

# Naturstoffbasierte Aminoepoxybenzochinone inhibieren das Wachstum verschiedener Serovare des Gram-negativen Krankheitserregers *Salmonella* durch Abschwächen der bakteriellen Stressabwehr

Franziska A. Mandl<sup>+</sup>, Volker C. Kirsch<sup>+</sup>, Ilke Ugur, Elena Kunold, Jan Vomacka, Christian Fetzer, Sabine Schneider, Klaus Richter, Thilo M. Fuchs, Iris Antes\* und Stephan A. Sieber\*

**Abstract:** Aufgrund ihrer undurchlässigeren Zellmembran und der damit verbundenen eingeschränkten Aufnahme von niedermolekularen Verbindungen stellen Gram-negative Bakterien eine große Herausforderung für die Entwicklung neuer Antibiotika dar. Hier wurden naturstoffbasierte Epoxycyclohexenone synthetisiert und deren antibiotische Aktivität gegen mehrere pathogene Bakterien untersucht. Eine dieser Verbindungen inhibierte das Wachstum von *Salmonella Typhimurium*, weswegen deren Zielenzyme mittels quantitativer chemischer Proteomik bestimmt wurden. Zwei dieser Enzyme konnten der bakteriellen Stressabwehr zugeordnet werden, und entsprechende Assays bestätigten eine erhöhte Anfälligkeit der mit der Sonde inkubierten Bakterien gegen reaktive Sauerstoffspezies. Die antibakterielle Aktivität der Sonde kann somit durch die parallele Inhibition dieser beiden Enzyme begründet werden, wodurch deutlich wird, dass Epoxycyclohexenone geeignete Naturstoffe zur Bekämpfung Gram-negativer Bakterien darstellen.

Die immer schnellere Ausbreitung von multiresistenten Bakterienstämmen stellt eine fundamentale Bedrohung für die menschliche Gesundheit dar. Während es noch einige wenige Reserveantibiotika gegen multiresistente Gram-positive Bakterienstämme gibt, sind vor allem nicht behandelbare, Gram-negative klinische Isolate ein akutes Problem.<sup>[1]</sup> Die größtenteils undurchlässige Zellmembran verhindert dabei die Aufnahme von niedermolekularen Arzneimitteln, was eine große Herausforderung für die Entwicklung neuer

Wirkstoffe darstellt.<sup>[2]</sup> Hierbei sind Infektionen, die von resistenten nichttyphoidalen Serovaren der Gattung *Salmonella* verursacht werden, besonders besorgniserregend.<sup>[3]</sup> In der Vergangenheit waren Naturstoffe, wie  $\beta$ -Lactame und Aminoglykoside, eine ergiebige Quelle für die Entdeckung neuer Antibiotika, wodurch die Entwicklung effektiver Wirkstoffe für die klinische Anwendung ermöglicht wurde. Allerdings adressiert die große Mehrheit der auf Naturstoffen basierenden antimikrobiell wirksamen Arzneistoffe nur eine begrenzte Zahl an zellulären Angriffsziele, wie etwa Proteine der Zellwand-, Protein- oder DNA-Biosynthese. Um nun das Problem der Resistenzentwicklung innerhalb dieser Zielenzyme zu umgehen, könnte die Suche nach weitestgehend strukturell unbekannten Naturstoffen und grundlegende Studien zur Aufdeckung ihrer Wirkmechanismen zusätzliche und demnach bisher nicht in Betracht gezogene zelluläre Stoffwechselwege aufdecken, was wiederum die Entwicklung neuer Arzneistoffe ermöglichen könnte. Aminoepoxycyclohexanone (AEC) stellen ein erstklassiges Beispiel solch privilegierter Strukturen dar, die in zahlreichen Naturstoffen vorkommen. Eine Unterklasse sind die Aminoepoxyhydroxycyclohexenone (AEHC), die entweder in der *ortho*(2)-Position (Typ I) oder der *meta*(5')-Position (Typ II) mit einer Aminogruppe substituiert sind. Beispiele hierfür sind LL-C10037a (**1**), Asukamycin (**2**), Epoxyquinomycin C (**3**) und Cetoniacyton (**4**). Diese strukturelle Vielfalt wird zudem durch die sehr ähnlichen Aminoepoxybenzochinone (AEBQ), im Folgenden Typ III genannt, ergänzt. Beispiele hierfür sind Epoxyquinomycin B (**5**) und G-7063-2 (**6**; Abbildung 1 A). Interessanterweise zeigen sowohl die AEHCs als auch die AEBQs eine validierte Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterienstämme.<sup>[4]</sup> Hierbei ist wichtig, dass nur das Vorhandensein einer intakten Epoxid-Einheit in Kombination mit dem Michael-Akzeptor zu einer antibakteriellen Aktivität dieser Substanzen führt, was wiederum darauf schließen lässt, dass die Alkylierung der aktiven Zentren der Enzyme ein wesentlicher Bestandteil des bis dato unbekannten Wirkmechanismus ist.<sup>[5]</sup> Deshalb wurden für dieses Projekt die antibiotische Aktivität und der zelluläre Wirkmechanismus strukturell verschiedener Aminoepoxycyclohexenone (I–III) mittels chemischer, biochemischer und proteomischer Methoden untersucht. Dabei konnten zwei Sonden mit antibiotischer Aktivität im niedrigen mikromolaren Bereich gegen *S. Typhimurium* identifiziert werden, die Enzyme adressieren, die für die bakterielle oxidative Stressantwort entscheidend sind. Darüber hinaus konnten die

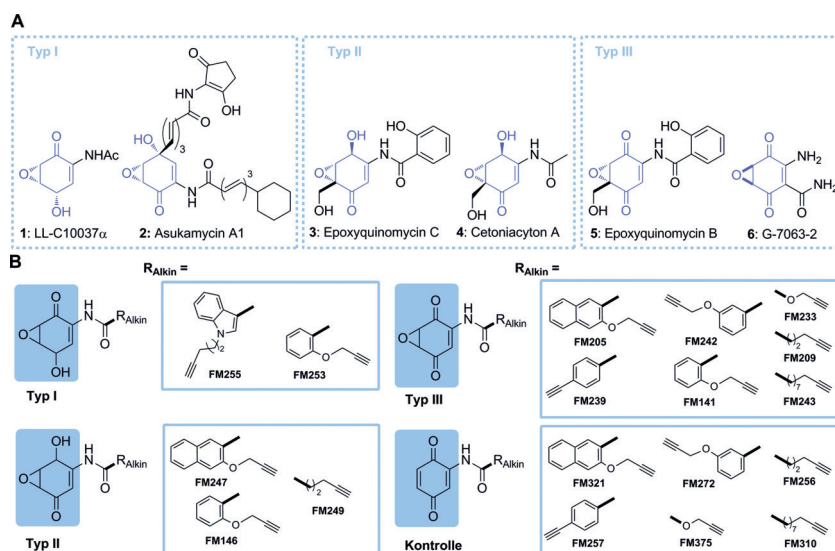
[\*] Dr. F. A. Mandl,<sup>[+]</sup> V. C. Kirsch,<sup>[+]</sup> E. Kunold, J. Vomacka, C. Fetzer, Dr. S. Schneider, Dr. K. Richter, Prof. Dr. S. A. Sieber  
Center for Integrated Protein Science, Department Chemie  
Technische Universität München  
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)  
E-Mail: stephan.sieber@tum.de

Dr. I. Ugur, Prof. Dr. I. Antes  
Center for Integrated Protein Science, Department für  
Biowissenschaften, Technische Universität München  
Erlenmeyer-Forum 8, 85354 Freising (Deutschland)  
E-Mail: antes@tum.de

Prof. Dr. T. M. Fuchs  
Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Zentralinstitut für Ernährungs-  
und Lebensmittelforschung, Technische Universität München  
Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising (Deutschland)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:  
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201607338> zu finden.



**Abbildung 1.** Einige Beispiele für natürliche Aminoepoxycyclohexenone: LL-C10037 $\alpha$  (1), Asukamycin A1 (2), Epoxyquinomycin C (3) und Cetoniacyton A (4), zugehörig zu Unterklasse der AEHCs (Typ I–II). Epoxyquinomycin B (5) und G-7063-702 (6), sind der Unterklasse AEBQ (Typ III) zuzuordnen.<sup>[4,8]</sup> B) Struktur der unterschiedlichen Typ-I- bis Typ-III-Aminoepoxycyclohexenon-ABPP-Sonden und deren entsprechende Kontrollsubstanzen, ohne Epoxid-Einheit (Kontrolle).

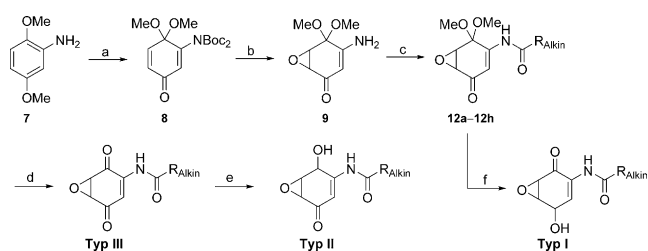
Struktur und die Funktion eines bisher nicht charakterisierten Zielenzymes bestimmt werden und so Einblicke in den Wirkmechanismus der Aminoepoxycyclohexenone erhalten werden.

Um die Bioaktivität und zellulären Angriffsziele der Aminoepoxycyclohexenone I–III aufzudecken, wurde zunächst eine Reihe von Molekülen mit verschiedenen aliphatischen und aromatischen Seitenketten synthetisiert, die zusätzlich mit einer Alkin-Einheit versehen wurden (Abbildung 1B), um die Zielenzyme mittels Huisgen/Sharpless/Meldal-Cycloaddition („Click-Chemie“, CC) identifizieren zu können.<sup>[6]</sup> Zusätzlich synthetisierte Aminobenzochinone, denen die entscheidende Epoxid-Einheit fehlt, fungierten als Kontrollsubstanzen für alle zellulären und proteomischen Experimente. Die Synthese der Sonden basierte auf etablierten Vorschriften,<sup>[7]</sup> mit einer oxidativen Dearomatisierung von Boc-geschütztem 2,5-Dimethoxyanilin (7) mittels Iodbenzylidipivalinat (a) im ersten Schritt, gefolgt von einer Epoxidierung im basischen Medium mit wässriger Wasserstoffperoxid-Lösung und anschließender Entschützung der Boc-Einheit mittels Trifluoressigsäure (b). Das Schlüssel-Fragment, bestehend aus Michael-Akzeptor und Epoxid-Einheit (9) wurde nun an verschiedenste Säuren oder Säurechloride, die wiederum mit dem Alkin-Tag versehen sind, über eine Amid-Bindung gekoppelt (siehe die Hintergrundinformationen, Kapitel SI 9.1). Die Entschützung der Acetalfunktion in den Chinonen (12a–12h) mit Bortrifluorid-Diethyletherat ergab dann die Typ-III-AEBQs, und durch eine anschließende Reduktion konnten so schließlich die Typ-II-AEHCs erhalten werden. Durch Umkehr der letzten beiden Stufen (d,e) erhielt man wiederum Zugang zu den Typ-I-AEHCs (f; Schema 1). Die Benzochinon-Analoga ohne die Epoxidereinheit (Kontrolle, Abbildung 1B) dienen als Referenzsubstanzen für phänotypische Studien und Mar-

kierungsexperimente (Schema S1, Tabelle S1). Vor der proteomischen Bestimmung der Zielenzyme wurden alle Verbindungen auf ihre wachstumshemmende Wirkung gegen 16 verschiedenen Bakterienstämme, einschließlich wichtiger Krankheitserreger wie *S. aureus*, multiresistenter *S. aureus* (MRSA) und *S. Typhimurium*, getestet (Tabelle S2).

Interessanterweise inhibierten die Typ-III-AEBQs **FM205** und **FM243**, genauso wie Typ-I-AECH **FM255** das Bakterienwachstum der Gram-positiven Bakterienstämme, einschließlich MRSA, mit einer minimalen Inhibitorkonzentration (MIC) von 10  $\mu\text{M}$ . Dagegen konnte für die Acetalgeschützten Analoga dieser Sonden keine wachstumshemmende Wirkung (bis zu einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$ ) festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass die Carbonyl- oder die reduzierte Hydroxygruppe wesentlich für die antibakterielle Wirkung dieser Substanzen sind. Bemerkenswerterweise inhibierten die AEBQs **FM233** und **FM233** das Wachstum der

Gram-negativen Bakterien *S. Typhimurium* LT2 und TA100 sowie auch *S. enteritidis* mit einer MIC im Bereich von 30  $\mu\text{M}$ , wohingegen die Kontrollsubstanzen ohne die Epoxid-Einheit keinen Effekt auf das Wachstum der Bakterien hatte (Abbildung 1B, Schema S1). Gleichzeitig wies **FM233** nur eine geringe Toxizität gegen A549-Zellen (weniger als 15 % apoptotische Zellen) bis zu einer getesteten Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  auf (Abbildung S1). Da durch die Sonde allerdings die metabolische Aktivität der Zellen beeinträchtigt wird (Abbildung S2, Tabelle S3), wurde ein komplexeres und aussagekräftigeres Modell zur Evaluierung der Toxizität innerhalb eines lebenden Organismus herangezogen. Fadenwürmer der Gattung *Caenorhabditis elegans*<sup>[9]</sup> tolerierten dabei sehr hohe Dosen sowohl der Sonde **FM233** als auch von deren inaktiver Kontrollsubstanz **FM375** (höchste getestete Konzentration 500  $\mu\text{M}$ ) über einen Zeitraum von fünf Tagen ohne erkenn-



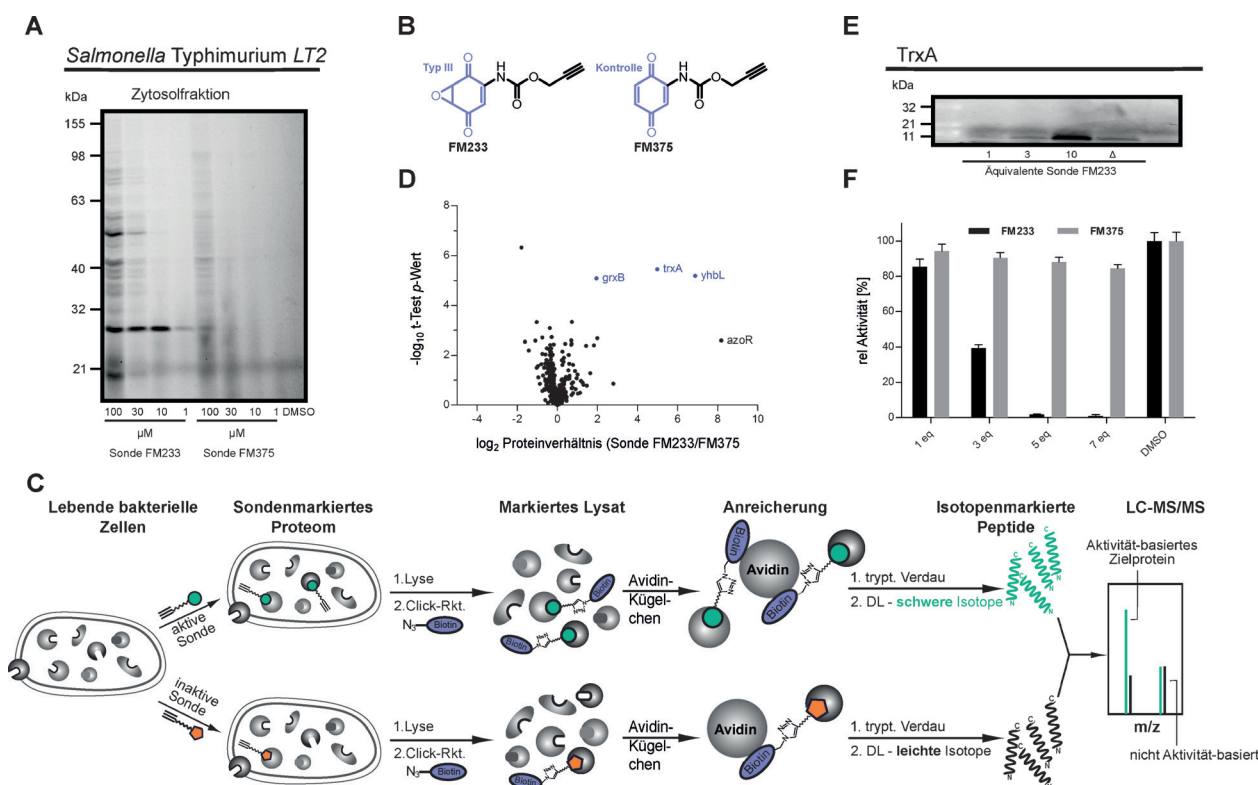
**Schema 1.** Synthese von Typ-I- und Typ-II-AEHCs und Typ-III-AEBQs:<sup>[7]</sup>

a) 1.  $\text{Boc}_2\text{O}$ , THF, 70°C, 16 h, 99%; 2. Iodobenzylidipivalinat, MeOH, 0°C  $\rightarrow$  RT, 16 h, 84%; 3.  $\text{Boc}_2\text{O}$ , THF, 70°C, 16 h, 68%; b) 1.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , NaOH, THF, RT, 16 h, 53%; 2. Trifluoressigsäure,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , RT, 2 h, 96%; c) synthetisierte Säuren und Säurechloride **11a–11e**, Lithium-*tert*-butoxid, THF,  $-10^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 4–16 h, 30%–73%; d)  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-20^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 14 h, 68%–93%; e)  $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ , MeOH, 0°C  $\rightarrow$  RT, 2 h, 53%; f) 1.  $\text{LiBHET}_3$ , THF,  $-78^\circ\text{C} \rightarrow \text{RT}$ , 3 h, 2. Montmorillonit K10,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , RT, 16 h, 70% über zwei Stufen.

bare Vergiftungserscheinungen oder Entwicklungsstörungen. Darüber hinaus bestätigte das Vorhandensein von Eiern und Larven des Stadiums L1 eine normale Fortpflanzung der Würmer, wohingegen die Inkubation mit Doxorubicin (100  $\mu\text{M}$ ) als Toxizitätskontrolle zu einem Wachstums- und Fortpflanzungsstopp führte (Abbildung S3). Während es sehr umfangreiche Studien zur Identifizierung der Zielenzyme von AEHCs und AEBQs in Humanzellen gibt, ist der Wirkmechanismus dieser Substanzen in Bakterien so gut wie nicht erforscht.<sup>[10]</sup> Um diesen Wirkmechanismus aufzuklären, wurden zunächst verschiedenen Gram-positive und Gram-negative Bakterienstämme mit den synthetisierten Sonden inkubiert und ein aktivitätsbasiertes Protein-Profilung (ABPP)<sup>[11]</sup> durchgeführt. Nach der Inkubation mit der Sonde wurden die Zellen lysiert, die Proteine durch Click-Cycloaddition an Rhodamin-Azid als Fluoreszenzreporter gebunden, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und schließlich alle markierten Proteine durch Fluoreszenzvisualisierung bildlich dargestellt (Abbildung 2A). Während das Markierungsmuster innerhalb der getesteten *S.-aureus*-Stämme sehr große Ähnlichkeiten in den markierten zytosolischen Proteinen, sichtbar als sehr präzise Banden, aufwies, konnten nach genauerer Betrachtung der markierten Proteine in den *Salmonella*-Stämmen auffallende Unterschiede zwischen den antibiotisch wirksamen AEBQs (FM239, FM233) und deren

inaktiven Kontrollsubstanzen ohne die Epoxid-Einheit (FM257, FM375) festgestellt werden (Abbildung S5). Die Sonde FM233 markiert beispielsweise einige Proteine (erkennbar zum Beispiel an der auffälligen Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ungefähr 30 kDa), die im Fall der inaktiven Kontrolle FM375 nicht markiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Epoxid-Einheit möglicherweise Enzyme adressiert, die für das Überleben der Bakterien essenziell sind (Abbildung 2A,B). Dagegen konnte mit diesen Sonden in den *S.-aureus*-Stämmen weder ein eindeutiges Markierungsmuster erkannt, noch eine wachstumshemmende Wirkung festgestellt werden, was wiederum auf einen spezifischen Wirkmechanismus hindeutet (Abbildung S6). Da es besonders in Gram-negativen Bakterien sehr schwierig ist, neue Angriffsziele für Antibiotika zu finden, wurden mit der Sonde FM233 im Folgenden detaillierte Analysen zur Aufdeckung des Wirkmechanismus der Substanz in *Salmonella Typhimurium* LT2 durchgeführt.

Zur quantitativen Bestimmung der Zielproteine wurden die Bakterienzellen zunächst entweder mit der aktiven Sonde FM233, deren inaktiver Kontrollsubstanz FM375 oder DMSO inkubiert, die Zellen anschließend lysiert, in lösliche und unlösliche Fraktion aufgetrennt, mittels Click-Reaktion an Biotin-Azid gebunden, durch Trypsin-Zugabe verdaut und die Peptide schließlich mittels „Dimethyl-Labeling“ (DL)



**Abbildung 2.** A) Fluoreszenzgel der In-situ-Markierung von *Salmonella Typhimurium* LT2 mit der bioaktiven Sonde FM233 und deren inaktiver Kontrollsubstanz FM375. B) Molekülstrukturen der verwendeten Sonden. C) Gelfreie quantitative Proteomikstudie basierend auf „Dimethyl-Labeling“. D) Anreicherungsanalyse dargestellt in einem Vulkandiagramm. Blaue Punkte entsprechen den Proteinen, die mit einer FDR von 0.01 statistisch signifikant angereichert sind. E) Validierung der Zielproteine durch konzentrationsabhängige Markierung von rekombinantem TrxA,  $\Delta T$ =hitzedeaktiviertes TrxA, markiert mit FM233 bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . F) Inhibition von TrxA durch FM233, verfolgt über die Reduktion von Insulindisulfid mittels eines turbidimetrischen Assays. Gezeigt sind zwei unabhängige, biologische Replikate, jeweils durchgeführt in Triplikaten, die Fehlerbalken repräsentieren dabei die Standardabweichungen der Mittelwerte.



unterschiedlich isotoopenmarkiert (Abbildung 2C). Die Proben wurden anschließend vereinigt und durch Flüssigkeitschromatographie-gekoppelte hochauflösende Massenspektrometrie analysiert. Dabei zeigten Proteine, die spezifisch an das Zielenzym gebunden haben, im Gegensatz zu unspezifisch angereicherten Proteinen, die auch in der DMSO-Kontrolle vorhanden sind, einen hohen Anreicherungsfaktor (Kriterium:  $\log_2 \geq 2$  und zudem statistisch signifikant (Students *t*-Test, Benjamini-Hochberg-FDR von 0.01)). Um nun gezielt die für die antibiotische Wirkung zuständigen Zielenzyme identifizieren zu können, wurden zusätzlich verschiedenen gelfreie Studien mit der inaktiven Kontrollsubstanz **FM375** (Abbildung 2D) durchgeführt, wodurch drei statistisch signifikant angereicherte Proteine innerhalb der löslichen Fraktion identifiziert werden konnten: Glutaredoxin 2 (GrxB), Thioredoxin-1 (TrxA) und das „Sigma cross-reacting Protein“ 27A (SCR-27A). Obwohl die FMN-abhängige Azoreduktase nicht das Signifikanzniveau der statistischen Auswertung erfüllt, ist es dennoch interessant zu erwähnen, dass dieses Protein ebenfalls als angereichertes Zielenzym identifiziert wurde. In seiner Funktion als Chinon-Reduktase schützt dieses Enzym Bakterienzellen vor Stress, der durch Chinon-Elektrophile verursacht wird,<sup>[12]</sup> da diese die Konzentration von niedermolekularen zellulären Thiolen reduzieren. Im Fall der unlöslichen Fraktion der Bakterienzellen konnten mit dieser Methode keine weiteren signifikant angereicherten Proteine als Zielenzyme der Sonde festgestellt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Sonde zum einen zellpermeabel ist und zudem hauptsächlich Zytosolproteine adressiert (Abbildung S8). Außerdem konnte die schon zuvor erwähnte charakteristische Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 30 kDa auch mittels gelbasierter MS-Experimente als SCR-27A bestimmt werden (Abbildung S9). Während die beiden anderen Zielenzyme GrxB und TrxA in Verbindung mit bakteriellen Redoxstoffwechselwegen gebracht werden können, ist über SCR-27A relativ wenig bekannt.<sup>[13]</sup> Um die Bindung der Sonde an diese drei Proteine weiter verifizieren und zudem den Wirkmechanismus der Substanz aufklären zu können, wurden diese im Anschluss überexprimiert, aufgereinigt und in verschiedenen Assays analysiert. Markierungsexperimente mit den drei rekombinanten Proteinen (SCR-27A, TrxA und GrxB) sowie In-situ-Markierungen innerhalb der jeweiligen Expressionsstämme bestätigten die kovalente Bindung der Sonde **FM233**, wohingegen die Kontrollsubstanz **FM375** in Übereinstimmung mit den durchgeführten proteomischen Studien nicht reaktiv war (Abbildung 2E, Abbildung S10–S14).

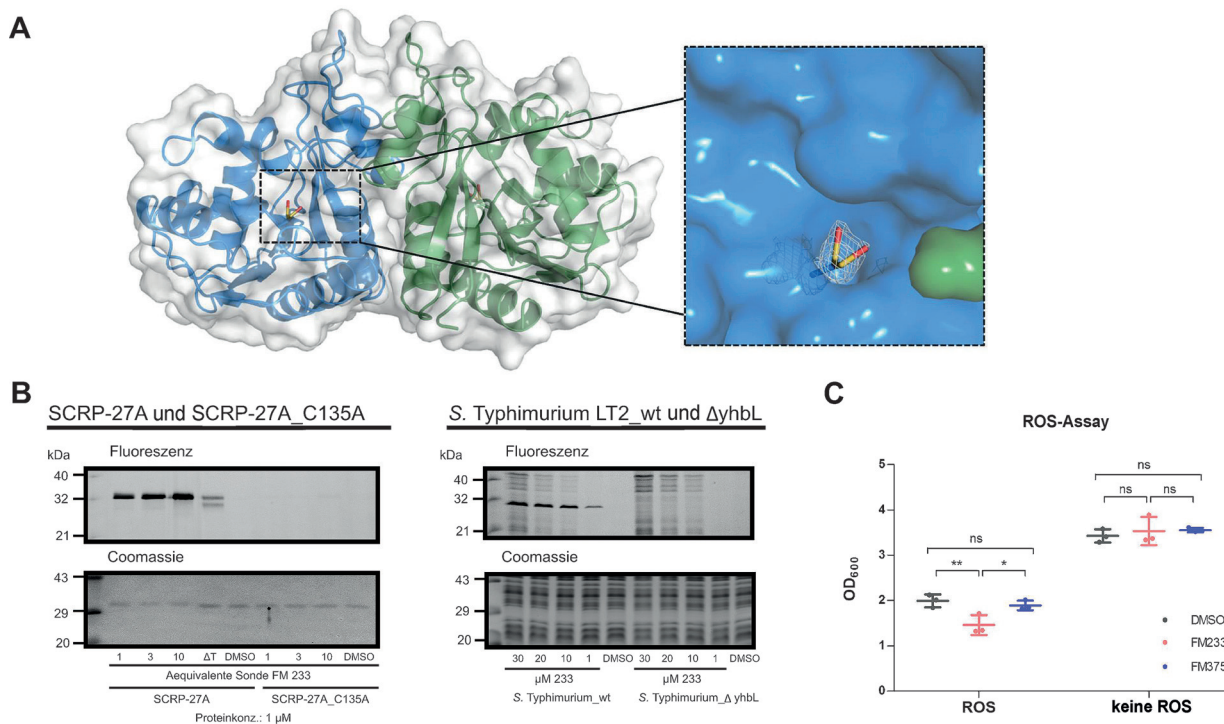
SCR-27A stellte sich als das herausforderndste der drei Proteine dar, da seine biologische Funktion noch völlig unbekannt ist. Es gehört zur DJ-1-Protein-Superfamilie<sup>[14]</sup> mit einer prognostizierten Cys-His-Glu-Triade, die charakteristisch für Amidotransferasen, Hydrolasen und Proteasen ist.<sup>[15]</sup> Um einen Einblick in den Wirkmechanismus zu erhalten, wurden röntgenkristallographische Experimente mit rekombinantem SCR-27A durchgeführt, woraufhin eine Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1.75 Å erhalten werden konnte (Abbildung 3A).<sup>[21]</sup> Interessanterweise konnte dabei ein freier Cys135-Rest in einer ausgeprägten Tasche des

Enzyms beobachtet werden, die bei Mitgliedern der DJ-1-Protein-Familie hoch konserviert ist.<sup>[15a]</sup> Um die Bedeutung dieses Restes für die Bindung der Sonde und den katalytischen Mechanismus zu untersuchen, wurde eine Punktmutante mittels ortsspezifischer Mutagenese (Cys135Ala, C135A) eingeführt. Fluoreszenz-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sowie massenspektrometrische Proteinvolllängenmessungen offenbarten – im Gegensatz zu rekombinantem Protein (wt) – eine fehlende Bindung der Sonde **FM233**, wodurch die Vermutung naheliegt, dass Cys135 eine wichtige Rolle in der Funktion von SCR-27A spielt (Abbildung 3B links, Abbildung S15, S16).

Um den katalytischen Wirkmechanismus genauer zu untersuchen, wurde die enzymatische Aktivität in verschiedenen Assays untersucht (Details siehe die Hintergrundinformationen). Interessanterweise zeigte das Protein nur in einem Esterase-Assay mit *p*-Nitrophenylacetat einen, wenn auch nur geringen Substratsatz, der bei der Mutante nicht existent und zudem durch Sonde **FM233** konzentrationsabhängig inhibierbar war (Abbildung S17). Um daraufhin die Bedeutung dieser möglichen Esterase auf die Überlebensfähigkeit der Bakterien zu testen, wurde eine unpolare Knockout-Mutante des *yhbL*-Gens (STM3327) in *S. Typhimurium* LT2 konstruiert. Da die entsprechende Bande nach Inkubation mit FM233 in dieser Mutante nicht detektiert werden konnte, wurde SCR-27A als Zielprotein der Sonde verifiziert. Des Weiteren konnte dadurch bestätigt werden, dass *yhbL* in der Tat SCR-27A kodiert. Da mit **FM233** in anschließenden Wachstumsassays in diesem Knockout-Stamm jedoch keine Veränderung bei der MIC festgestellt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Protein nicht direkt am antibakteriellen Wirkmechanismus beteiligt ist.

GrxB und TrxA sind gut charakterisierte Enzyme, die Redoxreaktionen von Cysteinseitenketten katalysieren und somit essentielle Funktionen in stressassoziierten Signalwegen innehaben.<sup>[13]</sup> Sie sind bedeutend für die Reaktivierung von Proteinen nach Oxidationsschäden. Zudem zeigen Bakterienstämme, denen Thioredoxin- und Glutaredoxin-Oxidoreduktasen fehlen, ein reduziertes Wachstum.<sup>[16]</sup> Diese Mechanismen suggerieren, dass unsere Verbindungen endogene Chinone imitieren und somit als Suizid-Inhibitoren für TrxA und GrxB fungieren. Diese Hypothese konnte durch Inhibitionsassays für beide Enzyme bestätigt werden. TrxA und GrxB, konnten jeweils nur durch die bioaktive Sonde **FM233** konzentrationsabhängig inhibiert werden, in Korrelation mit den Bioaktivitätsdaten jedoch nicht durch die inaktive Kontrollsubstanz **FM375** (Abbildung 2E, S18 und S19).

Obwohl aufgrund der schlechten Ionisierbarkeit des AEBQ-Strukturmotivs die Bindungsstelle nicht durch direkte MS/MS-Messungen identifiziert werden konnte, war es möglich, eine irreversible Modifizierung beider Enzyme (Abbildung S20) durch intakte Proteinvolllängenmessungen mittels MS-Analyse nachzuweisen. Des Weiteren wurde die Bindung von **FM233** an GrxB und TrxA durch molekulares Docking, gefolgt von Moleküldynamiksimulationen mittels QM/MM-Rechnungen, untersucht.<sup>[17]</sup> Darstellungen der Oberfläche von GrxB zeigen **FM233** dabei tief verankert in



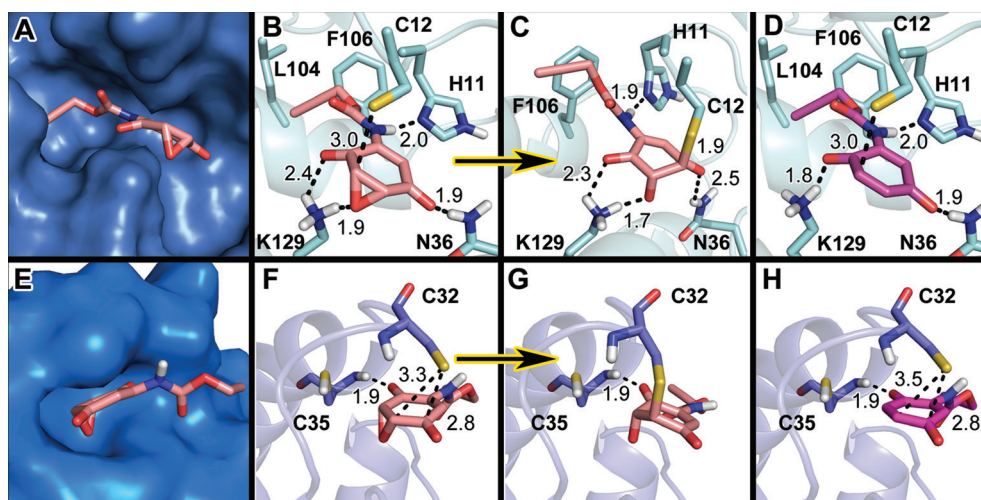
**Abbildung 3.** A) Kristallstruktur von SCR-27A in *S. Typhimurium*, bestimmt mit einer Auflösung von 1.75 Å.<sup>[21]</sup> Das Dimer (gezeigt als Bändermodell in grün und blau), überlagert mit dessen halbtransparent dargestellter Oberfläche, ergänzt durch die Darstellung der kristallographischen Symmetrie. Die Vergrößerung zeigt das prognostizierte aktive Zentrum des Enzyms Cys135, einschließlich der zugehörigen  $F_o - F_c$ -Differenz der Elektronendichte, 2 $\sigma$ -Konturniveau (graue Netzdarstellung). Cys135 kommt hierbei in zwei verschiedenen Konformationen vor und ist zudem wahrscheinlich zu Sulfensäure oxidiert.<sup>[18]</sup> B) Konzentrationsabhängige Markierung von **FM233** in SCR-27A und der SCR-C135A Mutante (links) sowie in *S. Typhimurium* LT2 und dem LT2- $\Delta yhbL$ -Knockout-Stamm bestätigte die kovalente Bindung von **FM233**. C) ROS-Assay mit der aktiven Sonde **FM233** und der inaktiven Sonde **FM375** [100  $\mu$ M] (ROS) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (keine ROS). ns = nicht signifikant; \* =  $p$ -Wert < 0.05; \*\* =  $p$ -Wert < 0.01.

einer Tasche des Enzyms (Abbildung 4A), stabilisiert durch mehrere Wasserstoffbrücken (Abbildung 4B). Dagegen fehlt der Kontrollsubstanz **FM375**, aufgrund der nicht vorhandenen Epoxid-Einheit, die wichtige Wechselwirkung mit Lys129, woraus eine 11 kcal mol<sup>-1</sup> niedrigere Wechselwirkungsenergie resultiert (Abbildung 4D, Tabelle S4). Eine ähnliche Differenz von 8 kcal mol<sup>-1</sup> wurde für die Bindung der aktiven und der inaktiven Sonden in TrxA (Abbildung 4F,H, Tabelle S4) ermittelt. Hierbei ist die Bindungstasche insgesamt stärker oberflächenexponiert und weist dadurch zugleich eine geringere Stabilisierung der Sonde auf, wodurch eine um 26 bis 30 kcal mol<sup>-1</sup> schwächere Wechselwirkung im Vergleich zur Bindung in GrxB (Abbildung 4E, Tabelle S4) resultiert. Basierend auf den durch QM/MM energetisch minimierten Strukturen, wurde die kovalente Bindung zwischen **FM233** und den redoxaktiven Cysteinen Cys12 und Cys32 von GrxB bzw. TrxA berechnet. Beide Nukleophile reagieren bereitwillig mit der elektrophilen Epoxid-Einheit in einer exothermen Reaktion (Abbildung 4C,G, Tabelle S4). MD-Simulationen für verschiedene gedockte Komplexe ergaben zudem eine bewegliche Position der Liganden innerhalb der Bindungstasche. Dies weist darauf hin, dass das aktive Zentrum durch seine partielle Oberflächenexposition die Diffusion der Liganden in das umgebende Solvens ermöglicht. Im Fall von **FM233** jedoch hält die stark exergonische kovalente Bindungsbildung die

Sonde stabil im Protein und führt so zu einer stabilen Inhibition.

Aufgrund dieser mechanistischen Validierung konnte schließlich der Einfluss von **FM233** auf den in den Bakterien verursachten oxidativen Stress mittels eines zellulären Assays, der den Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) untersucht, bestimmt werden (Abbildung 3C).<sup>[19]</sup> Interessanterweise wies unter ROS-Bedingungen nur **FM233**, und nicht das inaktive **FM375**, eine signifikante Verringerung der bakteriellen Überlebensfähigkeit im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf. Die antibiotische Wirkung von **FM233** stammt daher zu einem großen Teil von der negativen Regulierung der enzymatischen Stressantwort und der damit einhergehenden Sensibilisierung der Zellen für oxidativen Stress. Tatsächlich ist bekannt, dass Chinone durch ihren Abbau zu Semichinon-Radikalen die Bildung von ROS verursachen. Darüber hinaus führt die Chinon-vermittelte S-Alkylierung zur Aggregation von Proteinen und zudem zu einer Reduktion von Proteinen, die freie Thiolgruppen enthalten und daher wichtig für die zelluläre Homöostase sind.<sup>[20]</sup>

Zusammenfassend lassen sich AEHCs und AEBQs hinsichtlich ihrer spezifischen Reaktivität gegenüber nukleophilen Spezies als privilegierte Struktur motive diverser Naturstoffe bezeichnen. Bei Untersuchungen dieser Naturstoffklasse gegen diverse pathogene Bakterienstämme wurden einige Verbindungen, die sogar eine wachstumsinhibierende



**Abbildung 4.** QM/MM-minimierte Strukturen von FM233 in den Proteinbindetaschen: GrxB (A: Oberfläche, B: Bändermodell) und TrxA (E: Oberfläche, F: Bändermodell). Die kovalenten Komplexe, in denen FM233 in GrxB und TrxA an die Cysteine Cys12 bzw. Cys32 gebunden ist, sind in (C) bzw. (G) gezeigt. Die QM/MM-minimierten Strukturen der inaktiven Kontrollsubstanz FM375 in GrxB und TrxA sind unter (D) bzw. (H) zu sehen. Zur besseren Übersicht werden nur die relevanten Atome gezeigt, alle Abstände sind in [Å] angegeben.

Wirkung gegen so anspruchsvolle Pathogene wie *S. Typhimurium* aufweisen, entdeckt. Genauere Betrachtungen des Wirkmechanismus ergaben, dass die parallele Inhibition von Enzymen, die Teil der oxidativen Stressabwehr von Bakterien sind, einen Einfluss auf das Überleben der bakteriellen Zellen hat. Daher stellt die Inhibition von GrxB und TrxA durch Sonden, welche die von Naturstoffen abgeleitete Chinon-Struktur imitieren, einen interessanten Ansatz für die Entwicklung neuer antibakterieller Wirkstoffe dar.

## Danksagung

Dieses Forschungsprojekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, SFB749, CIPSM, FOR1406 und dem Fonds der chemischen Industrie gefördert. Wir danken Prof. Michael Groll für den Zugang zur Kristallisationseinrichtung und Fabian Koczian für seine Hilfe bei der Durchführung des FACS-Assays. Des Weiteren danken wir Astrid König, Katja Bäuml und Mona Wolff für die unterstützende Hilfe.

**Stichwörter:** Antibiotikaresistenzen · Gram-negative Bakterien · Kovalente Inhibitoren zur Wirkstoffentwicklung · Quantitative Proteomik · Stressabwehr

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 14852–14857  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 15074–15079

- [3] B. Swaminathan, P. Gerner-Smidt, T. Barrett, *Foodborne Pathog. Dis.* **2006**, 3, 154–156.
- [4] J. Marco-Contelles, M. T. Molina, S. Anjum, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 2857–2900.
- [5] J. U. N. Kohno, M. Nishio, K. Kawano, N. Nakanishi, S.-I. Suzuki, T. Uchida, S. Komatsubara, *J. Antibiot.* **1996**, 49, 1212–1220.
- [6] a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599; *Angew. Chem.* **2002**, 114, 2708–2711; b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064.
- [7] M. Hamada, Y. Niitsu, C. Hiraoka, I. Kozawa, T. Higashi, M. Shoji, K. Umegawa, T. Sugai, *Tetrahedron* **2010**, 66, 7083–7087.
- [8] R. Thiericke, A. Zeeck, A. Nakagawa, S. Omura, R. E. Herrold, S. T. S. Wu, J. M. Beale, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3979–3987.
- [9] M. C. K. Leung, P. L. Williams, A. Benedetto, C. Au, K. J. Helmcke, M. Aschner, J. N. Meyer, *Toxicol. Sci.* **2008**, 106, 5–28.
- [10] I. Sattler, R. Thiericke, A. Zeeck, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, 15, 221–240.
- [11] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3279–3301.
- [12] G. Liu, J. Zhou, Q. S. Fu, J. Wang, *J. Bacteriol.* **2009**, 191, 6394–6400.
- [13] W. A. Prinz, F. Åslund, A. Holmgren, J. Beckwith, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 15661–15667.
- [14] A. Derouaux, B. Wolf, C. Fraipont, E. Breukink, M. Nguyen-Distèche, M. Terrak, *J. Bacteriol.* **2008**, 190, 1831–1834.
- [15] a) Y. Wei, D. Ringe, M. A. Wilson, M. J. Ondrechen, *PLoS Comput. Biol.* **2007**, 3, e15; b) S.-J. Lee, S. J. Kim, I.-K. Kim, J. Ko, C.-S. Jeong, G.-H. Kim, C. Park, S.-O. Kang, P.-G. Suh, H.-S. Lee, S.-S. Cha, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 44552–44559.
- [16] a) R. Ortenberg, S. Gon, A. Porat, J. Beckwith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 7439–7444; b) C. Scharf, S. Riethdorf, H. Ernst, S. Engelmann, U. Völker, M. Hecker, *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 1869–1877.
- [17] I. Antes, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2010**, 78, 1084–1104.
- [18] C. Jacob, A. L. Holme, F. H. Fry, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1953–1956.
- [19] S. Ahuja, L. Rouge, D. L. Swem, J. Sudhamsu, P. Wu, S. J. Russell, M. K. Alexander, C. Tam, M. Nishiyama, M. A. Starovasnik, C. M. Koth, *Structure* **2015**, 23, 713–723.
- [20] H. Antelmann, J. D. Hellmann, *Antioxid. Redox Signaling* **2011**, 14, 1049–1063.
- [21] Die Kristallstruktur ist in der PDB-Datenbank unter der Nummer 5LIR hinterlegt (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/>).

- [1] a) J. M. Thomson, R. A. Bonomo, *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, 8, 518–524; b) A. L. Meyer, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2005**, 5, 490–494.
- [2] D. J. Payne, M. N. Gwynn, D. J. Holmes, D. L. Pompliano, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, 6, 29–40.

Eingegangen am 29. Juli 2016  
Online veröffentlicht am 26. Oktober 2016