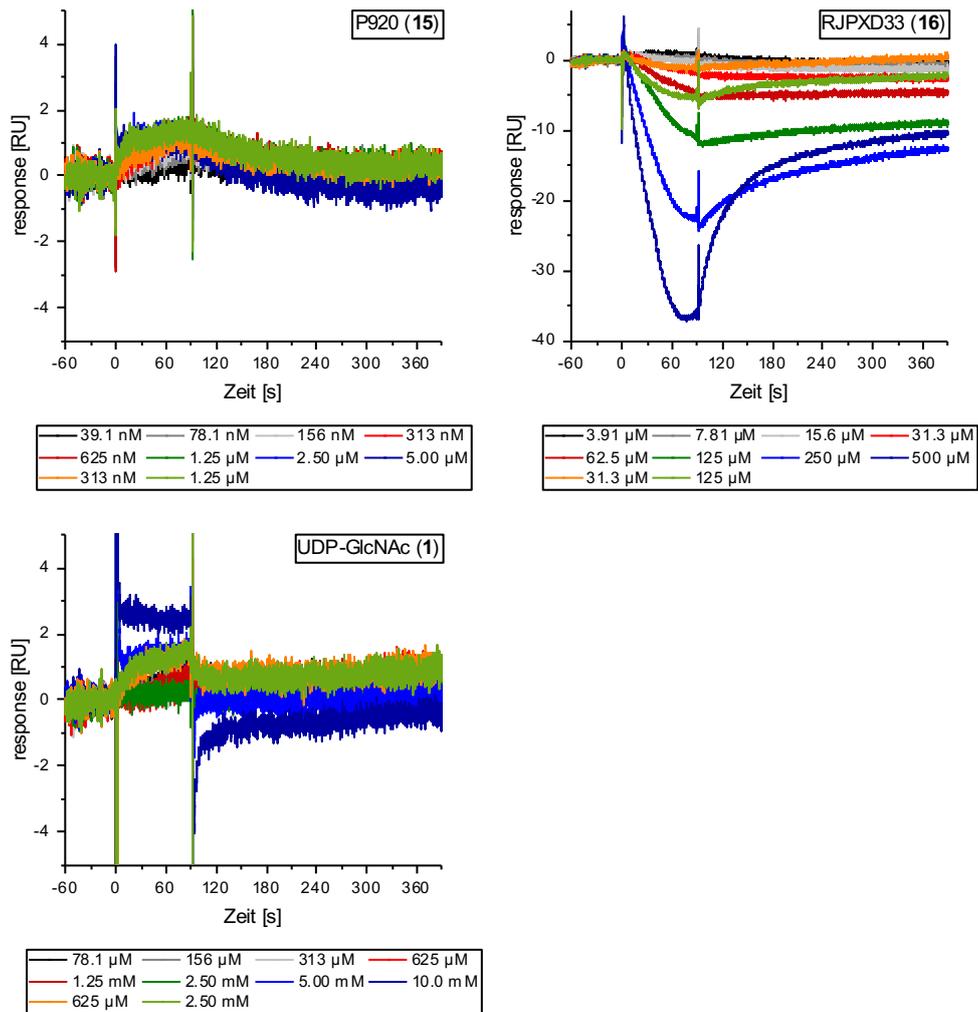


Abbildung 81: Sensorgramme der Affinitätsmessungen der Peptidinhibitoren P920 (15) und RJPXD33 (16) sowie des natürlichen Substrates 1 für *E. coli* LpxA bei 20 °C mittels SPR. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 5.00 μ M (15), 500 μ M (16) bzw. 10.0 mM (1) erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung der Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 300 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 3 (50 mM HEPES (pH = 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20) verwendet.

Dabei zeigte sich in Übereinstimmung mit dem niedrigen Immobilisierungslevel eine noch niedrigere *response* für P920 (15) sowie UDP-GlcNAc (1) als zuvor beim ungetaggteten LpxA. Das Peptid RJPXD33 (16) hingegen zeigte eine starke negative *response*. Zur Quantifizierung der Konzentrationsabhängigkeit wurde anschließend die *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die jeweilige Analytkonzentration aufgetragen (Abb. 82).

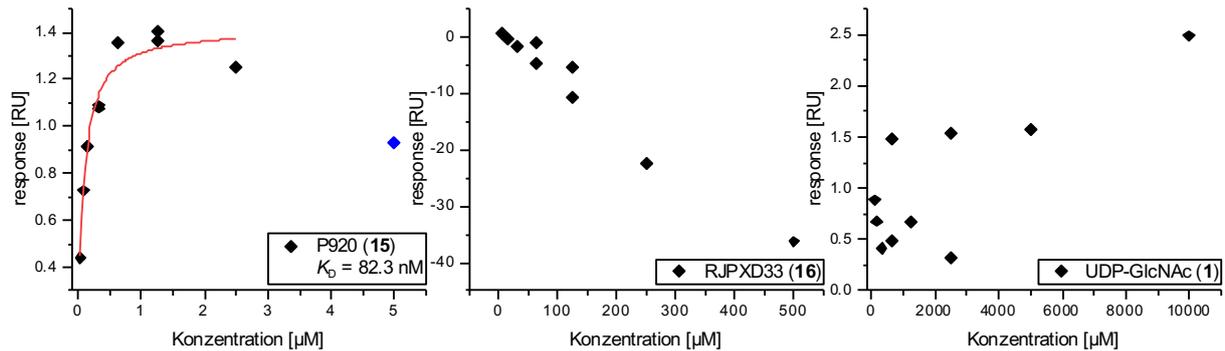


Abbildung 82: Analyse der Sensorgramme der Peptidinhibitoren P920 (**15**) und RJPXD33 (**16**) sowie des natürlichen Substrates **1** für *E. coli* LpxA bei 20 °C mittels SPR. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 5.00 µM (**15**), 500 µM (**16**) bzw. 10.0 mM (**1**) erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung der Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 300 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 3 (50 mM Hepes (pH = 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20) verwendet. Nach Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration wurde mithilfe des OneSite-Binding-Modells der K_D -Wert von **15** berechnet (blau = maskierter Wert).

Dabei zeigte sich für das Peptid P920 (**15**) mit Ausnahme der höchsten Analytkonzentration (5.00 µM) eine konzentrationsabhängige Zunahme der *response*. Diese erreichte ab einer Konzentration von ca. 625 nM einen Plateauwert. Der mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechnete K_D -Wert betrug unter Vernachlässigung dieser maximalen Konzentration 82.3 nM. Dieser war ca. um den Faktor 3 niedriger als der, der zuvor für das ungetaggte Enzym beobachtet wurde, lag jedoch im Bereich der Spanne der Literaturwerte. Sowohl für das Peptid RJPXD33 (**16**) als auch für das natürliche Substrat UDP-GlcNAc (**1**) konnte hingegen keine Bestimmung des K_D -Wertes mithilfe des OneSite-Binding-Modells durchgeführt werden. Während **16** eine konzentrationsabhängige Abnahme der *response* bis zu -35 RU zeigte, konnte bei **1** eine konzentrationsunabhängige positive *response* beobachtet werden.

Anschließend erfolgte aufgrund der sehr niedrigen *response* ($R_{\max} = 2$ RU) eine erneute Immobilisierung des Enzyms. Hierbei konnte eine Verdopplung des Immobilisierungslevels auf 1138 RU erzielt werden. Neben einer Wiederholung der Affinitätsmessungen der drei Analyten **15**, **16** und **1** wurde zusätzlich HM-UDP-GlcNAc (**2**), welches eines der Produkte der durch LpxA katalysierten Reaktion darstellt, untersucht (Abb. 83).

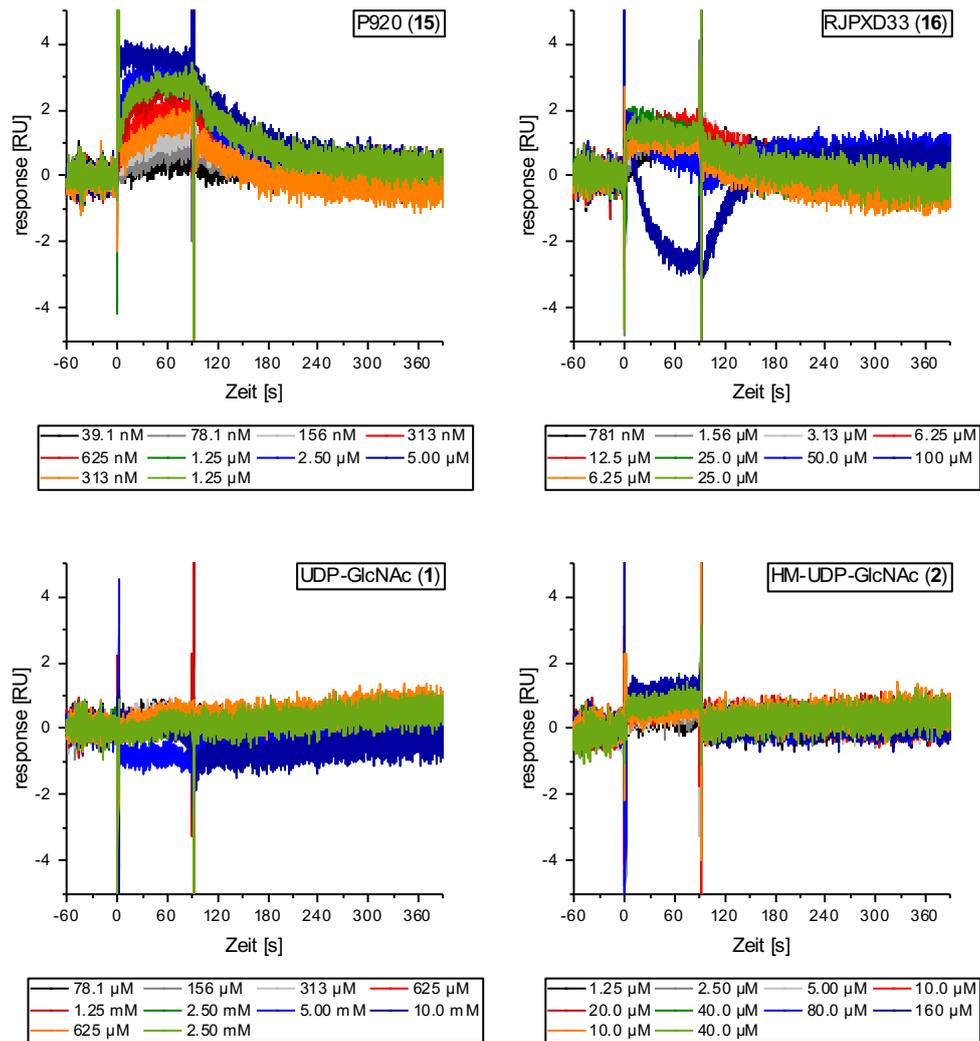


Abbildung 83: Sensorgramme der Affinitätsmessungen der Peptidinhibitoren P920 (15) und RJPXD33 (16) sowie des natürlichen Substrates 1 und des Reaktionsproduktes 2 für *E. coli* LpxA bei 20 °C mittels SPR. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 5.00 μ M (15), 100 μ M (16), 10.0 mM (1) bzw. 160 μ M (2) erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung der Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 300 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 3 (50 mM HEPES (pH = 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20) verwendet.

Auch bei dem neu immobilisierten Enzym zeigte sich nach wie vor eine sehr niedrige *response*. Insbesondere bei P920 (15) war jedoch eine Erhöhung der *response* um den Faktor 2 zu beobachten. Dies war in Übereinstimmung mit der Verdopplung des Immobilisierungslevels und wies darauf hin, dass es sich bereits bei der vorherigen Affinitätsmessung um eine spezifische Interaktion des Analyten mit dem Liganden handelte. Des Weiteren war bei 15 unter Verwendung des höheren Immobilisierungslevels bereits im Sensorgramm zu beobachten, dass die Zunahme der *response* konzentrationsabhängig war und einen Plateauwert mit einer maximalen *response* von ca. 4 RU erreichte. Auch für das Produkt der LpxA-katalysierten Reaktion HM-UDP-GlcNAc (2) war eine konzentrationsabhängige Zunahme der *response* zu beobachten. Das Peptid RJPXD33 (16) sowie das Substrat der LpxA-katalysierten Reaktion UDP-GlcNAc (1) hingegen zeigten vor allem eine Überlagerung der *response* bei verschiedenen Analytkonzentrationen sowie eine negative *response* bei der höchsten Analytkonzentration. Zur Quantifizierung der Konzentrationsabhängigkeit wurde anschließend die *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die jeweilige Analytkonzentration aufgetragen (Abb. 84).

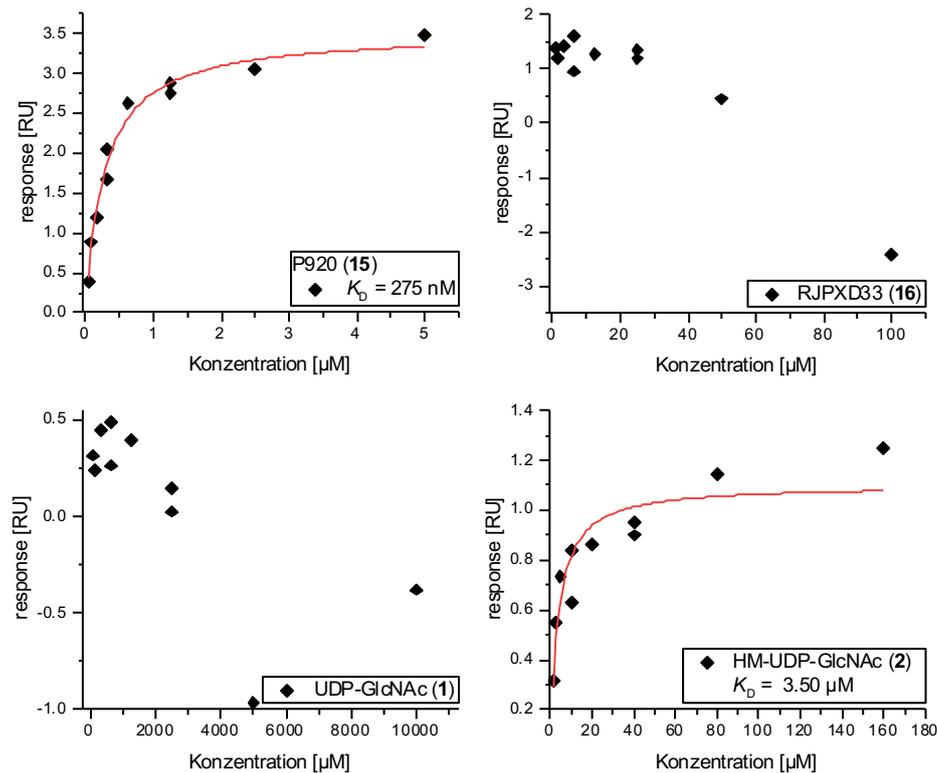


Abbildung 84: Analyse der Sensorgramme der Peptidinhibitoren P920 (**15**) und RJPXD33 (**16**) sowie des natürlichen Substrates **1** und des Reaktionsproduktes **2** für *E. coli* LpxA bei 20 °C mittels SPR. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 5.00 µM (**15**), 100 µM (**16**), 10.0 mM (**1**) bzw. 160 µM (**2**) erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung der Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 300 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 3 (50 mM Hepes (pH = 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20) verwendet. Durch Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration wurden mithilfe des OneSite-Binding-Modells die K_D -Werte von **15** und **2** berechnet.

Analog zu dem vorherigen Experiment mit getaggttem LpxA zeigte P920 (**15**) eine konzentrationsabhängige Zunahme der *response*, welche ab einer Konzentration von ca. 625 nM einen Plateauwert erreichte. Zusätzlich dazu konnte auch bei der höchsten Konzentration (5.00 µM) der Plateauwert erzielt werden. Der mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechnete K_D -Wert betrug 275 nM. Dieser Wert liegt in einer Größenordnung mit dem K_D -Wert von **15** für das ungetaggte LpxA ($K_D = 233$ nM) und weicht um den Faktor 3 von dem K_D -Wert aus dem vorherigen Experiment mit getaggttem LpxA ab. Dies wies darauf hin, dass bei der Immobilisierung über eine Amidkupplung die Bindung von **15** nicht negativ beeinflusst wurde. Des Weiteren zeigte dieses Experiment analog zu der Spannweite der K_i -Werte von P920 (**15**) in der Literatur auch eine gewisse Variabilität bei den mittels SPR bestimmten K_D -Werten von **15**. Sowohl für Peptid RJPXD33 (**16**) als auch für das natürliche Substrat UDP-GlcNAc (**1**) konnte hingegen keine spezifische Interaktion beobachtet werden. Beide Analyten zeigten bei niedrigen Konzentrationen eine konzentrationsunabhängige positive *response*, bei hohen Konzentrationen hingegen eine negative *response*. Das Ausbleiben einer sichtbaren spezifischen Interaktion lässt sich in Bezug auf das natürliche Substrat **1** möglicherweise mit dem Reaktionsmechanismus von LpxA erklären. Dort erfolgt die Bindung des Glucosaminderivates **1** sequentiell nach Bindung von Acyl-ACP.^[48] Die SPR-Experimente wurden jedoch in Abwesenheit des zweiten Substrates durchgeführt. Das acylierte Produkt HM-UDP-GlcNAc (**2**) hingegen zeigte eine spezifische Interaktion, welche sich in einer Sättigungskurve widerspiegelte. Der mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechnete K_D -Wert betrug 3.50 µM. Verglichen mit dem Peptid P920 (**15**) zeigte dieser Analyt

eine deutlich stärkere Abweichung der Affinität für das ungetaggte LpxA ($K_D = 78.2 \mu\text{M}$) von der für das getaggte LpxA. Die Zunahme der Affinität um den Faktor 20 lässt sich möglicherweise damit erklären, dass bei dem ungetaggtten LpxA die Amidkupplung über einen Lysinrest aus der UDP-Bindungstasche erfolgte und die Bindungsstelle von HM-UDP-GlcNAc (**2**) schlechter zugänglich war. Der Vergleich der K_D -Werte von **15** und **2** für das ungetaggte LpxA untereinander zeigte eine um den Faktor 10 niedrigere Affinität von **2**. Dies ist in Übereinstimmung mit Konkurrenzexperimenten von **2** gegen TAMRA-gelabeltes P920.^[64]

Anschließend wurden Affinitätsexperimente mit weiteren potentiellen LpxA-Inhibitoren durchgeführt. Hierbei handelte es sich zunächst um kommerziell verfügbare Substanzen aus der Molport-Datenbank, welche durch ein virtuelles Screening in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. J. Kirchmair (Universität Hamburg) identifiziert wurden. Dabei wurde sowohl ein struktur- als auch ein ligandbasierter Ansatz verfolgt. Bei anschließenden STD-NMR-Experimenten wurden sechs Verbindungen als potentielle Liganden identifiziert (Abb. 85).

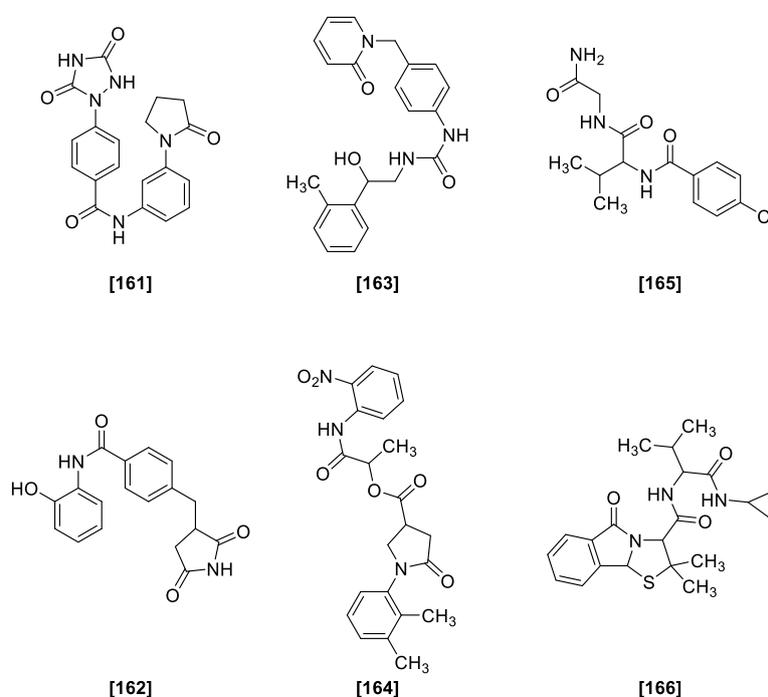


Abbildung 85: Übersicht über potentielle LpxA-Inhibitoren aus der Molport-Datenbank, die mittels virtuellen Screenings identifiziert wurden und ein positives Signal in STD-NMR-Experimenten zeigten. Links: strukturbasierter Ansatz, der auf der Kristallstruktur von LpxA mit dem Peptid RJPXD33 (**16**) (PDB-ID: 4J09) basierte. Mitte: strukturbasierter Ansatz, der auf der Kristallstruktur von LpxA mit dem Substrat UDP-GlcNAc (**1**) (PDB-ID: 2JF3) basierte. Rechts: ligandbasierter Ansatz, der auf einem Fragment von dem Peptid P920 (**15**) basierte.

Dabei wurden **161** und **162** mithilfe eines strukturbasierten Ansatzes, der auf der Kristallstruktur von LpxA mit gebundenem RJPXD33 (**16**) (PDB-ID: 4J09) beruhte, identifiziert. **163** und **164** stammten ebenfalls aus einem strukturbasierten Ansatz. Hierbei diente jedoch die Kristallstruktur von LpxA mit gebundenem Substrat UDP-GlcNAc (**1**) (PDB-ID: 2JF3) als Basis. Beide Kristallstrukturen zeigten eine Bindung des Liganden zwischen zwei benachbarten Monomeren des LpxA-Homotrimers. Der größte Unterschied zwischen den Kristallstrukturen war die Position der Seitenkette von His160, welche bei der Bindung des Peptides nicht mehr in Richtung der hydrophoben Tasche zeigte, sondern gedreht vorlag. **165** und **166** stammten hingegen aus einem ligandbasierten Ansatz, der auf einem Fragment von P920 (**15**) basierte. Bei den anschließenden SPR-Messungen wurde für alle Substanzen aufgrund der

niedrigen Löslichkeit eine maximale Konzentration von 50 μM gewählt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 Sekunden, die Dauer der Dissoziationsphase 300 Sekunden (Abb. 86).

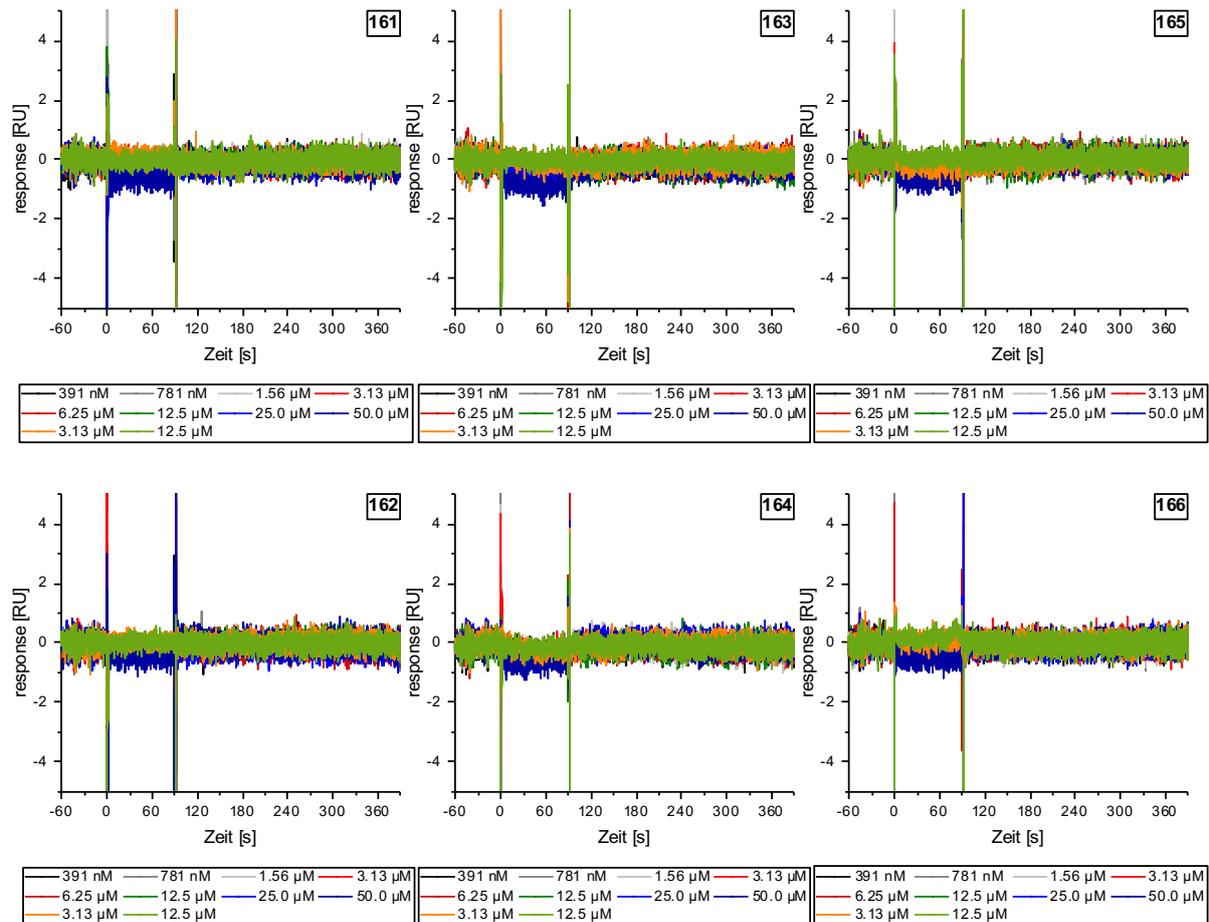


Abbildung 86: Sensorgramme der Affinitätsmessungen der Molport-Substanzen für *E. coli* LpxA bei 20 °C mittels SPR. Links: Substanzen, die auf einem strukturbasierten Ansatz mit der Kristallstruktur von LpxA mit dem Peptid RJPXD33 (16) (PDB-ID: 4J09) basierten. Mitte: Substanzen, die auf einem strukturbasierten Ansatz mit der Kristallstruktur von LpxA mit dem Substrat UDP-GlcNAc (1) (PDB-ID: 2JF3) basierten. Rechts: Substanzen, die auf einem ligandbasierten Ansatz mit einem Fragment von P920 (15) basierten. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 50,0 μM erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung der Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 300 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 3 (50 mM Hepes (pH = 8,0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0,05% Tween 20) verwendet.

Dabei zeigten alle sechs Analyten ein vergleichbares Sensorgramm. Generell zeigte sich bei allen Analyten eine *response* von ± 1 RU. Bedingt durch diese niedrige *response* zeigte sich in allen Sensorgrammen eine Überlagerung des Signals für verschiedene Konzentrationen. Zur Quantifizierung der Konzentrationsabhängigkeit wurde anschließend die *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die jeweilige Analytkonzentration aufgetragen (Abb. 87).

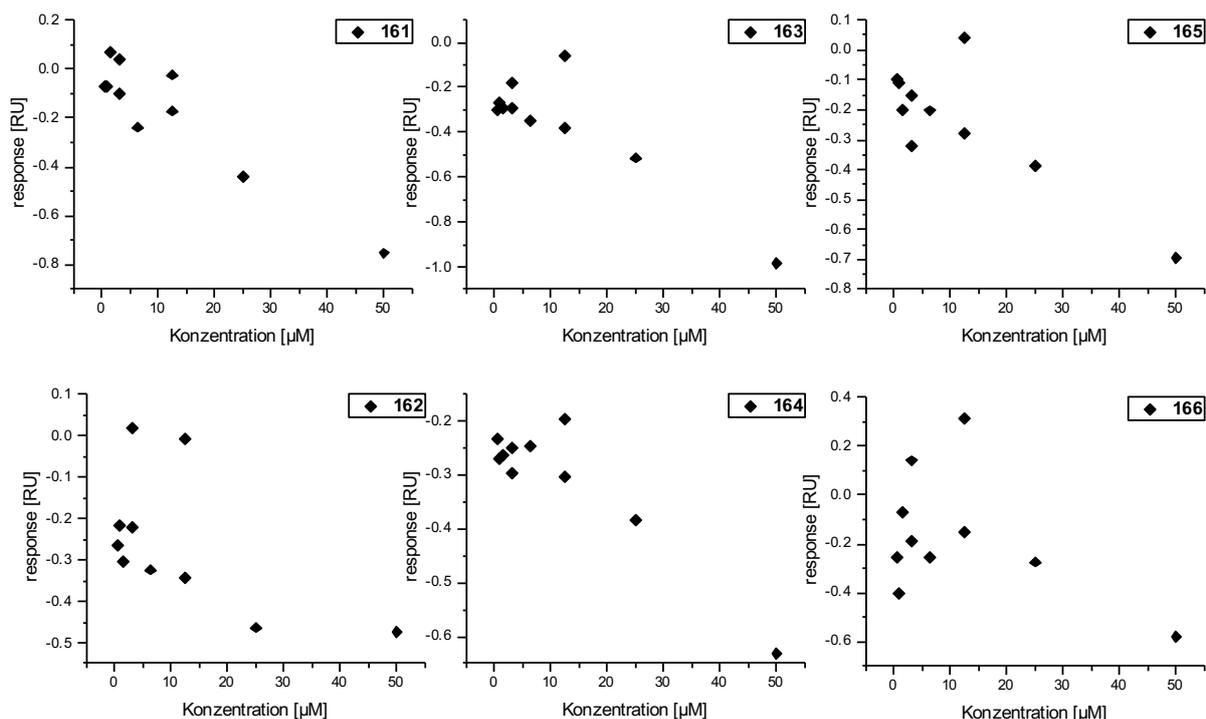


Abbildung 87: Analyse der Sensorgramme der Molport-Substanzen für *E. coli* LpxA bei 20 °C mittels SPR. Links: Substanzen, die auf einem strukturbasierten Ansatz mit der Kristallstruktur von LpxA mit dem Peptid RJPXD33 (**16**) (PDB-ID: 4J09) basierten. Mitte: Substanzen, die auf einem strukturbasierten Ansatz mit der Kristallstruktur von LpxA mit dem Substrat UDP-GlcNAc (**1**) (PDB-ID: 2JF3) basierten. Rechts: Substanzen, die auf einem ligandbasierten Ansatz mit einem Fragment von P920 (**15**) basierten. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 50.0 µM erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung der Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 300 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 3 (50 mM Hepes (pH = 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20) verwendet. Nach Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration konnten keine K_D -Werte der Substanzen mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechnet werden.

Auch hier konnte für keinen Analyten eine spezifische Interaktion innerhalb des getesteten Konzentrationsbereiches beobachtet werden. Alle Analyten zeigten bei niedrigen Konzentrationen geringe konzentrationsunabhängige Schwankungen der *response*. Mit steigender Konzentration konnte eine Abnahme der *response* beobachtet werden. Insbesondere bei den vier Substanzen, die mithilfe des strukturbasierten Ansatzes identifiziert wurden, war das Ausbleiben einer spezifischen Interaktion möglicherweise mit den Bedingungen des SPR-Experimentes zu erklären. Sowohl der literaturbekannte Peptidinhibitor RJPXD33 (**16**) als auch das natürliche Substrat UDP-GlcNAc (**1**), die in den Kristallstrukturen mit *E. coli* LpxA kokristallisiert wurden, zeigten zuvor unter identischen Bedingungen ebenfalls keine mittels SPR identifizierbare Bindung an immobilisiertes LpxA.

Alternativ zu den kommerziell verfügbaren Substanzen aus der Molport-Datenbank, welche mittels virtuellen Screenings identifiziert wurden, wurden sechs in der Arbeitsgruppe synthetisierte Verbindungen, die auf literaturbekannten LpxA-Inhibitoren basieren^[93], auf ihre LpxA-inhibitorische Aktivität untersucht (Abb. 88).

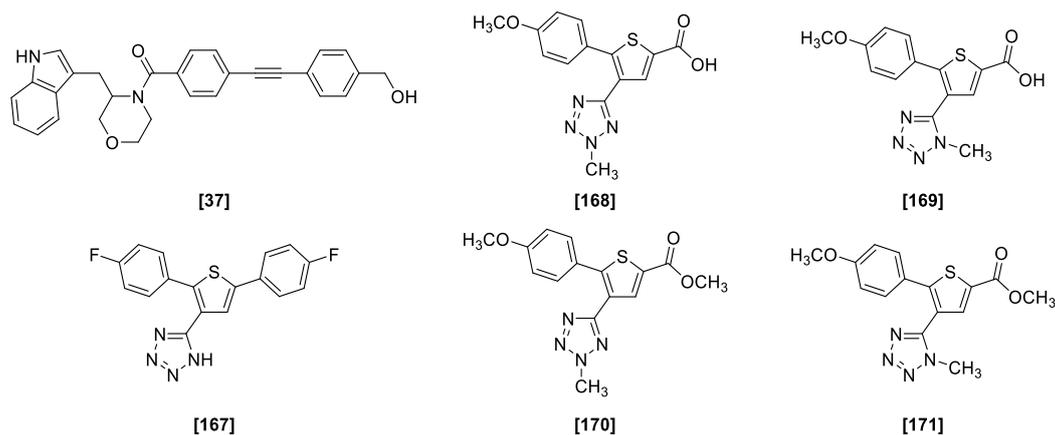


Abbildung 88: Übersicht über die untersuchten Verbindungen, die auf literaturbekannten sowie patentierten LpxA-Inhibitoren basieren. Dabei handelt es sich um Verbindung 37, welche literaturbekannten Morpholinderivaten ähnelt^[93], sowie Derivate der patentierten LpxA-Inhibitoren DNM-131 (167) und DNM-123E (168). Das Verschieben der Methylgruppe am Tetrazolring führte ausgehend von 168 zu 169 und die Veresterung der Säurefunktion beider Derivate zu 170 bzw. 171.

Dabei handelte es sich zum einen um das zuvor gegen LpxC untersuchte Morpholinderivat 37. Zum anderen wurden die patentierten LpxA-Inhibitoren (WO 2008/128321 A1) DNM-131 (167) und DNM-123E (168) sowie Derivate von 168 hergestellt. Das Verschieben der Methylgruppe lieferte 169, die Veresterung der Säurefunktionen 170 und 171. Bei den SPR-Experimenten betrug die Dauer der Assoziationsphase 90 Sekunden, die der Dissoziationsphase 300 Sekunden (Abb. 89).

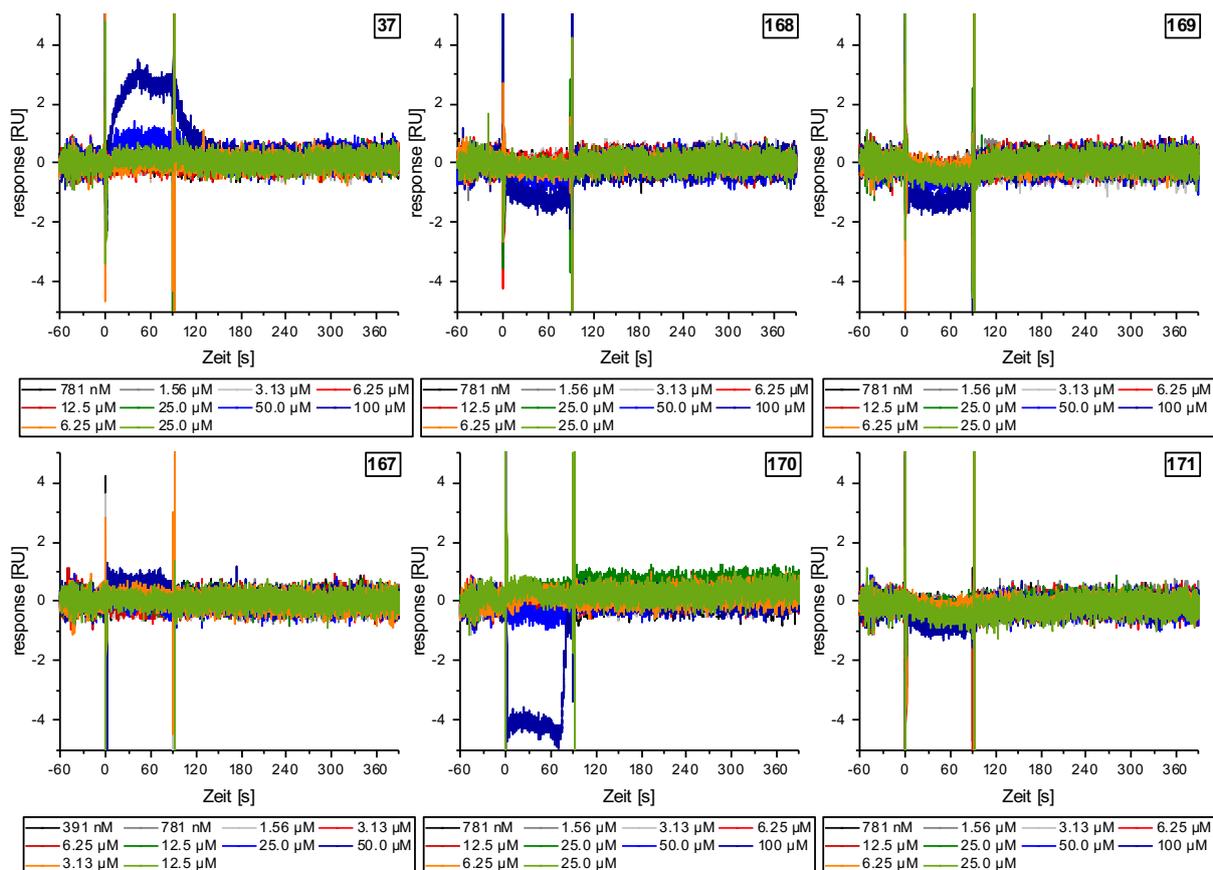


Abbildung 89: Sensorgramme der Affinitätsmessungen der auf literaturbekannten und patentierten LpxA-Inhibitoren basierenden Verbindungen für *E. coli* LpxA bei 20 °C mittels SPR. Dabei handelte es sich um Verbindung 37, welche literaturbekannten Morpholinderivaten ähnelt^[93], sowie Derivate der patentierten LpxA-Inhibitoren DNM-131 (167) und DNM-123E (168). Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 100 µM (167: 50.0 µM) erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung der Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 300 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 3 (50 mM Hepes (pH = 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20) verwendet.

Mit Ausnahme der höchsten Analytkonzentration zeigten auch hier alle Analyten ein vergleichbares Sensorgramm mit einer sehr niedrigen *response* von ± 1 RU. Dies führte wie bei den Molport-Substanzen in allen Sensorgrammen zu einer Überlagerung des Signals bei verschiedenen Konzentrationen. Lediglich das Morpholinderivat **37** zeigte eine Zunahme der *response* bei den beiden höchsten gemessenen Konzentrationen, **170** zeigte hingegen eine starke negative *response* bei der höchsten Konzentration. Zur Quantifizierung der Konzentrationsabhängigkeit wurde anschließend die *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die jeweilige Analytkonzentration aufgetragen (Abb. 90).

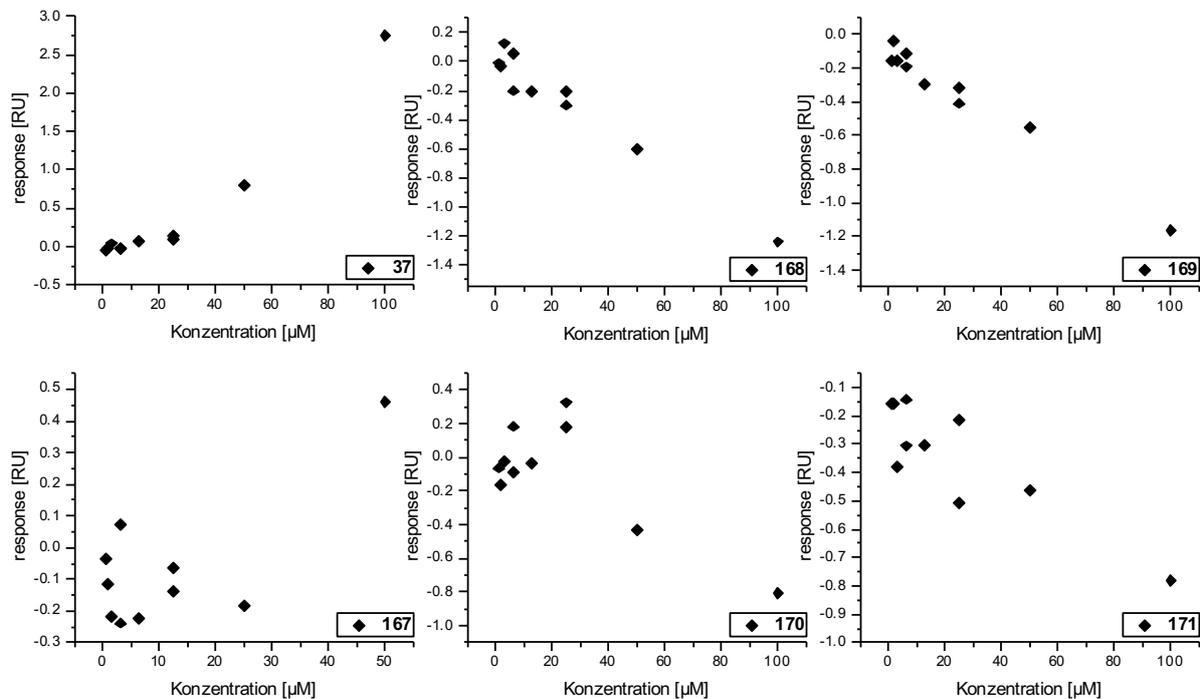


Abbildung 90: Analyse der Sensorgramme der auf literaturbekannten und patentierten LpxA-Inhibitoren basierenden Verbindungen für *E. coli* LpxA bei 20 °C mittels SPR. Dabei handelt es sich um Verbindung **37**, welche literaturbekannten Morpholinderivaten ähnelt^[93], sowie Derivate der patentierten LpxA-Inhibitoren DNM-131 (**167**) und DNM-123E (**168**). Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 100 µM (**167**: 50.0 µM) erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung der Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 300 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 3 (50 mM HEPES (pH = 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20) verwendet. Nach Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration konnten keine K_D -Werte der Substanzen mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechnet werden.

Auch nach Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Konzentration konnte für keinen der Analyten eine spezifische Interaktion innerhalb des getesteten Konzentrationsbereiches beobachtet werden. Alle Analyten zeigten bei niedrigen Konzentrationen geringe konzentrationsunabhängige Schwankungen der *response*. Mit steigender Konzentration konnte für die Tetrazolderivate eine Abnahme der *response* beobachtet werden. Dies lag möglicherweise daran, dass diese Substanzen nicht als Feststoff, sondern in DMSO gelöst vorlagen. Aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften war somit die DMSO-Konzentration der Stocklösung nicht genau bekannt, sodass aufgrund des zuvor beschriebenen VEE der Analyt scheinbar stärker an die Referenzzelle als an die aktive Zelle band. Morpholinderivat **37** zeigte hingegen eine lineare Zunahme des Signals. Dies sprach für eine unspezifische Interaktion mit der Sensorchipoberfläche anstelle einer spezifischen Bindung an LpxA. Hierbei war jedoch zu beachten, dass auch die literaturbeschriebenen Morpholinderivate lediglich eine Bindung an den LpxA-Produkt-Komplex zeigten und keine Bindung an das isolierte Enzym beobachtet werden konnte.

Zuletzt wurden drei weitere Analyten, die mittels virtuellen Screenings identifiziert wurden, untersucht. Dabei handelte es sich um einen strukturbasierten Ansatz, der in der Arbeitsgruppe von Professor Dr. W. Sippl (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt wurde (Abb. 91).

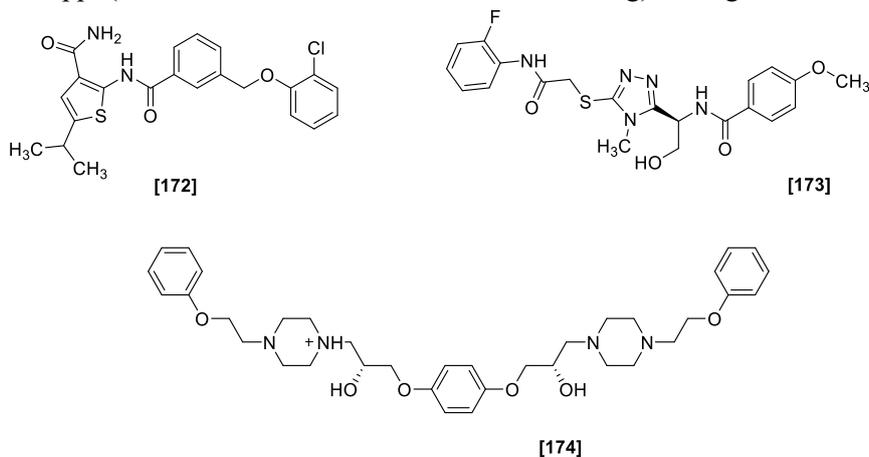


Abbildung 91: Übersicht potentieller LpxA-Inhibitoren aus der PrincetonBio-Datenbank, die mittels virtuellen Screenings identifiziert wurden. Dabei handelte es sich um einen strukturbasierten Ansatz, der auf der Kristallstruktur von LpxA mit UDP-3-*O*-[(*R*)-3-Hydroxydecanoyl]-*N*-acetylglucosamin (**159**) (PDB-ID: 2QIV) basierte.

Dieses virtuelle Screening verwendete eine andere Kristallstruktur von LpxA als die vorherigen strukturbasierten Ansätze und enthielt UDP-3-*O*-[(*R*)-3-Hydroxydecanoyl]-*N*-acetylglucosamin (HD-UDP-GlcNAc, **159**) als gebundenen Liganden (PDB-ID: 2QIV). Hierbei handelte es sich um ein Derivat des natürlichen Produktes von *E. coli* LpxA, welches eine um vier C-Atome verkürzte Fettsäureseitenkette besaß. Analog zu den vorherigen Kristallstrukturen war auch **159** zwischen zwei Monomeren des LpxA-Homotrimers lokalisiert. Dabei banden die Fettsäureseitenkette sowie das UDP-Motiv an verschiedene Untereinheiten. Verglichen mit dem natürlichen Substrat **1** sowie dem Reaktionsprodukt **2** zeigte **159** eine vergleichbare Positionierung des Zuckergrundgerüsts. Bei der Orientierung des UDP-Motivs zeigten sich hingegen starke Unterschiede aufgrund der freien Rotation des *P*-*O*-Bindung des Diphosphates. Dieses wies auf eine hohe Variabilität möglicher Bindungspartner in der UDP-Bindetasche hin. Bei den anschließenden SPR-Messungen wurde für alle Substanzen eine maximale Konzentration von 100 μM gewählt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 Sekunden, die Dauer der Dissoziationsphase 300 Sekunden (Abb. 92).

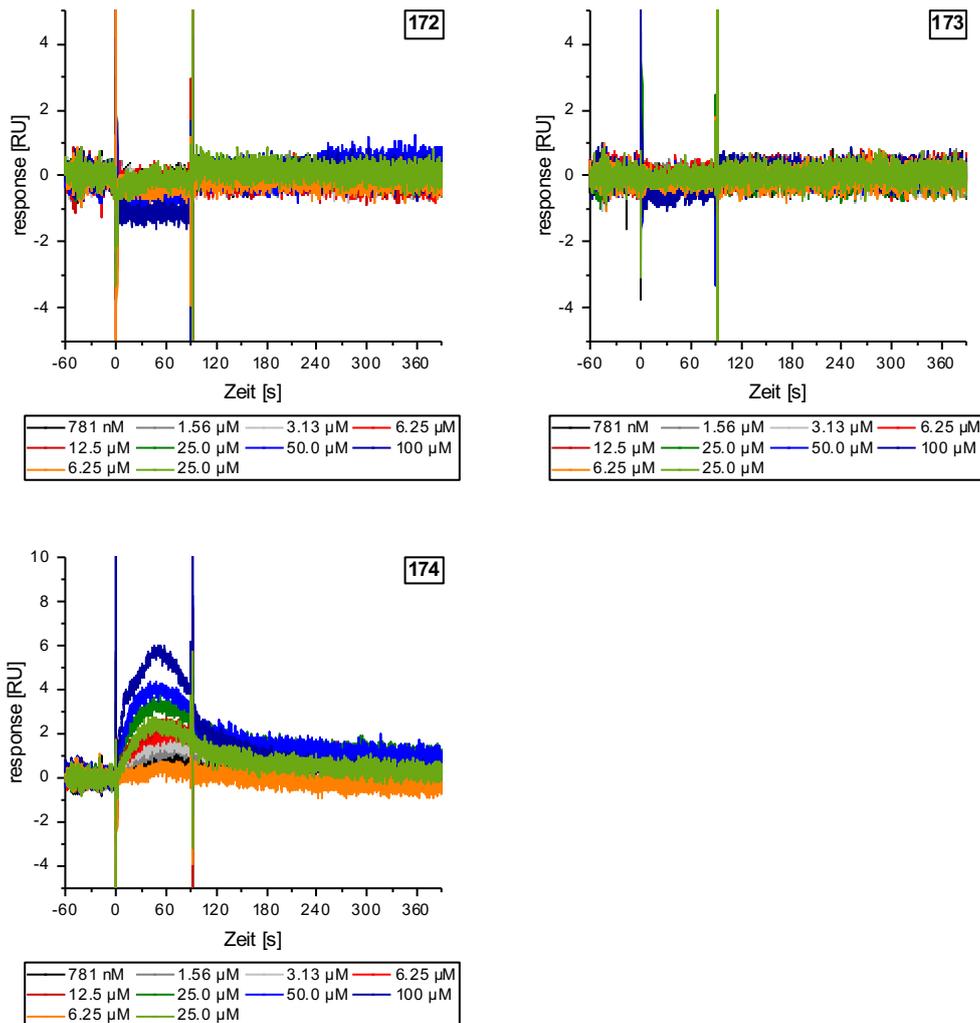


Abbildung 92: Sensorgramme der Affinitätsmessungen der PrincetonBio-Substanzen für *E. coli* LpxA bei 20 °C mittels SPR. Diese wurden mittels virtuellen Screenings in einem strukturbasierten Ansatz, der auf der Kristallstruktur von LpxA mit UDP-3-*O*-[(*R*)-3-Hydroxydecanoyl]-*N*-acetylglucosamin (**159**) (PDB-ID: 2QIV) basierte, identifiziert. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 100 μM erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung der Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 300 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 3 (50 mM Hepes (pH = 8,0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0,05% Tween 20) verwendet.

Dabei zeigten **172** und **173** ein ähnliches Sensorgramm. Beide Analyten wiesen eine sehr niedrige *response* auf, die sich für verschiedene Konzentrationen überlagerte. Im Gegensatz dazu war für **174** eine konzentrationsabhängige Zunahme der *response*, die auf eine spezifische Interaktion hinwies, zu beobachten. Zur Quantifizierung der Konzentrationsabhängigkeit sowie der Bestimmung des K_D -Wertes von **174** wurde anschließend die *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die jeweilige Analytkonzentration aufgetragen (Abb. 93).

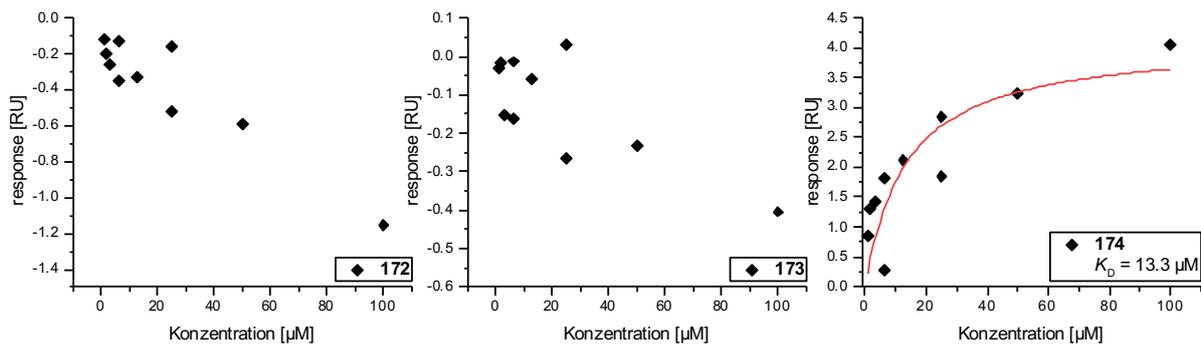


Abbildung 93: Analyse der Sensorgramme der PrincetonBio-Substanzen für *E. coli* LpxA bei 20 °C mittels SPR. Diese wurden mittels virtuellen Screenings in einem strukturbasierten Ansatz, der auf der Kristallstruktur von LpxA mit UDP-3-*O*-[(*R*)-3-Hydroxydecanoyl]-*N*-acetylglucosamin (**159**) (PDB-ID: 2QIV) basierte, identifiziert. Ausgehend von einer maximalen Analytkonzentration von 100 µM erfolgte eine serielle 1:2-Verdünnung der Analyten. Zusätzlich dazu wurde eine Doppelbestimmung der 1:4- sowie der 1:16-Verdünnungen erstellt. Die Dauer der Assoziationsphase betrug 90 s, die der Dissoziationsphase 300 s. Als Laufpuffer wurde SPR-Puffer 3 (50 mM Hepes (pH = 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM TCEP, 0.05% Tween 20) verwendet. Durch Auftragen der *response* am Ende der Assoziationsphase gegen die Analytkonzentration wurde der K_D -Wert von **174** mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechnet.

Wie bereits die Sensorgramme vermuten ließen, konnte für **172** und **173** keine spezifische Interaktion beobachtet werden. Beide Analyten zeigten bei niedrigen Konzentrationen eine konzentrationsunabhängige positive *response*, bei hohen Konzentrationen hingegen eine negative *response*. Im Gegensatz dazu zeigte **174** eine spezifische Interaktion, die sich in einer Sättigungskurve widerspiegelte. Der mithilfe des OneSite-Binding-Modells berechnete K_D -Wert betrug 13.3 µM.

5.2.4 Vergleich und Bewertung der entwickelten Testsysteme

Nach der Übertragung der anhand von *E. coli* LpxC C63A entwickelten Testsysteme auf weitere Enzyme der Lipid A-Biosynthese erfolgte ein Vergleich der Testsysteme auf ihre Eignung zur Identifizierung neuartiger Inhibitoren. Dabei wurden sowohl der fluoreszenzbasierte, der massenbasierte sowie der SPR-basierte LpxC-Enzymassay zur Identifizierung von LpxC-Inhibitoren als auch zwei verschiedene Immobilisierungsmethoden im SPR-basierten Enzymassay zur Identifizierung von LpxA-Inhibitoren gegenübergestellt.

I. Vergleich der entwickelten Enzymassays zur Identifizierung von LpxC-Inhibitoren

Beim Vergleich der mithilfe der verschiedenen Enzymassays erhaltenen K_i - bzw. K_D -Werte zeigte sich zunächst, dass die mithilfe von Fluoreszenz sowie LC-MS/MS bestimmten K_i -Werte jeweils in einer Größenordnung lagen. Dies entsprach den Erwartungen, da die Assays unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden und sich nur in dem Abbruch der Reaktion (basisch bzw. sauer) sowie der Detektion des Produktes unterschieden. In beiden Fällen wurde in derselben Reaktionsumgebung die Inhibition des Umsatzes des natürlichen Substrates über einen Zeitraum von 30 Minuten verfolgt.

Die mithilfe von Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie ermittelten K_D -Werte wichen hingegen deutlich von den zuvor ermittelten K_i -Werten ab (Tab. 46).

Tabelle 46: Vergleich der Werte der Affinitätskonstanten, die mithilfe verschiedener Enzymassays bestimmt wurden. Dabei wurden die K_i - bzw. K_D -Werte von **17**, **18** und **19** verglichen. Die Bestimmung der K_i -Werte erfolgte mithilfe des fluoreszenzbasierten sowie des massenbasierten LpxC-Enzymassays. Die Bestimmung der K_D -Werte erfolgte mithilfe des SPR-basierten LpxC-Enzymassays. Während alle Experimente für *P. aeruginosa* LpxC bei pH = 7.5 durchgeführt wurden, betrug dieser in den Experimenten für *E. coli* LpxC C63A in den Inhibitionsexperimenten pH = 6.0 und in den SPR-Experimenten pH = 7.5.

		Assay	17	18	19
<i>E. coli</i> LpxC C63A	K_i	Fluoreszenz	411 ± 121 nM	2.76 ± 0.71 µM	10.7 ± 1.2 nM
		LC-MS/MS	n.b.	3.34 ± 1.67 µM	7.76 ± 4.51 nM
	K_D	SPR	9.02 µM	7.39 µM	n.b.
		$\frac{K_D}{K_i}$	20	2	-
<i>P. aeruginosa</i> LpxC	K_i	Fluoreszenz	n.b.	n.b.	n.b.
		LC-MS/MS	95.4 ± 64.4 nM	313 nM	5.91 ± 1.47 nM
	K_D	SPR	12.6 µM	11.9 µM	155 nM
		$\frac{K_D}{K_i}$	130	40	25

Hierbei zeigte sich zunächst, dass mit Ausnahme von Phenylethylenglycolderivat **18** gegen *E. coli* LpxC C63A alle Analyten eine deutlich niedrigere Affinität in den SPR-Experimenten (Faktor 20–130) für das jeweilige Enzym zeigten als in den Inhibitionsexperimenten. Dieses lässt sich möglicherweise mit der Art der Immobilisierung des Enzyms auf dem Sensorchip erklären. Während bei den Inhibitionsexperimenten das Enzym in Lösung und frei zugänglich vorlag, erfolgte in den SPR-Experimenten eine Immobilisierung des Enzyms über eine Amidkupplung. Hierbei kann die Bindung an den Sensorchip prinzipiell über jedes freie Amin erfolgen, sodass das Enzym nicht nur über seinen *N*-Terminus, sondern auch über eine Lysinseitenkette an die Chipoberfläche gebunden werden kann. Da die Inhibitoren, wie durch die verschiedenen K_i -Werte in den Inhibitionsexperimenten gezeigt wurde, mit unterschiedlich hoher Affinität, resultierend aus unterschiedlichen Wechselwirkungen mit dem Enzym, binden, bewirkt eine unerwünschte Immobilisierung über eine Lysinseitenkette eine verschieden starke sterische Hinderung bzw. den teilweisen Verlust einer Wechselwirkung. Dies hat zur Folge, dass die Affinitätskonstanten in unterschiedlich starkem Maße beeinflusst werden. Da die geringe Affinität von **18** bereits mit dem Fehlen einer solchen starken Enzym-Inhibitor-Wechselwirkung einhergeht, hat ein potentieller zusätzlicher Verlust einer Interaktion möglicherweise einen deutlich geringeren Einfluss auf die Affinität zum Enzym.

Eine weitere Möglichkeit für die geringere Affinität in den SPR-Experimenten ist insbesondere im Fall von der Affinität von **17** für *E. coli* LpxC C63A die Reaktionsumgebung in dem Experiment. Während das Inhibitionsexperiment bei pH = 6.0, welcher dem pH-Optimum des Enzyms entspricht, durchgeführt wurde, betrug der pH-Wert in dem SPR-Experiment pH = 7.5. Dieser höhere pH-Wert hat möglicherweise nicht nur auf den Umsatz des Substrates, sondern auch auf die Bindung der Analyten einen negativen Einfluss. Allerdings erklärt dies nicht die geringere Affinität der Inhibitoren für *P. aeruginosa* LpxC in den SPR-Experimenten, da dieses Enzym ein höheres pH-Optimum aufweist und sowohl die Inhibitions- als auch die Bindungsexperimente bei pH = 7.5 durchgeführt wurden.

Somit lassen sich aufgrund der bisherigen Experimente die höheren K_D -Werte in den SPR-Experimenten sowohl durch die Reaktionsbedingungen als auch durch die Immobilisierungsbedingungen begründen. Eine Möglichkeit zur Überprüfung der Thesen ist eine Durchführung der Experimente mit LpxC,

welches über einen *N*-terminalen Tag anstelle einer Amidkupplung an den Sensorchip gebunden wird. Führt dies trotz des potentiellen Wegfallens einer sterischen Hinderung sowie des potentiellen Wegfallens einer Blockade von für die Inhibitorbindung essentiellen Aminosäureresten zu einer signifikant niedrigeren Affinität der Analyten in den SPR-Experimenten, kann stattdessen eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen vorgenommen werden. Hierbei sollte der Fokus auf andere Parameter als den bereits untersuchten pH-Wert gelegt werden, da pH = 6.0 in Experimenten mit *E. coli* LpxC C63A primär eine unspezifische Interaktion mit dem Sensorchip hervorrief und pH = 7.5 in Experimenten mit *P. aeruginosa* LpxC bereits dem pH-Optimum entsprach. Eine Möglichkeit ist die Zugabe von Additiven zum Puffer. Dies könnte beispielsweise die Zugabe eines Reduktionsmittels oder die Zugabe des Cofaktors Zn^{2+} beinhalten. Des Weiteren könnten die Bindungsexperimente analog zu den Inhibitionsexperimenten bei 37 °C anstelle von 20 °C durchgeführt werden, um den Einfluss der Temperatur auf den K_D -Wert zu prüfen.

Ungeachtet der konkreten K_i - bzw. K_D -Werte erwiesen sich alle drei Assays als geeignet zur Identifizierung von LpxC-Inhibitoren. Dabei wiesen alle Assays aufgrund verschiedener limitierender Faktoren sowohl Vor- als auch Nachteile auf.

Der literaturbekannte, fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay ist der am schnellsten und unkompliziertesten durchführbare Enzymassay und insbesondere dann von Vorteil, wenn die biologischen Daten zeitnah benötigt werden. Grund hierfür ist, dass der Enzymassay nahezu keine Vorlaufzeit benötigt, jederzeit durchgeführt werden kann und keine Mindestanzahl an zu untersuchenden Substanzen notwendig ist. Dabei können die IC_{50} -Werte von bis zu sechs Substanzen pro 96-Wellplatte bestimmt werden. Die Dauer der Detektion beträgt nach dem Abbruch der enzymatischen Reaktion aufgrund der chemischen Reaktion des Reaktionsproduktes zum fluoreszierenden Isoindol etwas mehr als 30 Minuten. Somit können die IC_{50} -Werte von sechs Substanzen in ca. zwei Stunden bestimmt werden. Des Weiteren bietet der fluoreszenzbasierte Enzymassay dank des sofortigen Erhalts von Ergebnissen die Möglichkeit, flexibel zu reagieren und Assayparameter wie beispielsweise eine zu hohe oder zu niedrige Enzymkonzentration direkt für die folgenden Assays anzupassen. Nachteil bei der Durchführung des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays ist jedoch die hohe basale Hintergrundfluoreszenz sowie das daraus resultierende hohe Detektionslimit des Produktes. Dies erfordert die Durchführung des Enzymassays bei einer Substratkonzentration von 25 μ M und ist aufgrund der hohen Kosten für das Substrat somit unvorteilhaft. Generelle Ausschlusskriterien für den fluoreszenzbasierten Assay stellen die Anwesenheit eines primären Amins in der Struktur sowie eine Eigenfluoreszenz der Testsubstanz dar.

In beiden Fällen eignen sich sowohl der LC-MS/MS- als auch der SPR-basierte LpxC-Enzymassay. Der massenbasierte LpxC-Enzymassay unterscheidet sich prinzipiell lediglich in der Detektion vom fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay und lieferte für alle untersuchten Substanzen vergleichbare Inhibitionskonstanten. Zusätzlich dazu konnte aufgrund der hohen Sensitivität dieser Methode und dem daraus resultierenden geringeren Detektionslimit die einzusetzende Substratkonzentration um den Faktor 10 reduziert werden. Dies ging zeitgleich mit einer Reduktion der im Assay notwendigen Inhibitor- sowie Enzymkonzentration einher. Des Weiteren wurde aufgrund einer geringeren Anzahl an Störfaktoren als bei der fluorimetrischen Detektion nur ein Drittel der Datenpunkte benötigt. Dies bedeutet, dass insgesamt eine deutlich geringere Menge an Substrat, Inhibitor und Enzym benötigt wird und der massenbasierte Enzymassay eine kostengünstigere Alternative zum fluoreszenzbasierten Assay darstellt. Nachteil des LC-MS/MS-basierten Assays ist jedoch die Dauer. Während der fluorimetrischen

Detektion eine 30-minütige chemische Reaktion vorangeht und anschließend die Fluoreszenz aller Ansätze zeitgleich bestimmt werden kann, erfordert die Detektion mittels Massenspektrometrie pro Ansatz eine ca. 20-minütige chromatographische Trennung. Diese erfolgt für alle Proben nacheinander und nicht zeitgleich. Weitere Nachteile des LC-MS/MS-basierten Enzymassays sind sowohl die Verfügbarkeit des Massenspektrometers als auch die langen Rüstzeiten. Diese beruhen darauf, dass jeder Nutzer des Gerätes verschiedene Säulen benötigt und der Wechsel dieser, gefolgt von der Wiederherstellung des Messsystems und dem Equilibrieren der Säule im Vorfeld der Messungen sowie analog dazu der reverse Prozess im Nachgang der Messungen sehr zeitintensiv ist. Dadurch ist eine massenspektrometrische Analyse erst ab einer Gesamtmesszeit von drei Tagen effektiv. Dies entspricht der Analyse von zwei 96-Wellplatten. Dabei entspricht eine 96-Wellplatte aufgrund der höheren Sensitivität des Assays einer Untersuchung von 30 Testsubstanzen. Der LC-MS/MS-basierte LpxC-Enzymassay ist somit nicht geeignet für die kurzfristige Bestimmung einzelner IC_{50} -Werte. Bei freiem Zugang zum Massenspektrometer sowie einer großen Anzahl zu analysierender Proben relativiert sich jedoch der zeitliche Mehraufwand des massenbasierten Enzymassays. Dank der automatisierten Probenanalyse über Nacht können innerhalb von drei Tagen ca. 60 IC_{50} -Werte bestimmt werden. Zur Identifikation derselben Anzahl an K_i -Werten mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays ist die Vermessung von zehn statt zwei 96-Wellplatten notwendig. Dabei ist im gleichen Zeitraum von drei Tagen die Durchführung von 12 manuellen, fluoreszenzbasierten Enzymassays realistisch. Durch Anwendung des LC-MS/MS-basierten Enzymassays können somit in dem gleichen Zeitraum zwar etwas weniger IC_{50} -Werte bestimmt werden, verglichen mit den Vorteilen wie einer Reduktion der Substrat-, Enzym- und Inhibitormenge sowie der Arbeitszeit, in denen andere Tätigkeiten durchgeführt werden können, ist diese geringfügig kleinere Anzahl an IC_{50} -Werten jedoch vernachlässigbar.

Auch der SPR-basierte LpxC-Enzymassay hat den Vorteil, dass sowohl fluoreszierende Verbindungen als auch Substanzen mit dem strukturellen Element eines primären Amins analysiert werden können. Ungeachtet der konkreten K_D -Werte ist dieser Assay insbesondere dann geeignet, wenn eine Substanz lediglich qualitativ als Binder ohne quantitative Bestimmung der Dissoziationskonstante identifiziert werden soll. In Anwesenheit der zuvor diskutierten Ausschlusskriterien für den fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay stellt der SPR-basierte Enzymassay eine geeignete Alternative zum massenbasierten LpxC-Enzymassay dar, wenn kurzfristig ein LpxC-Inhibitor identifiziert werden soll. Der Vorteil ist hierbei, dass das Gerät jederzeit frei verfügbar ist und es keine Mindestanzahl zu untersuchender Substanzen gibt. Auch ohne strukturelle Notwendigkeit stellt der SPR-basierte Enzymassay jedoch unter bestimmten Umständen eine geeignete Alternative zum fluoreszenzbasierten Enzymassay dar. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die verfügbare Menge der Testsubstanz sehr gering ist. Der SPR-basierte Enzymassay benötigt zwar eine größere Inhibitormenge als der LC-MS/MS-basierte Enzymassay, diese ist jedoch deutlich geringer als im fluoreszenzbasierten Assay. Des Weiteren wird im SPR-basierten Enzymassay gar kein Substrat benötigt. Auch dies ist beispielsweise in einem Screening, in dem lediglich eine Identifizierung von Bindern ohne Quantifizierung dieser Bindung erfolgen soll, in Bezug auf eine Kostenersparnis vorteilhaft. Nachteil des SPR-basierten Enzymassays ist jedoch die Assaydauer. Analog zum massenbasierten Enzymassay erfolgt eine automatisierte, aufeinanderfolgende Analyse der einzelnen Proben, wobei die Messdauer pro Probe ca. sieben Minuten beträgt. Verglichen mit dem massenbasierten Enzymassay, in dem lediglich drei Konzentrationen zur Ermittlung des K_i -Wertes ausreichend sind, werden im SPR-basierten Enzymassay zur Bestimmung des K_D -Wertes typischerweise 12 Konzentrationen pro Analyt analysiert. Dies geht mit einer noch längeren Assaydauer als bei der chromatographischen Trennung im LC-MS/MS-Assay einher. Soll jedoch

lediglich ein Screening zur Identifikation einer Bindung ohne Bestimmung eines konkreten K_D -Wertes durchgeführt werden, bietet sich zur Reduktion der Messdauer die Analyse einzelner weniger Konzentrationen, die sich jeweils um den Faktor 10 unterscheiden, an.

II. Vergleich der SPR-basierten Enzymassays zur Identifizierung von LpxA-Inhibitoren

Zur Identifizierung und Charakterisierung von Inhibitoren, die LpxA als alternatives Target in der Lipid A-Biosynthese adressieren sollten, wurde ein SPR-basierter Ansatz gewählt. Dies bot im Gegensatz zur Inhibitionskinetik die Möglichkeit, LpxA-Inhibitoren in Abwesenheit eines Cosubstrates und unter Vernachlässigung des Reaktionsgleichgewichtes zu identifizieren. Die Validierung des Assays mithilfe des Reaktionsproduktes HM-UDP-GlcNAc (**2**) sowie mithilfe von Peptid **15** erfolgte dabei sowohl für natürliches LpxA, welches über eine Amidkupplung an die Sensorchipoberfläche gebunden wurde, als auch für modifiziertes LpxA, welches über einen *N*-terminalen Strep-Tag II an die Chipoberfläche gebunden wurde. Nicht erfolgreich war hingegen die Untersuchung von Substrat **1** sowie dem zweiten Peptidinhibitor **16**, für die keine Bindung nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Ursache für die nicht erfolgreiche Validierung beim Peptidinhibitor **16** ist der gänzlich andere Bindungsmodus verglichen mit **15**. Während **15** orthogonal zur linksgängigen β -Helix bindet und vor allem die UDP-bindende Region adressiert, bindet **16** parallel zur β -Helix und imitiert somit den Phosphopantetheinarm.^[61] Substrat **1** und Produkt **2** weisen hingegen einen ähnlichen Bindungsmodus auf^[76], sodass dieses die (nicht) erfolgreiche Validierung des Assays nicht erklären kann. Eine mögliche Ursache für das Ausbleiben einer spezifischen Interaktion von **1** ist hier der sequentielle Bindungsmodus, bei dem das Glucosaminderivat **1** erst nach der Bindung von Acyl-ACP bindet.^[48]

Bei der Validierung des Assays mithilfe des Peptidinhibitors **15** konnte sowohl für das ungetaggte ($K_D = 233$ nM) als auch für das getaggte Enzym ($K_D = 275$ nM) ein ähnlicher K_D -Wert bestimmt werden. Dies wies darauf hin, dass bei der Immobilisierung von LpxA über eine Amidkupplung die Bindung von **15** nicht negativ beeinflusst wurde. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Validierung des Assays mithilfe des Reaktionsproduktes HM-UDP-GlcNAc (**2**) ein deutlicher Unterschied der K_D -Werte. Hierbei zeigte das ungetaggte Enzym ($K_D = 78.2$ μ M) eine um mehr als den Faktor 20 niedrigere Affinität für **2** als das getaggte Enzym ($K_D = 3.50$ μ M). Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass bei der Amidkupplung die Bindung an den Sensorchip nicht nur über den *N*-Terminus des Enzyms, sondern über eine Lysinseitenkette erfolgte. Besonders hervorzuheben ist hierbei die Seitenkette von Lys76, welche sowohl mit der 6-OH-Gruppe des Glucosaminrings eine Wasserstoffbrücke ausbildet als auch mit dem Ringsauerstoff des Zuckergrundgerüsts interagiert.^[50] Somit würden durch Immobilisierung über Lys76 zwei Wechselwirkungen wegfallen, was sich in einer geringeren Affinität des Analyten für das Enzym widerspiegeln kann.

Die im Zuge der Assay-Validierung mittels SPR bestimmten K_D -Werte von **15** lagen in einer Größenordnung mit den Literaturwerten ($K_i = 0.050$ – 4.7 μ M)^[62–64]. Ein Literaturwert von HM-UDP-GlcNAc (**2**) ist nicht bekannt. Konkurrenzexperimente mit TAMRA-gelabeltem **15** ließen jedoch darauf schließen, dass die Affinität von **2** ca. um den Faktor 10 geringer als die von **15** ist.^[64] Dies ist in Übereinstimmung mit dem mittels SPR bestimmten K_D -Wert für getaggttes LpxA.

Bei der Identifizierung und Charakterisierung neuer LpxA-Inhibitoren konnte lediglich für Substanzen, die zuvor mittels virtuellen Screenings als potentielle Inhibitoren identifiziert worden waren, eine Bindung mittels SPR detektiert werden. Eine Modifizierung patentierter LpxA-Inhibitoren brachte keine

neuen Binder hervor. Beim virtuellen Screening wurden sowohl struktur- als auch ligandbasierte Ansätze verwendet. Die Substanzen, die aus dem ligandbasierten Ansatz mit einem Fragment von **15** stammten, zeigten jedoch keine Bindung an LpxA. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das besondere Bindungsmotiv von **15**, die Haarnadelstruktur, aus der gesamten Peptidsequenz resultiert. Diese Tertiärstruktur ist bei der Verwendung eines Fragmentes von **15** jedoch nicht zwangsläufig gegeben. Zusätzlich dazu zeigte der Bindungsmodus von Peptidinhibitor **16**, dass auch eine in Bezug auf die gesamte Peptidsequenz von **15** ähnliche Primärstruktur nicht zwangsläufig mit einem vergleichbaren Bindungsmodus einhergeht.

Bei den strukturbasierten Ansätzen wurden drei verschiedene Kristallstrukturen als Grundlage für den Screening-Ansatz verwendet. Dabei konnte für die Substanzen, die auf den Kristallstrukturen von LpxA mit dem Peptidinhibitor **16** bzw. dem natürlichen Substrat **1** basierten, ebenfalls keine Bindung an LpxA detektiert werden. Dies lässt sich sowohl mit einer zu geringen Anzahl an untersuchten Substanzen als auch mit den Bedingungen des SPR-Experimentes erklären, da selbst **16** und **1** unter den verwendeten Bedingungen keine mittels SPR identifizierbare Bindung aufwiesen. Der dritte strukturbasierte Ansatz lieferte hingegen eine Substanz, die auch im SPR-Experiment Bindung an LpxA zeigte. Grundlage dieses Screenings war hierbei HD-UDP-GlcNAc (**159**), welches ein Derivat des natürlichen Produktes **2** mit verkürzter Fettsäurekette darstellt. Im Gegensatz zu **1** und **16** konnte für **2** eine Bindung mittels SPR detektiert werden. Bei der Substanz, die in den SPR-Experimenten Bindung an LpxA zeigte, handelte es sich um diejenige Substanz, die von den drei mittels virtuellen Screenings identifizierten Substanzen **172**, **173** und **174** den komplexesten Bindungsmodus aufwies. Während **172** und **173** beide laut Docking primär an nur ein Monomer binden, weist **174** ähnlich dem Peptidinhibitor **15** eine haarnadelähnliche Struktur auf und interagiert wie auch das natürliche Substrat mit zwei benachbarten Untereinheiten des Homotrimers LpxA. Der ermittelte K_D -Wert von **174** betrug $13.3 \mu\text{M}$. Somit lag die Affinität von **174** in einer Größenordnung mit der des literaturbekannten Peptidinhibitors **16**.

5.3 Weiterführende Charakterisierung von LpxC-Inhibitoren

Zuletzt erfolgte die weiterführende Charakterisierung ausgewählter LpxC-Inhibitoren. Dabei wurde zunächst deren antibakterielle Aktivität in Kombinationsexperimenten untersucht. Dies geschah sowohl in Kombination mit einem Effluxpumpeninhibitor als auch in Kombination mit zugelassenen Antibiotika. Zusätzlich dazu wurde für Phenylether **126** untersucht, ob dieser *E. coli* LpxC C63A über einen alternativen Mechanismus durch Photoaktivierung inhibieren kann.

5.3.1 Kombinationsexperimente mit einem Effluxpumpeninhibitor

Zur weiteren Charakterisierung der antibakteriellen Eigenschaften ausgewählter LpxC-Inhibitoren wurde zunächst untersucht, ob diese Substrat von bakteriellen Effluxpumpen sind. Dafür wurden zehn Substanzen, die ein breites Spektrum der zuvor untersuchten chemischen Strukturen abdecken, ausgewählt (Abb. 94).

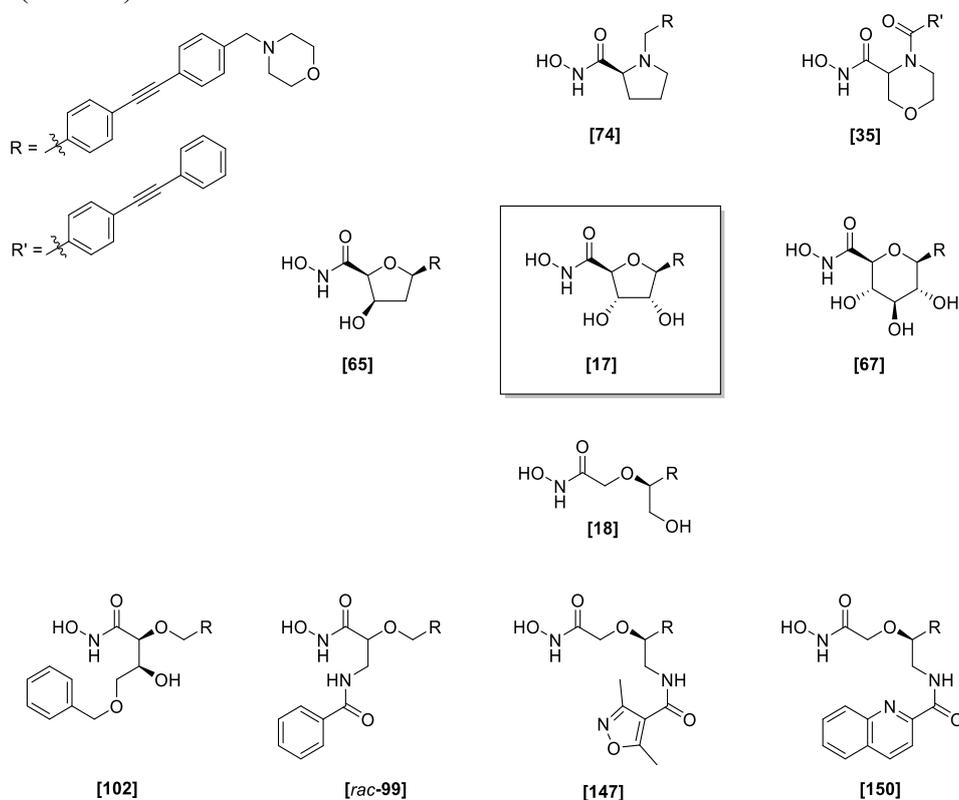


Abbildung 94: Übersicht über die in Kombination mit einem Effluxpumpeninhibitor untersuchten LpxC-Inhibitoren. Ausgehend von C-Furanosid **17** wurden neun weitere Verbindungen ausgewählt, die ein breites Spektrum der vorgenommenen strukturellen Variationen dieser Verbindung abdecken.

Alle ausgewählten LpxC-Inhibitoren wurden durch strukturelle Variation ausgehend von dem aktivsten C-Furanosid **17** entwickelt. So wurden drei Substanzen ausgewählt, bei denen der zentrale Ring von C-Furanosid **17**, der das Hydroxamsäuremotiv sowie die lipophile Seitenkette verknüpft, variiert wurde. Dabei handelte es sich um das durch Ringerweiterung erhaltene Glucose-basierte C-Pyranosid **67** sowie das Prolinderivat **74** und das Morpholinderivat **35**. Bei Letzteren wurde der Tetrahydrofuranring von **17** durch einen stickstoffhaltigen Heterocyclus ausgetauscht und die lipophile Seitenkette über dieses Stickstoffatom mit dem Grundgerüst verknüpft. Des Weiteren führte, ausgehend von **17**, die Inversion der Konfiguration in Position 3 sowie die Dehydroxylierung in Position 4 zu C-Glycosid **65**. Eine anschließende Ringspaltung sowie die Entfernung des Substituenten aus der Benzylposition führte zu den in α -Position des Hydroxamsäuremotivs substituierten Verbindungen **102** und *rac*-**99**. Bei beiden

wurde ein zusätzlicher Phenylrest, im Fall von **102** über eine Etherfunktion und im Fall von *rac*-**99** über eine Amidfunktion, mit dem Grundgerüst verknüpft. Analog dazu führte ausgehend von **17** eine Ringspaltung sowie die Entfernung des Substituenten aus der α -Position des Hydroxamsäuremotivs zu der in Benzylposition substituierten Hydroxamsäure **18**. Der Austausch der Hydroxygruppe von **18** durch einen Acylaminorest lieferte Dimethylisoxazolylderivat **147** und Chinolinderivat **150**.

Im ersten Schritt wurde untersucht, ob diese zehn Verbindungen Substrat von Effluxpumpen in *E. coli* sind. Dazu erfolgte die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen gegen *E. coli* ATCC 25922 in Ab- sowie in Anwesenheit des Effluxpumpeninhibitors Phenylalanin-Arginyl- β -Naphthylamid (PA β N) (Tab. 47).

Tabelle 47: MHK-Experimente in Ab- sowie in Anwesenheit des Effluxpumpeninhibitors PA β N gegen *E. coli* ATCC 25922. Die Bestimmung der MHK erfolgte exemplarisch für zehn LpxC-Inhibitoren, die ein breites Spektrum der chemischen Struktur aller untersuchten LpxC-Inhibitoren abdecken. Zusätzlich zur MHK im jeweiligen Experiment ist die Differenz der MHK zwischen den Experimenten angegeben. Die Darstellung dieser Differenz erfolgte sowohl in Form von (seriellen 1:2-) Verdünnungsstufen als auch in Form eines Faktors des jeweiligen Konzentrationsunterschiedes.

	MHK ohne EPI [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	MHK mit EPI [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	Δ MHK [Verdünnungsstufen]	Δ MHK [Faktor]
17	4	4	0	1
35	64	32	1	2
74	8	2	2	4
67	32	8	2	4
65	32	4	3	8
102	32	1	5	32
<i>rac</i> - 99	32	2	4	16
18	16	4	2	4
147	16	2	3	8
150	>64*	4	>4	>16

*Substanz fiel aus bei der höchsten untersuchten Konzentration.

Hierbei zeigte sich zunächst, dass mit Ausnahme von **150**, welche bei der höchsten untersuchten Konzentration ($64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) nicht vollständig löslich war, alle Substanzen das Wachstum von *E. coli* ATCC 25922 in Abwesenheit eines Effluxpumpeninhibitors inhibierten. Dabei wies *C*-Furanosid **17** mit einer minimalen Hemmkonzentration von $4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ die niedrigste MHK auf. Mit Ausnahme der aktivsten (**17**) sowie der am wenigsten aktiven Verbindung (**150**) lag die MHK aller untersuchten Substanzen innerhalb von drei seriellen 1:2-Verdünnungsstufen. Die Zugabe des Effluxpumpeninhibitors PA β N bewirkte für die meisten Substanzen eine Reduktion der MHK. Auch hier lagen die MHK-Werte mit Ausnahme der aktivsten sowie der beiden am wenigsten aktiven Verbindungen innerhalb einer Größenordnung. Dabei war die in Anwesenheit von PA β N meistvertretene MHK um den Faktor 8 niedriger als ohne Effluxpumpeninhibitor. Somit reduzierte sich durch Zugabe von PA β N die MHK durchschnittlich um drei serielle 1:2-Verdünnungsstufen.

Beim Vergleich der antibakteriellen Aktivitäten zeigte sich zunächst, dass die hohe Aktivität von *C*-Furanosid **17** gegen *E. coli* ATCC 25922 darauf beruhte, dass diese Substanz kein Substrat von den durch PA β N gehemmten Effluxpumpen ist. Die Zugabe von PA β N bewirkte keine weitere Reduktion der MHK. Im Gegensatz dazu zeigte das in Position 4 dehydroxylierte *C*-Furanosid **65** eine Reduktion

der MHK um drei Verdünnungsstufen und erreichte in Kombination mit dem Effluxpumpeninhibitor die identische MHK wie **17**. Bei der am wenigsten aktiven Verbindung (MHK = 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) handelte es sich um Morpholinderivat **35**. Dieses zeigte durch Zugabe von PA β N zwar eine leichte Zunahme der antibakteriellen Aktivität, diese war dennoch lediglich schwach ausgeprägt. Bei den beiden weiteren untersuchten cyclischen Verbindungen, Prolinderivat **74** sowie C-Pyranosid **67**, wurde jeweils eine Reduktion der MHK um zwei serielle 1:2-Verdünnungsstufen beobachtet.

Beim Vergleich der offenkettigen Substanzen zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den in α -Position und den in Benzylposition substituierten Hydroxamsäuren. Chinolinderivat **150** zeigte in Anwesenheit von PA β N antibakterielle Aktivität und schien somit ebenfalls Target von Effluxpumpen zu sein, wurde jedoch aufgrund der geringen Löslichkeit und der unbekanntenen MHK in Abwesenheit eines Effluxpumpeninhibitors bei der Aufstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen nicht weiter betrachtet. Während die anderen in Benzylposition substituierten Hydroxamsäuren (**18**, **147**) eine Reduktion der MHK um den Faktor 4–8 aufwiesen, war dieser Effekt bei den in α -Position substituierten Hydroxamsäuren (**102**, *rac*-**99**) viermal höher (Faktor 16–32). Ether **102** zeigte sowohl die höchste Zunahme der MHK durch die Verwendung des Effluxpumpeninhibitors (fünf serielle 1:2-Verdünnungsstufen) als auch die niedrigste MHK überhaupt in Anwesenheit von PA β N (MHK = 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Zusätzlich dazu wurde untersucht, ob diese zehn Verbindungen Substrat von Effluxpumpen in *P. aeruginosa* sind. Dazu erfolgte analog zu den vorherigen Experimenten die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen gegen *P. aeruginosa* ATCC 27853 in Ab- sowie in Anwesenheit des Effluxpumpeninhibitors PA β N (Tab. 48).

Tabelle 48: MHK-Experimente in Ab- sowie in Anwesenheit des Effluxpumpeninhibitors PA β N gegen *P. aeruginosa* ATCC 27853. Die Bestimmung der MHK erfolgte exemplarisch für zehn LpxC-Inhibitoren, die ein breites Spektrum der chemischen Struktur aller untersuchten LpxC-Inhibitoren abdecken. Zusätzlich zur MHK im jeweiligen Experiment ist die Differenz der MHK zwischen den Experimenten angegeben. Die Darstellung dieser Differenz erfolgte sowohl in Form von (seriellen 1:2-) Verdünnungsstufen als auch in Form eines Faktors des jeweiligen Konzentrationsunterschiedes.

	MHK ohne EPI [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	MHK mit EPI [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	Δ MHK [Verdünnungsstufen]	Δ MHK [Faktor]
17	16	2	3	8
35	>256	8	>5	>32
74	>128	8	>4	>16
67	32	≤ 2	>4	>16
65	>256	8	>5	>32
102	>64	4	>4	>16
<i>rac</i> - 99	>128	8	>4	>16
18	>128	8	>4	>16
147	>128	2	>6	>64
150	>64*	8	>3	>8

*Substanz fiel aus bei der höchsten untersuchten Konzentration.

Trotz einer in Abhängigkeit von der Löslichkeit höheren untersuchten Maximalkonzentration inhibierten lediglich zwei Substanzen das Wachstum von *P. aeruginosa* ATCC 27853 in Abwesenheit des Effluxpumpeninhibitors PA β N. Bei diesen Substanzen handelte es sich um C-Furanosid **17**, welches auch zuvor bereits die höchste Aktivität gegen *E. coli* ATCC 25922 gezeigt hatte, und C-Pyranosid **67**.

Die MHK von **17** gegen *P. aeruginosa* ATCC 27853 war dabei um den Faktor 4 höher als die gegen *E. coli* ATCC 25922, die MHK von **67** war gegen beide Bakterienstämme identisch. In Anwesenheit von PA β N inhibierten hingegen alle Substanzen das Wachstum von *P. aeruginosa* ATCC 27853. Die Abnahme der MHK betrug dabei für alle untersuchten Verbindungen mindestens drei serielle 1:2-Verdünnungsstufen. Aufgrund der unterschiedlichen maximalen untersuchten Konzentration sowie der Inaktivität der meisten Substanzen in Abwesenheit von PA β N konnte jedoch kein weiterer quantitativer Vergleich der Verdünnungsstufen wie gegen *E. coli* ATCC 25922 durchgeführt werden. Qualitativ betrachtet zeigte sich jedoch, dass in Anwesenheit eines Effluxpumpeninhibitors alle untersuchten Substanzen eine vergleichbare MHK aufwiesen. Im Gegensatz zu den Experimenten ohne Effluxpumpeninhibitor lagen diese Werte für die meisten Verbindungen in einer Größenordnung wie die Werte gegen *E. coli* ATCC 25922.

Der Vergleich der Experimente veranschaulicht anhand des Effluxpumpeninhibitors PA β N, dass die Resistenzmechanismen von *E. coli* und *P. aeruginosa* durch (Nicht-)Einführung verschiedener Erkennungsmotive bzw. Substituenten in den Wirkstoffen umgangen werden können. Während alle untersuchten Verbindungen als Substrat von Effluxpumpen in *P. aeruginosa* ATCC 27853 dienten, war die MHK von *C*-Furanosid **17** in *E. coli* ATCC 25922 in An- sowie in Abwesenheit des Effluxpumpeninhibitors identisch. Dies wies darauf hin, dass **17** nicht als Substrat von den durch PA β N gehemmten Effluxpumpen in *E. coli* ATCC 25922 erkannt wurde. Im Gegensatz dazu zeigte das in Position 4 dehydroxylierte *C*-Furanosid **65** in Anwesenheit von PA β N eine Reduktion der MHK um drei serielle 1:2-Verdünnungsstufen. Auch die in α -Position substituierten Strukturen (**102**, *rac*-**99**), welche offenkettige Analoga der in Position 4 unsubstituierten, cyclischen Struktur darstellten, zeigten die höchste Steigerung der antibakteriellen Aktivität durch Zugabe von PA β N. Dies wies darauf hin, dass insbesondere das Fehlen eines Substituenten in Benzylposition bzw. Position 4 im cyclischen System sich besonders günstig auf die Erkennung durch eine Effluxpumpe auswirkt, wodurch unabhängig vom inhibitorischen Potential der Verbindung keine antibakterielle Aktivität vorliegen kann. Zeitgleich zeigte sich jedoch auch, dass das alleinige Vorhandensein eines Substituenten keine Garantie für die Nicht-Erkennung durch Effluxpumpen darstellt, da bei den in Benzylposition substituierten, (*S*)-konfigurierten Verbindungen weder ein kleiner polarer (**18**) noch ein großer unpolarer Substituent (**147**) Schutz vor der Erkennung durch die Effluxpumpe boten. Dies wies darauf hin, dass möglicherweise anstelle des Vorhandenseins oder der Art des Substituenten die räumliche Ausrichtung einzelner funktioneller Gruppen für die Erkennung der Verbindung entscheidend ist. Während bei beiden benzylsubstituierten Verbindungen dieser Substituent konformativ flexibel ist und in Relation zum Hydroxamsäuremotiv und zum hydrophoben Tail verschiedene räumliche Anordnungen einnehmen kann, zeigten beim konformativ fixierten *C*-Furanosid **17** sowohl die Hydroxygruppe in Position 3 als auch die Hydroxygruppe in Position 4 in die entgegengesetzte Richtung wie die beiden *cis*-konfigurierten Substituenten in Position 2 und 5. *C*-Pyranosid **67**, welches zusätzlich zu den beiden auf der entgegengesetzten Ringseite stehenden Hydroxygruppen eine zum Hydroxamsäuremotiv und zur lipophilen Seitenkette *cis*-konfigurierte Hydroxygruppe aufwies, wurde hingegen als Substrat von Effluxpumpen erkannt. Dies war möglicherweise genauso wie das Erkennen von **65** und **102** durch die Effluxpumpe ein Hinweis darauf, dass bereits eine einzige Hydroxygruppe mit einer bestimmten möglichen räumlichen Ausrichtung als Erkennungsmotiv für die entsprechende Effluxpumpe ausreichend ist.

Zur weiteren Abklärung, warum **17** nicht als Substrat von Effluxpumpen in *E. coli* ATCC 25922 erkannt wurde und ob der Resistenzmechanismus der Effluxpumpe entweder durch die Art oder die räumliche Ausrichtung des Substituenten umgangen werden kann, ist eine weitere Untersuchung von Verbindungen basierend auf **17** sowie **102** notwendig. Hierbei ist zunächst insbesondere die Inversion der Konfiguration des Stereozentrums, das die Hydroxygruppe von **102** trägt (**103**), sowie die Inversion der Konfiguration in Position 4 von **67** von Interesse, um den Einfluss der räumlichen Ausrichtung der in den Verbindungen enthaltenen Hydroxygruppe(n) weiter zu untersuchen. Hierbei sollte bezüglich **102** bzw. **103** untersucht werden, ob durch den Phenylrest die freie Drehbarkeit des Substituenten eingeschränkt ist, oder die Hydroxygruppe verschiedene räumliche Ausrichtungen einnehmen kann. Der Austausch der beiden zum Hydroxamsäuremotiv sowie zum lipophilen Tail *trans*-konfigurierten Hydroxygruppen von **17** bietet im Gegensatz dazu die Möglichkeit, den Einfluss der Art des Substituenten weiter zu untersuchen. Analog dazu könnte dieser Austausch der Substituenten auch für **102** und **103** durchgeführt werden. Zuletzt könnte auch die Position des Substituenten variiert werden. Dies kann beispielsweise, ausgehend von **102** und **103** bzw. den auf Basis dieser Verbindung neu designten Verbindungen, durch eine Verschiebung des ein Stereozentrum enthaltenden Substituenten aus der α -Position in die Benzylposition überprüft werden. Zusätzlich dazu könnte ausgehend von **17** eine einfache Dehydroxylierung in Position 3 bzw. Position 4 untersucht werden.

Des Weiteren zeigte sich, dass auch das Target LpxC in den beiden Bakterienarten durch Einführung verschiedener Substituenten unterschiedlich gut adressiert werden kann. Dieses konnte insbesondere anhand der C-Furanoside **17** und **65** sowie des Morpholinderivates **35** gezeigt werden. Während die meisten Verbindungen in Anwesenheit eines Effluxpumpeninhibitors die gleiche MHK gegen *E. coli* sowie gegen *P. aeruginosa* aufwiesen und beide Enzyme vermutlich in einem ähnlichen Maße inhibierten, war die MHK von **35** gegen *E. coli* deutlich höher als gegen *P. aeruginosa*. Dies ist in Übereinstimmung mit den Experimenten zur Bestimmung des K_i -Wertes von **35** (vgl. Tabelle 37), in denen diese Verbindung lediglich gegen *P. aeruginosa* LpxC inhibitorische Aktivität aufwies. Da Morpholinderivat **35** die stärkste strukturelle Abweichung von den anderen untersuchten Strukturen aufwies, ist dies möglicherweise ein Hinweis darauf, dass für die Inhibition von *E. coli* LpxC ein stärker konserviertes Inhibitor-Rückgrat als für die Inhibition von *P. aeruginosa* LpxC benötigt wird.

Zugleich wies die Untersuchung der C-furanosidischen Inhibitoren darauf hin, dass die Stereochemie der Verbindungen für die Inhibition von *P. aeruginosa* von größerer Bedeutung ist als für die Inhibition von *E. coli*. Während die unterschiedliche MHK von **17** und **65** gegen *E. coli* ATCC 25922 lediglich darauf beruhte, dass **17** nicht als Target von Effluxpumpen diente und beide C-Furanoside die identische MHK in Anwesenheit von PA β N aufwiesen (MHK = 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), war diese gegen *P. aeruginosa* ATCC 27853 in Anwesenheit des Effluxpumpeninhibitors verschieden. Verglichen mit *E. coli* ATCC 25922 zeigte gegen *P. aeruginosa* ATCC 27853 **65** eine um den Faktor 2 höhere und **17** eine um den Faktor 2 niedrigere MHK.

5.3.2 Kombinationsexperimente mit zugelassenen Antibiotika

Bei der Kombination eines LpxC-Inhibitors mit einem zugelassenen Antibiotikum handelt es sich um die zeitgleiche Gabe von zwei Wirkstoffen mit jeweils unterschiedlichem Wirkmechanismus. Dies kann prinzipiell verschiedene Effekte auf ihre antibakterielle Wirkung haben: Ohne Interaktion der Wirkstoffe, d.h. bei einer völlig unabhängigen Wirkungsweise, wird durch die zeitgleiche Gabe ein

additiver Effekt erreicht. Besteht hingegen ein Zusammenspiel der Wirkmechanismen beider Wirkstoffe, kann dieses sowohl einen wirkungsverstärkenden (Synergismus) als auch einen wirkungsabschwächenden (Antagonismus) Effekt hervorrufen.^[94]

Da LpxC-Inhibitoren als Inhibitoren der Lipid A-Biosynthese Einfluss auf die Permeabilität der äußeren Membran gramnegativer Bakterien haben, sollte untersucht werden, ob durch geeignete Kombination dieser Verbindungen ein günstiger Effekt auf die Effektivität kommerziell verfügbarer Antibiotika hervorgerufen werden kann. Hierfür wurden Phenylethylenglycolderivat **18** sowie zunächst vier kommerziell verfügbare Antibiotika ausgewählt (Abb. 95).

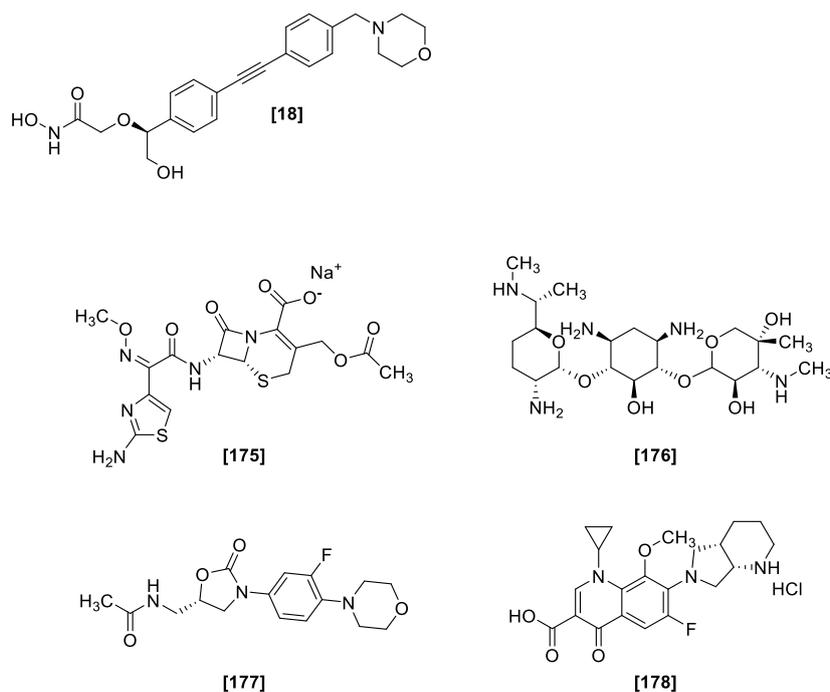


Abbildung 95: Übersicht über die bei den Kombinationsexperimenten untersuchten Substanzen. Dabei handelte es sich um den LpxC-Inhibitor **18** sowie das β -Lactam-Antibiotikum Cefotaxim (**175**), das Aminoglycosid Gentamicin (**176**), das Oxazolidinon Linezolid (**177**) sowie das Fluorchinolon Moxifloxacin (**178**).

Um den Einfluss der erhöhten Permeabilität der Zellmembran zu überprüfen, wurden dabei drei Antibiotika, die in gramnegativen Bakterien ein intrazelluläres Target adressieren, ausgewählt. Zusätzlich dazu wurde ein Antibiotikum, das die bakterielle Zellmembran gramnegativer Bakterien nicht passiert und nur gegen grampositive Bakterien Wirkung zeigt, ausgewählt. Dabei hemmt das β -Lactam-Antibiotikum Cefotaxim (**175**) ähnlich wie Phenylethylenglycolderivat **18** die Biosynthese eines wichtigen Bestandteils der bakteriellen Zellwand. Das konkrete Target sind Penicillin-bindende Proteine, die an der Peptidoglycanbiosynthese beteiligt sind. Da Peptidoglycan Bestandteil von den Zellwänden grampositiver und gramnegativer Bakterien ist, wirkt **175** sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Bakterien. Fluorchinolon Moxifloxacin (**178**) wirkt ebenfalls gegen grampositive und gramnegative Bakterien. Hierbei inhibiert **178** einen frühen Schritt der bakteriellen Replikation. Durch Bindung an die Topoisomerasen II und IV verhindert **178** die Stabilisierung der topologischen Spannung, die aus dem *unwinding* der DNA durch Helicasen resultiert. Aminoglycosid Gentamicin (**176**) und Oxazolidinon Linezolid (**177**) hemmen beide durch Bindung am Ribosom die Translation der Proteinbiosynthese. Während **176** die 30S-Untereinheit des Ribosoms bindet und primär gegen gramnegative Bakterien antibakterielle Aktivität zeigt, bindet das Reserveantibiotikum **177** die 50S-Untereinheit und zeigt ausschließlich gegen grampositive Bakterien antibakterielle Aktivität.^[5,95]

Zur Identifikation einer geeigneten Substanzkonzentration für die Kombinationsexperimente wurde im ersten Schritt die MHK aller in Frage kommenden Substanzen gegen *E. coli* ATCC 25922 bestimmt und die Zellanzahl bei der jeweiligen Konzentration quantifiziert. Für Linezolid, bei dem auch bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Bakterienwachstum stattfand, wurde die Zellanzahl bei dieser maximal untersuchten Konzentration bestimmt (Abb. 96).

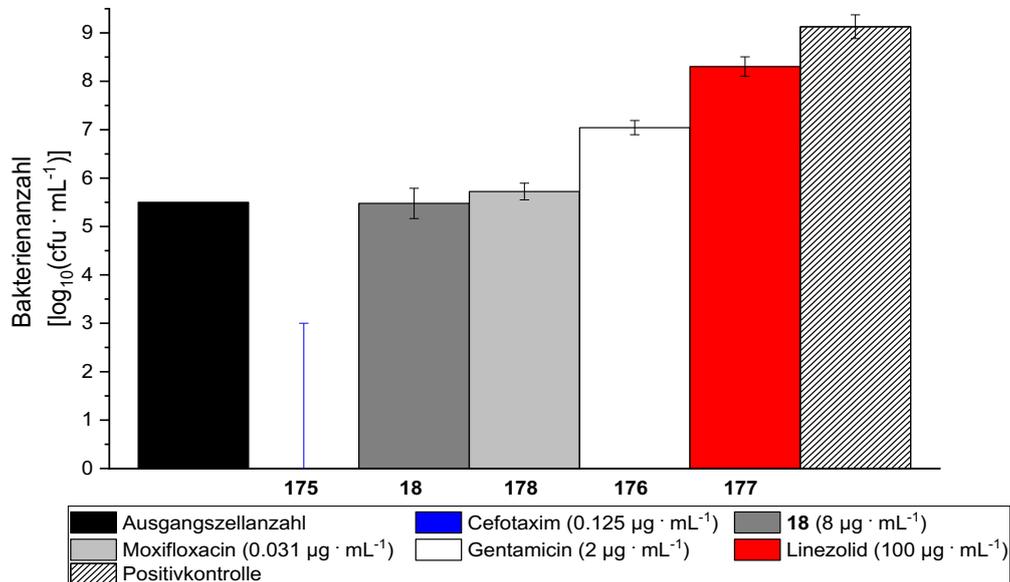


Abbildung 96: Quantifizierung der Zellanzahl bei der MHK von 18 sowie vier kommerziell verfügbaren Antibiotika. Zusätzlich zu dem LpxC-Inhibitor 18 erfolgte die Untersuchung von β -Lactam-Antibiotikum Cefotaxim (175), Aminoglycosid Gentamicin (176), Oxazolidinon Linezolid (177) und Fluorchinolon Moxifloxacin (178). Des Weiteren wurden die bestimmten Zellanzahlen mit der Ausgangszellanzahl sowie der Zellanzahl in Abwesenheit einer antibakteriellen Substanz verglichen.

Ausgehend von einer initialen Zellanzahl von $5 \cdot 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ erfolgte in Abwesenheit eines Antibiotikums innerhalb von 16 Stunden ein Anstieg der Zellanzahl auf ca. $10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$. Auch in Anwesenheit von $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Linezolid (177) konnte sichtbares Bakterienwachstum beobachtet werden. Die Zellanzahl betrug dabei ca. $10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ und war somit lediglich geringfügig niedriger als die Zellanzahl in Abwesenheit eines Antibiotikums. Die Bestimmung der MHK von 177 gegen *E. coli* ATCC 25922 war daher nicht erfolgreich. Dies entsprach den Erwartungen, da 177 auch in der Klinik nur gegen Infektionen mit grampositiven Bakterien eingesetzt wird.

Für die anderen drei kommerziell verfügbaren Antibiotika war die Bestimmung der MHK erfolgreich. Dabei zeigten sich durch die Unterschiede in der Zellkonzentration bei der jeweiligen minimalen Hemmkonzentration verschiedene Wirkmechanismen für die drei Antibiotika: In Anwesenheit von $0.125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Cefotaxim (175) konnte eine Reduktion der Zellanzahl auf $<10^3 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ beobachtet werden. Daraus ergab sich ein bakterizider Wirkmechanismus für das β -Lactam-Antibiotikum 175. Im Gegensatz dazu zeigten sowohl Aminoglycosid Gentamicin (176) als auch Fluorchinolon Moxifloxacin (178) bei ihrer MHK einen bakteriostatischen Effekt. Dabei konnte für $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 176 ein leichter, visuell nicht sichtbarer Anstieg der Zellanzahl verglichen zur ursprünglich eingesetzten Zellanzahl beobachtet werden. 178 zeigte bei einer Konzentration von $0.031 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ hingegen eine vollständige Inhibition des Bakterienwachstums. Auch für den LpxC-Inhibitor 18 konnte ein bakteriostatischer Effekt beobachtet werden. Analog zu Moxifloxacin (178) zeigte sich hierbei bei einer Konzentration von $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ weder ein Wachstum noch eine Reduktion der ursprünglich eingesetzten Zellanzahl.

Zur Auswahl einer geeigneten Konzentration für die Kombinationsexperimente erfolgte im Folgenden eine genauere Untersuchung der Substanzen, die zuvor antibakterielle Aktivität in den MHK-Experimenten gezeigt hatten (Abb. 97).

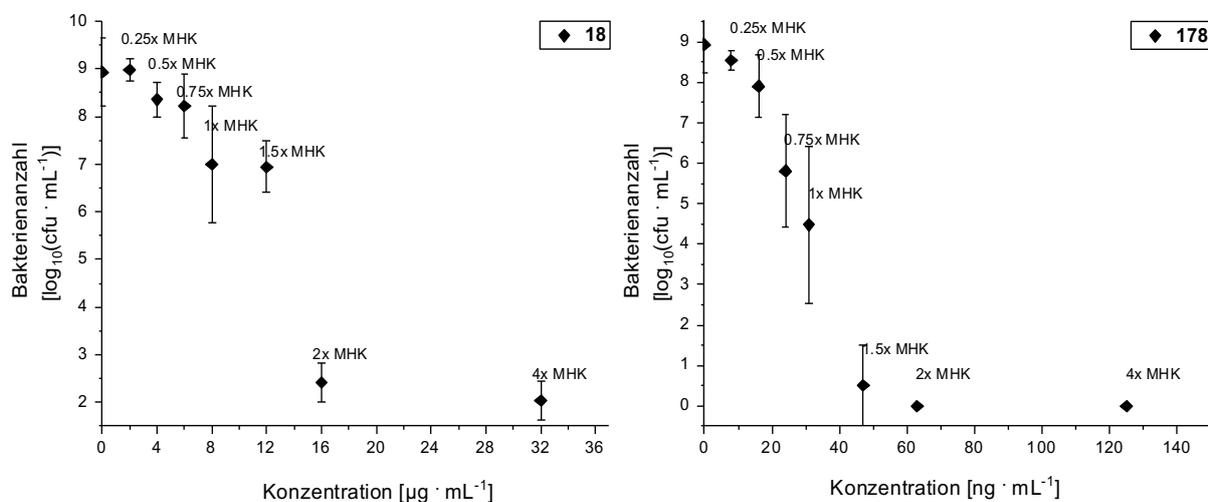


Abbildung 97: Konzentrations-Effektkurven von 18 und Moxifloxacin (178). Ausgehend von der minimalen Hemmkonzentration der Substanz (**18**: 8 µg · mL⁻¹, **178**: 0.031 µg · mL⁻¹) erfolgte die Untersuchung eines Konzentrationsbereiches, bei dem die niedrigste untersuchte Konzentration einem Viertel der MHK und die höchste untersuchte Konzentration der vierfachen MHK entsprach.

Sowohl für den LpxC-Inhibitor **18** als auch für Fluorchinolon Moxifloxacin (**178**) konnte eine reproduzierbare, konzentrationsabhängige Inhibition des Bakterienwachstums beobachtet werden. Die geringste untersuchte Konzentration betrug dabei ein Viertel der minimalen Hemmkonzentration, die höchste untersuchte Konzentration das Vierfache der minimalen Hemmkonzentration. Dabei zeigten beide Substanzen, die bei der MHK einen bakteriostatischen Effekt zeigten, nahezu keine Inhibition bei der niedrigsten untersuchten Konzentration und nahezu vollständiges Abtöten der Bakterien bei der höchsten Konzentration. Insbesondere für den LpxC-Inhibitor **18** zeigte sich dabei eine sehr steile Konzentrations-Effektbeziehung. Sowohl für Cefotaxim (**175**) als auch für Gentamicin (**176**) konnten hingegen keine reproduzierbaren Konzentrations-Effektkurven ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Insbesondere für **175** konnte bei einer Wiederholung des Experimentes keine bloße Schwankung der Zellzahl bei einer bestimmten Konzentration, sondern aufgrund des starken bakteriziden Effektes eine horizontale Verschiebung der gesamten Konzentrations-Effektkurve in den einzelnen Experimenten beobachtet werden. Aus diesem Grund wurden beide Substanzen für die Kombinationsexperimente nicht weiter betrachtet. Für **18** und **178** hingegen wurden anschließend durch Anwendung eines nicht-linearen Fits mithilfe des Hill-Modells charakteristische inhibitorische Konzentrationen aus den Konzentrations-Effektkurven berechnet (Tab. 49).

Tabelle 49: Charakteristische inhibitorische Konzentrationen von LpxC-Inhibitor 18 und Fluorchinolon 178. Diese wurden durch Anwendung eines nicht-linearen Fits mithilfe des Hill-Modells aus den Konzentrations-Effektkurven, bei denen die Bakterienanzahl in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration quantifiziert wurde, erhalten.

	18 [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	Moxifloxacin (178) [$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$]
$IC_{0.1}$	7.80	5.24
IC_1	9.31	9.45
$IC_{2.5}$	10.0	12.0
IC_5	10.6	14.4
IC_{10}	11.2	17.4
IC_{50}	13.2	30.5
IC_{90}	15.7	53.3

Anschließend sollte der generelle Effekt der Kombination beider Wirkstoffe untersucht werden. Hierfür wurden die jeweiligen Inhibitorkonzentrationen, die halbmaximale Hemmung des Bakterienwachstums hervorriefen (IC_{50}), sowie zwei periphere Konzentrationen der Konzentrations-Effektkurve ausgewählt. Dabei dienten die IC_{90} -Konzentrationen zur Überprüfung eines antagonistischen Wirkmechanismus und die IC_{10} -Konzentrationen zur Überprüfung eines synergistischen Wirkmechanismus. Zusätzlich zu der Bakterienanzahl für die neun möglichen Kombinationen von **18** und **178** wurde jeweils die Bakterienanzahl in Anwesenheit von lediglich **18** oder **178** bei den jeweiligen IC_{10} -, IC_{50} -, und IC_{90} -Konzentrationen quantifiziert (Tab. 50).

Tabelle 50: Kombinationsexperimente von 18 und Moxifloxacin (178) zur Charakterisierung der Wechselwirkung der Wirkstoffe. Hierbei wurde die Bakterienanzahl bei der jeweiligen IC_{10} -, IC_{50} - und IC_{90} -Konzentration quantifiziert. Zusätzlich dazu wurde die Bakterienanzahl für die neun möglichen Kombinationen bestimmt.

Bakterienanzahl [$\log_{10}(\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1})$]		18			
		-	IC_{10}	IC_{50}	IC_{90}
Moxifloxacin (178)	-	8.82	6.96	2.72	1.00
	IC_{10}	6.00	0.00	0.00	0.00
	IC_{50}	3.57	0.00	0.00	0.00
	IC_{90}	1.30	0.00	0.00	0.00

Hierbei zeigte sich bei allen neun untersuchten Kombinationen ein vollständiges Abtöten der Bakterien. Insbesondere die Kombination der beiden IC_{10} -Konzentrationen, welche einzeln ein Bakterienwachstum auf $\geq 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ ermöglichten, war dabei ein erster Hinweis auf einen synergistischen Wirkmechanismus. Zur weiteren Quantifizierung des Synergieeffektes wurde anschließend die Kombination niedrigerer charakteristischer Inhibitorkonzentrationen untersucht (Tab. 51).

Tabelle 51: Kombinationsexperimente von 18 und Moxifloxacin (178) zur Quantifizierung des Synergieeffektes. Hierbei wurde die Bakterienanzahl bei den jeweiligen $IC_{0.1}$ -, IC_1 -, $IC_{2.5}$ -, IC_5 - und IC_{10} -Konzentrationen quantifiziert. Zusätzlich dazu wurde die Bakterienanzahl für die 25 möglichen Kombinationen bestimmt.

Bakterienanzahl [log ₁₀ (cfu · mL ⁻¹)]		18					
		-	$IC_{0.1}$	IC_1	$IC_{2.5}$	IC_5	IC_{10}
Moxifloxacin (178)	-	9.0 ± 0.3	8.7 ± 0.2	8.0 ± 0.5	8.1 ± 0.1	7.8 ± 0.1	7.3 ± 0.8
	$IC_{0.1}$	7.4 ± 1.2	7.3 ± 1.3	5.2 ± 2.9	4.8 ± 3.0	4.3 ± 1.7	2.3 ± 3.2
	IC_1	7.8 ± 0.9	8.1 ± 0.1	6.1 ± 1.6	3.2 ± 3.3	3.2 ± 3.3	0.7 ± 1.3
	$IC_{2.5}$	7.3 ± 1.0	7.9 ± 0.6	4.8 ± 2.1	4.3 ± 3.7	4.0 ± 3.5	0.0 ± 0.0
	IC_5	7.0 ± 0.9	6.6 ± 2.7	4.4 ± 3.2	3.1 ± 3.1	2.1 ± 3.6	0.0 ± 0.0
	IC_{10}	7.8 ± 1.0	7.3 ± 1.6	7.2 ± 0.2	2.6 ± 3.2	0.8 ± 1.3	0.0 ± 0.0

Hierbei zeigte sich insbesondere bei den Kombinationen im jeweiligen mittleren Konzentrationsbereich eine teils sehr hohe Variabilität der Replikate, die sich in hohen Standardabweichungen widerspiegelte. Dies lässt sich möglicherweise mit der zuvor beobachteten steilen Konzentrations-Effektbeziehung der untersuchten Substanzen erklären. Die Betrachtung der jeweils höchsten Konzentration mit niedrigeren Konzentrationen des Interaktionspartners ermöglichte es, nicht nur das Vorhandensein eines synergistischen Effektes zu beschreiben, sondern auch, ab welcher Konzentration des Partners dieser Effekt zustande kommt. Neben der Kombination beider IC_{10} -Konzentrationen konnte auch für die Kombination der IC_{10} -Konzentration von **18** mit der IC_5 - und $IC_{2.5}$ -Konzentration von **178** ein vollständiges Abtöten der Bakterien beobachtet werden. Die Kombination der IC_{10} -Konzentration von **18** mit der IC_1 - sowie der $IC_{0.1}$ -Konzentration von **178** führte zu einer Reduktion der Ausgangszellanzahl um mehr als den Faktor 1000. In Abwesenheit von **178** konnte bei der IC_{10} -Konzentration von **18** hingegen sichtbares Bakterienwachstum beobachtet werden. Auch für die IC_{10} -Konzentration von Moxifloxacin konnte in Kombination mit der IC_5 - sowie der $IC_{2.5}$ -Konzentration von **18** eine deutliche Reduktion der Zellanzahl beobachtet werden. Der Effekt der IC_{10} -Konzentration von **178** war dabei jedoch deutlich stärker von der Konzentration von **18** abhängig als andersherum. Ab einer Kombination mit der IC_1 -Konzentration von **18** konnte kein Unterschied verglichen mit der alleinigen Gabe von **178** beobachtet werden. Zur weiteren Quantifizierung des Synergieeffektes erfolgte anschließend eine Modellierung der Interaktion mithilfe eines allgemeinen pharmakodynamischen Interaktionsmodells, dem sogenannten „*General Pharmacodynamic Interaction Model*“^[96] (Abb. 98).

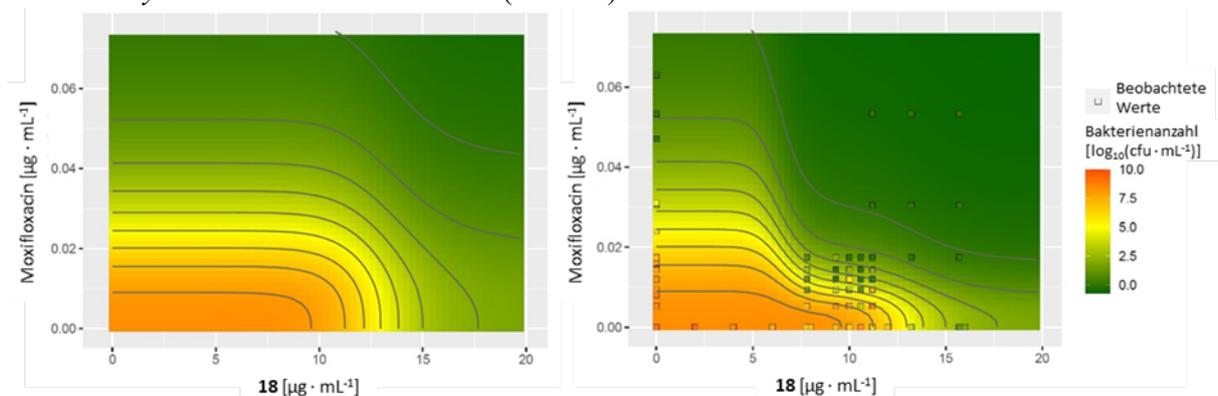


Abbildung 98: Response Surface Plot zur Modellierung der Interaktion von 18 und Moxifloxacin (178). Links: Modellierter Effekt bei einem additiven Wirkmechanismus („Unabhängigkeit nach Bliss“). Rechts: Modellierter Effekt bei einem durch **18** dominierten, synergistischen Effekt. Zusätzlich dazu wurden zur Verifizierung der Modellierung die berechneten Werte mit den experimentell bestimmten Werten verglichen.

Dieses Modell erlaubt eine Quantifizierung einer Interaktion als Verschiebung des maximalen Effektes (E_{\max}) oder des IC_{50} -Wertes. Ebenso kann bestimmt werden, ob die Interaktion gerichtet ist, oder beidseitig. Hierbei zeigte sich zunächst, dass auch bei Konzentrationen, bei denen laut Modell bei einem additiven Effekt unter der Annahme einer Unabhängigkeit nach Bliss^[97] (links) keine Wirkung mehr auftreten sollte, die Kombination von **18** und **178** eine starke Reduktion der Bakterienanzahl bzw. noch eine Inhibition des Bakterienwachstums hervorrief. Dies beschrieb ein Modell mit einer einseitigen Interaktion am besten. Die beobachteten Daten konnten dabei in guter Übereinstimmung mit einer durch **18** dominierten, synergistischen Interaktion (rechts) charakterisiert werden. Der IC_{50} -Wert von **178** wurde mit $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ bestimmt, der von **18** mit $13.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. In Kombination konnte durch **18** der IC_{50} -Wert von **178** um 61% reduziert werden. Für die synergistische Interaktion wurde ein IC_{50} -Wert von $6.43 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ für **18** bestimmt, d.h. bei dieser Konzentration von **18** ist der synergistische Effekt halbmaximal ausgeprägt. Somit stellt die Kombination des LpxC-Inhibitors **18** mit **178** einen vielversprechenden Ansatz zur Erhöhung der Effektivität des kommerziell verfügbaren Antibiotikums Moxifloxacin dar.

5.3.3 Photoexperimente

Beim Vergleich der 1,4-substituierten Triazole in Benzylposition mit den 1,4-substituierten Triazolen in α -Position zum Hydroxamsäuremotiv zeigte sich ein deutlicher Unterschied der inhibitorischen Aktivität. Trotz bemerkenswerter antibakterieller Eigenschaften der 1,4-substituierten Triazole in Benzylposition gegen *E. coli* D22 zeigten diese eine um mehr als den Faktor 100 reduzierte inhibitorische Aktivität (vgl. Tabelle 25). Dabei waren die Substituenten des Triazolrings in Benzylposition vor allem Phenylether und Naphthylether. Neben ihrer Funktion als Adressaten der UDP-Bindungs-tasche handelte es sich bei diesen Substituenten um photolabile Abgangsgruppen. Von Daniel Harms-Pollak durchgeführte computerchemische Untersuchungen zeigten, dass bei heterolytischer Bindungsspaltung des Phenylethers ein stabiles Kation freigesetzt werden kann, welches keine weitere Umlagerung, die mit einer unerwünschten Verschiebung der positiven Ladung gepaart ist, vollzieht (Abb. 99).

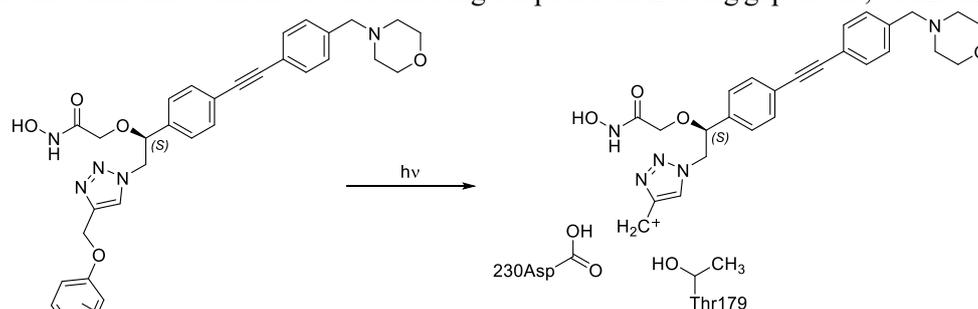


Abbildung 99: Schematische Darstellung der Freisetzung kationischer LpxC-Inhibitoren aus photoaktivierbaren Vorläufermolekülen. Durch Anregung durch Licht sollte bei einer heterolytischen Bindungsspaltung ein Kation entstehen, welches nahe der nucleophilen Seitenketten von Asp230 und Thr179 im aktiven Zentrum lokalisiert ist.

Dieses Kation sollte anschließend kovalent an die nucleophilen Seitenketten von Asp130 oder Thr179 binden und das Enzym somit irreversibel hemmen. Weitere computerchemische Rechnungen anhand von Norbornylphenylethern als Modellsysteme zeigten, dass eine Nitrogruppe in *p*-Position des Phenylrings das entstehende Phenolat zu einer geeigneten Abgangsgruppe machte, da die Nitrogruppe das Anion besonders gut stabilisieren konnte. Zusätzlich dazu begünstigte dieser Substituent auch eine Verschiebung der benötigten Anregungswellenlänge zu längeren Wellenlängen.

Aus diesem Grund wurden im Folgenden Photoexperimente mit dem Phenylether **126**, welcher eine Nitrogruppe in *p*-Position aufwies, durchgeführt. Zusätzlich dazu wurden die Experimente mit der Azoverbindung **130** sowie dem 4-Methyltriazol **116** als Negativkontrolle durchgeführt (Abb. 100).

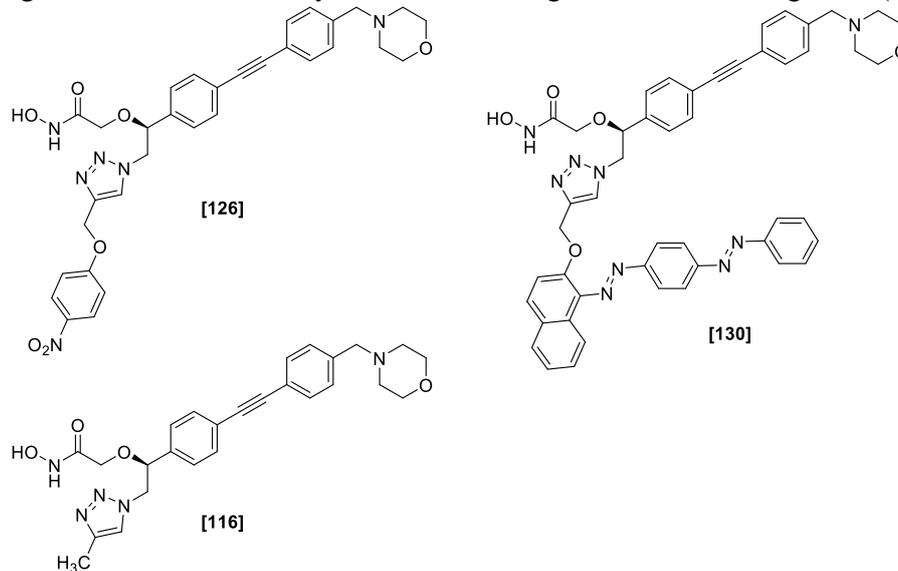


Abbildung 100: Übersicht über die für die Photoexperimente verwendeten LpxC-Inhibitoren. Hierbei handelt es sich um den 4-Nitro-substituierten Phenylether **126**, den 2-Diazo-substituierten Naphthylether **130** sowie das 4-Methyltriazol **116**.

Im ersten Schritt wurde der Einfluss der Bestrahlung auf die antibakterielle Aktivität der LpxC-Inhibitoren untersucht. Dem vorgelagert erfolgte eine Untersuchung des generellen Einflusses einer zehnminütigen Bestrahlung bei der verwendeten Wellenlänge auf Bakterienzellen. Dabei wurden drei Bakterienstämme in jeweils zwei unterschiedlichen Medien getestet. Hierbei handelte es sich um die beiden Wildtyp-Arten *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* BL21(DE3) sowie den defizienten Bakterienstamm *E. coli* D22. Als Medien wurden LB- sowie MHB-Medium verwendet. Zusätzlich dazu wurde der Zeitpunkt der Bestrahlung variiert. Nach einer Gesamtdauer von Wachstum (37 °C) und Bestrahlung (25 °C, 10 min) von sechs Stunden zeigte sich bei allen Ansätzen sichtbares Wachstum in unterschiedlicher Intensität, welches anschließend quantifiziert wurde (Abb. 101).

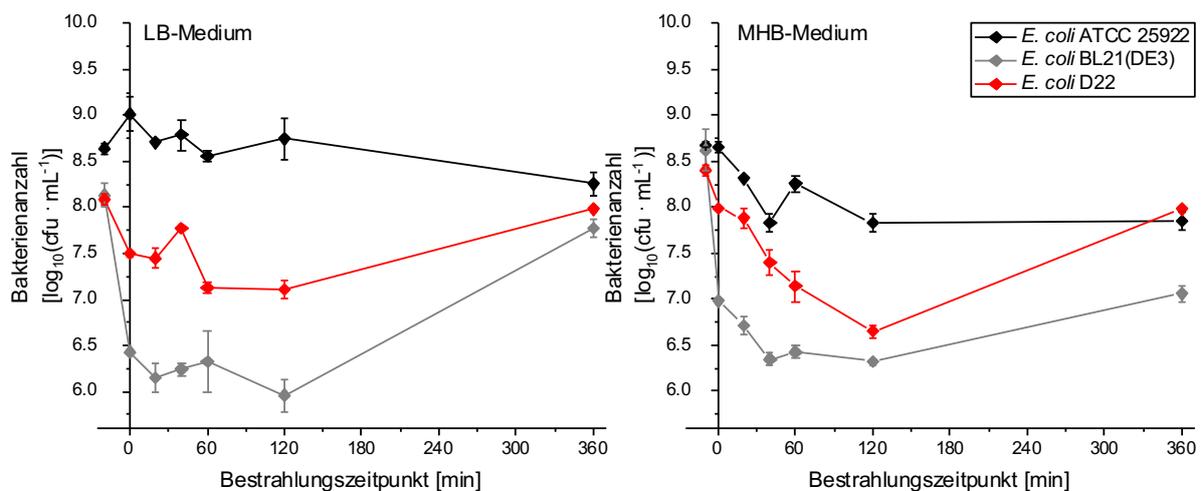


Abbildung 101: Untersuchung des Einflusses einer zehnminütigen Bestrahlung auf das Bakterienwachstum. Hierbei wurden die Wildtypen *E. coli* ATCC 25922 und *E. coli* BL21(DE3) sowie der defiziente Stamm *E. coli* D22 untersucht. Als Medium wurde für alle Stämme sowohl LB- als auch MHB-Medium verwendet. Die Gesamtdauer des Wachstumsexperimentes betrug 6 h, dabei wurden die Ansätze zu verschiedenen Zeitpunkten ($t = 0$ min, 20 min, 40 min, 60 min, 120 min) für 10 min bestrahlt ($\lambda = 300$ nm). Als Kontrollen dienten dabei ein Ansatz, der nicht bestrahlt wurde, sowie ein Ansatz, der erst nach der sechsstündigen Wachstumsphase bestrahlt wurde (dargestellt bei $x = -20$ min bzw. $x = 360$ min).

Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede der Zellanzahl in Abhängigkeit von dem verwendeten Bakterienstamm. Das verwendete Medium beeinflusste das Wachstum hingegen kaum. Alle Bakterienstämme wiesen, ausgehend von einer Zellanzahl von $5 \cdot 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, nach einer sechsständigen Wachstumsphase eine Zellanzahl von ca. $1\text{--}5 \cdot 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ auf. Eine zehnmütige Bestrahlung nach sechs Stunden lieferte eine Zellanzahl von $5 \cdot 10^7\text{--}5 \cdot 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ in LB-Medium und eine Zellanzahl von $1 \cdot 10^7\text{--}1 \cdot 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ in MHB-Medium. Dies zeigte eine leichte Reduktion der Zellanzahl durch Bestrahlung nach Ende der Wachstumsphase. Diese Reduktion war beim Wildtyp *E. coli* BL21(DE3) am stärksten ausgeprägt, beim Wildtyp *E. coli* ATCC 25922 am geringsten.

Auch in Bezug auf den Einfluss des Bestrahlungszeitpunktes zeigten sich abhängig vom Bakterienstamm deutliche Unterschiede. Vor allem für *E. coli* BL21(DE3) sowie *E. coli* D22 konnte, verglichen mit den unbestrahlten Bakterien sowie den Bakterienzellen, die in der stationären Phase bestrahlt wurden, eine deutliche Reduktion der Zellanzahl durch Bestrahlung der Bakterien in der lag-Phase sowie der exponentiellen Wachstumsphase beobachtet werden. Am stärksten ausgeprägt war dies bei einer Bestrahlung nach 120 Minuten. Verglichen mit den unbestrahlten Bakterienzellen ($1 \cdot 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) wurde die Zellanzahl von *E. coli* D22 um den Faktor 10 ($1 \cdot 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) und die von *E. coli* BL21(DE3) um den Faktor 100 ($1 \cdot 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) reduziert. Eine Bestrahlung innerhalb der ersten 60 Minuten lieferte keinen eindeutigen Trend. Der Wildtyp *E. coli* ATCC 25922 zeigte hingegen über den gesamten Zeitraum unabhängig vom Zeitpunkt der Bestrahlung eine nahezu konstante Zellanzahl nach sechs Stunden. Aus diesem Grund wurden die folgenden Experimente mit diesem Bakterienstamm in LB-Medium durchgeführt.

Anschließend wurden die Bakterien mit den beiden photoaktivierbaren LpxC-Inhibitoren **126** und **130** sowie dem nicht-photoaktivierbaren Inhibitor **116** versetzt und die Zellanzahl nach sechsständiger Inkubation bei 37°C quantifiziert. Zusätzlich dazu erfolgte zu verschiedenen Wachstums- und Inkubationszeitpunkten eine Bestrahlung der Zell-Inhibitor-Lösung, wodurch die kationische aktive Form des LpxC-Inhibitors freigesetzt werden sollte. Hierbei erfolgte ebenfalls die Quantifizierung der Zellanzahl nach einer Gesamtwachstumsdauer von sechs Stunden (Abb. 102).

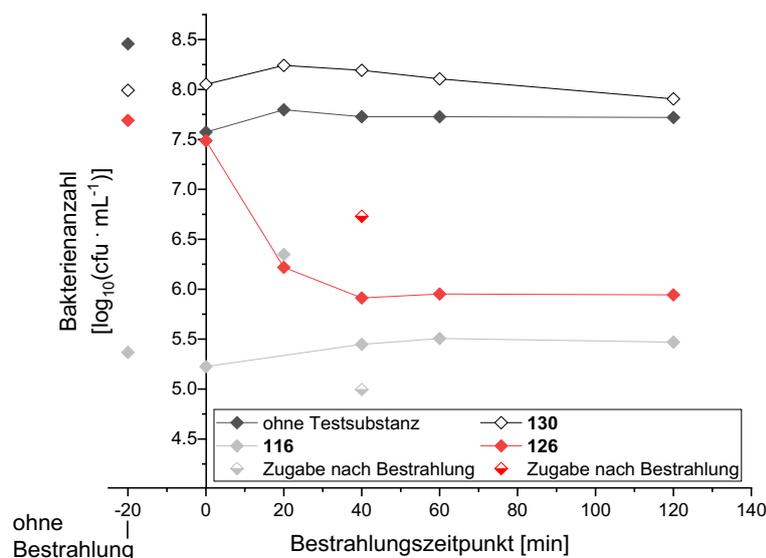


Abbildung 102: Untersuchung des Einflusses der (photoaktivierbaren) LpxC-Inhibitoren 116, 126 und 130 auf das Wachstum von *E. coli* ATCC 25922. Dabei wurde die Zellanzahl nach sechsständigem Wachstum in Anwesenheit der Inhibitoren ($32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) quantifiziert. Zusätzlich dazu erfolgte eine zehnmütige Bestrahlung ($\lambda = 300 \text{ nm}$) der Bakterien-Inhibitor-Lösung nach verschiedenen Inkubationszeitpunkten ($t = 0 \text{ min}, 20 \text{ min}, 40 \text{ min}, 60 \text{ min}, 120 \text{ min}$). Des Weiteren wurden exemplarisch die Bakterienzellen in Abwesenheit eines Inhibitors für 40 min wachsen gelassen. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte erst nach der anschließenden zehnmütigen Bestrahlung der Bakterienzellen.

Dabei zeigte sich für den unbestrahlten Ansatz ohne zusätzlichen Inhibitor nach sechsstündigem Wachstum eine Zellanzahl von ca. $5 \cdot 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die Bestrahlung der Zellen bewirkte unabhängig vom Zeitpunkt der Bestrahlung eine Reduktion um den Faktor 10 auf ca. $7 \cdot 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Die Zugabe des Naphthylethers **130** bewirkte ohne zusätzliche Bestrahlung eine leichte Reduktion der Zellanzahl um den Faktor 5 auf ca. $1 \cdot 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$. Eine zusätzliche Bestrahlung des Ansatzes bewirkte jedoch unabhängig vom Zeitpunkt der Bestrahlung keine weitere Reduktion der Zellanzahl. Dies zeigte, dass die Photoaktivierung des Naphthylethers **130** nicht erfolgreich war. Zeitgleich zeigten alle bestrahlten Ansätze, die den Naphthylether **130** enthielten, jedoch eine minimal höhere Zellanzahl als alle bestrahlten Ansätze ohne Inhibitor. Dies deutete darauf hin, dass ein Unterschied der Zellanzahl um weniger als den Faktor 2 keine eindeutige Reduktion darstellte, sondern es sich hierbei um normale Schwankungen innerhalb eines lebenden Systems handelte. Die Zugabe des 4-Methyltriazols **116** bewirkte bereits ohne Bestrahlung eine Reduktion der Zellanzahl auf ca. $5 \cdot 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$. Dies entspricht der Zellanzahl, die zu Beginn des Experimentes verwendet wurde, und deutet somit darauf hin, dass es sich bei **116** um einen bakteriostatischen Inhibitor handelt. Die Bestrahlung der Bakterien-Inhibitor-Lösung bewirkte unabhängig vom Zeitpunkt der Bestrahlung keine weitere Reduktion der Zellanzahl. Dies entsprach in Anbetracht der fehlenden photolabilen Abgangsgruppe am Triazolring den Erwartungen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine Bestrahlung keinen bakteriziden Effekt auf Bakterien hatte, deren Wachstum bereits inhibiert wurde. Zusätzlich dazu erfolgte für $t = 40 \text{ min}$ die Zugabe des Inhibitors nach der Bestrahlung der Bakterienlösung. Hierbei zeigte sich nach einer sechsstündigen Wachstumsphase eine Zellanzahl von ca. $1 \cdot 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$. Dies entspricht einer um den Faktor 5 niedrigeren Zellanzahl als zu Beginn des Experimentes verwendet wurde und deutet möglicherweise auf einen leichten additiven Effekt einer bakteriziden Bestrahlung gefolgt von einer bakteriostatischen LpxC-Inhibition hin. Die Zugabe des *p*-Nitro-substituierten Phenylethers **126** lieferte eine Reduktion des Zellwachstums in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bestrahlung. Ohne zusätzliche Bestrahlung lag die Zellanzahl nach sechs Stunden um den Faktor 10 unterhalb der Zellanzahl der nicht-inhibierten Ansätze (ca. $5 \cdot 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$). Ohne Photoaktivierung zeigte **126** somit bereits schwache LpxC-inhibitorische Aktivität. Die Bestrahlung direkt nach der Zugabe bewirkte keine weitere Reduktion der Zellanzahl. Eine zwanzigminütige Inkubation von Bakterien und Inhibitor vor der Bestrahlung bewirkte hingegen eine zusätzliche Reduktion der Zellanzahl auf ca. $2 \cdot 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, eine vierzigminütige Inkubation eine Reduktion der Zellanzahl auf ca. $9 \cdot 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$. Eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit vor der Bestrahlung hatte keine weitere Reduktion der Zellanzahl zur Folge. Analog zu **116** erfolgte auch für **126** für $t = 40 \text{ min}$ die Zugabe des Inhibitors nach der Bestrahlung der Bakterienlösung. Verglichen mit dem unbestrahlten Ansatz zeigte sich auch hier eine weitere Reduktion der Zellanzahl um den Faktor 10. Dies wies wie zuvor bei **116** auf einen leichten additiven Effekt von Bestrahlung der Bakterienzellen sowie intrinsischer LpxC-inhibitorischer Aktivität der nicht-bestrahlten Inhibitorform hin. Allerdings war diese Reduktion der Zellanzahl deutlich geringer als für den Ansatz, bei dem der Inhibitor ebenfalls bestrahlt wurde. Dies deutete darauf hin, dass die Photoaktivierung des Phenylethers **126** zu einem aktiveren LpxC-Inhibitor erfolgreich war. Dabei war jedoch eine gewisse Inkubationsdauer von Bakterien und Inhibitor vor der Bestrahlung notwendig, damit der Inhibitor vollständig von den Bakterienzellen aufgenommen werden konnte. Dies lässt sich möglicherweise damit erklären, dass nur die native Form des Inhibitors die bakterielle Zellmembran durchdringen konnte. Erfolgte die Bestrahlung der Bakterien-Inhibitor-Lösung jedoch vor der vollständigen Aufnahme des Inhibitors, lag die photoaktivierte Form des Inhibitors nur außerhalb der Bakterienzellen vor und hatte keinen Effekt auf diese.

Um zu überprüfen, ob diese beobachtete Photoaktivierung tatsächlich auf einer Inhibition von *E. coli* LpxC C63A beruhte, erfolgte anschließend die Untersuchung von **126** auf enzymatischer Ebene. Analog zu den zuvor durchgeführten Experimenten zur antibakterielle Aktivität erfolgte auch hier zunächst eine Untersuchung des Einflusses einer zehnminütigen Bestrahlung auf die enzymatische Aktivität von *E. coli* LpxC C63A (Tab. 52).

Tabelle 52: Untersuchung des Einflusses einer zehnminütigen Bestrahlung ($\lambda = 300$ nm) auf die enzymatische Aktivität von *E. coli* LpxC C63A. Dazu wurde der Umsatz von 2.5 μ M Substrat durch 7.4 nM (ggf. bestrahltes) Enzym verfolgt. Die Bestrahlung des Enzyms erfolgte für eine Dauer von 10 min vor Substratzugabe. Die Quantifizierung der Substrat- und Produktkonzentrationen erfolgte nach 30-minütigem Umsatz bei 37 °C mittels LC-MS/MS durch den Vergleich der Peakflächen der *Quantifier*.

	Bedingungen	Umsatz [%]
<i>E. coli</i> LpxC C63A (7.4 nM, 2.5 μ M Substrat)	unbestrahlt	62
	bestrahlt (10 min, $\lambda = 300$ nm)	83

Hierbei zeigte sich, dass die Bestrahlung keinen negativen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hatte, sondern sogar die enzymatische Aktivität erhöhte. Während ohne Bestrahlung 62% des Substrates in 30 Minuten umgesetzt wurden, wurden nach vorheriger Bestrahlung des Enzyms 83% des Substrates innerhalb von 30 Minuten umgesetzt. Diese Erhöhung der enzymatischen Aktivität lässt sich möglicherweise durch eine Erwärmung der Lösung durch die Bestrahlung erklären.

Anschließend erfolgte die Bestimmung des IC_{50} -Wertes von **126** in seiner nativen sowie seiner photoaktivierten Form. Zusätzlich dazu wurde der IC_{50} -Wert von **126** in der nativen Form gegen zuvor bestrahltes Enzym bestimmt (Tab. 53).

Tabelle 53: Bestimmung des IC_{50} -Wertes von **126 in seiner nativen sowie der photoaktivierten Form gegen *E. coli* LpxC C63A.** Zusätzlich dazu erfolgte die Bestimmung des IC_{50} -Wertes von **126** in seiner nativen Form gegen zuvor bestrahltes Enzym. Die Bestrahlung erfolgte vor Substratzugabe für einen Zeitraum von 10 min bei $\lambda = 300$ nm. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte erfolgte bei einer Substratkonzentration von 2.5 μ M und einer Enzymkonzentration von 7.4 nM. Die Quantifizierung der Substrat- und Produktkonzentrationen erfolgte nach 30-minütigem Umsatz bei 37 °C mittels LC-MS/MS durch den Vergleich der Peakflächen der *Quantifier*.

	Bestrahlung (10 min, $\lambda = 300$ nm)		IC_{50} [μ M] <i>E. coli</i> LpxC C63A
	Enzym	Inhibitor	
<i>E. coli</i> LpxC C63A (7.4 nM, 2.5 μ M Substrat)	-	-	6.21
	+	-	12.1
	+	+	47.4

Dabei inhibierte **126** in seiner nativen Form *E. coli* LpxC C63A mit einem IC_{50} -Wert von 6.21 μ M. Eine vorherige Bestrahlung des Enzyms bewirkte eine Reduktion der inhibitorischen Aktivität von **126** in seiner nativen Form um den Faktor 2. Dies ist in Einklang mit dem höheren Substratumsatz des Enzyms bei vorheriger zehnminütiger Bestrahlung. Die zehnminütige Bestrahlung des Enzym-Inhibitor-Komplexes hingegen bewirkte eine deutliche Reduktion der inhibitorischen Aktivität. Der IC_{50} -Wert betrug dabei 47.4 μ M.

Dies zeigt, dass **126** durch Bestrahlung nicht in eine aktivere Form überführt wurde, welche das Enzym irreversibel hemmt, und dass die zuvor beobachtete Erhöhung der antibakteriellen Aktivität der photoaktivierten Substanz nicht auf einer Inhibition des LpxC-Enzyms beruhte.

6 Experimentaltteil

6.1 Materialien

6.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und ihre Hersteller sind nachfolgend aufgelistet (Tab. 54).

Tabelle 54: Übersicht über die verwendeten Chemikalien sowie deren Hersteller.

Hersteller	Chemikalien
Acros Organics	Methanol
Alfa Aesar	<i>o</i> -Phthaldialdehyd
Appllichem	Brij® 35, Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz Dihydrat, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Carbosynth	UDP-3- <i>O</i> -[(<i>R</i>)-3-Hydroxymyristoyl]- <i>N</i> -acetylglucosamin Dinatriumsalz
Carl Roth	Acrylamid-Bisacrylamidlösung (37.5:1), Agar-Agar, Ammoniumperoxodisulfat, D-Biotin, Borax, Bromphenolblau-Natriumsalz, Columbia-Agar, Coomassie Brillant Blau G 250, Dikaliumhydrogenphosphat, 1,4-Dithiothreitol, D-Glucose, Glycerol, Hefeextrakt, Hepes, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, Kaliumchlorid, Kaliumhydroxid, Kanamycin A-Sulfat, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 2-Mercaptoethanol, 2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure, Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin Hydrochlorid, Tris(hydroxymethyl)methylamin, Phenylmethylsulfonylfluorid, Triton® X-100, Trypton, Tween® 20
Cytiva (GE Healthcare)	Biotin CAPture reagent, Ethanolamin, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid, Guanidin-Hydrochlorid, Natriumhydroxid, <i>N</i> -Hydroxysuccinimid
Fisher Bio Reagents	Bis-Tris, Carbenicillin-Dinatriumsalz, Natriumlaurylsulfat
Fisher Scientific	Dimethylsulfoxid
Gruessing	Kaliumdihydrogenphosphat, Natriumacetat, Salzsäure
Honeywell	Glycin
Merck	Ammoniumformiat, Calciumchlorid, D-Glucosamin-Hydrochlorid, Zinkchlorid, Zinksulfat
Pfizer	Linezolid
Sigma Aldrich (Merck)	Benzamidin-Hydrochlorid, Cefotaxim-Natriumsalz, Gentamicin-Sulfat, Moxifloxacin-Hydrochlorid, Mueller Hinton II, 2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure (Natriumsalz), Phe-Arg-β-Naphthylamid-Hydrochlorid
TCI	2-Iodanilin
VWR	Acetonitril (hypergrade für die LC-MS), Essigsäure, Ethanol, Isopropanol, Isopropanol (hypergrade für die LC-MS), Natriumchlorid, Wasser (hypergrade für die LC-MS)

6.1.2 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller sind nachfolgend aufgelistet (Tab. 55).

Tabelle 55: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller.

Hersteller	Verbrauchsmaterialien
B Braun	Sterican Kanüle (0.80 × 120 mm, 0.90 × 70 mm)
Brand	Pipettenspitzen (unsteril, graduert, 1000 µL), Reaktionsgefäße (1.5 mL, braun)
Carl Roth	Pipettenspitzen (unsteril, 200 µL)
Cytiva (ehemals GE Healthcare)	96-Wellplatten (transparent, PS, V-Boden) inkl. Abdeckfolie, Affinitätschromatographiesäule (StrepTrap XT (1 × 1 mL)), Anionenaustauschchromatographiesäule (HiPrep Q HP 16/10), Antibiotika-Testplättchen ($\varnothing = 6$ mm, $h = 0.75$ mm), Größenausschlusschromatographiesäule (HiLoad 16/600 Superdex 200 prepgrade), Plastik Vials 1.5 mL, Rubber Cap Type 2, Series S Sensorchip CAP, Series S Sensorchip CM5, Series S Sensorchip CM7
Eppendorf	CombiTips advanced (10.0 mL biopure, 1.0 mL biopure, 1.0 mL, 0.5 mL)
Greiner BioOne	96-Wellplatten (schwarz, nicht-bindend, PS, F-Boden), 96-Wellplatten (transparent, steril, PS, F-Boden), Abdeckplatte für 96-Wellplatten (transparent, steril, PS, 9 mm Höhe), Falcon Tubes (15 mL, 50 mL)
Henke-Sass Wolf	Einmalspritzen (steril, Luer Slip, 5 mL, 10 mL, 20 mL)
Labsolute	Pipettenspitzen (unsteril, graduert, 10 µL XL/20 µL)
Macherey-Nagel	HPLC-Säule EC 100/3 Nucleodur C18 Gravity SB-Säule ($\varnothing = 3$ µm, $h = 100$ mm), HPLC-Vorsäule EC 4/2 Universal RP ($\varnothing = 2$ mm, $h = 4$ mm)
Pall Laboratory	Macrosep® Advance Zentrifugaleinheiten (10 kDa)
Sarstedt	Pipettenspitzen (unsteril, graduert, 1000 µL, 200 µL, 20 µL), Reagiergefäße (1.5 mL, 2 mL)
Sartorius	Celluloseacetat-Spritzenfilter (hydrophil, steril, 1.2 µm, 0.2 µm)
Th Geyer	Celluloseacetat-Membranfilter (weiß, $\varnothing = 47$ mm, Porengröße 0.22 µm)
VWR	48-Wellplatten (transparent, steril, GPPS, F-Boden), Petrischalen mit drei Belüftungsnocken (90 × 14 mm)
Xantec	Sensorchip CMD700M

6.1.3 Größenmarker

Als Größenmarker für die SDS-Polyacrylamidgele wurde der *PageRuler Unstained Protein Ladder* von Thermo Scientific verwendet.

6.1.4 Kommerzielle Kits

Für die Plasmidisolierung wurde das innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0 von Analytik Jena verwendet.

6.1.5 Bakterienstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme sind inklusive ihrer genetischen Eigenschaften nachfolgend aufgelistet (Tab. 56).

Tabelle 56: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme inklusive ihrer genetischen Eigenschaften.

	Eigenschaften	Referenz
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Klinisches Isolat	American Type Culture Collection
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> , <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)	Studier und Moffatt, 1986
<i>E. coli</i> D22	<i>F</i> , <i>lpxC101</i> , <i>proA23</i> , <i>lac-28</i> , <i>tsx-81</i> , <i>trp-30</i> , <i>his-51</i> , <i>tufA1</i> , <i>rpsL173(strR)</i> , <i>ampCp-1</i>	Normark, Boman <i>et al.</i> , 1969
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Klinisches Isolat	American Type Culture Collection

6.1.6 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind inklusive der Vektoreigenschaften nachfolgend aufgelistet (Tab. 57).

Tabelle 57: Übersicht über die verwendeten Plasmide inklusive ihrer Vektoreigenschaften.

Name	Eigenschaften	Referenz/ Hersteller
pET11EcLpxCC63A	pET-11a-System, T7-Promotor, <i>N</i> -term. T7-Tag, T7-Terminator, <i>lacI</i> , pBR322 origin, <i>AmpR</i> , bla coding sequence, <i>E. coli</i> LpxC C63A	Hernick, Gattis <i>et al.</i> 2010 ^[76]
PJT1075	pET-28b(+)-System, T7-Promotor, <i>N</i> -term. His ₆ -Tag, <i>N</i> -term. T7-Tag, MCS, <i>C</i> -term. (His) ₆ -Tag, T7-Terminator, <i>lacI</i> , pBR322 origin, <i>KanR</i> , fl ori, <i>E. coli</i> LpxA	Shapiro, Ross <i>et al.</i> 2013 ^[64]
pWY427	pET30b(+)-System, T7-Promotor, <i>N</i> -term. (His) ₆ -Tag, <i>N</i> -term. S-Tag, MCS, <i>C</i> -term. (His) ₆ -Tag, T7-Terminator, <i>lacI</i> , pBR322 origin, <i>KanR</i> , fl ori, <i>P. aeruginosa</i> LpxC	Hale, Hill <i>et al.</i> 2013 ^[92]
pET30bEcLpxCC63AStrepII	pET30b(+)-System, T7-Promotor, <i>N</i> -term. (His) ₆ -Tag, <i>N</i> -term. S-Tag, MCS, <i>C</i> -term. (His) ₆ -Tag, T7-Terminator, <i>lacI</i> , pBR322 origin, <i>KanR</i> , fl ori, <i>E. coli</i> LpxC C63A (<i>N</i> -terminaler Strep-Tag II)	Diese Arbeit, BioCat (Heidelberg, DE)
pET30bEcLpxAStrepII	pET30b(+)-System, T7-Promotor, <i>N</i> -term. (His) ₆ -Tag, <i>N</i> -term. S-Tag, MCS, <i>C</i> -term. (His) ₆ -Tag, T7-Terminator, <i>lacI</i> , pBR322 origin, <i>KanR</i> , fl ori, <i>E. coli</i> LpxA (<i>N</i> -terminaler Strep-Tag II)	Diese Arbeit, BioCat (Heidelberg, DE)

6.1.7 Proteinsequenzen

***E. coli* LpxA:**

MIDKSAFVHPTAIVEEGASIGANAHIGPFCIVGPHVEIGEGTVLKSHVVVNGHTKIGRDNEIYQ
 FASIGEVNQDLKYAGEPTRVEIGDRNRIRESVTIHRGTVQGGGLTKVGSNDLLMINAHIAHDC
 TVGNRCILANNATLAGHVSVDDEFAIIGGMTAVHQFCIIGAHVMVGGCSGVAQDVPPYVIAQG
 NHATPFGVNIEGLKRRGFSREAITAIRNAYKLIYRSGKTLDEVKPEIAELAETYPVKAFTDF
 ARSTRGLIR

***E. coli* LpxC C63A:**

MIKQRTLKRIVQATGVGLHTGKKVTLTLRPAPANTGVIYRRDNLNPPVDFPADAKSVRDTML
63ATCLVNEHDVRISTVEHLNAALAGLGIDNIVIEVNAPEIPIMDGSAAFPVYLLLDAGIDELNC
AKKFVRIKETVRVEDGDKWAEFKPYNGFSLDFTIDFNHPAIDSSNQRYAMNFSADAFMRQISR
ARTFGFMRDIEYLQSRGLCLGGSFDCAIVVDDYRVLNEDGLRFEDEFVRHKMLDAIGDLFMC
GHNIIGAFTAYKSGHALNNKLLQAVLAKQEAWEYVTFQDDAELPLAFKAPSAVLA

***P. aeruginosa* LpxC:**

MIKQRTLKNIIRATGVGLHSGEKVYLTLKPAPVDTGIVFCRTDLDPVVEIPARAENVGETTMS
TTLVKGDVKVDTVEHLLSAMAGLGIDNAYVELSASEVPIMDGSAGPFVFLIQSAGLQEQEAA
KKFIRIKREVSVEEGDKRAVFPFDGFKVSFEIDFDHPVFRGRTQQASVDFSSTSFVKEVSRAR
TFGFMRDIEYLRSQNLALGGSVENAIVVDENRVLNEDGLRYEDEFVKHKILDAIGDLYLLGNS
LIGEFRGFKSGHALNNQLLRTLIADKDAWEVTFEDARTAPISYMRPAAAV

***E. coli* LpxA mit N-terminalem Strep-Tag II:**

MIDKSAFVHPTAIVEEGASIGANAHIGPFCIVGPHVEIGEGTVLKSHVVVNGHTKIGRDNEIYQ
FASIGE VNQDLKYAGEPTRVEIGDRNRIRESVTIHRGTVQGGGLTKVGSNDLLMINAHIAHDC
TVGNRCILANNATLAGHVSVDFAIIGGMTAVHQFCIIGA HVMVGGCSGVAQDVPPYVIAQG
NHATPFGVNIEGLKRRGFSREAITAIRNAYKLIYRSGKTLDEVKPEIAELAETPEVKAFTDFF
ARSTRGLIRWSHPQFEK

***E. coli* LpxC C63A mit N-terminalem Strep-Tag II:**

MIKQRTLKRIVQATGVGLHTGKKVTLTLRPAPANTGVIYRRDNLNPPVDFPADAKSVRDTML
63ATCLVNEHDVRISTVEHLNAALAGLGIDNIVIEVNAPEIPIMDGSAAFPVYLLLDAGIDELNC
AKKFVRIKETVRVEDGDKWAEFKPYNGFSLDFTIDFNHPAIDSSNQRYAMNFSADAFMRQISR
ARTFGFMRDIEYLQSRGLCLGGSFDCAIVVDDYRVLNEDGLRFEDEFVRHKMLDAIGDLFMC
GHNIIGAFTAYKSGHALNNKLLQAVLAKQEAWEYVTFQDDAELPLAFKAPSAVLAWSHPQF
EK

6.1.8 Puffer und Medien

Alle verwendeten Puffer und Medien wurden, sofern nicht anders spezifiziert, mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) hergestellt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mithilfe von Salzsäure und Kali- bzw. Natronlauge, abhängig vom dominierenden Kation in der Lösung (Tab. 58–63).

Tabelle 58: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Medien, Antibiotika und weiterer allgemein angesetzter Stocklösungen für die mikrobiologischen Arbeiten.

	Substanz	Konzentration
Benzamidin-Stocklösung	Benzamidin-Hydrochlorid	10 mg · mL ⁻¹
Calciumchloridlösung	Calciumchlorid Glycerol	0.1 M 10% (V/V)
Carbenicillin-Stocklösung	Carbenicillin Dinatriumsalz	0.1 M (50 mg · mL ⁻¹)
Columbia-Agar	Columbia-Agar	42.5 g · L ⁻¹
IPTG-Stocklösung	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	1 M
Kanamycin-Stocklösung	Kanamycin A-Sulfat	0.1 M (25 mg · mL ⁻¹)

Kochsalzlösung (0.9%)	Natriumchlorid	0.9% (w/V)
LB-Medium	Hefeextrakt Natriumchlorid Trypton	5 g · L ⁻¹ 10 g · L ⁻¹ 10 g · L ⁻¹
LB-Agar	Agar Hefeextrakt Natriumchlorid Trypton	16 g · L ⁻¹ 5 g · L ⁻¹ 10 g · L ⁻¹ 10 g · L ⁻¹
MHB-Medium	Müller-Hinton-Bouillon II	22 g · L ⁻¹
PMSF-Stocklösung	Phenylmethylsulfonylfluorid	100 mM in Isopropanol
SOC-Medium	Trypton Hefeextrakt Natriumchlorid Magnesiumchlorid Kaliumchlorid D-Glucose	20 g · L ⁻¹ 5.0 g · L ⁻¹ 0.5 g · L ⁻¹ 10 mM 2.5 mM 20 mM
TE-Puffer pH = 8.0	Tris-Base EDTA	10 mM 1.0 mM

Tabelle 59: Übersicht über die verwendeten Puffer bei der Proteinaufreinigung.

	Substanz	Konzentration
Anionenaustauschpuffer 1 pH = 8.0	Tris-HCl EDTA Glycerol	25 mM 1 mM 5% (V/V)
Anionenaustauschpuffer 2 pH = 8.0	Tris-HCl EDTA Glycerol Natriumchlorid	25 mM 1 mM 5% (V/V) 1 M
Anionenaustauschpuffer 3 pH = 7.0	Hepes DTT	25 mM 2 mM
Anionenaustauschpuffer 4 pH = 7.0	Hepes DTT Kaliumchlorid	25 mM 2 mM 1 M
Anionenaustauschpuffer 5 pH = 8.0	Tris-HCl DTT Glycerol	25 mM 2 mM 5%
Anionenaustauschpuffer 6 pH = 8.0	Tris-HCl DTT Glycerol Natriumchlorid	25 mM 2 mM 5% 1 M
Elutionspuffer pH = 8.0	Tris-HCl Natriumchlorid EDTA Biotin	100 mM 150 mM 1 mM 50 mM
Größenausschlusspuffer 1 pH = 7.5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ Natriumchlorid	50 mM 150 mM
Größenausschlusspuffer 2 pH = 6.0	Bis-Tris Natriumchlorid	50 mM 150 mM
Größenausschlusspuffer 3 pH = 8.0	Hepes DTT Glycerol	25 mM 2 mM 5%

Größenausschlusspuffer 4 pH = 8.0	Tris-HCl NaCl EDTA Glycerol	25 mM 150 mM 2 mM 5%
Waschpuffer pH = 8.0	Tris Natriumchlorid EDTA	100 mM 150 mM 1 mM

Tabelle 60: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

	Substanz	Konzentration
APS-Lösung	Ammoniumperoxodisulfat	10% (w/V)
Coomassie-Färbelösung	Ethanol Essigsäure Coomassie Brilliant Blue G-250	50% (V/V) 10% (V/V) 0.5% (w/V)
Coomassie-Entfärbelösung	Essigsäure	10% (V/V)
Sammelgel (4%)	Acrylamidlösung Sammelgelpuffer APS-Lösung	42% (V/V) 25% (V/V) 1% (V/V)
Sammelgelpuffer (4x) pH = 6.8	Tris SDS TEMED	0.5 M 0.4% (w/V) 0.4% (V/V)
SDS-Laufpuffer pH = 8.3	Tris Glycin SDS	25 mM 250 mM 0.1% (w/V)
SDS-Probenpuffer (2x) pH = 6.8	Tris DTT Glycerol SDS Bromphenolblau	100 mM 200 mM 20% (V/V) 4% (w/V) 0.2% (w/V)
Trenngel (12.5%)	Acrylamidlösung Trenngelpuffer APS-Lösung	13% (V/V) 25% (V/V) 0.6% (V/V)
Trenngelpuffer (4x) pH = 8.8	Tris SDS TEMED	1.5 M 0.4% (w/V) 0.4% (V/V)

Tabelle 61: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen im fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay.

	Substanz	Konzentration
Assaypuffer 1 pH = 6.0	MES DTT Brij35	40 mM 80 µM 0.02% (w/V)
Assaypuffer 2 pH = 7.5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ DTT Brij® 35	50 mM 80 µM 0.02% (w/V)
Boraxpuffer	Borax o-Phthaldialdehyd 2-Mercaptoethanol Methanol	100 mM 3.0 mM 1.4 mM 4% (V/V)
Essigsäure	Essigsäure	0.625 M
Natronlauge	Natriumhydroxid	0.625 M

Tabelle 62: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen bei den SPR-Experimenten.

	Substanz	Konzentration
Acetatpuffer pH = 4.0	Essigsäure / Natriumacetat	10 mM
Acetatpuffer pH = 4.5	Essigsäure / Natriumacetat	10 mM
Acetatpuffer pH = 5.0	Essigsäure / Natriumacetat	10 mM
Acetatpuffer pH = 5.5	Essigsäure / Natriumacetat	10 mM
CAPture-Lösung pH = 7.4	Hepes Natriumchlorid EDTA Tween® 20 CAPture reagent	10 mM 150 mM 3 mM 0.005% (V/V) 50 µg · mL ⁻¹
Regenerationslösung 1	Natriumhydroxid	50 mM
Regenerationslösung 2	Guanidin Hydrochlorid Natriumhydroxid	6.0 M 0.75 M
SPR-Puffer 1 pH = 8.0	Hepes Triton® X-100	50 mM 0.01% (V/V)
SPR-Puffer 2 pH = 7.5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ Natriumchlorid DMSO Triton® X-100	50 mM 150 mM 1% (V/V) 0.05% (V/V)
DMSO-freier Stock	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ Natriumchlorid Triton® X-100	50.5 mM 151.5 mM 0.0505% (V/V)
SPR-Puffer 3 pH = 8.0	Hepes-NaOH Natriumchlorid EDTA TCEP DMSO Tween® 20	50 mM 150 mM 2 mM 1 mM 1% (V/V) 0.05% (V/V)
DMSO-freier Stock	Hepes-NaOH Natriumchlorid EDTA TCEP Tween® 20	50.5 mM 151.5 mM 2.02 mM 1.01 mM (V/V) 0.0505% (V/V)
SPR-Puffer 4 pH = 7.5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ Natriumchlorid Zinkchlorid DMSO Tween® 20	50 mM 150 mM 100 µM 1% (V/V) 0.05% (V/V)
DMSO-freier Stock	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ Natriumchlorid Zinkchlorid Tween® 20	50.5 mM 151.5 mM 101 µM 0.0505% (V/V)
Desorb 1	SDS	0.5% (w/V)
Desorb 2	Glycin-NaOH (pH = 9.5)	50 mM
Desinfektant	NaOCl	7.5% (V/V)

Tabelle 63: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen im massenbasierten LpxC-Enzymassay.

	Substanz	Konzentration
Laufmittel A	Ammoniumformiat	20 mM
Laufmittel B	Acetonitril Isopropanol Wasser Ammoniumformiat	47.5% (V/V) 42.75% (V/V) 9.75% (V/V) 1 mM
Assaypuffer 1 pH = 6.0	MES DTT Brij® 35	40 mM 80 µM 0.02% (w/V)
Assaypuffer 2 pH = 7.5	KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ DTT Brij® 35	50 mM 80 µM 0.02% (w/V)
Salzsäure	Salzsäure	0.625 M

Weitere Puffer, die lediglich in der Assayentwicklung und nicht standardmäßig verwendet wurden, sind in den entsprechenden Kapiteln extra aufgeführt.

6.1.9 Geräte und Software

Die verwendeten Geräte sowie die verwendete Software und ihre jeweiligen Hersteller sind nachfolgend aufgelistet (Tab. 64–65).

Tabelle 64: Übersicht über die verwendete Software sowie deren Hersteller.

Software	Hersteller
Analyst 1.7.1	AB Sciex LLC
Biacore T100 Control Software 1.1.1	GE Healthcare
Biacore T100 Evaluation Software 2.0.4	GE Healthcare
BioDoc Analyze 2.66.321	Biometra GmbH (Analytik Jena GmbH & Co.KG)
Chemdraw Professional 16.0	Perkin Elmer Informatics
Data Analysis 4.1	Bruker Daltonik GmbH
Expasy	Schweizerisches Institut für Bioinformatik
ICE Instrument Control and Evaluation 1.0.9.6	Berthold Technologies GmbH & Co.KG
OriginPro 2018	OriginLab Corporation
Prime View 5.31	GE Healthcare
PrimeView Evaluation 5.31	GE Healthcare

Tabelle 65: Übersicht über die verwendeten Geräte sowie deren Hersteller.

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
ÄKTA	Äkta Prime Plus	GE Healthcare
Autoclav	VX-75	Systec
Geldokumentationssystem	BioDoc Analyze	Biometra
Kamera für die Geldokumentation	EOS 1100D	Canon
Gelelektrophoresekammer	SE260 Mighty Small II Deluxe	Serva
Inkubationsschrank	INCU-Line IL 10	VWR
Inkubationsschüttler	MaxQ™ 4000	Thermo Scientific
Magnetrührer	RCT basic	IKA
Massenspektrometer	QTRAP 5500	AB Sciex LLC
Nanodrop-Spektrometer	2000C	Nanodrop
pH-Meter	Five Easy	Mettler Toledo
Plattenreader	Tristar ² S LB942 Multimode Reader	Berthold Technologies
UV-Reinstwasseranlage	Arium® pro	Sartorius
SPR	Biacore® T100	GE Healthcare
Sterilwerkbank	Maxisafe 2020	Thermo Scientific
Thermomixer	Thermomixer C	Eppendorf
UHPLC	1920 Infinity	Agilent Technologies
Ultraschallgeräte	Sonoplus	Bandelin
	Sonorex	Bandelin
Vibrationsschüttler	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waagen	Analysenwaage ABS 120-4N	Kern & Sohn GmbH
	Präzisionswaage PCB 100-3	
	Analysenwaage AE 240	Mettler Toledo
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific
	Mini Star Silverline	VWR

6.2 Allgemeine und nach Optimierung routinemäßig angewandte Methoden

Die standardmäßig durchgeführten bzw. final optimierten Methoden gliedern sich in biochemische Arbeiten und die biologische Testung. Zusätzlich dazu konnte im Verlauf der Arbeit ein massenbasierter LpxC-Enzymassay sowie ein SPR-basierter Affinitätsassay etabliert werden.

6.2.1 Biochemische Arbeiten

Die durchgeführten biochemischen Arbeiten unterteilen sich in mikrobiologische und molekularbiologische Methoden sowie die Proteinaufreinigung.

I. Methoden der Mikrobiologie

i. Zellkultivierung

Für die Herstellung einer Flüssigvorkultur wurden 12 mL LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft. Enthielt diese Einzelkolonie eine plasmidcodierte Antibiotikaresistenz, wurde noch das entsprechende Antibiotikum (0.1 mM) hinzugegeben. Die Kulturen wurden anschließend über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Inkubationsschüttler wachsen gelassen. Für die Herstellung einer Kultur auf einem Gel-Nährboden wurde eine Einzelkolonie gepickt und mittels Dreistrichtechnik auf einer neuen Agarplatte ausgestrichen. Im Falle einer Hitzeschocktransformation wurden 150 µL des Transformationsansatzes auf einer LB-Agarplatte (mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen.

ii. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde zunächst eine Flüssigvorkultur von *E. coli* BL21(DE3) erstellt. Anschließend wurde für die Hauptkultur je 40 mL LB-Medium mit je 1.5 mL der Flüssigvorkultur angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm wachsen gelassen, bis die OD_{600} 0.6–0.8 betrug. Nach zehnmütigem Abkühlen auf Eis wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C und $3200 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in je 2 mL gekühlter Calciumchloridlösung (0.1 M, 10% Glycerol (V/V)) resuspendiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension erneut für 10 min bei 4 °C und $3200 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellpellets in 1 mL Calciumchloridlösung resuspendiert. Die chemisch kompetenten Zellen wurden zu 50 µL aliquotiert, mithilfe von flüssigem Stickstoff gefroren und bei –80 °C gelagert.

iii. Hitzeschocktransformation

50 µL chemisch kompetenter Zellen wurden mit 1 µL des jeweiligen Plasmides ($c = 36\text{--}120 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Nach dreiminütigem Abkühlen auf Eis wurden 450 µL vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben und der Ansatz für weitere 60 min bei 37 °C und 700 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation wurden 200 µL des Überstandes verworfen, die Zellen im restlichen Medium resuspendiert und 150 µL auf einer mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzten Platte ausplattiert.

iv. Proteinexpression in *E. coli*

Im Verlauf der Arbeit wurden die Enzyme *E. coli* LpxA, *E. coli* LpxC C63A und *P. aeruginosa* LpxC sowie *E. coli* LpxA mit *N*-terminalem Strep-Tag II und *E. coli* LpxC C63A mit *N*-terminalem Strep-

Tag II in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Hitzeschocktransformation von *E. coli* BL21(DE3) erfolgte mit dem entsprechenden Plasmid:

- PJT1075 (*E. coli* LpxA, Kan-Resistenz),
- pET11EcLpxCC63A (*E. coli* LpxC C63A, Carb-Resistenz),
- pWY427 (*P. aeruginosa* LpxC, Kan-Resistenz),
- pET30bEcLpxAStrepII (*E. coli* LpxA + *N*-Strep-Tag II, Kan-Resistenz),
- pET30bEcLpxCC63AStrepII (*E. coli* LpxC C63A + *N*-Strep-Tag II, Kan-Resistenz).

Nach Erstellen der Flüssigvorkultur mithilfe einer Einzelkolonie des Transformationsansatzes in 50 mL LB-Medium, versetzt mit 0.5% Glucose und 0.1 mM des jeweiligen Antibiotikums, wurden 2.0 mL dieser in 400 mL LB-Medium, ebenfalls versetzt mit 0.5% Glucose und 0.1 mM des entsprechenden Antibiotikums, überführt und wachsen gelassen, bis die OD_{600} 0.3–0.8 betrug. Anschließend erfolgte nach Kühlen auf 30 °C die Induktion durch Zugabe von IPTG (0.5–1 mM) und ggf. $ZnCl_2$ (0.1 mM) und die Zellen wurden für weitere 2–4 h bei 30–37 °C wachsen gelassen (Tab. 66).

Tabelle 66: Übersicht über die variablen Expressionsbedingungen für *E. coli* LpxA (mit und ohne *N*-terminalem Strep-Tag II), *E. coli* LpxC C63A (mit und ohne *N*-terminalem Strep-Tag II) und *P. aeruginosa* LpxC.

	<i>E. coli</i> LpxA	<i>E. coli</i> LpxA + <i>N</i> -Strep-Tag II	<i>E. coli</i> LpxC C63A	<i>E. coli</i> LpxC C63A + <i>N</i> -Strep-Tag II	<i>P. aeruginosa</i> LpxC
OD_{600}	0.6–0.8				0.3–0.4
Induktion durch	IPTG (1 mM)		IPTG (1 mM) $ZnCl_2$ (100 μ M)		IPTG (0.5 mM) $ZnCl_2$ (100 μ M)
Dauer	4 h				2 h

Danach wurde die Zellsuspension 15 min auf Eis gekühlt, zentrifugiert ($4696 \times g$, 30 min, 4 °C), der Überstand dekantiert und die Zellpellets bei –20 °C gelagert.

II. Methoden der Molekularbiologie

i. Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte mithilfe des *innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0* von Analytik Jena. Die Zellpellets von 2 mL einer Flüssigvorkultur wurden nach Zentrifugation ($25\,830 \times g$, 1 min) mit 250 μ L Resuspensionspuffer versetzt. Nach Resuspension der Zellpellets wurden 250 μ L Lysispuffer hinzugegeben und der Ansatz vorsichtig invertiert (6–8 Mal). Nach fünfminütiger Lyse wurden 350 μ L Neutralisationspuffer hinzugegeben, der Ansatz erneut invertiert (6–8 Mal) und anschließend zentrifugiert ($25\,830 \times g$, 8 min). Der Überstand wurde in einen (einem Eppendorf Tube aufgesetzten) Spin Filter überführt. Nach Zentrifugation ($11\,000 \times g$, 1 min) wurde der Spin Filter einmal mit 700 μ L Waschlösung A gewaschen und zentrifugiert ($11\,000 \times g$, 1 min) und einmal mit 700 μ L Waschlösung B gewaschen und erneut zentrifugiert ($11\,000 \times g$, 1 min). Das Filtrat wurde verworfen, der Spin Filter nochmals zentrifugiert ($25\,830 \times g$, 2 min) und das Plasmid mit 50–100 μ L Elutionspuffer bei Raumtemperatur inkubiert (1 min) und durch anschließende Zentrifugation ($11\,000 \times g$, 1 min) eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mithilfe des Nanodrops. Die genaue Zusammensetzung der im Kit enthaltenen Puffer und Waschlösungen ist nicht bekannt.

III. Proteinaufreinigung

Alle Schritte wurden, wenn nicht anders spezifiziert, bei 4 °C durchgeführt. Die Proteinaufreinigung von *E. coli* LpxA, *E. coli* LpxC C63A und *P. aeruginosa* LpxC erfolgte zunächst mittels Anionenaustausch-, anschließend mittels Größenausschlusschromatographie. Die Proteinaufreinigung der Enzyme mit zusätzlichem *N*-terminalen Strep-Tag II erfolgte zunächst mittels Affinitäts-, anschließend mittels Größenausschlusschromatographie. Die Zusammensetzung der einzelnen Puffer unterschied sich dabei je nach Enzym (Tab. 67).

Tabelle 67: Zuordnung der verschiedenen Puffer bei der Proteinaufreinigung. Die exakte Zusammensetzung der Puffer ist in Kapitel 6.1.8 beschrieben.

	AEX (A)	AEX (B)	SEC
<i>E. coli</i> LpxA	Anionenaustauschpuffer 1	Anionenaustauschpuffer 2	Größenausschlusspuffer 1
<i>E. coli</i> LpxC C63A	Anionenaustauschpuffer 3	Anionenaustauschpuffer 4	Größenausschlusspuffer 2
<i>P. aeruginosa</i> LpxC	Anionenaustauschpuffer 5	Anionenaustauschpuffer 6	Größenausschlusspuffer 3
	Binden/Waschen	Elution	SEC
<i>E. coli</i> LpxA + <i>N</i> -Strep-Tag II	Waschpuffer	Elutionspuffer	Größenausschluss-Puffer 4
<i>E. coli</i> LpxC C63A + <i>N</i> -Strep-Tag II	Waschpuffer	Elutionspuffer	Größenausschluss-Puffer 5

Die Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut und in AEX (A) bzw. Waschpuffer, versetzt mit den Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM) und Benzamidin (15 µg · mL⁻¹), resuspendiert (10–15 mL Puffer pro 400 mL Expressionsansatz). Anschließend wurden die Zellen fünffach auf Eis sonifiziert (je 40 s mit 30 s Pause), die zellulären Trümmer durch Zentrifugation entfernt (4696 × g, 90 min, 4 °C) und der Überstand in zwei Schritten steril filtriert (1. 1.2 µm, 2. 0.2 µm).

i. Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie erfolgte automatisiert mittels einer HiPrep Q HP 16/10-Säule an der Äkta Prime Plus. Zunächst wurde die Säule mit fünf Säulenvolumen (*column volume*, CV) Anionenaustauschpuffer (A) equilibriert. Nach Auftragen von 40–45 mL Probe wurde die Säule zunächst mit 5 CV Anionenaustauschpuffer (A) gewaschen. Anschließend erfolgte für die Dauer von 8 CV ein linearer Gradient auf 50% Anionenaustauschpuffer (B). Nach einem Stufengradienten auf 100% Anionenaustauschpuffer (B) erfolgte die finale Elution für eine Dauer von 2 CV.

Die Flussrate betrug dabei 0.5 mL · min⁻¹, das Volumen der Elutionsfraktionen betrug 5 mL. Die Absorption des Eluats wurde mittels UV-Spektroskopie (280 nm) verfolgt. Die Elutionsfraktionen, die hierbei eine signifikante Absorption aufwiesen, wurden anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese analysiert. Die Fraktionen, die das gesuchte Protein enthielten, wurden mithilfe von Macrosep-Zentrifugenröhrchen (10 kDa; 3000 × g, 4 °C) auf 3–5 mL eingengt.

ii. Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie erfolgte manuell mittels einer StrepTrap XT (1×1 mL)-Säule. Zunächst wurde die Säule mit 5 CV Waschpuffer equilibriert. Nach langsamem Auftragen von ca. 30 mL Probe wurde die Säule zunächst mit 10 CV Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution des Zielproteins durch Zugabe von 6 CV Elutionspuffer. Die Flussrate betrug durchgehend $<1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Die einzelnen Fraktionen (Durchlauf, Waschen, Eluat) wurden mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese kontrolliert und das Eluat wurde mithilfe von Macrosep-Zentrifugenröhrchen (10 kDa; $3000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) auf 3–5 mL eingeeengt.

iii. Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie erfolgte automatisiert an der Äkta Prime Plus mittels einer HiLoad 16/600 Superdex 200 prepgrade-Säule. Zunächst wurde die Säule mit 1.5 CV Größenausschlusspuffer equilibriert. Nach Auftragen von 3–5 mL Probe erfolgte die Elution über die Dauer von 1 CV bei einer Flussrate von $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, das Volumen der Elutionsfraktionen betrug 2.5 mL. Die Absorption des Eluats wurde mittels UV-Spektroskopie (280 nm) verfolgt. Die Elutionsfraktionen, die hierbei eine signifikante Absorption aufwiesen, wurden anschließend mittels SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese analysiert. Die Fraktionen, die das gesuchte Protein enthielten, wurden anschließend mithilfe des Nanodrop 2000C quantifiziert. *E. coli* LpxC C63A und *P. aeruginosa* LpxC wurden anschließend mit dem jeweiligen Größenausschlusspuffer auf $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ verdünnt und als 50–100 μL -Aliquots bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. *E. coli* LpxA, *E. coli* LpxA mit *N*-terminalem Strep-Tag II und *E. coli* LpxC C63A mit *N*-terminalem Strep-Tag II wurden ohne weitere Verdünnung oder Aufkonzentrierung als 100 μL -Aliquots bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

iv. SDS-Polyacrylamidgele

Zur Überprüfung der Proteinexpression sowie der Proteinaufreinigung wurden 12.5%ige SDS-Polyacrylamidgele angefertigt. Hierbei wurden die Pellets aus 1 mL Zellkultur mit je 50 μL bzw. 20 μL der Elutionsfraktionen mit je 20 μL des reduzierenden SDS-Probenpuffers versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei $96 \text{ }^\circ\text{C}$ aufgekocht und auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde noch ein Standard (*PageRuler Unstained Protein Ladder*) mit auf das Gel aufgetragen.

Nachdem die Trennung im Gel abgeschlossen war, wurde es mithilfe von Coomassie gefärbt und anschließend wieder entfärbt, sodass nur noch die Proteinbanden sichtbar waren.

6.2.2 Biologische Testung

Die standardmäßig durchgeführte biologische Testung einer Verbindung umfasste zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität die Durchführung von Agardiffusionstests sowie die Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration und zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität gegen *E. coli* LpxC C63A die Durchführung eines fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays. Alle Tests wurden als Triplikat an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Im Laufe der Arbeit konnte zusätzlich ein massenbasierter LpxC-Enzymassay sowie ein SPR-basierter Affinitätsassay etabliert werden.

I. Agardiffusionstests

Beim Agardiffusionstest wurden 150 μL einer Flüssigvorkultur (*E. coli* BL21(DE3) oder *E. coli* D22) gleichmäßig auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Anschließend wurden Filterplättchen ($\varnothing = 6 \text{ mm}$, $h = 0.75 \text{ mm}$, Cytiva) auf die LB-Agarplatte aufgebracht und mit einer Lösung der zu untersuchenden

Substanz (150 nmol in DMSO) getränkt. Als Negativkontrolle wurde DMSO, als Positivkontrolle CHIR-090 (1 nmol) verwendet. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und der Durchmesser des entstandenen Hemmhofes für jede Substanz gemessen.

II. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration erfolgte mithilfe der Mikrodilutions-Methode in einer 96-Wellplatte. Jedes Well dieser Platte enthielt dabei 10 µL einer seriellen 1:2-Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Substanz in DMSO sowie 90 µL LB-Medium. Anschließend wurden 100 µL inokuliertes Medium (1:1000 Verdünnung einer Flüssigvorkultur von *E. coli* BL21(DE3) oder *E. coli* D22 in LB-Medium) hinzugefügt. Die finale Konzentration an Bakterien betrug $5 \cdot 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, die Endkonzentration der zu untersuchenden Substanzen $0.016\text{--}64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Die Platten wurden für 20 h bei 37 °C inkubiert und die geringste Konzentration, bei der kein sichtbares Bakterienwachstum detektiert werden konnte, wurde als minimale Hemmkonzentration angegeben.

III. Der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay

Die Durchführung des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays basierte auf dem von Clements *et al.* für LpxC beschriebenen Assay. Dabei wurden in die Wells einer schwarzen, nicht-bindenden 96-Wellplatte 93 µL einer Lösung des Substrates UDP-3-*O*-[(*R*)-3-Hydroxymyristoyl]-*N*-acetylglucosamin (26.9 µM) in Assaypuffer sowie je 2 µL einer Lösung des zu testenden Inhibitors in DMSO vorgelegt. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 5 µL LpxC. Die Zusammensetzung des Assaypuffers und die Enzymkonzentration unterschieden sich dabei je nach Enzym (Tab. 68).

Tabelle 68: Zuordnung der Reaktionsbedingungen im fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay zu den verschiedenen Enzymen. Die Zusammensetzung der Puffer ist in Kapitel 6.1.8 beschrieben.

	Reaktionsumgebung
<i>E. coli</i> LpxC C63A	Assaypuffer 1 25 µM Substrat 15 nM Enzym (1:50-Verdünnung in Assaypuffer 1) 2 nM – 200 µM Inhibitor 2% DMSO
<i>P. aeruginosa</i> LpxC	Assaypuffer 2 25 µM Substrat 75 nM Enzym (1:10-Verdünnung in Assaypuffer 2) 2 nM – 200 µM Inhibitor 2% DMSO

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C im Plattenreader wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 µL NaOH (0.625 M) beendet. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation über 10 min. Nach Neutralisation durch Zugabe von 40 µL AcOH (0.625 M) wurde die Fluoreszenz des Hintergrundes gemessen (Excitation = 340 nm, Emission = 460 nm).

Danach wurde das deacetylierte Produkt durch Zugabe von 120 µL Boraxpuffer in ein fluoreszierendes Isoindol überführt. Nach 30 min wurde die Fluoreszenz analog zu der Fluoreszenz des Hintergrundes gemessen. Als Negativkontrolle wurde reines DMSO (0% Inhibition), als Positivkontrolle CHIR-090 (20 µM, 100% Inhibition) definiert. Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte über die Probit-Regression mithilfe der Software Origin.

6.2.3 Der massenbasierte LpxC-Enzymassay

Die Durchführung des massenbasierten LpxC-Enzymassays basierte auf dem fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay. Für die enzymatische Reaktion wurden die Wells einer schwarzen, nicht-bindenden 96-Wellplatte mit 93 μL einer Lösung des Substrates UDP-3-*O*-[(*R*)-3-Hydroxymyristoyl]-*N*-acetylglucosamin in Assaypuffer sowie je 2 μL einer Lösung des zu testenden Inhibitors in DMSO befüllt. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 5 μL LpxC. Die Konzentrationen von Enzym und Inhibitoren variierten in Abhängigkeit von dem verwendeten Enzym und der Substratkonzentration. Standardmäßig wurde eine Substratkonzentration von 2.5 μM verwendet (Tab. 69).

Tabelle 69: Übersicht über die Enzym- und Inhibitorkonzentrationen im massenbasierten LpxC-Enzymassay in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

	<i>E. coli</i> LpxC C63A Assaypuffer 1, 2% DMSO		<i>P. aeruginosa</i> LpxC Assaypuffer 2, 2% DMSO	
Substrat- konzentration	Enzym- konzentration	Inhibitor- konzentration	Enzym- konzentration	Inhibitor- konzentration
25 μM	15 nM	4× Inhibitor- konzentration, die bei 2.5 μM Substrat verwendet wurde	75 nM	4× Inhibitor- konzentration, die bei 2.5 μM Substrat verwendet wurde
2.5 μM	7.4 nM	0.56–50 μM	7.5 nM	0.56 nM – 50 μM

Nach dreißigminütiger Inkubation bei 37 °C im Plattenreader wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 μL HCl (0.625 M) beendet. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation über 10 min. Danach wurden die Proben bis zur massenspektrometrischen Analyse bei –80 °C gelagert.

Die massenspektrometrische Analyse erfolgte mittels LC-MS/MS. Für die Chromatographie wurde eine 1920 Infinity UHPLC (*ultra-high performance liquid chromatography*) verwendet, für die massenspektrometrische Analyse eine QTRAP 5500 im negativen Ionenmodus. Als Methode diente „Substrat_QOpt_FinalMRM_Neg_FIA2“ mit zuvor optimierten Parametern (Tab. 70).

Tabelle 70: Messparameter bei der massenspektrometrischen Analyse des LpxC-Enzymassays.

	Wert
Injektionsvolumen [μL]	3
Zeitfenster der Retentionszeit [min]	12–19
Curtain-Gas-Zufuhr (CUR) [psi]	20
Kollisionsgas [CAD]	Medium
Ionenspray-Spannung (IS) [V]	–4500
Temperatur (TEM) [°C]	450
Ionenquellengas 1 (GS1, Zerstäubergas) [psi]	60
Ionenquellengas 2 (GS2, Heizergas) [psi]	50
Clusterauflösungspotential (DP) [V]	–170
Eintrittspotential (EP) [V]	–10
Verweildauer (Dwell Time) [ms]	150

Im ersten Schritt erfolgte bei einer Flussrate von $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ die chromatographische Trennung von Substrat und Produkt mittels einer Nucleodur C18 Gravity SB-Säule ($\varnothing = 3 \mu\text{m}$, $h = 100 \text{ mm}$, Macherey-Nagel), welche an die Vorsäule Universal RP ($\varnothing = 2 \text{ mm}$, $h = 4 \text{ mm}$, Macherey-Nagel) gekoppelt war. Hierfür wurden $3 \mu\text{L}$ der Reaktionslösung in die HPLC injiziert. Die Trennung erfolgte mithilfe von Laufmittel A (20 mM Ammoniumformiat in Wasser) und Laufmittel B (1 mM Ammoniumformiat in Acetonitril-Isopropanol-Wasser (47.5:42.75:9.75)). Ausgehend von 30% Laufmittel B erfolgte nach 1 min innerhalb von 15 min ein linearer Gradient auf 90% Laufmittel B. Anschließend erfolgte die Regeneration der Säule durch eine finale Elution für 1 min bei 90% Laufmittel B, gefolgt von einem linearen Gradienten innerhalb von 0.5 min auf 30% Laufmittel B, gefolgt von 4 min Reequilibrierung bei 30% Laufmittel B. Das Substrat (m/z 832) eluierte bei einer Retentionszeit von 12.2 min, das Produkt (m/z 790) bei einer Retentionszeit von 13.0 min. An die HPLC gekoppelt war eine QTRAP 5500, welche die eluierten Substanzen ionisierte, fragmentierte und detektierte. Dabei wurden für das Substrat sowie das Produkt je drei Massenübergänge analysiert (Tab. 71).

Tabelle 71: Analytierte Massenübergänge sowie die für jeden Massenübergang spezifische Kollisionsenergie und das Kollisionszellenaustrittspotential.

	Q1 m/z	Q3 m/z	Kollisionsenergie [V]	Kollisionszellenaustrittspotential [V]
Substrat 2	832	79	-140	-12
		159	-80	-10
		384	-60	-12
Produkt 3	790	79	-140	-12
		159	-80	-8
		384	-60	-8

Zur Auswertung wurden anschließend die beiden Massenübergänge mit derselben Q3-Masse verglichen und so der prozentuale Anteil von Substrat und Produkt in der jeweiligen Probe ermittelt. Dabei wurde m/z 79 als *Quantifier* und m/z 159 sowie m/z 384 als *Qualifier* verwendet. Als Negativkontrolle diente reines DMSO (0% Inhibition), und es wurde die prozentuale Inhibition bezogen auf die maximale Produktkonzentration nach 30 min bestimmt. Die Berechnung von IC_{50} -Werten erfolgte analog zum fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay über die Probit-Regression mithilfe der Software Origin.

6.2.4 SPR-Experimente

Abgesehen vom ungetaggen *E. coli* LpxA wurden alle SPR-Experimente am Biacore T100 bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (*E. coli* LpxA: $25 \text{ }^\circ\text{C}$) durchgeführt. Die Temperatur im Probenfach betrug $15 \text{ }^\circ\text{C}$ (*E. coli* LpxA: $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Für die ungetaggen Enzyme gliederten sich die Experimente in ein pH-Scouting, die Immobilisierung und Affinitätsmessungen. Für die Enzyme mit *N*-terminalem Strep-Tag II gliederten sich die Experimente in Immobilisierung und Affinitätsmessungen. Der Laufpuffer unterschied sich dabei je nach Ligand (Tab. 72).

Tabelle 72: Zuordnung der SPR-Laufpuffer zu den untersuchten Liganden.

	Ligand
SPR-Puffer 1	<i>E. coli</i> LpxA
SPR-Puffer 2	<i>E. coli</i> LpxC C63A <i>P. aeruginosa</i> LpxC
SPR-Puffer 3	<i>E. coli</i> LpxA + Strep-Tag II
SPR-Puffer 4	<i>E. coli</i> LpxC C63A + Strep-Tag II

I. Ungetaggte Enzyme

Die SPR-Experimente für *E. coli* LpxA wurden auf einem CM5-Sensorchip durchgeführt, die Experimente für *E. coli* LpxC C63A und *P. aeruginosa* LpxC auf einem CM7-Sensorchip.

i. pH-Scouting

Zur Bestimmung geeigneter Immobilisierungsbedingungen wurde für alle ungetaggten Liganden ein pH-Scouting durchgeführt. Hierzu wurden die Liganden in vier Acetatpuffern (10 mM; pH = 4.0, 4.5, 5.0 und 5.5) gelöst, sodass die Endkonzentration der Liganden $5\text{--}10\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ betrug. Im Falle von *E. coli* LpxC C63A und *P. aeruginosa* LpxC enthielten die Acetatpuffer zusätzlich 1 mM DTT und $100\ \mu\text{M}$ ZnCl_2 . Anschließend erfolgte eine elektrostatische Präkonzentrierung des Liganden für 120 s an der Chipoberfläche, gefolgt von einer 30-sekündigen Regeneration mit 50 mM NaOH. Die Flussrate betrug $10\ \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

ii. Immobilisierung

Die Immobilisierung der Liganden erfolgte über eine Amidkupplung. Im ersten Schritt wurde die Chipoberfläche für 420 s durch zeitgleiche Zugabe von EDC (0.4 M) und NHS (0.1 M) aktiviert. Anschließend erfolgte die Immobilisierung des Liganden bei einer Kontaktzeit von 300–420 s. Die exakte Ligandkonzentration variierte bei jedem Experiment: Ziel war ein Immobilisierungslevel von ca. 7500–10 000 RU. Wurde diese *response* bei dem vorherigen pH-Scouting erreicht, wurde die Ligandkonzentration aus dem pH-Scouting verdoppelt, wick die *response* davon ab, wurde die Ligandkonzentration dementsprechend angepasst. Zuletzt erfolgte für 420 s die Blockierung unbesetzter Bindungsstellen durch Ethanolamin (1 M, pH = 8.5; Ligand = LpxA) bzw. einem 1:1-Gemisch aus Ethanolamin (1 M, pH = 8.5) und SPR-Puffer 2 (Ligand = LpxC). Die Flussrate betrug $30\ \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

iii. Affinitätsmessungen

Vor den Affinitätsmessungen der Analyten wurden zur Equilibrierung des Systems drei Start-up cycle gemessen, in denen lediglich der Laufpuffer über die Chipoberfläche geleitet wurde.

Abhängig von der Löslichkeit des Analyten wurde dieser entweder direkt im Laufpuffer gelöst, oder der Laufpuffer zusätzlich, um das DMSO-Volumen verringert, ohne DMSO angesetzt, sodass nach einer 1:100-Verdünnung einer Analytenstocklösung (100% DMSO) mit diesem „Laufpuffer ohne DMSO“ die Zusammensetzung der höchsten Analytkonzentration der Zusammensetzung des Laufpuffers entsprach. Pro Analyt wurden zwei Blanklösungen sowie zehn Analytkonzentrationen vermessen. Ausgehend von der höchsten Analytkonzentration wurden acht unterschiedliche Konzentrationen in einer seriellen 1:2-Verdünnung erstellt sowie die dritt- und die fünfthöchste Konzentration jeweils zusätzlich als Doppelbestimmung angesetzt. Die Flussrate betrug $30\ \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, die Kontaktzeit 90 s und die Dissoziationszeit 120–300 s.

II. Enzyme mit N-terminalem Strep-Tag II

Alle SPR-Experimente wurden mithilfe des Biotin CAPture Kits (Cytiva) durchgeführt und es wurde der Sensorchip CAP verwendet.

Vor der ersten Affinitätsmessung wurde der Sensorchip für 24 h mit ddH₂O equilibriert und es erfolgte ein *surface conditioning*, bei dem die Chipoberfläche dreimal für 60 s mit Regenerationslösung 2 (6.0 M Guanidin Hydrochlorid, 0.75 M Natriumhydroxid) gespült wurde. Die Flussrate dabei betrug 10 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

i. Immobilisierung

Die Immobilisierung des jeweiligen Liganden erfolgte über eine Biotin-Streptavidin-Interaktion. Im ersten Schritt wurde die Chipoberfläche für 300 s durch Zugabe von CAPture-Lösung aktiviert. Die Flussrate betrug dabei 2 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Anschließend erfolgte die Immobilisierung des Liganden für 300 s bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ und einer Konzentration von 25–140 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, resultierend in einem Immobilisierungslevel von 683–9795 RU.

ii. Affinitätsmessungen

Die Affinitätsmessungen für die getaggten Liganden wurden abgesehen davon, dass die Dissoziationszeit für alle Analyten 300 s betrug, analog zu denen für die ungetaggten Liganden durchgeführt.

6.3 (Weiter-)Entwicklung von Testsystemen

6.3.1 Der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay

Der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay erfolgte wie in Kapitel 6.2.2 beschrieben.

I. Einstellung der optimalen Enzymkonzentration

Zur Einstellung der optimalen Enzymkonzentration im fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay wurde der IC_{50} -Wert von CHIR-090 in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration (15–75 nM) bestimmt. Betrag der bestimmte IC_{50} -Wert 60–220 nM für *E. coli* LpxC C63A, wurde die getestete Enzymkonzentration als geeignet für die biologische Testung eingestuft. Zusätzlich dazu wurde die Produktbildung in Abhängigkeit von der Reaktionszeit für eine Stunde bei verschiedenen Enzymkonzentrationen verfolgt (Tab. 73).

Tabelle 73: Übersicht über die exakten Stopp-Zeitpunkte in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration bei der Verfolgung des Reaktionsumsatzes durch *E. coli* LpxC C63A und *P. aeruginosa* LpxC mithilfe des fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassays.

	<i>E. coli</i> LpxC C63A			<i>P. aeruginosa</i> LpxC
	74 nM	15 nM	7.4 nM	75 nM
Reaktionsdauer 1 [min]	0:00	0:00	0:00	0:00
Reaktionsdauer 2 [min]	5:58	5:24	6:30	1:30
Reaktionsdauer 3 [min]	11:26	10:52	11:58	3:00
Reaktionsdauer 4 [min]	15:58	15:24	16:30	5:00
Reaktionsdauer 5 [min]	20:56	20:22	21:28	7:00
Reaktionsdauer 6 [min]	26:16	25:42	26:48	9:00
Reaktionsdauer 7 [min]	31:00	30:26	31:32	11:00
Reaktionsdauer 8 [min]	41:33	40:59	42:05	13:00
Reaktionsdauer 9 [min]	51:15	50:41	51:47	15:00
Reaktionsdauer 10 [min]	60:39	60:05	61:11	20:00
Reaktionsdauer 11 [min]	-	-	-	30:00
Reaktionsdauer 12 [min]	-	-	-	40:00
Reaktionsdauer 13 [min]	-	-	-	50:00
Reaktionsdauer 14 [min]	-	-	-	60:00
Reaktionsdauer 15 [min]	-	-	-	70:00

Wurde in den ersten 30 min eine kontinuierliche Zunahme der Produktkonzentration beobachtet, wurde die getestete Enzymkonzentration als geeignet für die biologische Testung eingestuft.

II. Bestimmung der Produktkonzentration anhand von Kalibrierkurven primärer Amine

Zur Quantifizierung des gebildeten Produktes wurden Kalibrierkurven von primären Aminen erstellt. Hierbei wurden je 100 μ L Glucosamin Hydrochlorid, 2-Iodanilin und Tris(hydroxymethyl)methylamin analog dem fluoreszenzbasierten Enzymassay mit 40 μ L Natriumhydroxid (0.625 M) und 40 μ L Essigsäure (0.625 M) versetzt und durch Zugabe von 120 μ L Boraxpuffer in ein fluoreszierendes Isoindol überführt. Nach 30 min wurde die Fluoreszenz (Excitation = 340 nm, Emission = 460 nm) gemessen.

III. Bestimmung enzymkinetischer Parameter

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante wurde der fluoreszenzbasierte Enzymassay bei sechs verschiedenen Substratkonzentrationen ohne Zugabe eines Inhibitors oder DMSO durchgeführt. Abweichend von der 30-minütigen Inkubation wurde die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von Natronlauge (0.625 M) gestoppt (Tab. 74–75).

Tabelle 74: Übersicht über die exakten Reaktionszeiten bei der Bestimmung des K_M -Wertes von *E. coli* LpxC C63A für das natürliche Substrat 2 für die einzelnen Substratkonzentrationen.

	t_0 [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	t_4 [min]	t_5 [min]
1.02 μM	0	1:34	3:04	6:33	9:17	12:02
5.11 μM	0	1:29	2:59	6:14	9:12	11:56
10.21 μM	0	1:34	2:57	5:58	8:59	11:56
15.32 μM	0	1:30	3:05	5:55	8:55	11:57
20.42 μM	0	1:29	2:56	6:06	8:56	11:58
25.53 μM	0	1:25	2:55	5:56	8:50	12:01

Tabelle 75: Übersicht über die exakten Reaktionszeiten bei der Bestimmung des K_M -Wertes von *P. aeruginosa* LpxC für das *E. coli*-Substrat 2 für die einzelnen Substratkonzentrationen.

	t_0 [min]	t_1 [min]	t_2 [min]	t_3 [min]	t_4 [min]
1.02 μM	0	1:40	3:10	5:10	7:10
5.11 μM	0	1:30	3:00	5:00	7:00
10.21 μM	0	1:20	2:50	4:50	6:50
15.32 μM	0	1:30	3:00	5:00	7:00
20.42 μM	0	1:20	2:50	4:50	6:50
25.53 μM	0	1:10	2:40	4:40	6:40

Anschließend wurde für jede Substratkonzentration die Produktkonzentration (in Form der Fluoreszenzintensität) gegen die Reaktionsdauer aufgetragen und die Reaktionsgeschwindigkeit mithilfe einer linearen Regression berechnet. Zuletzt wurde die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit gegen die reziproke Substratkonzentration aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt, die Nullstelle lieferte dabei $-K_M^{-1}$.

6.3.2 Der massenbasierte LpxC-Enzymassay

Die Durchführung des massenbasierten LpxC-Enzymassays erfolgte bis auf die hier beschriebenen Abweichungen wie in Kapitel 6.2.3 beschrieben.

I. Überprüfung limitierender Reaktionsbedingungen

Zur Überprüfung limitierender Reaktionsbedingungen wurde der massenbasierte LpxC-Enzymassay bei drei verschiedenen Substratkonzentrationen (0.25 μM , 1.0 μM , 25 μM) durchgeführt. Abweichend von der 30-minütigen Inkubationsdauer wurden die Substrat- und Produktkonzentrationen nach 0 min, 90 s und 7 min quantifiziert. Die Enzymkonzentration von *E. coli* LpxC C63A betrug dabei 74 nM, die von *P. aeruginosa* LpxC 75 nM.

II. Bestimmung enzymkinetischer Parameter

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) wurde der massenbasierte Enzymassay bei sechs verschiedenen Substratkonzentrationen in Anwesenheit von 2% DMSO durchgeführt. Die Enzymkonzentration von *E. coli* LpxC betrug im ersten Versuch 74 nM und im zweiten Versuch 7.4 nM, die Enzymkonzentration von *P. aeruginosa* LpxC betrug 75 nM. Abweichend von der 30-minütigen Inkubationsdauer wurde die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von Salzsäure (0.625 M) gestoppt (Tab. 76).

Tabelle 76: Übersicht über die exakten Reaktionszeiten für die einzelnen Substratkonzentrationen bei der Bestimmung des K_M -Wertes von *P. aeruginosa* LpxC sowie *E. coli* LpxC C63A für das *E. coli*-Substrat 2.

	t_0 [s]	t_1 [s]	t_2 [s]	t_3 [s]	t_4 [s]	t_5 [s]	t_6 [s]	t_7 [s]	t_8 [s]
0.25 μM	0	10	20	30	40	50	60	70	90
0.50 μM									
1.0 μM									
2.5 μM									
10 μM									
25 μM									

Anschließend wurde für jede Substratkonzentration die Produktkonzentration gegen die Reaktionsdauer aufgetragen und die Reaktionsgeschwindigkeit mithilfe einer linearen Regression berechnet. Zuletzt wurde die reziproke Reaktionsgeschwindigkeit gegen die reziproke Substratkonzentration aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt. Dabei lieferte die Nullstelle $-K_M^{-1}$ und der y-Achsenabschnitt v_{\max}^{-1} .

III. Entwicklung standardisierter Reaktionsbedingungen

Im ersten Schritt wurde in Abwesenheit eines Inhibitors der Reaktionsumsatz in einer seriellen 1:10-Verdünnung ermittelt, ausgehend von 25 μ M Substratkonzentration und 74 nM (*E. coli* LpxC C63A) bzw. 75 nM (*P. aeruginosa* LpxC) Enzymkonzentration. Im zweiten Schritt wurde für *E. coli* LpxC C63A zusätzlich der Reaktionsumsatz bei einer Enzymkonzentration von 15 nM (25 μ M Substratkonzentration) bzw. 1.5 nM (2.5 μ M Substratkonzentration) bestimmt.

Des Weiteren wurden für alle untersuchten Bedingungen die IC_{50} -Werte von **12**, **18** und **19** im Falle von *E. coli* LpxC C63A bzw. die IC_{50} -Werte von **12** und **19** im Falle von *P. aeruginosa* LpxC bestimmt. Die Inhibitorkonzentration betrug dabei 25% (2.5 μ M Substratkonzentration) bzw. 16% (0.25 μ M Substratkonzentration) der Ausgangsinhibitorkonzentration, die bei einer Substratkonzentration von 25 μ M verwendet wurde (Tab. 77).

Tabelle 77: Übersicht über die in Abhängigkeit von der Substratkonzentration verwendeten Enzym- und Inhibitorkonzentrationen im massenbasierten LpxC-Enzymassay.

Substratkonzentration	0.25 μ M	2.5 μ M		25 μ M	
Enzymkonzentration <i>E. coli</i> LpxC C63A	0.74 nM	1.5 nM	7.4 nM	15 nM	74 nM
Enzymkonzentration <i>P. aeruginosa</i> LpxC	0.75 nM	-	7.5 nM	-	75 nM
Inhibitorkonzentration	$0.16 \cdot c_{25 \mu\text{M}}$	$0.25 \cdot c_{25 \mu\text{M}}$		$c_{25 \mu\text{M}}$	

Aufgrund der Unterschiede bei den eingesetzten Substratkonzentrationen wurden die IC_{50} -Werte anschließend zur Vergleichbarkeit mithilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung in K_i -Werte umgerechnet. Lag der Reaktionsumsatz unter 80% und befand sich der K_i -Wert in einer ähnlichen Größenordnung, wurden die untersuchten Bedingungen als geeignet für die biologische Testung eingestuft. Diese Einschätzung galt unabhängig davon, ob der Umsatz in zukünftigen Einzelexperimenten davon abwich.

6.3.3 SPR-Experimente

Die Durchführung der SPR-Experimente erfolgte bis auf die hier genannten Abweichungen wie in Kapitel 6.2.4 beschrieben. Zusätzlich dazu sind die Immobilisierungslevel, die Analyten inkl. der Analytkonzentrationen bei den Affinitätsmessungen sowie die Dauer, die das Enzym bei den einzelnen Affinitätsexperimenten bereits auf dem Chip immobilisiert war, angegeben.

I. E. coli LpxA

i. pH-Scouting

Das pH-Scouting erfolgte ohne zusätzliche Optimierung wie in Kapitel 6.2.4 beschrieben.

ii. Immobilisierung

Die Immobilisierung des Enzyms erfolgte in drei Experimenten (Tab. 78).

Tabelle 78: Übersicht über die einzelnen Experimente zur Immobilisierung von *E. coli* LpxA.

	Immobilisierungsbedingungen		Response [RU]
	Enzymkonzentration	pH-Wert des Acetatpuffers	
Experiment 1	12.7 ng · μL^{-1}	5.0	7790
Experiment 2	12.7 ng · μL^{-1}	5.5	9231
Experiment 3	12.7 ng · μL^{-1}	5.5	7536

iii. Affinitätsmessungen

Die Affinitätsmessungen wurden für vier verschiedene Analyten durchgeführt. Hierbei wurde Enzym aus insgesamt drei verschiedenen Immobilisierungsexperimenten verwendet (Tab. 79).

Tabelle 79: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Affinität für *E. coli* LpxA.

Analyt	Konzentrationsbereich	Immobilisierung	Enzymalter
15	50 nM – 1.6 μM	Experiment 1	0 Tage
15	50 nM – 1.6 μM		1 Tag
15	50 nM – 1.6 μM	Experiment 2	0 Tage
16	2–200 μM	Experiment 3	0 Tage
16	90 nM – 1 mM		0 Tage
2	50 nM – 1.6 μM		1 Tag
2	50 nM – 160 μM		1 Tag
15	100 nM – 160 μM		2 Tage
15 (TAMRA gelabelt)	15.5–500 nM		2 Tage

II. *E. coli* LpxA mit *N*-terminalem Strep-Tag II

i. Immobilisierung

Die Immobilisierung des Enzyms erfolgte in zwei Experimenten (Tab. 80).

Tabelle 80: Übersicht über die Experimente zur Immobilisierung von *E. coli* LpxA mit *N*-terminalem Strep-Tag II.

	Enzymkonzentration	Response [RU]
Experiment 1	24.0 ng · μL^{-1}	683
Experiment 2	48.0 ng · μL^{-1}	1138

ii. Affinitätsmessungen

Die Affinitätsmessungen wurden für 19 verschiedene Analyten mit Enzym aus zwei verschiedenen Immobilisierungsexperimenten durchgeführt (Tab. 81).

Tabelle 81: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Affinität für *E. coli* LpxA mit *N*-terminalem Strep-Tag II.

Analyt	Konzentrationsbereich	Immobilisierung	Enzymalter	
1	78 μM – 10 mM	Experiment 1	0 Tage	
15	39 nM – 5 μM			
16	3.9–500 μM			
1	78 μM – 10 mM	Experiment 2	0 Tage	
2	1.25–160 μM			
15	39 nM – 5 μM			
16	0.78–100 μM			
161	0.39–50 μM			
162	0.39–50 μM			
163	0.39–50 μM		1 Tag	
164	0.39–50 μM			
165	0.39–50 μM			
166	0.39–50 μM			
167	0.39–50 μM			
37	0.78–100 μM			
168	0.78–100 μM			2 Tage
169	0.78–100 μM			
170	0.78–100 μM			
171	0.78–100 μM			
172	0.78–100 μM			
173	0.78–100 μM			
174	0.78–100 μM			

III. *E. coli* LpxC C63A

i. pH-Scouting

Zur Reduktion der unspezifischen Enzymbindung auf dem Sensorchip wurden vier Laufpuffer, die mit verschiedenen Additiven versetzt wurden, getestet. Den Acetatpuffern wurden dabei die Additive in identischer Konzentration hinzugefügt (Tab. 82–84).

Tabelle 82: Übersicht über die Kombinationen der Additive DTT und Zinkchlorid, basierend auf Laufpuffer 1 (40 mM MES (pH = 6.0), 0.05% Triton X-100).

Laufpuffer	DTT [mM]	Zinkchlorid [μ M]
LP ₁	-	-
LP _{1a}	0.08	-
LP _{1b}	1	-
LP _{1c}	5	-
LP _{1d}	1	100
LP _{1e}	1	1000
LP _{1f}	5	100
LP _{1g}	5	1000
LP _{1h}	-	100
LP _{1i}	-	1000

Tabelle 83: Übersicht über die Kombination weiterer Additive (2-Mercaptoethanol, Zinkchlorid und Zinksulfat), die für den Laufpuffer 1 (40 mM MES (pH = 6.0), 0.05% Triton X-100) getestet wurden.

Laufpuffer	2-Mercaptoethanol [mM]	Cofaktor (100 μ M)
LP _{1j}	1	-
LP _{1k}	1	ZnCl ₂
LP _{1l}	1	ZnSO ₄
LP _{1m}	2	ZnSO ₄

Tabelle 84: Übersicht über die Laufpuffer 2-4 mit verschiedenen Salzkonzentrationen ohne weitere Additive.

Laufpuffer	Basis	Salzkonzentration
LP ₂	50 mM MES, pH = 6.0 0.05% Triton X-100	-
LP _{2a}		150 mM Natriumchlorid
LP ₃	50 mM Bis-Tris, pH = 6.0 0.05% Triton X-100	-
LP _{3a}		150 mM Natriumchlorid
LP ₄	50 mM Bis-Tris, pH = 7.0 0.05% Triton X-100	-
LP _{4a}		150 mM Natriumchlorid

ii. Immobilisierung

Die ersten drei Experimente zur Immobilisierung des Enzyms wurden mithilfe eines CM5-Sensorchips vor Beendigung der pH-Scouts durchgeführt. Die Immobilisierungsbedingungen variierten dabei bei allen Experimenten (Tab. 85).

Tabelle 85: Übersicht über die initialen Experimente zur Immobilisierung von *E. coli* LpxC C63A.

Experiment-nummer	Laufpuffer	Additive + pH-Wert des Acetatpuffers	Enzymkonzentration [ng · μL^{-1}]	Kontaktzeit [s]	Response [RU]
1	40 mM MES, pH = 6.0 0.1% DMSO 0.05% Triton X-100	pH = 5.0	27	300	5290
2	40 mM MES, pH = 6.0 1 mM DTT 100 μM ZnCl ₂ 1% DMSO 0.05% Triton X-100	1 mM DTT, 100 μM ZnCl ₂ pH = 4.5	10	300	678
3	50 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ pH = 7.5 150 mM NaCl 1% DMSO 0.05% Triton X-100	pH = 5.0	20	120	1351

Anschließend wurden nach Beendigung der pH-Scouts mithilfe von CM7-Sensorchips zwei Experimente zur Optimierung der Immobilisierungsbedingungen durchgeführt. Dabei wurde *E. coli* LpxC C63A mit Acetatpuffern, die DTT (1 mM) sowie ZnCl₂ (100 μM) enthielten, auf eine Konzentration von 20 ng · μL^{-1} verdünnt. Die Laufpuffer sowie der pH-Wert der Acetatpuffer und die Kontaktzeiten variierten bei den einzelnen Experimenten (Tab. 86).

Tabelle 86: Übersicht über die Experimente zur Optimierung der Immobilisierung von *E. coli* LpxC C63A.

Experiment-nummer	Laufpuffer	pH-Wert des Acetatpuffers	Kontaktzeit [s]	Response [RU]
4	40 mM MES, pH = 6.0 150 mM NaCl 1 mM DTT 100 μM ZnCl ₂ 1% DMSO 0.05% Triton X-100	4.5	420	4320
5	50 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ pH = 7.5 150 mM NaCl 1% DMSO 0.05% Triton X-100	4.5	300	6443
		5.0	420	9779

Zur Durchführung standardisierter Affinitätsmessungen erfolgte die Immobilisierung des Enzyms in insgesamt fünf Experimenten. Die Verdünnung der Enzyme erfolgte in einem Acetatpuffer (10 mM, pH = 4.5), allen Acetatpuffern wurden dabei die Additive DTT (1 mM) und Zinkchlorid (100 μM) hinzugefügt (Tab. 87).

Tabelle 87: Übersicht über die Experimente zur Immobilisierung von *E. coli* LpxC C63A, mit dem anschließend Experimente zur Bestimmung der Affinität unter standardisierten Bedingungen durchgeführt wurden.

Experiment-nummer	Sensorchip	Enzymkonzentration [ng · μL^{-1}]	Kontaktzeit [s]	Response [RU]
6	CM7	20	420	7655
7	CM7	20	420	4613
8	CM7	40	420	8228
9	CM7	40	600	8874
10	CMD700M	80	420	9267

iii. Affinitätsmessungen

Mit dem Liganden, der in dem Immobilisierungsexperiment 5 immobilisiert wurde, wurde eine Optimierung der Bedingungen für die Affinitätsmessungen mithilfe der Analyten 17, 18 und 19 durchgeführt. Hierbei wurden sowohl die Konzentrationsbereiche der Analyten als auch die Laufpuffer variiert (Tab. 88).

Tabelle 88: Übersicht über die verwendeten Bedingungen bei der Optimierung der Bestimmung der Affinität der Analyten für *E. coli* LpxC C63A.

Analyt	Konzentrationsbereich	Laufpuffer	Enzymalter
17	80 nM – 10 μM Serielle 1:2-Verdünnung	50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH = 7.5 150 mM NaCl 1% DMSO 0.05% Triton® X-100	0 Tage
	800 nM – 100 μM Serielle 1:2-Verdünnung		
18	80 nM – 10 μM Serielle 1:2-Verdünnung		
	800 nM – 100 μM Serielle 1:2-Verdünnung		
19	800 pM – 100 nM Serielle 1:2-Verdünnung		
	8–1000 nM Serielle 1:2-Verdünnung		
17	46 nM – 100 μM Serielle 1:3-Verdünnung	50 mM MES, pH = 6.0 150 mM NaCl 1% DMSO 0.05% Triton® X-100	1 Tag
18	46 nM – 100 μM Serielle 1:3-Verdünnung		
17	80 nM – 10 μM Serielle 1:2-Verdünnung		
	800 nM – 100 μM Serielle 1:2-Verdünnung		
	46 nM – 100 μM Serielle 1:3-Verdünnung		
18	80 nM – 10 μM Serielle 1:2-Verdünnung		
	800 nM – 100 μM Serielle 1:2-Verdünnung		
	46 nM – 100 μM Serielle 1:3-Verdünnung		
19	800 pM – 100 nM Serielle 1:2-Verdünnung		

	8–1000 nM Serielle 1:2-Verdünnung		
17	46 nM – 100 µM Serielle 1:3-Verdünnung	50 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , pH = 6.5 150 mM NaCl 1% DMSO 0.05% Triton® X-100	23 Tage
18	46 nM – 100 µM Serielle 1:3-Verdünnung		
17	46 nM – 100 µM Serielle 1:3-Verdünnung	50 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , pH = 7.0 150 mM NaCl 1% DMSO 0.05% Triton® X-100	
18	46 nM – 100 µM Serielle 1:3-Verdünnung		
17	46 nM – 100 µM Serielle 1:3-Verdünnung	50 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , pH = 7.5 150 mM NaCl 1% DMSO 0.05% Triton® X-100	
18	46 nM – 100 µM Serielle 1:3-Verdünnung		

Nach Optimierung der Immobilisierungsbedingungen wurden Affinitätsmessungen wie in Kapitel 6.2.4 beschrieben für 12 verschiedene Analyten durchgeführt. Abweichend von der dort beschriebenen Durchführung basierten die gemessenen Konzentrationen jedoch teilweise auf einer seriellen 1:3- anstelle einer seriellen 1:2-Verdünnung. Hierbei wurde Enzym aus insgesamt fünf verschiedenen Immobilisierungsexperimenten verwendet (Tab. 89)

Tabelle 89: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Affinität für *E. coli* LpxC C63A.

Analyt	Konzentrationsbereich	Immobilisierung	Enzymalter
17	46 nM – 100 µM Serielle 1:3-Verdünnung	Experiment 6	0 Tage
18	46 nM – 100 µM Serielle 1:3-Verdünnung		
19	0.46–1000 nM Serielle 1:3-Verdünnung		
68	4.6 nM – 10 µM Serielle 1:3-Verdünnung		
98	46 nM – 100 µM Serielle 1:3-Verdünnung		
<i>ent-100</i>	4.6 nM – 10 µM Serielle 1:3-Verdünnung		
140	0.46–1000 nM Serielle 1:3-Verdünnung		
17	80 nM – 10 µM	Experiment 7	0 Tage
18	80 nM – 10 µM		
19	8–1000 nM		
68	80 nM – 10 µM		
98	80 nM – 10 µM		
<i>ent-100</i>	80 nM – 10 µM		
140	8–1000 nM		
17	80 nM – 10 µM	Experiment 8	0 Tage
18	80 nM – 10 µM		
19	8–1000 nM		
68	80 nM – 10 µM		

98	8–1000 nM	Experiment 9	0 Tage
<i>ent-100</i>	80 nM – 10 μ M		
140	80 nM – 10 μ M		
10	80 nM – 10 μ M		
17	80 nM – 10 μ M		
18	80 nM – 10 μ M		
19	8–1000 nM		
67	80 nM – 10 μ M		
100	8–1000 nM		
140	8–1000 nM		
142	80 nM – 10 μ M		
10	80 nM – 10 μ M	Experiment 10	0 Tage
17	80 nM – 10 μ M		
18	80 nM – 10 μ M		
19	8–1000 nM		
98	80 nM – 10 μ M		
140	8–1000 nM		
155	80 nM – 10 μ M		
DMSO	1% Serielle 1:2-Verdünnung mit Laufpuffer (1% DMSO)		7 Tage
	2% Serielle 1:2-Verdünnung mit Laufpuffer (1% DMSO)		

IV. *E. coli* LpxC C63A mit *N*-terminalem Strep-Tag II

i. Immobilisierung

Die Immobilisierung des Enzyms erfolgte in zwei Experimenten (Tab. 90).

Tabelle 90: Übersicht über die Experimente zur Optimierung der Immobilisierungsbedingungen von *E. coli* LpxC C63A mit *N*-terminalem Strep-Tag II.

	Enzymkonzentration	Response [RU]
Experiment 1	3.48 ng · μ L ⁻¹	0.7
Experiment 2	139 ng · μ L ⁻¹	9795

ii. Affinitätsmessungen

Die Affinitätsmessungen wurden für zwei Analyten unter Verwendung von zwei verschiedenen Laufpuffern durchgeführt. Hierbei wurde nur das Enzym aus dem zweiten Immobilisierungsexperiment verwendet (Tab. 91).

Tabelle 91: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Affinität für *E. coli* LpxC C63A mit N-terminalem Strep-Tag II.

Analyt	Konzentrationsbereich	Laufpuffer	Enzymalter
19	5 nM – 15 µM	50 mM MES, pH = 6.0 150 mM NaCl 100 µM ZnCl ₂ 1% DMSO 0.05% Triton® X-100	0 Tage
18	1.5–150 µM	50 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , pH = 7.5 150 mM NaCl 100 µM ZnCl ₂ 1% DMSO 0.05% Triton® X-100	1 Tag
19	5 nM – 15 µM		

V. P. aeruginosa LpxC

i. pH-Scouting

Das pH-Scouting erfolgte ohne zusätzliche Optimierung – basierend auf den für *E. coli* LpxC C63A optimierten Bedingungen – wie in Kapitel 6.2.4 beschrieben.

ii. Immobilisierung

Die Immobilisierung des Enzyms erfolgte in vier Experimenten (Tab. 92).

Tabelle 92: Übersicht über die Experimente zur Immobilisierung von *P. aeruginosa* LpxC, mit dem anschließend Experimente zur Bestimmung der Affinität unter standardisierten Bedingungen durchgeführt wurden.

Experiment-nummer	Sensorchip	Enzymkonzentration [ng · µL ⁻¹]	Kontaktzeit [s]	Response [RU]
1	CM7	20	420	7655
2	CM7	20	420	4613
3	CM7	40	420	8228
4	Xantec CMD700M	80	420	9267

iii. Affinitätsmessungen

Nach Optimierung der Immobilisierungsbedingungen wurden Affinitätsmessungen wie in Kapitel 6.2.4 beschrieben für 12 verschiedene Analyten durchgeführt. Abweichend von der dort beschriebenen Durchführung basierten die gemessenen Konzentrationen jedoch teilweise auf einer seriellen 1:3- anstelle einer seriellen 1:2-Verdünnung. Hierbei wurde Enzym aus insgesamt vier verschiedenen Immobilisierungsexperimenten verwendet (Tab. 93)

Tabelle 93: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Bestimmung der Affinität für *P. aeruginosa* LpxC.

Analyt	Konzentrationsbereich	Immobilisierung	Enzymalter
17	46 nM – 100 µM Serielle 1:3-Verdünnung	Experiment 1	0 Tage
18	46 nM – 100 µM Serielle 1:3-Verdünnung		
19	0.46–1000 nM Serielle 1:3-Verdünnung		
68	4.6 nM – 10 µM Serielle 1:3-Verdünnung		
98	46 nM – 100 µM Serielle 1:3-Verdünnung		
<i>ent-100</i>	4.6 nM – 10 µM Serielle 1:3-Verdünnung		
140	0.46–1000 nM Serielle 1:3-Verdünnung		
17	80 nM – 10 µM	Experiment 2	0 Tage
18	80 nM – 10 µM		
19	8–1000 nM		
68	80 nM – 10 µM		
98	80 nM – 10 µM		
<i>ent-100</i>	80 nM – 10 µM		
140	8–1000 nM		
17	80 nM – 10 µM	Experiment 3	0 Tage
18	80 nM – 10 µM		
19	8–1000 nM		
68	80 nM – 10 µM		
98	80 nM – 10 µM		
<i>ent-100</i>	80 nM – 10 µM		
140	8–1000 nM		
10	80 nM – 10 µM	Experiment 4	0 Tage
17	80 nM – 10 µM		
18	80 nM – 10 µM		
19	8–1000 nM		
98	80 nM – 10 µM		
140	8–1000 nM		
155	80 nM – 10 µM		
DMSO	1% Serielle 1:2-Verdünnung mit Laufpuffer (1% DMSO)		
	2% Serielle 1:2-Verdünnung mit Laufpuffer (1% DMSO)		

6.4 *P. aeruginosa* LpxC

Vor der Verwendung von *P. aeruginosa* LpxC in den entwickelten Enzymassays erfolgte zum einen die Optimierung der Expressions- und Aufschlussbedingungen, zum anderen die Identifikation einer Reaktionsumgebung, in der das Enzym Aktivität zeigte.

6.4.1 Proteinexpression und -aufreinigung

Die Optimierung der Expression von *P. aeruginosa* LpxC erfolgte bis auf die hier beschriebenen Abweichungen wie in Kapitel 6.2.1 beschrieben. Alle Testexpressionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 100 mL, insgesamt wurden 14 verschiedene Bedingungen bei der Induktion überprüft (Tab. 94).

Tabelle 94: Übersicht über die getesteten Bedingungen zur Induktion bei der Optimierung der *P. aeruginosa* LpxC-Expression.

Experimentnummer	Medium	OD ₆₀₀	Additive	Temperatur	Dauer
1	LB-Medium 0.1 mM Kan	0.6	IPTG (0.5 mM) ZnCl ₂ (100 µM)	37 °C	2.5 h
			IPTG (1 mM) ZnCl ₂ (100 µM)		
	IPTG (0.5 mM) ZnCl ₂ (100 µM)				
	IPTG (1 mM) ZnCl ₂ (100 µM)				
2	LB-Medium 0.1 mM Kan 0.5% Glucose	0.35	IPTG (0.5 mM) ZnCl ₂ (100 µM)	25 °C	17 h
		0.43			
		0.53			
		0.60			
3	LB-Medium 0.1 mM Kan 0.5% Glucose	0.47	IPTG (0.5 mM) ZnCl ₂ (100 µM)	25 °C	17 h
			IPTG (0.25 mM) ZnCl ₂ (100 µM)		
			IPTG (0.1 mM) ZnCl ₂ (100 µM)		
			IPTG (0.01 mM) ZnCl ₂ (100 µM)		
4	LB-Medium 0.1 mM Kan 0.5% Glucose	0.44	IPTG (0.5 mM) ZnCl ₂ (100 µM)	37 °C	2 h
			IPTG (0.5 mM) ZnCl ₂ (500 µM)		

Anschließend wurden insgesamt fünf verschiedene Puffer beim Zellaufschluss getestet (Tab. 95).

Tabelle 95: Übersicht über die Zusammensetzung der verwendeten Aufschlusspuffer bei der Optimierung der *P. aeruginosa* LpxC-Aufreinigung.

	Zusammensetzung
Aufschlusspuffer 1	50 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , pH = 7.0 150 mM NaCl
Aufschlusspuffer 2	20 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , pH = 7.0
Aufschlusspuffer 2	10 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , pH = 7.0 1 mM EDTA
Aufschlusspuffer 4	25 mM Tris-HCl, pH = 8.1 2 mM DTT 5% Glycerol
Aufschlusspuffer 5	25 mM Hepes, pH = 8.1 2 mM DTT 5% Glycerol

Der Expressionsansatz 1 wurde dabei mit den Aufschlusspuffern 2–3 getestet, die Expressionsansätze 2–3 mit dem Aufschlusspuffer 1 und der Expressionsansatz 4 mit den Aufschlusspuffern 2–5.

6.4.2 Der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay

Zur Identifikation einer geeigneten Reaktionsumgebung wurde der fluoreszenzbasierte LpxC-Enzymassay mit drei verschiedenen Assaypuffern durchgeführt (Tab. 96).

Tabelle 96: Übersicht über die verwendeten Puffer bei der Identifikation einer geeigneten Reaktionsumgebung für *P. aeruginosa* LpxC im fluoreszenzbasierten LpxC-Enzymassay.

	Zusammensetzung
Pae-Assaypuffer 1 (entspricht Assaypuffer 1)	40 mM MES, pH = 6.0 80 µM DTT 0.02% Brij® 35
Pae-Assaypuffer 2 (entspricht Größenausschlusspuffer 3)	25 mM Hepes, pH = 8.0 2 mM DTT 5% Glycerol
Pae-Assaypuffer 3 (entspricht Assaypuffer 2)	40 mM KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ , pH = 7.5 80 µM DTT 0.02% Brij® 35

Abgesehen von den verwendeten Puffern erfolgte die Durchführung des Enzymassays wie in Kapitel 6.2.2 beschrieben. Die niedrigste Fluoreszenzintensität entsprach der unter Verwendung von **12** (20 µM) als Inhibitor ermittelten, die höchste Fluoreszenzintensität der unter der Verwendung von reinem DMSO.

6.5 Weiterführende biologische Testung

Die weiterführende biologische Testung gliedert sich in Kombinationsexperimente von LpxC-Inhibitoren mit kommerziell erhältlichen Antibiotika, die Untersuchung des Einflusses eines Effluxpumpeninhibitors auf die biologische Aktivität sowie die Untersuchung photoaktivierbarer Substanzen.

6.5.1 Kombinationsexperimente

Bei den Kombinationsexperimenten wurden der LpxC-Inhibitor **18** sowie die kommerziell erhältlichen Antibiotika Cefotaxim, Gentamicin, Linezolid und Moxifloxacin verwendet. Hierfür wurde zunächst die minimale Hemmkonzentration der zu untersuchenden Substanzen bestimmt. Anschließend wurde die exakte Bakterienanzahl in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration mithilfe des Droplet-Plate-Assays quantifiziert. Nach Erstellen von Konzentrations-Effektcurven wurden Kombinationsexperimente für **18** und Moxifloxacin durchgeführt.

I. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Moxifloxacin, Gentamicin, Cefotaxim, Linezolid und **18** gegen *E. coli* ATCC 25922 wurde der Bakterienstamm über Nacht auf einer Col-Agarplatte wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie mit steriler Kochsalzlösung (0.9%) zu einer Suspension, die einem McFarland-Standard von 0.5 entsprach, verdünnt. Anschließend wurden 890 μL MHB-Medium sowie 100 μL einer zweifachen Verdünnungsreihe des jeweiligen Antibiotikums ($0.80\text{--}320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) in einer 48-Wellplatte vorgelegt. Zuletzt wurde das Inokulum 1:2 mit steriler Kochsalzlösung (0.9%) verdünnt und 10 μL dieser Verdünnung in alle Wells gegeben. Die finale Konzentration an Bakterien betrug somit $5 \cdot 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, die Endkonzentration der Substanzen $0.008\text{--}32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Die Platten wurden anschließend für 16–18 h bei 37 °C inkubiert. Die geringste Konzentration, bei der kein sichtbares Bakterienwachstum detektiert werden konnte, wurde als minimale Hemmkonzentration angegeben.

II. Droplet-Plate-Assay

Zur Quantifizierung der Bakterienanzahl wurden 100 μL der bakterienhaltigen Suspension aus dem MHK-Experiment entnommen, und es erfolgte eine serielle zehnfache Verdünnungsreihe mit 900 μL 0.9%iger Natriumchloridlösung.

Anschließend wurden für jede Verdünnungsstufe $10 \times 10 \mu\text{L}$ auf eine geviertelte Col-Agarplatte aufgetragen, die beimpfte Agarplatte trocknen gelassen und diese für 8 h bei 37 °C sowie weitere 10 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden die Agarplattenviertel, die 20–500 Einzelkolonien enthielten, ausgezählt und es wurde der dekadische Logarithmus der Bakterienanzahl pro Milliliter unverdünnter Zellsuspension ($\log_{10}(\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1})$) berechnet.

III. Konzentrations-Effektcurven

Zur Erstellung von Konzentrations-Effektcurven wurden nach Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für weitere Substanzkonzentrationen „MHK-Experimente“ durchgeführt (Tab. 97).

Tabelle 97: Getestete Konzentrationen in Abhängigkeit von der MHK für 18 und Moxifloxacin bei der Erstellung von Konzentrations-Effektkurven.

	18	Moxifloxacin
4× MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	32	0.125
2× MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	16	0.063
1.5× MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	12	0.047
1× MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	8	0.031
0.75× MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	6	0.024
0.5× MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	4	0.016
0.25× MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]	2	0.008

Anschließend wurde für die jeweilige Substanzkonzentration die Bakterienanzahl pro Milliliter unverdünnter Zellsuspension wie zuvor beschrieben quantifiziert und der $\log_{10}(\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1})$ berechnet. Die Berechnung der Konzentrations-Effektkurven erfolgte nach dem Hill-Modell.

IV. Kombinationsansätze

Die Durchführung der Kombinationsansätze basierte auf den zuvor beschriebenen MHK-Experimenten sowie dem Droplet-Plate-Assay, abgesehen davon, dass anstelle von 100 μL einer Inhibitorstocklösung je 50 μL von zwei Inhibitorstocklösungen bzw. 50 μL Inhibitorstocklösung und 50 μL MHB-Medium verwendet wurden. Zunächst wurden 16 Kombinationen getestet, anschließend 36 (Tab. 98–99).

Tabelle 98: Übersicht über 16 getestete Kombinationen basierend auf den IC_{10} -, IC_{50} - und IC_{90} -Werten von 18 und Moxifloxacin.

		18	0	IC_{10}	IC_{50}	IC_{90}
		[$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]				
Moxifloxacin	[$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$]	0		11.2	13.2	15.7
	0					
	IC_{10}	17.4				
	IC_{50}	30.5				
	IC_{90}	53.3				

16 Kombinationen

Tabelle 99: Übersicht über 36 getestete Kombinationen basierend auf den $IC_{0.1}$ -, IC_1 -, $IC_{2.5}$ -, IC_5 - und IC_{10} -Werten von 18 und Moxifloxacin.

		18	0	$IC_{0.1}$	IC_1	$IC_{2.5}$	IC_5	IC_{10}
		[$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]						
Moxifloxacin	[$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$]	0		7.80	9.31	10.0	10.6	11.2
	0							
	$IC_{0.1}$	5.25						
	IC_1	9.45						
	$IC_{2.5}$	12.0						
	IC_5	14.4						
	IC_{10}	17.4						

36 Kombinationen

6.5.2 Einfluss des Effluxpumpeninhibitors PA β N auf die MHK

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration in An- sowie in Abwesenheit des Effluxpumpeninhibitors Phe-Arg- β -Naphthylamid Hydrochlorid gegen *E. coli* ATCC 25922 und *P. aeruginosa* ATCC 27853 wurden die Bakterienstämme über Nacht auf einer LB-Agarplatte wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde je eine Einzelkolonie mit steriler Kochsalzlösung (0.9%) zu einer Suspension, die einem McFarland-Standard von 0.5 entsprach, verdünnt.

Anschließend wurden 25 μ L LB-Medium bzw. 25 μ L PA β N (64 μ g \cdot mL $^{-1}$ in LB-Medium) in einer 96-Wellplatte vorgelegt und 25 μ L einer seriellen zweifachen Verdünnungsreihe der jeweiligen Testsubstanz hinzugefügt. Die höchste getestete Konzentration der Testsubstanz betrug dabei in Abhängigkeit von der Löslichkeit 64–256 μ g \cdot mL $^{-1}$ gegen *P. aeruginosa* ATCC 27853 und 32–64 μ g \cdot mL $^{-1}$ gegen *E. coli* ATCC 25922. Zuletzt wurde das Inokulum 1:100 mit steriler Kochsalzlösung (0.9%) verdünnt, und es wurden davon 50 μ L hinzugefügt. Die finale Konzentration an Bakterien betrug somit $5 \cdot 10^5$ cfu \cdot mL $^{-1}$, die Endkonzentration der Substanzen 0.25–256 μ g \cdot mL $^{-1}$.

Die Platten wurden anschließend für 18 h bei 37 °C inkubiert. Die geringste Konzentration, bei der kein sichtbares Bakterienwachstum detektiert werden konnte, wurde als minimale Hemmkonzentration angegeben.

6.5.3 Photoaktivierbare Substanzen

Die biologische Testung photoaktivierbarer Substanzen gliederte sich in die Bestimmung der antibakteriellen sowie der inhibitorischen Aktivität.

I. Bestimmung der antibakteriellen Aktivität

Vor Beginn der Bestimmung der antibakteriellen Aktivität wurde der generelle Einfluss der Bestrahlung auf die Bakterien ohne zusätzliche Zugabe von Testsubstanzen überprüft.

i. Untersuchung des Einflusses der Bestrahlung auf das Bakterienwachstum

Zur Untersuchung des generellen Einflusses von Bestrahlung auf das Bakterienwachstum wurden sechs Flüssigvorkulturen erstellt: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* D22, jeweils sowohl in LB- als auch in MHB-Medium.

Am nächsten Tag erfolgte eine 1:2000-Verdünnung der Flüssigvorkulturen und es wurden pro Verdünnung jeweils 1000 μ L in jeweils sieben Wells einer 48-Wellplatte verteilt. Die finale Konzentration an Bakterien betrug überall $5 \cdot 10^5$ cfu \cdot mL $^{-1}$. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Bakteriensuspension für 6 h. Die Inkubationsdauer unterteilte sich in 5 h und 50 min bei 37 °C ohne Bestrahlung der Zellen sowie eine zehnminütige Bestrahlungsphase. Die Bestrahlung der Zellen ($\lambda = 300$ nm) erfolgte jeweils zu einem von sechs Zeitpunkten (Tab. 100).

Tabelle 100: Übersicht über die Bestrahlungszeitpunkte bei der Untersuchung des generellen Einflusses der Bestrahlung auf die Bakterien.

Bestrahlungszeitpunkt	t_0	t_1	t_2	t_3	t_4	t_5
Inkubationsdauer vor Bestrahlung	0 min	20 min	40 min	60 min	120 min	350 min

Als Positivkontrolle diente die jeweilige Bakteriensuspension ohne Bestrahlung, als Negativkontrolle reines LB-Medium sowie MHB-Medium.

Nach 6 h wurden die Platten über Nacht bei 4 °C gelagert und anschließend die Bakterienanzahl wie in Kapitel 6.5.1 beschrieben mithilfe des Droplet-Plate-Assays quantifiziert.

ii. Einfluss der Bestrahlung auf die biologische Aktivität

Zur Bestimmung des Einflusses einer zehnmütigen Bestrahlung der Testsubstanzen **116**, **126** und **130** auf ihre biologische Aktivität bei einer Konzentration von $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ wurde zunächst eine Flüssigvorkultur von *E. coli* ATCC 25922 in LB-Medium erstellt.

Anschließend wurden 890 μL MHB-Medium und 100 μL der jeweiligen Testsubstanz ($320 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) in einer 48-Wellplatte vorgelegt. Zuletzt wurde die Flüssigvorkultur 1:1000 mit LB-Medium und dieses Inokulum 1:2 mit steriler Kochsalzlösung (0.9%) verdünnt und es wurden davon 10 μL in die Wells gegeben. Die finale Konzentration an Bakterien betrug somit $5 \cdot 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, die Endkonzentration der Testsubstanzen $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Bakteriensuspension für 6 h. Die Inkubationsdauer unterteilt sich in 5 h und 50 min bei 37 °C ohne Bestrahlung der Zellen sowie eine zehnmütige Bestrahlungsphase. Die Bestrahlung der Zellen ($\lambda = 300 \text{ nm}$) erfolgte jeweils zu einem von sechs Zeitpunkten (Tab. 101).

Tabelle 101: Übersicht über die Bestrahlungszeitpunkte bei der biologischen Testung photoaktivierbarer Substanzen.

Bestrahlungszeitpunkt	t_0	t_1	t_2	t_3	t_4
Inkubationsdauer vor Bestrahlung	0 min	20 min	40 min	60 min	120 min

Zusätzlich dazu wurden zwei weitere Kombinationen getestet. Zum einen erfolgte die Zugabe der Testsubstanz ebenfalls vor Inkubationsbeginn, aber es wurde zu keinem Zeitpunkt bestrahlt. Zum anderen erfolgte keine Zugabe der Substanz vor Inkubationsbeginn, der Ansatz wurde nach 40 min bestrahlt (10 min, $\lambda = 300 \text{ nm}$) und anschließend erfolgte die Zugabe der Testsubstanz nach Bestrahlung der Bakteriensuspension. Als Positivkontrolle diente die reine Bakteriensuspension ohne Bestrahlung, als Negativkontrolle reines LB-Medium

Nach 6 h wurde direkt die Bakterienanzahl wie in Kapitel 6.5.1 beschrieben mithilfe des Droplet-Plate-Assays quantifiziert.

II. Bestimmung von K_i -Werten

Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von **126** erfolgte mithilfe des massenbasierten Enzymassays bei einer Substratkonzentration von $2.5 \mu\text{M}$. Als Basis für die Bestrahlungsexperimente diente eine Enzymlösung von *E. coli* LpxC C63A (148 nM) in Assaypuffer 1.

- (1) Zur Bestrahlung des Enzyms in Anwesenheit des Inhibitors wurden 177.4 μL Enzymlösung mit je 4 μL einer seriellen 1:3-Verdünnung von **126** (9.25–83.5 μM) versetzt. Nach zehnmütiger Bestrahlung ($\lambda = 300 \text{ nm}$) wurden 90.7 μL der Lösung entnommen und mit 9.3 μL Substrat (26.9 μM) versetzt.
- (2) Als Kontrolle dazu wurde lediglich die Enzymlösung für 10 min bestrahlt ($\lambda = 300 \text{ nm}$), 88.7 μL der Enzymlösung entnommen und mit 9.3 μL Substrat (26.9 μM) sowie 2 μL **126** (9.25–83.5 μM) versetzt.
- (3) Die Negativkontrolle entsprach (1) abgesehen davon, dass anstelle des Inhibitors 4 μL DMSO verwendet wurden.

Die Endkonzentrationen im Assay betragen in allen Ansätzen $2.5 \mu\text{M}$ Substrat, 7.4 nM *E. coli* LpxC C63A und $0.185\text{--}1.67 \mu\text{M}$ **126** in Anwesenheit von 2% DMSO. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde der restliche Enzymassay wie in Kapitel 6.2.2 beschrieben durchgeführt.

7 Literaturverzeichnis

- [1] *ANTIMICROBIAL RESISTANCE. Global Report on Surveillance*, **2014**.
- [2] G. A. Durand, D. Raoult, G. Dubourg, *International journal of antimicrobial agents* **2019**, *53*, 371.
- [3] Kyriacos C Nicolaou, Stephan Rigol, *J Antibiot* **2018**, *71*, 153.
- [4] "Penicillin Production through Deep-tank Fermentation - National Historic Chemical Landmark - American Chemical Society", zu finden unter <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/penicillin.html>, **2021**.
- [5] M. I. Hutchings, A. W. Truman, B. Wilkinson, *Current opinion in microbiology* **2019**, *51*, 72.
- [6] Fabian Grein, Anna Müller, Katharina M. Scherer, Xinliang Liu, Kevin C. Ludwig, Anna Klöckner, Manuel Strach, Hans-Georg Sahl, Ulrich Kubitscheck, Tanja Schneider, *Nat Commun*, *11*, 1.
- [7] World Health Organization (WHO), "The top 10 causes of death", zu finden unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, **2020**.
- [8] World Health Organization (WHO), "New report calls for urgent action to avert antimicrobial resistance crisis", **2019**.
- [9] World Health Organization (WHO), "Fact sheet: Antimicrobial resistance", **2020**.
- [10] Jonathan North (Hrsg.) *Challenges to Tackling Antimicrobial Resistance: Economic and Policy Responses*, Cambridge University Press, **2020**.
- [11] Mike Tyers, Gerard D. Wright, *Nat Rev Microbiol* **2019**, *17*, 141.
- [12] E. P. ABRAHAM, E. CHAIN, *Nature* **1940**, *146*, 837.
- [13] M. A. Cooper, D. Shlaes, *Nature* **2011**, *472*, 32.
- [14] C. L. Ventola, *Pharmacy and Therapeutics* **2015**, *40*, 277.
- [15] A.-P. Magiorakos, A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist et al., *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2012**, *18*, 268.
- [16] E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D. L. Monnet, C. Pulcini, G. Kahlmeter, J. Kluytmans, Y. Carmeli et al., *The Lancet Infectious Diseases* **2018**, *18*, 318.
- [17] D. P. Pires, D. Vilas Boas, S. Sillankorva, J. Azeredo, *Journal of virology* **2015**, *89*, 7449.
- [18] S. Sandoval-Motta, M. Aldana, *Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine* **2016**, *8*.
- [19] L. Fernández, R. E. W. Hancock, *Clinical microbiology reviews* **2012**, *25*, 661.
- [20] W. Witte, M. Mielke, *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* **2003**, *46*, 881.
- [21] D. Du, X. Wang-Kan, A. Neuberger, H. W. van Veen, K. M. Pos, L. J. V. Piddock, B. F. Luisi, *Nature reviews. Microbiology* **2018**, *16*, 523.
- [22] M. Puzari, P. Chetia, *World journal of microbiology & biotechnology* **2017**, *33*, 24.
- [23] H. Nikaïdo, Y. Takatsuka, *Biochimica et biophysica acta* **2008**, *1794*, 769.
- [24] Schweizerisches Tropeninstitut, "<http://www.infektionsbiologie.ch>".
- [25] C. R. H. Raetz, *Annual review of genetics* **1986**, *20*, 253.
- [26] C. R. Raetz, *Annual review of biochemistry* **1990**, *59*, 129.
- [27] T. J. Wyckoff, C. R. Raetz, J. E. Jackman, *Trends in Microbiology* **1998**, *6*, 154.

- [28] D. V. Kalinin, R. Holl, *Expert opinion on therapeutic patents* **2017**, *27*, 1227.
- [29] C. R. H. Raetz, C. Whitfield, *Annual review of biochemistry* **2002**, *71*, 635.
- [30] C. R. H. Raetz, Z. Guan, B. O. Ingram, D. A. Six, F. Song, X. Wang, J. Zhao, *Journal of Lipid Research* **2009**, *50*, S103-8.
- [31] P. G. Sorensen, J. Lutkenhaus, K. Young, S. S. Eveland, M. S. Anderson, C. R. Raetz, *The Journal of biological chemistry* **1996**, *271*, 25898.
- [32] P. Zhou, J. Zhao, *Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids* **2017**, *1862*, 1424.
- [33] M. S. Anderson, H. G. Bull, S. M. Galloway, T. M. Kelly, S. Mohan, K. Radika, C. R. Raetz, *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 19858.
- [34] L. I. Robins, A. H. Williams, C. R. H. Raetz, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6191.
- [35] A. W. Barb, P. Zhou, *Current pharmaceutical biotechnology* **2008**, *9*, 9.
- [36] D. A. Whittington, K. M. Rusche, H. Shin, C. A. Fierke, D. W. Christianson, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, *100*, 8146.
- [37] H. R. Onishi, B. A. Pelak, L. S. Gerckens, L. L. Silver, F. M. Kahan, M. H. Chen, A. A. Patchett, S. M. Galloway, S. A. Hyland, M. S. Anderson et al., *Science (New York, N.Y.)* **1996**, *274*, 980.
- [38] J. E. Jackman, C. R. H. Raetz, C. A. Fierke, *Biochemistry* **1999**, *38*, 1902.
- [39] H. A. Gennadios, D. A. Whittington, X. Li, C. A. Fierke, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2006**, *45*, 7940.
- [40] C. P. McClure, K. M. Rusche, K. Peariso, J. E. Jackman, C. A. Fierke, J. E. Penner-Hahn, *Journal of inorganic biochemistry* **2003**, *94*, 78.
- [41] M. Hernick, H. A. Gennadios, D. A. Whittington, K. M. Rusche, D. W. Christianson, C. A. Fierke, *The Journal of biological chemistry* **2005**, *280*, 16969.
- [42] G. M. Clayton, D. J. Klein, K. W. Rickert, S. B. Patel, M. Kornienko, J. Zugay-Murphy, J. C. Reid, S. Tummala, S. Sharma, S. B. Singh et al., *The Journal of biological chemistry* **2013**, *288*, 34073.
- [43] C.-J. Lee, X. Liang, X. Chen, D. Zeng, S. H. Joo, H. S. Chung, A. W. Barb, S. M. Swanson, R. A. Nicholas, Y. Li et al., *Chemistry & biology* **2011**, *18*, 38.
- [44] C. R. Sweet, S. Lin, R. J. Cotter, C. R. Raetz, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 19565.
- [45] A. Das, C. Mukhopadhyay, *Biopolymers* **2010**, *93*, 845.
- [46] C. R. Raetz, S. L. Roderick, *Science (New York, N.Y.)* **1995**, *270*.
- [47] B. I. Lee, S. W. Suh, *Proteins* **2003**, *53*, 772.
- [48] T. J. Wyckoff, C. R. Raetz, *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274*, 27047.
- [49] T. J. Wyckoff, S. Lin, R. J. Cotter, G. D. Dotson, C. R. Raetz, *The Journal of biological chemistry* **1998**, *273*, 32369.
- [50] A. H. Williams, C. R. H. Raetz, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 13543.
- [51] C. M. Bartling, C. R. H. Raetz, *Biochemistry* **2009**, *48*, 8672.
- [52] a) X. Li, T. Uchiyama, C. R. H. Raetz, O. Hindsgaul, *Organic letters* **2003**, *5*, 539; b) J. E. Jackman, C. A. Fierke, L. N. Tumey, M. Pirrung, T. Uchiyama, S. H. Tahir, O. Hindsgaul, C. R. Raetz, *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 11002.

- [53] A. W. Barb, T. M. Leavy, L. I. Robins, Z. Guan, D. A. Six, P. Zhou, M. J. Hangauer, C. R. Bertozzi, C. R. H. Raetz, *Biochemistry* **2009**, *48*, 3068.
- [54] J. M. Clements, F. Coignard, I. Johnson, S. Chandler, S. Palan, A. Waller, J. Wijkman, M. G. Hunter, *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2002**, *46*, 1793.
- [55] I. Mochalkin, J. D. Knafels, S. Lightle, *Protein science : a publication of the Protein Society* **2008**, *17*, 450.
- [56] A. L. McClerren, S. Endsley, J. L. Bowman, N. H. Andersen, Z. Guan, J. Rudolph, C. R. H. Raetz, *Biochemistry* **2005**, *44*, 16574.
- [57] A. W. Barb, A. L. McClerren, K. Snehelatha, C. M. Reynolds, P. Zhou, C. R. H. Raetz, *Biochemistry* **2007**, *46*, 3793.
- [58] A. W. Barb, L. Jiang, C. R. H. Raetz, P. Zhou, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 18433.
- [59] X. Liang, C.-J. Lee, X. Chen, H. S. Chung, D. Zeng, C. R. H. Raetz, Y. Li, P. Zhou, E. J. Toone, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2011**, *19*, 852.
- [60] S. B. Singh, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *24*, 3683.
- [61] R. J. Jenkins, K. A. Heslip, J. L. Meagher, J. A. Stuckey, G. D. Dotson, *The Journal of biological chemistry* **2014**, *289*, 15527.
- [62] A. H. Williams, R. M. Immormino, D. T. Gewirth, C. R. H. Raetz, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103*, 10877.
- [63] R. J. Jenkins, G. D. Dotson, *ACS Chemical Biology* **2012**, *7*, 1170.
- [64] A. B. Shapiro, P. L. Ross, N. Gao, S. Livchak, G. Kern, W. Yang, B. Andrews, J. Thresher, *Journal of biomolecular screening* **2013**, *18*, 341.
- [65] H. Bisswanger, *Enzyme kinetics. Principles and methods*, Wiley-VCH, Weinheim, **2017**.
- [66] L. Michaelis, M. L. Menten, *Biochemische Zeitung* **1913**, *49*, 333.
- [67] G. E. Briggs, J. B. Haldane, *The Biochemical journal* **1925**, *19*, 338.
- [68] G. L. Glish, R. W. Vachet, *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 140.
- [69] H. Awad, M. M. Khamis, A. El-Aneed, *Applied Spectroscopy Reviews* **2015**, *50*, 158.
- [70] S. Bienz, L. Bigler, T. Fox, H. Meier, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 9. Aufl., Thieme, Stuttgart, **2016**.
- [71] J. Homola, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2003**, *377*, 528.
- [72] Z. Salamon, H. A. Macleod, G. Tollin, *Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. I: Theoretical principles*, **1997**.
- [73] F. B. Kamal Eddin, Y. W. Fen, *Molecules (Basel, Switzerland)* **2020**, *25*.
- [74] Spezial-Heft: Proteomics and Drug Development in *Biospektrum*, S. 532–535.
- [75] S. G. Patching, *Biochimica et biophysica acta* **2014**, *1838*, 43.
- [76] M. Hernick, S. G. Gattis, J. E. Penner-Hahn, C. A. Fierke, *Biochemistry* **2010**, *49*, 2246.
- [77] R. Novy, B. Morris, *inNovations, Newsletter of Novagen, Inc.* **2001**, *8*.
- [78] *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)* **1952**, *41*, 627.
- [79] D. Strzelecka, S. Chmielinski, S. Bednarek, J. Jemielity, J. Kowalska, *Scientific reports* **2017**, *7*, 8931.
- [80] K. Hoff, S. Mielniczuk, O. Agoglitta, M. T. Iorio, M. Caldara, E. F. Bülbül, J. Melesina, W. Sippl, R. Holl, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2020**, *28*, 115529.

- [81] a) A. Dreger, K. Hoff, O. Agoglitta, E. F. Bülbül, J. Melesina, W. Sippl, R. Holl, *Bioorganic Chemistry* **2021**, *117*, 105403; b) A. Dreger, K. Hoff, O. Agoglitta, S.-K. Hotop, M. Brönstrup, P. Heisig, J. Kirchmair, R. Holl, *Bioorganic Chemistry* **2021**, *107*, 104603; c) S. Wimmer, K. Hoff, B. Martin, M. Grewer, L. Denni, R. Lascorz Massanet, M. V. Raimondi, E. F. Bülbül, J. Melesina, S.-K. Hotop et al., *Bioorganic Chemistry* **2023**, *131*, 106331.
- [82] A. Kr zel, W. Lesniak, M. Jezowska-Bojczuk, P. Mlynarz, J. Brasuñ, H. Kozlowski, W. Bal, *Journal of inorganic biochemistry* **2001**, *84*, 77.
- [83] A. Dreger, O. Kharwb, O. Agoglitta, E. F. Bülbül, J. Melesina, W. Sippl, R. Holl, *ChemMedChem* **2019**, *14*, 871.
- [84] M. Löppenber, H. Müller, C. Pulina, A. Oddo, M. Teese, J. Jose, R. Holl, *Organic & biomolecular chemistry* **2013**, *11*, 6056.
- [85] G. Tangherlini, T. Torregrossa, O. Agoglitta, J. Köhler, J. Melesina, W. Sippl, R. Holl, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2016**, *24*, 1032.
- [86] M. Szermerski, J. Melesina, K. Wichapong, M. Löppenber, J. Jose, W. Sippl, R. Holl, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2014**, *22*, 1016.
- [87] a) A. Oddo, R. Holl, *Carbohydrate Research* **2012**, *359*, 59; b) S. K. Jana, M. Löppenber, C. G. Daniliuc, J. Jose, R. Holl, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 9434.
- [88] H. Müller, V. Gabrielli, O. Agoglitta, R. Holl, *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *110*, 340.
- [89] D. V. Kalinin, O. Agoglitta, H. van de Vyver, J. Melesina, S. Wagner, B. Riemann, M. Schäfers, W. Sippl, B. Löffler, R. Holl, *Bioorganic & medicinal chemistry* **2019**, *27*, 1997.
- [90] O. Agoglitta, *Dissertation*, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Münster, **2021**.
- [91] S. A. Hyland, S. S. Eveland, M. S. Anderson, *Journal of bacteriology* **1997**, *179*, 2029.
- [92] M. R. Hale, P. Hill, S. Lahiri, M. D. Miller, P. Ross, R. Alm, N. Gao, A. Kutschke, M. Johnstone, B. Prince et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 2362.
- [93] W. Han, X. Ma, C. J. Balibar, C. M. Baxter Rath, B. Benton, A. Bermingham, F. Casey, B. Chie-Leon, M.-K. Cho, A. O. Frank et al., *Journal of the American Chemical Society* **2020**, *142*, 4445.
- [94] J. B. Fitzgerald, B. Schoeberl, U. B. Nielsen, P. K. Sorger, *Nat Chem Biol* **2006**, *2*, 458.
- [95] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Biochemie*, 4. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, **2011**.
- [96] S. G. Wicha, C. Chen, O. Clewe, U. S. H. Simonsson, *Nat Commun* **2017**, *8*, 2129.
- [97] R. A. Pearson, S. G. Wicha, M. Okour, *Journal of clinical pharmacology* **2023**, *63*, 151.

8 Anhang

8.1 Sicherheitsdatenblatt

Tabelle 102: Verwendete Chemikalien inklusive ihrer Gefahrenpiktogramme sowie H- und P-Sätze.

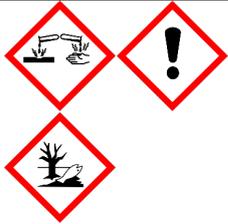
	Gefahrenpiktogramm	H-Sätze	P-Sätze
Acetonitril	 Gefahr	225, 302+312+332, 319	210, 280, 305+351+338, 403+235
Acrylamid-Bisacrylamidlösung (37.5:1)	 Gefahr	302, 315, 317, 319, 340, 350, 361f, 372	201, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338, 308+313
Agar-Agar	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Ammoniumformiat	 Achtung	319	280, 302+352, 305+351+338
Ammoniumperoxodisulfat	 Gefahr	272, 302, 315, 317, 319, 334, 335	261, 280, 302+352, 305+351+338, 332+313, 337+313
Benzamidin-Hydrochlorid	 Achtung	315, 319, 335	261, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 312
Biotin	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Bis-Tris	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Brij® 35	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Bromphenolblau-Natriumsalz	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Calciumchlorid	 Achtung	319	280, 305+351+338, 337+313
Carbenicillin-Dinatriumsalz	 Gefahr	317, 334	272, 280, 302+352, 333+313, 342+311

Cefotaxim-Natriumsalz	 Gefahr	317, 334	261, 280, 342+311
Columbia-Agar	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Coomassie Brilliant Blue G-250	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Dikaliumhydrogenphosphat	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Dimethylsulfoxid	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
1,4-Dithiothreitol	 Achtung	302, 315, 319, 335, 421	260, 280, 305+351+338, 337+313
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz-Dihydrat	  Achtung	332, 373	260, 314
Essigsäure	  Gefahr	226, 314	210, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Ethanol	  Gefahr	225, 319	210, 233, 305+351+338
Ethanolamin	  Gefahr	302+312+332, 314, 335	280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 310
Ethyl(dimethylaminopropyl)- carbodiimid Hydrochlorid	   Gefahr	302, 311, 315, 317, 373, 410	273, 280, 301+312, 302+352, 305+351+338
Gentamicin-Sulfat	 Gefahr	317, 334	261, 272, 280, 284, 302+352, 333+313
Glucosamin-Hydrochlorid	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
D-Glucose	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		

Glycerol	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Glycin	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Guanidin-Hydrochlorid	 Achtung	302+332, 315, 319	260, 280, 302+352, 305+351+338
Hefeextrakt	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Hepes	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
2-Iodanilin	 Achtung	315, 319, 335	261, 264, 271, 280, 302+352, 305+351+338
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Isopropanol	  Gefahr	225, 319, 336	210, 233, 305+351+338
Kanamycin A-Sulfat	 Gefahr	360D	260, 308+313
Kaliumchlorid	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Kaliumdihydrogenphosphat	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Linezolid (ZYVOX)	 Gefahr	373	260, 314, 501
Magnesiumchlorid	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Methanol	   Gefahr	225, 301+311+331, 370	210, 270, 280, 303+361+353, 304+340, 308+311

2-Mercaptoethanol		301+331, 310, 315, 317, 318, 373, 410	273, 280, 302+352, 304+340, 305+351+338, 310
	Gefahr		
Morpholinoethansulfonsäure	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Morpholinoethansulfonsäure Natriumsalz	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Moxifloxacin-Hydrochlorid		302, 319, 412	264, 270, 273, 280, 301+312, 305+351+338
	Achtung		
Müller Hinton II	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Natriumacetat	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Natriumchlorid	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Natriumhydroxid		290, 314	233, 280, 303+361+353, 305+351+338, 310
	Gefahr		
Natriumhypochloritlösung (5–10% Cl)		290, 314, 410	273, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
	Gefahr		
Natriumtetraborat-Decahydrat		319, 360FD	201, 305+351+338, 308+313
	Gefahr		
N-Hydroxysuccinimid	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
o-Phthaldialdehyd		301, 314, 317, 335, 410	273, 280, 301+330+331, 302+352, 305+351+338, 310
	Gefahr		
PageRuler Unstained Protein Ladder	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Phe-Arg-β-Naphthylamid-Hydrochlorid	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		

Phenylmethylsulfonylfluorid	 Gefahr	301, 314	280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Salzsäure	 Gefahr	290, 314, 335	280, 303+361+353, 304+340, 305+351+338, 310
Sodiumdodecylsulfat	 Gefahr	228, 302+332, 315, 318, 335, 412	210, 261, 280, 302+352, 305+351+338, 312
<i>N,N,N',N'</i> - Tetramethylethylendiamin	 Gefahr	225, 302+332, 314	210, 280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Tris-(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid	 Gefahr	314	280, 301+330+331, 303+361+353, 305+351+338, 310
Tris(hydroxymethyl)methylamin	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Triton® X-100	 Gefahr	302, 318, 411	270, 273, 280, 305+351+338, 310
Trypton	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Tween® 20	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
UDP-3- <i>O</i> -[(<i>R</i>)-3- Hydroxymyristoyl]-GlcNAc	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
UDP-3- <i>O</i> -[(<i>R</i>)-3- Hydroxymyristoyl]-GlcNAc Dinatriumsalz	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		
Wasser	Kein gefährlicher Stoff nach der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008.		

Zinkchlorid	 Gefahr	302, 314, 335, 410	260, 273, 280, 302+352, 305+351+338, 310
Zinksulfat	 Gefahr	302, 318, 410	264, 270, 273, 280, 301+312, 305+351+338

8.2 KMR-Verzeichnis

Tabelle 103: Verwendete KMR-Stoffe inklusive CAS-Nummer und Einordnung in die entsprechende Kategorie.

CAS-Nummer	Stoffname	Kategorie
79-06-1	Acrylamid	K1B, M1B
110-26-9	Bisacrylamid	K1B, M1B
25389-94-0	Kanamycin A-Sulfat	R1B
1303-96-4	Natriumtetraborat-Decahydrat	R1B

8.3 Rohdaten der standardmäßig durchgeführten biologischen Testung

	Hemmhof [mm]		MHK [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$]		IC_{50} [Einheit]	
	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> D22	<i>E. coli</i> LpxC C63A	Assay
10	15, 18, 18, 19	26, 29, 30, 30	16, 16, 8	0.5, ≤ 0.5 , > 0.25	1.08, 1.30, 0.938	μM (1)
18	20, 21	31, 32	n.b.	n.b.	28.1, 19.5, 17.7	μM (1)
19	18, 20, 21	28, 29, 31	≤ 2 , 2, ≤ 1 , 1	≤ 0.031 , 0.031, 0.031	96.5, 84.3, 80.0, 75.7	nM (1)
<i>ent-19</i>	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	12, 13, 14, 14	> 64 , > 64 , > 64	4, 4, 4	13.7, 11.3	μM (1)
28	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	≤ 6 , ≤ 6 , 7	> 64 , > 64 , > 64	> 64 , > 64 , > 64	> 50	μM (2)
29	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	≤ 6 , ≤ 6 , $\leq 6-8$	> 64 , > 64 , > 64	> 64 , > 64 , > 64	> 50	μM (2)
30	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	8, 9, 10, 10	> 64 , > 64 , > 64	> 64 , 64, 64	> 50	μM (2)
31	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	≤ 6 , ≤ 6 , 7	> 64 , > 64 , > 64	> 64 , > 64 , > 64	> 50	μM (2)
<i>ent-31</i>	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	≤ 6 , ≤ 6 , 8	> 64 , > 64 , > 64	> 64 , > 64 , > 64	> 50	μM (2)
32	7, 8, 8	8, 9, 10	64, 64, 64	64, 64, 64	> 50	μM (2)
<i>ent-32</i>	7, 8, 9	7, 8, 9	64, 64, 64	64, 64, 64	> 50	μM (2)
33	≤ 6 , ≤ 6 , 7	7, 8, 9	> 64 , > 64 , > 64	> 64 , > 64 , > 64	> 50	μM (2)
34	≤ 6 , ≤ 6 , 8, 8	17, 17, 18, 19	> 64 , > 64 , > 64	16, ≤ 16 , > 8	55.3, 19.6	μM (2)
35	8, 8, 9	19, 20, 21	> 64 , > 64 , > 64	32–16, 16, ≤ 16	> 50	μM (1)
36	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	≤ 6 , ≤ 6 , 7, 8	> 64 , > 64 , > 64	> 64 , > 64 , > 64	> 50	μM (1)
37	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	> 32 , > 32 , > 32	> 32 , > 32 , > 32	> 50	μM (1)
38	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	9, 9, 9	> 64 , > 64 , > 64	> 64 , 32, 32, 32–16, ≤ 16	> 50	μM (1)
39	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	7, 8, 8	> 32 , > 32 , > 32	> 64 , 16, 16, 16, ≤ 16	> 50	μM (1)
40	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6 , $\leq 6-8$	> 64 , > 64 , > 64	64, ≤ 64 , 32, ≤ 32	> 50	μM (1)
41	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	> 16 , > 16 , > 16	> 16 , > 16 , > 16	> 50	μM (1)
42	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	> 16 , > 16 , > 16	> 16 , > 16 , > 16	> 50	μM (1)
43	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	> 16 , > 16 , > 16	> 16 , > 16 , > 16	> 50	μM (1)
44	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	≤ 6 , ≤ 6 , ≤ 6	> 16 , > 16 , > 16	> 16 , > 16 , > 16	> 50	μM (1)

45	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>16, >16, >16	>16, >16, >16	>50	μM	(1)
46	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, 7	>16, >16, >16	>16, >16, >16	>50	μM	(1)
47	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>64, >64, >64	>64, >64, >64	>50	μM	(1)
48	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>16, >16, >16	>16, >16, >16	>50	μM	(1)
49	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>16, >16, >16	>16, >16, >16	>50	μM	(1)
50	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>16, >16, >16	>16, >16, >16	>50	μM	(1)
51	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>16, >16, >16	>16, >16, >16	>50	μM	(1)
52	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>64, >64, >64	>32, >32, ≤32	>50	μM	(1)
53	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>32, >32, >32	>32, >32, >32	>50	μM	(1)
54	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>32, >32, >32	>32, >32, >32	>50	μM	(1)
55	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>64, >64, >64	>64, >64, >64	>50	μM	(1)
56	≤6, ≤6, ≤6	10, 12, 12	>32, >32, >32	32, 32, ≤32	>50	μM	(1)
58	14, 15, 15, 18	30, 30, >30	64, 64, 64–32, 32, 32	8, 2, 2, ≤2	38.0, 23.9, 22.0	μM	(1)
59	13, 15, 16, 16	20, 21, 24, 24	>64, >64, >64	16, 16, 8, 4, 4	64.7, 41.6, 27.0, 21.1	μM	(1)
<i>ent-59</i>	≤6, ≤6, ≤6	9, 11, 11	>64, >64, >64	>64, 64, 64, 32	193, 130, 129	μM	(1)
61	12, 12, 13, 16	25, 27, 28	64, 64, 64–32, 64–32, 32	8, 4, 4	129, 64.3, 41.9	μM	(1)
62	9, 9, 13, 13	15, 15, 19, 21	>64, >64, >64	64, 32, 32	192, 150, 135, 121	μM	(1)
<i>ent-62</i>	9, 9, 12	16, 19, 20	>64, >64, >64	64, 64–16, 32, 32	229, 199, 129	μM	(1)
63	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	139, 134, 111	μM	(1)
64	≤6, ≤6, ≤6	7, 9, 10	>64, >64, >64	16–8, 8, 8	295, 226, 179, 164, 107	μM	(1)
<i>ent-64</i>	≤6, ≤6, ≤6	14, 15, 15	>64, >64, >64	32, 32, 32	>200, >200, >200	μM	(1)
65	17, 18, 19	24, 25, 27	64, 64, >32, 32	4, 2, 2, 2–1	45.3, 27.8, 15.3, 6.43	μM	(1)
<i>ent-65</i>	9, 10, 11, 11	19, 19, 20, 22	>64, >64, 64	8–4, 4, 4	73.3, 55.4, 40.3	μM	(1)
66	10, 10, 11	18, 19, 19, 20	>64, >64, 64	16, 16, 16, 16	>200, >200, >200	μM	(1)
<i>ent-66</i>	≤6, ≤6, ≤6	19, 19, 21	>64, >64, >64	32, 32, 32	>200, >200, >200	μM	(1)
67	22, 22, 22, 23, 23	28, 30, 31, 33	16, ≤16, 8, 8, 4	2, ≤2, 1, 1, >0.5, 0.5	1.01, 0.977, 0.975	μM	(1)
68	16, 17, 19, 21, 22	28, 29, 29, 34	32, 16, 16, 16, 16, 16	2, ≤2, 2–1, 2–1, >0.5, 0.5	1.63, 1.17, 0.788, 0.758	μM	(1)

69	≤6, ≤6, ≤6	19, 21, 23	>64, >64, >64	16, 16, 8	<200, >200, >200, >20	μM	(1)
70	11, 13, 14	25, 27, 27	64, 64, 64–32, 32	≤16, 8, 8, 8, 2	422, 301, 248	nM	(2)
71	≤6, ≤6, ≤6	8, 9, 10	>64, >64, >64	>64, >64, >64	40.6, 30.8, 30.7	μM	(2)
72	≤6, ≤6, ≤6	15, 18, 19	>64, >64, >64	64, 64, 32	1.32, 1.11, 1.03	μM	(2)
73	≤6, ≤6, ≤6	16, 17, 18	>64, >64, >64	64, 32, 32	4.95, 4.30, 4.29	μM	(2)
76	11, 13, 16, 16	21, 22, 23	32–16, 16, 16	1, ≤0.5, 0.5, 0.5	<30.0, 10.5, 10.1, >3.00	μM	(1)
77	8, 9, 10, 13	18, 19, 20	>64, >64, >64	4, 4, 4–2, 2	72.0, 50.5, 49.6	μM	(1)
81	14, 15, 15	21, 22, 25, 25	64, 64, 64	8, 4, 2	9.69, 9.02, 8.85	μM	(1)
82	10, 11, 13	23, 24, 27	32, 16, 16	1, 0.5, 0.5	5.79, 4.45, 4.43	μM	(1)
83	7, 9, 10	18, 20, 21	>64, >64, 64	8–4, 2, 2, 2	38.5, 24.2, 22.8	μM	(1)
84	8, 9, 10	18, 19, 19	>64, >64, 64	8, 2, 2, 2	13.6, 13.1, 9.54	μM	(1)
85	≤6, ≤6, ≤6	8, 9, 10	>64, >32, >32	8, 8, 1, 1, 1	61.5, 26.6, 19.6	μM	(1)
86	≤6, ≤6, ≤6	11, 11, 13	>64, >64, 64	2, 1, 1	4.57, 4.26, 3.04	μM	(1)
87	≤6, ≤6, ≤6	12, 12, 13	>64, >64, 64	16, ≤8, 8	26.8, 25.1, 24.5	μM	(1)
88	≤6, 7, 7	14, 16, 16	>64, >64, 64	4, 4, 4	13.2, 9.46, 9.15	μM	(1)
89	≤6, ≤6, ≤6	11, 12, 14	>64, >64, 64	16, 16, 16, >4	>50, >50, >50	μM	(2)
90	≤6, ≤6, ≤6	10, 12, 12	>64, >64, 64	64, 64, 64	3.39, 2.32, 2.06	μM	(2)
91	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>64, >64, 64	>64, >64, 64	5.65, 5.52, 4.84	μM	(2)
92	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>64, >32, >32	16, 16, 16	>50, >50, >50	μM	(2)
93	≤6, ≤6, ≤6	8, 8, 9	>64, >64, 64	32, 32, 32	3.39, 3.01, 2.46	μM	(2)
94	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>64, >64, 64	>64, >64, >64	2.74, 2.24, 2.12	μM	(2)
95	19, 20, 21	27, 28, 29, 31	16, 8, 8, ≤4	0.5, ≤0.5, 0.25, 0.25	39.1, 12.2, 10.4	μM	(1)
<i>ent-95</i>	24, 24, 26, 27	29, >30, >30	2, 2, 2, ≤1	≤0.5, ≤0.063, 0.063	5.06, 2.53, 2.52	μM	(1)
96	12, 13, 14	22, 25, 26	16, 16, ≤16	≤2, 0.5, 0.5	47.3, 33.1, 28.2, >20	μM	(1)
<i>ent-96</i>	10, 10, 12	19, 19, 22	32, 32, 32	4, 4, 4	59.7, 51.0, 28.9, >20	μM	(1)
97	≤6, ≤6, ≤6	7, 7, 9	>16, >16, >16	16, 16, ≤16, >0.25	>20, >20, >20	μM	(1)
<i>ent-97</i>	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>16, >16, >16	>16, >16, >16	>20, >20, >20	μM	(1)

98	≤6, ≤6, ≤6	12, 15, 15, 17, 18	>32, >32, >32	0.5, 0.5, 0.5, 0.25	7.96, 3.68, 2.69	μM	(1)
<i>ent-98</i>	≤6, ≤6, ≤6	15, 15, 17	>64, >64, >64	4-2, 4-2, 2	33.7, 28.2, 23.7	μM	(1)
99	14, 16, 17	25, 25, 27, 28	8, 8, 8	0.25, 0.125, 0.125	1.76, 1.24, 0.867, 0.819	μM	(1)
<i>ent-99</i>	9, 10, 10	16, 18, 20	>64, >64, 64	4, 4, 4	29.7, 17.4, 13.5	μM	(1)
100	8, 9, 10	17, 20, 21, 21, 23	16, 16, 16-8, 16-4, 8	≤0.25, 0.125, 0.125	223, 192, 167	nM	(1)
<i>ent-100</i>	≤6, ≤6, ≤6	18, 19, 21	>32, 32, 32	0.5, 0.25, 0.25, 0.125	1.64, 1.55, 0.696, 0.620	μM	(1)
101	≤6, ≤6, ≤6	12, 12, 12	2, ≤2, >1	2, ≤2, >1	97.1, 61.6, 38.6	μM	(1)
<i>ent-101</i>	≤6, ≤6, 8	10, 10, 11	>64, >64, >64	4, 2, 2	197, 148, 122, 40.0	μM	(1)
102	10, 11, 11, 11, 12, 12	17, 19, 19, 20, 21, 21	4, 4, 4	0.125, 0.125, 0.063, 0.063	3.78, 1.91, 1.19, 0.522	μM	(1)
<i>ent-102</i>	7, 7, 9	13, 14, 15	>64, >64, >64	4, 2, 2	10.2, 8.90, 8.46	μM	(1)
103	7, 8, 8	17.5, 18, 18	>64, >64, 64	2, 1, 1	81.3, 28.0, 9.46	μM	(1)
<i>ent-103</i>	8, 8, 9, 9	11, 13, 14, 15	>64, >64, 64	4, 4, 2	8.15, 5.23, 4.24	μM	(1)
104	13, 14, 14, 15, 15, 15, 16, 17	24, 25, 25, 26, 26.5, 27, 27, 29	32, 16, 16	4, 1, 1, 1	18.2, 1.43, 0.976	μM	(1)
<i>ent-104</i>	≤6, ≤6, ≤6	19, 20, 20	>64, >64, >64	8, 8, 8	55.4, 39.1, 36.0	μM	(1)
105	≤6, 7, 7, 8	19.5, 20, 21	>64, >64, >32	>4, 8, 8	166, 103, 57.4	μM	(1)
<i>ent-105</i>	≤6, ≤6, 7	19, 20, 20	>64, >64, >64	16, 16, 16	34.0, 31.6, 15.5	μM	(1)
106	≤6, ≤6, ≤6	14, 14, 14, 18	>64, >64, >32	2, 1, 1	60.7, 36.2, 10.2	μM	(1)
107	12, 12, 13	12, 12, 13	64, >32, 32	≤2, 0.25, 0.25	597, 377, 325	nM	(1)
108	10, 11, 13	25, 26, 26	>32, 32-16, 16, 16	≤2, ≤0.5, 0.25, 0.25-0.125, 0.125, 0.125-0.063	16.6, 13.9, 7.11	μM	(1)
<i>ent-108</i>	8, 9, 11	13, 15, 15	>64, >64, >64, 32, 32	2, ≤2, 1, 1	8.43, 4.51, 2.76	μM	(1)
109	10, 12, 13	25, 27, 23	64, 32, 32	≤0.5, 0.25, 0.25, 0.125	2.14, 1.76, 1.43	μM	(1)
<i>ent-109</i>	≤6, ≤6, 8	12, 12, 13	>64, >64, >64, 32	4, 4, 4	33.0, 23.4, 10.9	μM	(1)
110	19, 20, 20, 21, 21, 24	>30, >30, 36	4, 4, 4	≤2, 0.125, 0.125, 0.063	2.15, 1.77, 1.31	μM	(1)
111	23, 23, 25	>30, >30, >30	8, 4, 4, 2	0.125, 0.063, 0.063	467, 457, 381	nM	(1)
112	17, 18, 19	26, 27, 29	32, 32, 32-16	0.5, 0.5, 0.25	534, 503, 493	nM	(1)

113	12, 13, 13	23, 25, 25	2, 2, ≤2, 1, 1, 0.5	≤2, 0.125, 0.125, 0.063, 0.063, ≤0.031, ≤0.031	26.9, 23.9, 20.7	nM	(1)
114	22, 22, 22	30, 34, 34, 35	32, 32, 16	0.5, 0.5, 0.5, 0.25, 0.25	13.0, 12.6, 7.87	μM	(1)
115	18, 18, 21	28, 29, 30	64, 32, 16	≤2, ≤2, 0.5, 0.5, 0.5	18.4, 12.3	μM	(1)
116	16, 16, 18	28, 28, 30	32, ≤32, 16, 16	0.25, 0.25, 0.25	26.3, 18.1, 14.4	μM	(1)
117	7, 8, 9	20, 22, 22, 24	>32, 32, 32	0.25, 0.25, 0.125, 0.125, 0.125	9.15, 7.90, 6.71	μM	(1)
118	≤6, ≤6, ≤6	16, 17, 17	>64, >64, >64	0.25, 0.25, ≤0.125	17.4, 10.2, 8.72	μM	(1)
119	≤6, ≤6, 8	18, 20, 21	>16, >16, >16	0.5, 0.25, 0.25	10.1, 7.54, 5.63	μM	(1)
120	≤6, ≤6, 7	20, 21, 21	>32, >32, 32	0.25, 0.125, 0.125	4.39, 4.12, 3.78	μM	(1)
121	6, 8, 8	19, 19, 20	>32, >32, >32	0.25–0.125, 0.25–0.125, 0.125	7.30, 6.86, 6.83	μM	(1)
122	≤6, 7, 8	19, 20.5, 21	>32, >32, >32	0.25, 0.25, 0.25	9.29, 7.75, 5.33	μM	(1)
123	≤6, ≤6, ≤6	18, 19, 20	>32, >32, 32	0.25, 0.25, 0.25	4.83, 4.80, 4.69	μM	(1)
124	≤6, ≤6, 7	20, 20, 21	>64, >64, >32	0.5, 0.5, 0.5	11.0, 9.43, 8.62	μM	(1)
125	7, 8, 10	23, 26, 26	>64, >64, >64	1, 1, 1	11.0, 10.4, 7.34	μM	(1)
126	≤6, ≤6, ≤6	18, 19, 19, 20	>16, >16, >16	0.25–0.125, 0.125, 0.125	9.30, 6.28, 4.68	μM	(1)
127	≤6, ≤6, ≤6	10, 11, 12, 14, 14	>16, >16, >16	>32, ≤8, ≤0.5, 0.5, 0.25, 0.25	9.02, 6.35, 5.43	μM	(1)
128	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, 7	>32, >32, >32	>4, >16, >16	>50, >50, >50	μM	(1)
129	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>16, >16, >16	>16, >16, >16	>50, >50, >50	μM	(1)
130	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>16, >16, >16	>16, >16, >16	>50, >50, >50	μM	(1)
131	≤6, 7, 7	14, 16, 16	>64, >64, >64	8, 4, 4	3.97, 3.77, 2.71	μM	(1)
132	≤6, ≤6, 8	18, 18, 19	>16, >16, >16	1, 1, 0.5	20.9, 18.9, 13.3	μM	(1)
133	≤6, 7, 8	19, 19, 20	>64, >64, >64	1, 0.5, 0.5	20.5, 15.7, 12.2	μM	(1)
134	20, 20.5, 22	26, 26, 27, 27, 29– 32, 31, 31, >30, >30	16, 16, 16	0.25–0.125, 0.125, 0.125	1.36, 0.822, 0.821	μM	(1)
135	≤6, ≤6, ≤6	7, 9, 11, 12, 13, 15	>32, >32, >32	0.125, 0.125, 0.125, ≤0.063, 0.063	>20, >20, >20	μM	(1)
<i>ent-135</i>	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>16, >16, >16	>16, >16, >16	>20, >20, >20	μM	(1)

136	≤6, ≤6, ≤6, 8, 8	17, 19, 19, 19, 21	>32, >32, >32	0.125, 0.125, 0.125, 0.063	376, 316, 289	nM	(1)
<i>ent-136</i>	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>16, >16, >16	>16, >16, >16	>20, >20, >20	μM	(1)
137	≤6, ≤6, ≤6	8, 9, 11	>32, >32, >32	0.5, 0.5, 0.25, 0.25, 0.125	3.69, 2.01, 1.94	μM	(1)
<i>ent-137</i>	≤6, ≤6, 7	≤6, ≤6, 7	>32, >32, >32	>32, >32, >32	>50, >20, >20	μM	(1)
138	≤6, ≤6, 7	13, 15, 18, 18	>32, >32, >32	0.5, 0.25, 0.25	3.43, 2.51	μM	(1)
<i>ent-138</i>	≤6, ≤6, 8	11, 13, 14	>16, >16, >16	8, 8, 8–2, 4	>50, >50, >50	μM	(1)
139	9, 10, 11, 11, 14, 14	28, 29, 30	>32, 32, 32	0.25, 0.25, 0.25–0.125	1.06, 0.963, 0.741	μM	(1)
<i>ent-139</i>	≤6, ≤6, ≤6	9, 11, 11	>64, >64, >64	64, 32, 32	55.4, 31.8	μM	(1)
140	19, 20, 21	27, 28, 29, 30, 31	≤16, ≤2, 2, 2	≤0.125, 0.063, ≤0.031, 0.031, 0.031, 0.016	81.6, 76.0, 66.0	nM	(1)
<i>ent-140</i>	≤6, ≤6, ≤6	11, 11, 13	>32, >32, >32	16, 16, 16	11.6, 9.06, 6.61	μM	(1)
141	18, 20, 21, 21, 22	28, 29, 29, >30, >30, >30	≤16, ≤8, 4, 4, ≤2	≤0.125, ≤0.031, ≤0.031, 0.031, 0.031	149, 121, 92.7	nM	(1)
142	9, 10, 11	22, 23, 24	8, 8, 8–4	0.125, 0.063, 0.063	1.17, 0.636, 0.252	μM	(1)
<i>ent-142</i>	≤6, ≤6, ≤6	8, 9, 10	>16, >16, >16	16, 16, 16	>50, >20	μM	(1)
143	23, 23, 24	31, 34, 35	4, 4, 4	0.063, 0.063, 0.063	832, 780, 686	nM	(1)
144	24, 25, 25	>30, 31–36, 35	8–2, 4, 4, ≤2	0.125, 0.063, 0.063	715, 625, 575	nM	(1)
145	10, 11, 13	23, 24, 24, 27	16–4, 8, ≤8	≤0.125, 0.125, 0.125, ≤0.063, ≤0.063, 0.063	834, 688, 494	nM	(1)
<i>ent-145</i>	≤6, ≤6, ≤6	8, 10, 11	>32, >32, >32	>32, 32, 16	37.6, 29.9	μM	(1)
148	12, 12, 13, 14, 14	25, 27, 27, 28, 30	64, 64, 64	≤2, 0.5, 0.5, 0.25	34.9, 22.6, 20.3, 9.60	μM	(1)
149	16, 17, 18, 21	>30 (34), >30 (30–32), >30 (32)	32, 32, >16, 16, 16	>30, >30, >30	32.4, 31.6, 27.7	μM	(1)
150	7, 7, 8	15, 16, 17	>16, >16, >8	≤1, ≤0.125, 0.063, 0.063, 0.032	3.83, 3.50, 2.15	μM	(1)
151	≤6, ≤6, ≤6	16, 18, 18, 20	>16, >16, >8	≤1, 0.25, 0.25, 0.125	4.93, 4.90	μM	(1)
152	7, 9, 10, 11	23, 25, 25	32, 32, 16	≤2, ≤0.25, 0.125, 0.063, 0.063	3.78, 3.37, 1.37	μM	(1)
153	≤6, ≤6, ≤6	20, 21, 21	>64, >64, >64	≤2, ≤0.25, 0.125, 0.125, 0.125	8.43, 4.99, 4.63	μM	(1)

154	≤6, ≤6, ≤6	17, 19, 19	>64, >64, >64	≤2, ≤0.25, 0.25, 0.125, 0.125, 0.063	7.54, 6.64, 4.77	μM	(1)
155	7, 9, 10	18, 18, 19	>8, 8, 8, 4	≤2, ≤0.25, 0.031, 0.031, 0.031	1.17, 0.458, 0.398, 0.188	μM	(1)
156	7, 8, 10	20, 21, 22, 24	16, 16, 16	≤2, ≤0.25, 0.25, 0.25, 0.125, 0.063	829, 660, 565	nM	(1)
157	≤6, ≤6, ≤6	18, 20, 20	>64, >64, >64	≤2, >1, 1, 1, 0.5	1.98, 1.52, 1.18	μM	(1)
158	≤6, ≤6, 7–8	15, 17, 18	>16, 16, 16, 16	≤2, 0.063, 0.063, 0.063	1.49, 1.07, 0.995	μM	(1)
160	≤6, ≤6, ≤6	≤6, ≤6, ≤6	>64, >64, >64	>64, >64, >16	>50	μM	(2)

(1) fluoreszenzbasierter LpxC-Enzymassay bei einer Substratkonzentration von 25 μM.

(2) massenbasierter LpxC-Enzymassay bei einer Substratkonzentration von 2.5 μM.

9 Danksagung

Zuletzt möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hierbei gilt mein erster und aufrichtiger Dank meinem Doktorvater, Professor Dr. Ralph Holl, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem spannenden und medizinisch relevanten Thema zu arbeiten. Hierbei hatte er immer ein offenes Ohr, war stets ansprechbar und stand für zahlreiche, konstruktive Diskussionen zur Verfügung. Zugleich bedanke mich neben dem immer wertvollen Feedback für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheiten in der Ausführung der wissenschaftlichen Arbeiten. Dies hat maßgeblich zu meiner persönlichen Entwicklung als Wissenschaftlerin beigetragen. Des Weiteren danke ich Professor Dr. Sebastian Wicha für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie die persönliche Betreuung im Rahmen der wissenschaftlichen Zusammenarbeit. Zusätzlich dazu möchte ich mich bei den weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission, Professorin Dr. Louisa Temme sowie Dr. Thomas Hackl bedanken.

Natürlich danke ich auch

- Sebastian Mielniczuk, der mir im Rahmen des Naturstoffchemie-Praktikums den Weg in die Arbeitsgruppe geebnet und mich damals noch synthetisch betreut hat, und bis zum Ende meiner Promotion treuer Wegbegleiter in der Arbeitsgruppe Holl war.
- Dr. Oriana Agoglitta, die meine Masterarbeit betreut und mich dort in das Aufgabengebiet der biologischen Testung eingeführt hat.
- Timothy Duewell sowie Frederick Wichter, deren Forschung auf meiner Arbeit aufgebaut hat, und die im Rahmen dieser Wissensweitergabe als Diskussionspartner auf Augenhöhe agierten und dabei noch einmal neuen und konstruktiven Input lieferten.
- Dr. Alexander Dreger und Timo Allen, die mich von Beginn an in dieser Arbeitsgruppe aufgenommen und willkommen geheißen haben.
- Daniel Harms-Pollak und Max Schwenk für das enge kollegiale Verhältnis, das Teilen und die Bewältigung von Frustration, die technische Unterstützung und grenzenlose Kreativität bei der Problemlösung sowie die unzähligen Momente abseits der Arbeit.
- Allen weiteren (ehemaligen) Arbeitsgruppenmitgliedern: Dr. André Behnk, Fabian Lüttchens, Ilona Grüneberg, Jan von Rönn, Dr. Michael Worlaku Klu, Patrick Myslinski, Stefan Wimmer und Dr. Tianyu Niu sowie allen Studierenden für die gemeinsame Zeit.
- Besonders hervorzuheben sind dabei die Praktikantinnen Laura Franzen, Laura Gauglitz und Yandra Rohde, die in ihren Forschungsprojekten wichtige wissenschaftliche Beiträge lieferten.
- Der Massenspektrometrischen Abteilung, insbesondere Dr. Maria Riedner und Gaby Graack, die mich bei sämtlichen LC-MS/MS-Messungen unterstützt hat.
- Julian Plaga (Cytiva), der mir die SPR-Technologie nahegebracht hat und später jederzeit bei Problemen mit dem Spektrometer oder Unklarheiten bei der Auswertung ansprechbar war, und Dr. Maximilian Britz für die Diskussion gegenseitiger Messergebnisse.
- Der Arbeitsgruppe Wicha, insbesondere Dr. Astrid Bröker und Dr. Lisa Amann, sowie der Arbeitsgruppe Heisig, insbesondere Gudrun Melles und Phillip Groth, für ihre Unterstützung im Rahmen von Kooperationsprojekten.
- Der Arbeitsgruppe Stark, deren Equipment und deren S1-Labor wir zu Beginn nutzen durften, insbesondere Lilia Marcinkiewicz.
- Professor Dr. Johannes Kirchmair sowie Professor Dr. Wolfgang Sippl, auf deren Forschungsergebnissen die virtuell identifizierten potentiellen Inhibitoren basierten.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Sofern im Zuge der Erstellung der vorliegenden Dissertationsschrift generative Künstliche Intelligenz (gKI) basierte elektronische Hilfsmittel verwendet wurden, versichere ich, dass meine eigene Leistung im Vordergrund stand und dass eine vollständige Dokumentation aller verwendeten Hilfsmittel gemäß der Guten wissenschaftlichen Praxis vorliegt. Ich trage die Verantwortung für eventuell durch die gKI generierte fehlerhafte oder verzerrte Inhalte, fehlerhafte Referenzen, Verstöße gegen das Datenschutz- und Urheberrecht oder Plagiate.

V. Hoff

Hamburg, 27.07.2024