

## **Schlussbericht (öffentliche Version)**

Zuwendungsempfänger: Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V. mit dem beteiligten Institut Fraunhofer-Institut für Translationale Medizin und Pharmakologie ITMP für den Standort Hamburg (nachfolgend ITMP)

Förderkennzeichen: 01DP21010

Vorhabenbezeichnung: Verbundprojekt: Neue Inhibitoren zur Adressierung von DXR in *Neisseria gonorrhoeae*, Teilvorhaben: Assay-Entwicklung und Screening (AP 1), Toxizitätstests (AP 3), Management, Training, Verbreitung (AP 4)

Laufzeit des Vorhabens: 01.10.2021 – 30.09.2024

Berichtszeitraum: 01.10.2021 – 30.09.2024

## I. Kurzbericht

### 1. Aufgabenstellung und wissenschaftlich-technischer Stand

Gonorrhö ist eine sexuell übertragbare Infektions-Krankheit, die durch das Bakterium *Neisseria gonorrhoeae* ausgelöst wird. Aufgrund der zunehmenden Antibiotika-Resistenzen von Neisserien wird die Behandlung der Erkrankung zunehmend schwieriger (Cole 2017, Buder 2018, Unemo 2019). Als Reaktion auf diese Entwicklung wird *N. gonorrhoeae* auf der WHO-Prioritätenliste für die Erforschung und Entwicklung neuer Antibiotika geführt (WHO 2017).

Ein vielversprechender Ansatz für einen neuen Wirkmechanismus von Antibiotika ist die Hemmung essenzieller biosynthetischer Stoffwechselwege, die im Menschen nicht vorkommen (Frank & Groll 2017). Einer dieser Stoffwechselwege ist der Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg), der für die Synthese von Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP) benötigt wird (Hunter 2007). DMAPP und IPP dienen als Vorläufer für die Synthese von Isoprenoiden, die für verschiedene zelluläre Prozesse benötigt werden. Aufgrund der Abwesenheit des MEP-Weges im Menschen stellt dieser einen attraktiven Angriffspunkt für neue Antibiotika dar (Wang & Dowd 2018). In diesem Projekt sollten neue Inhibitoren für eines der Enzyme des MEP-Weges (DXP-Reduktoisomerase, DXR) identifiziert werden. DXR katalysiert die Isomerisierung von 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphat (DXP) in 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphat (MEP). Fosmidomycin ist ein DXR-Inhibitor, der das Enzym aus verschiedenen Bakterien (*E. coli*, *M. tuberculosis*) und Parasiten (*P. falciparum*) (Knak 2022). Bislang sind Inhibitoren der DXR aus *N. gonorrhoeae* beschrieben worden.

Das Konsortium strebte die folgenden Ziele an:

- Ziel des Teilvorhabens Assay-Entwicklung und Screening (AP 1) ist die Identifizierung neuer Inhibitoren des *N. gonorrhoeae* Enzyms DXR mittels virtuellen und experimentellen Screening-Verfahren (Partner ITMP, YTU).
- Ziel des Teilvorhabens Toxizitätstests (AP 3) ist die Evaluation von identifizierten DXR-Inhibitoren hinsichtlich deren toxischen Potentials.
- Ziel des Teilvorhabens Management, Training, Verbreitung (AP 4) ist die Organisation der Durchführung der Arbeiten, der Anleitung von in dem Projekt involvierten Studenten und Doktoranden, sowie die Verbreitung der Ergebnisse.

### 2. Ablauf des Vorhabens

Die Projektdauer war auf 36 Monate veranschlagt. Die Laufzeit begann am 01.10.2021 und endete am 30.09.2024. Das Projekt konnte trotz der Corona-Pandemie durchgeführt werden.

Liste der Meilensteine:

#### Arbeitspaket 1

M1.1: Protein-Produktion, -Charakterisierung, -Validierung (Monat 4)

M1.2: Screening-Assay etabliert (M 8)

M1.3: Screen abgeschlossen und IC50-Werte für Hits bestimmt (M 12)

M1.4: Tests für Hit-Analoga durchgeführt (M 23)

#### Arbeitspaket 4

M4.1: Konsortialvereinbarung, Kick-Off-Meeting, Organisation von Telefonkonferenzen (M 1)

M4.2: Datenaustauschplattform und Datenmanagement-Plan etabliert (M2)

M4.3: Workshops in Deutschland, Thailand, Türkei (M 10, 20, 30)

M4.3: Abschlussbericht (M36)

### **3. Wesentliche Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen**

Im Arbeitspaket 1 (Assay-Entwicklung und Screening) wurde basierend auf dem vom türkischen Projektpartner zur Verfügung gestellten DXR-Protein ein hochdurchsatzfähiges biochemisches Testsystem zum Screening kleiner organischer Moleküle hinsichtlich einer Enzym-Inhibition etabliert. Dieser erlaubt das Screening nach DXR-Inhibitoren in 384-Well-Multititerplatten. Insgesamt wurden ca. 25.000 Substanzen hinsichtlich einer möglichen DXR-Inhibition in einem Primärscreen getestet und Dosis-Wirkungskurven für vielversprechende Substanzen generiert.

Im Arbeitspaket 3 (Toxizitätstests) sollten die in AP1 identifizierten DXR-Inhibitoren hinsichtlich möglicher toxischer Eigenschaften untersucht werden. Aufgrund der Verzögerungen bei der Proteinproduktion für das biochemische Testsystem konnten keine Substanzen in diesem Arbeitspaket untersucht werden.

Im Arbeitspaket 4 (Management, Training, Verbreitung) erfolgte das Projektmanagement. Hier lag der Fokus auf der Sicherstellung eines reibungslosen Projektablaufs und der Kommunikation zwischen den Projektteilnehmern aus Deutschland, Thailand und der Türkei. Zudem wurde ein wissenschaftlicher Workshop in Hamburg organisiert, an dem neben allen Konsortialpartnern auch externe Vortragende eingeladen wurden. Zudem wurde seitens des deutschen Projektpartners an Workshops in Bangkok und Istanbul teilgenommen.

Bei dem Vorhanden handelte es sich um ein Verbundprojekt mit der **Technischen Universität Yildiz** (Istanbul) und der **Mahidol University** (Bangkok, Thailand). Das Fraunhofer ITMP (Standort Hamburg) übernahm die Koordinationsfunktion für das Projekt. Für die Proteinproduktion wurde eine bestehende Kooperation mit der Protein Production Core Facility des **Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf** am **Centre for Structural Systems Biology** auf dem DESY-Campus in Hamburg genutzt

## II. Eingehende Darstellung

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

Zum einen sollte, basierend auf dem von der Technischen Universität Yildiz zu produzierendem Protein ein biochemischer Assay entwickelt werden. Zum anderen sollte der entwickelte Assay ans ITMP transferiert und dort genutzt werden um DXR-Inhibitoren zu identifizieren und deren Potential durch gemessene IC50-Werte einzuschätzen.

Aufgrund von unerwarteten Schwierigkeiten bei der Protein-Expression und -Aufreinigung auf Seiten des türkischen Partners verzögerte sich dieser Teil des Projektes erheblich.

Nach Vergleich der Ähnlichkeit der DXR-Proteine von *N. gonorrhoeae* und *E. coli* wurde durch seitens des Konsortiums entschieden, das *E. coli* DXR-Enzym als geeignetes Surrogat für die Entwicklung eines Testsystems zu nutzen. Für *E. coli* DXR wurde eine erfolgreiche Expression und Aufreinigung bereits publiziert und es sind Kristallstrukturen verfügbar. Die Sequenzidentität der Ligandenbindestelle im aktiven Zentrum der beiden Enzyme beträgt 100 %, daher ist zu erwarten, dass Inhibitoren des *E. coli*-Enzyms auch DXR in *N. gonorrhoeae* inhibieren. Trotzdem wurde parallel seitens des Partners YTU daran gearbeitet, *N. gonorrhoeae* DXR in entsprechenden Mengen zu produzieren,

Die Expression und Aufreinigung von *E. coli* DXR gelang sehr schnell und erste Aktivitätstests konnten Literaturwerte in Bezug auf Referenzinhibitoren und Enzymparameter bestätigen. Leider ergaben sich weitere Probleme was den Versand der Klone betraf, die das *E. coli* DXR-Protein exprimieren. Es wurde deshalb als Ausweichstrategie eine Klonierung des Proteins beim Partner ITMP initiiert.

Während sich die Bereitstellung des DXR-Proteins verzögerte, wurde beschlossen, zunächst einen phänotypischen Hochdurchsatz-Screen durchzuführen. Dazu wurde der ebenfalls beim thailändischen Partner Mahidol University (MU) genutzte *N. gonorrhoeae* Stamm bei der Deutschen Sammlung für Zellkulturen und Mikroorganismen bezogen und eine Kultivierung versucht. Dabei konnten wir auf Wissen des Partners MU zurückgreifen, mussten jedoch selbst noch erhebliche Anpassungen vornehmen, da das Bakterium mikroaerophil ist. Nach einigen Versuchen unter anderem auf Schokoladen-Agar mit oder ohne IsoVitalX und bei verschiedenen CO<sub>2</sub>-Konzentrationen in einem Inkubator konnten geeignete Bedingungen gefunden werden. Abbildung 1 zeigt den Aufbau der Kultur.

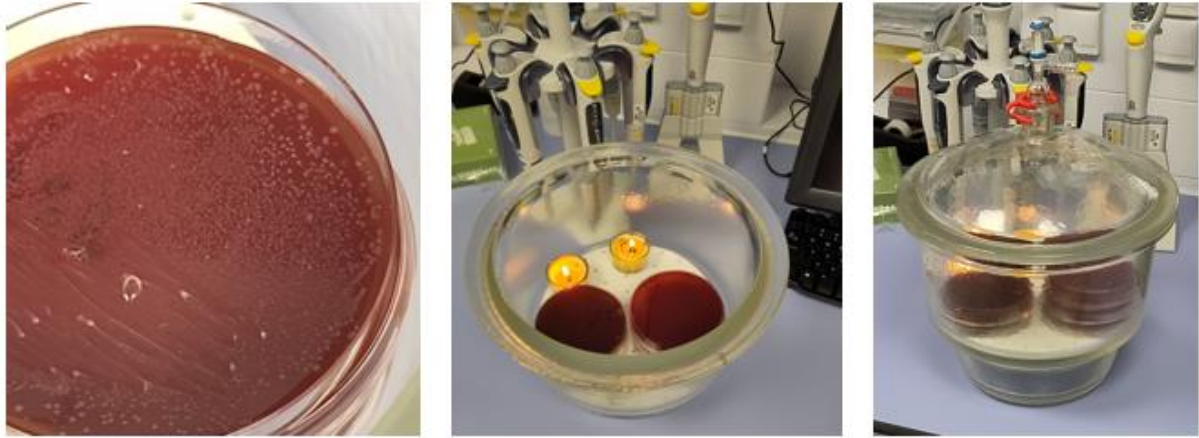


Abbildung 1: Kultur von *N. gonorrhoeae* auf Columbia-Blutagar im Kerzentopf.

In einem nächsten Arbeitsschritt wurden Kryokulturen in 3,5% DMSO und 40% Glycerol angelegt. Um einen phänotypischen Screen in geeignetem Durchsatz durchzuführen wurde die Kultur auf ein 96-well Format transferiert.

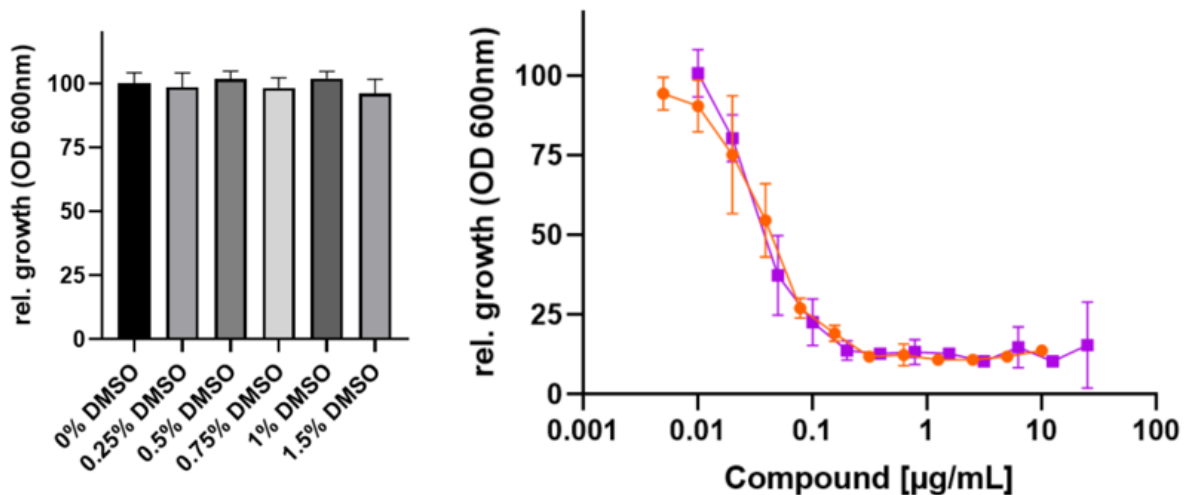


Abbildung 2: Kultur von *N. gonorrhoeae* mittels Flüssigmedium in 96-well Mikrotiterplatten. Auf der linken Seite ist eine DMSO Toleranzuntersuchung dargestellt. Auf der rechten Seite sind die Dosis-Wirkungskurven von Rifampicin (orange) und Penicillin (lila) dargestellt.

Dabei zeigte sich ein gleichmäßiges Wachstum in allen beimpften Wells. Das Wachstum führte zwar nur zu einer Trübung, die um den Faktor 1,7 stärker war als das reine Medium, aber die Datenqualität war mehr als ausreichend um die Effektivität der beiden genutzten Antibiotika auszuwerten. Für Rifampicin konnte eine minimale inhibitorische Konzentration (MIC) von 0,31 µg/mL bestimmt werden, was sehr nah an dem beschriebenen Literaturwert von 0,21 µg/mL liegt. Für Penicillin wurde ein MIC von 0,2 µg/mL bestimmt, wobei der Literaturwert hier bei 0,8 µg/mL liegt. Die Literaturwerte wurden allerdings mittels Epsilometer-Tests bestimmt und eine Abweichung zwischen Epsilometer-Test und Mikrodilutionstest, wie er in unserem Labor verwendet wird, von zwei Verdünnungsstufen und mehr ist nicht ungewöhnlich. Insgesamt zeigen die Daten, dass unsere Methode gut funktioniert.

Um das Wachstum der Bakterien in unserem Assay-System zu verbessern wurde eine Inkubationszeit von 48 h anstelle der üblichen 24 h getestet.

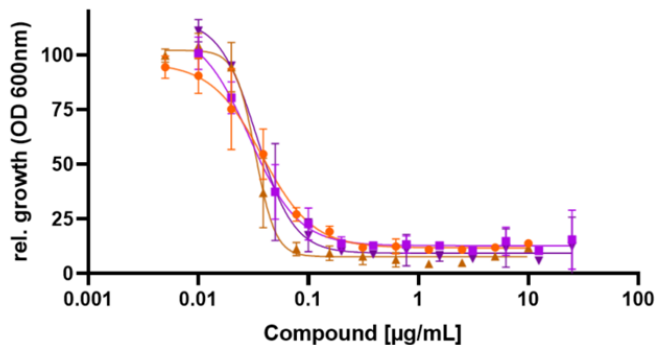


Abbildung 3: Vergleich der Inkubationszeiten. Die Dosis-Wirkungskurven nach 24 h von Rifampicin (orange) und Penicillin (lila) sind denen von 48 h, Braun für Rifampicin und Dunkellila für Penicillin, gegenübergestellt. Die 48h Werte sind als Dreiecke dargestellt.

Das Wachstum nach 48 h lag mit einem Faktor von 1,8 nahezu bei dem 24h-Wert von 1,7. Zusätzlich verschob sich aber der MIC von Rifampicin, die braune Kurve in Abbildung 3, auf 0,08 µg/mL und damit weiter weg vom Literaturwert von 0,21 µg/mL. Insgesamt erhöhte eine längere Inkubationszeit die prädiktive Kraft des Testsystems nicht.

Da das Wachstum der Neisserien auf Columbia-Blutagar sehr zufriedenstellend war, wurde versucht, dieses Konzept auf Mikrotiterplatten zu übertragen.

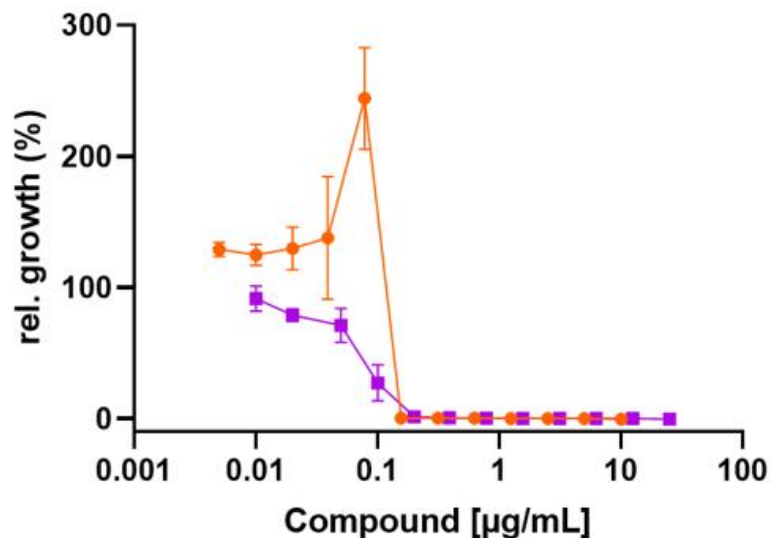
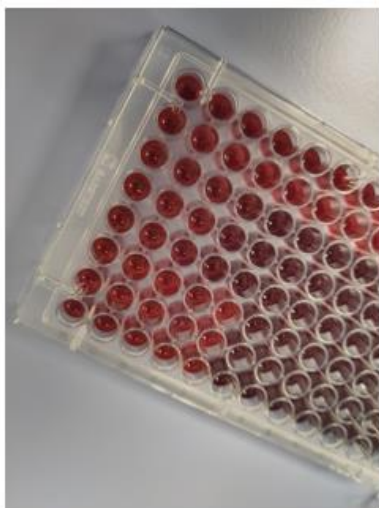
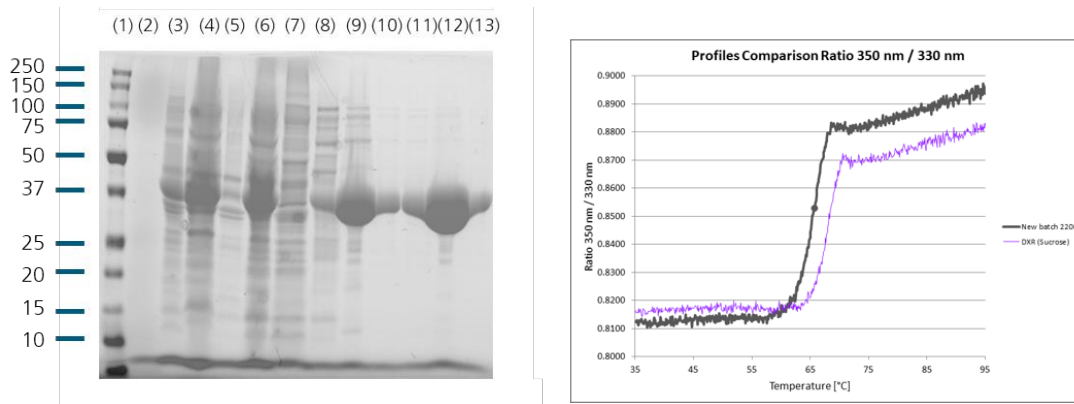


Abbildung 4: Kultur von *N. gonorrhoeae* mittels Columbia-Blutagar in 96well Platten. Auf der linken Seite ist eine 96well Platte nach der Messung gezeigt. Auf der rechten Seite sind die Dosis-Wirkungskurven von Rifampicin (orange) und Penicillin (lila) dargestellt.

Da die Mikrotiterplatten für eine Messung der optischen Dichte durch die Medienbeschaffenheit nicht mehr geeignet waren, wurde die Analyse mittels Resazurin Assay durchgeführt. Resazurin wird in metabolisch aktiven Zellen zum fluoreszenten Resorufin oxidiert und die Schwierigkeit bestand darin, einen wahren Mittelwert über das gesamte well zu erhalten, da die Diffusion im Agar deutlich eingeschränkt ist. Wie in Abbildung 4 zu sehen ist funktionierte das Testsystem außerordentlich gut. Nicht nur bestand der Unterschied zwischen Wachstum und keinem Wachstum in einem Faktor von 37, sondern die wells ohne



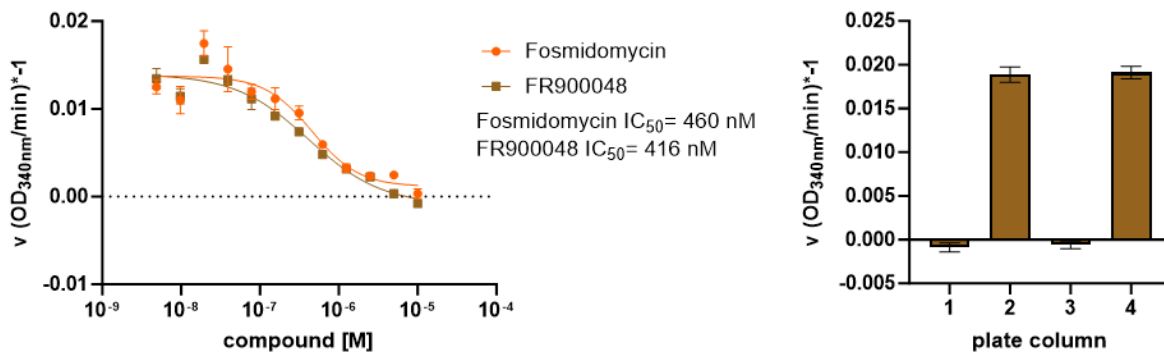
Größenausschlusschromatographie mit einer HisTrap HP-Säule (Cytiva) und einer HiLoad 16/600 Superdex 200 pg-Säule (Cytiva) gereinigt.



**Abbildung 6: Reinheit und Stabilität des *E. coli* DXR-Enzyms.** Die Reinheitskontrolle mittels SDS-PAGE (12 % TGX SDS PAGE (stainfree)) nach der Affinitätschromatographie zeigt, dass das DXR-Enzym bereits in diesem Schritt ausreichend gereinigt ist. (Spalten: (1) All blue Marker; (2) Überstand der Ernte, (3) Pellet nach Zellyse, (4) Überstand nach Zellyse, (5) Pellet nach 20.000 x g Zentrifugation, (6) Überstand nach 20.000 x g Zentrifugation, (7) HisTrap-loading der ungebundenen Fraktion, (8) HisTrap Waschfraktion, (9) Fraktion A12 (1. Peak), (10) Fraktion C11, (11) Fraktion C12, (12) Fraktion D9 (2. Peak), (13) Fraktion E3). Die Stabilität des *E. coli* DXR-Proteins, in dem von unserem Partner optimierten Puffer, ist auf der rechten Seite dargestellt. Die Stabilität wurde durch die Aufnahme von Schmelzkurven nach Lagerung bei -80°C bestätigt.

### Assay Entwicklung

Das *E. coli* DXR-Protein wurde für die Assay-Entwicklung verwendet. Zunächst wurden verschiedene Puffer-Zusammensetzungen und Substratkonzentrationen getestet. Nachdem ein ausreichend großes Signalfenster erhalten wurde und eine Zeitstabilität erreicht werden konnte, wurde der Assay für das 384 Well-Format adaptiert.



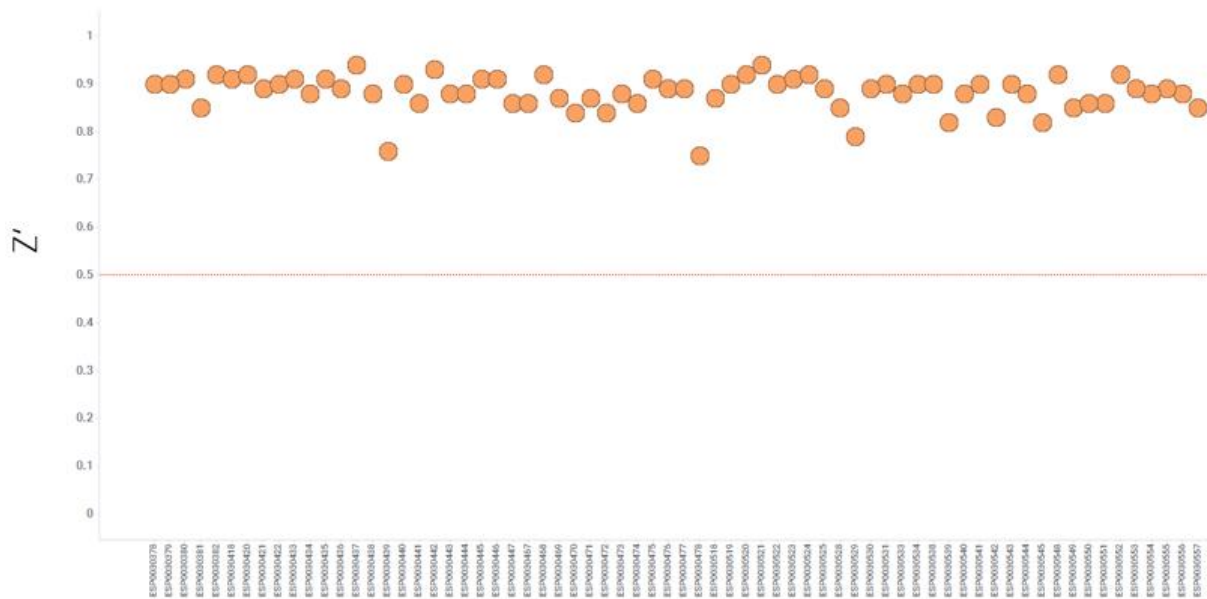
**Abbildung 7: Kenngrößen des Assays.** Auf der linken Seite sind die Dosis-Wirkungs-Kurven von zwei bekannten Inhibitoren des *E. coli* DXR-Enzyms dargestellt. Auf der rechten Seite ist die Geschwindigkeit des *E. coli* DXR-Enzyms unter Verwendung einer Kontrollplatte dargestellt. Spalte 1 und 3 enthalten 10µM Fosmidomycin, während Spalte 2 und 4 die nicht gehemmte Enzymreaktion darstellen.

Abbildung 7 zeigt die Aktivität der Kontroll-Verbindungen und die Reproduzierbarkeit des Assays. Der derzeitige Aufbau erzeugt z'-Werte zwischen 0,7 und 0,85, was für das Screening absolut ausreichend ist.

Wir haben daher mit dem Screening des DXR-Enzyms von *E. coli* begonnen. Das homologe Enzym aus *N. gonorrhoeae* ließ sich bisher weder durch das ITMP noch durch die Technischen Universität Yildiz reinigen. Aus diesem Grund wurde die Expression und Reinigung des *N. gonorrhoeae* DXR-Enzyms nicht weiterverfolgt.

### Testung einer Substanzbibliothek

Nach erfolgreicher Entwicklung des Testsystems wurden 25.000 chemische Substanzen aus unserer Substanzbibliothek getestet. Die Auswahl der Substanzen erfolgte entsprechend ihrer Größe, da für dieses Enzym bisher nur kompetitive Inhibitoren bekannt sind und die Substratbindetasche des Enzymes sehr klein ist.



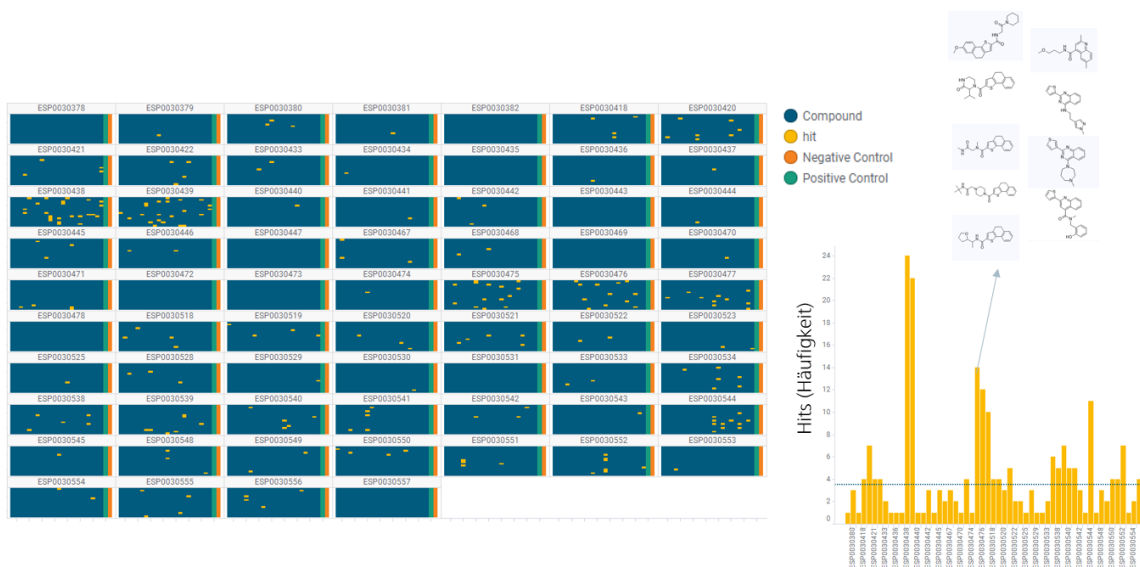
**Abbildung 8: Qualitätskontrolle der Untersuchung von 25.000 Substanzen.** Der Z' der Screeningplatten wurde für jede Platte als oranger Punkt dargestellt. Das minimale Qualitätskriterium ist als rote Linie dargestellt.

Jede getestete Platte erfüllte das Qualitätskriterium mit einem Z' der besser als 0,5 (rote Linie) war (siehe Abbildung 8).



bei 2µM, in grün und die Negativkontrolle, DMSO, in orange dargestellt ist. Die als aktiv identifizierten getesteten Substanzen sind in Gelb dargestellt.

Die Substanzen in den wells mit den geringsten Enzymaktivitäten zeigen durch die Normalisierung die höchste Aktivität in der Abbildung 10. Sie sind gelb hervorgehoben und gut über die einzelnen Bereiche der Platte verteilt. Dies zeigt, dass der Test der 25.000 Substanzen keine systematischen Fehler enthielt.



**Abbildung 11: Übersicht über die aktiven Substanzen pro getesteter Platte.** Das Farbschema entspricht der Abbildung 6. Auf der linken Seite ist die Verteilung der aktiven Substanzen auf den Platten dargestellt, während auf der rechten Seite die Häufigkeit dargestellt ist.

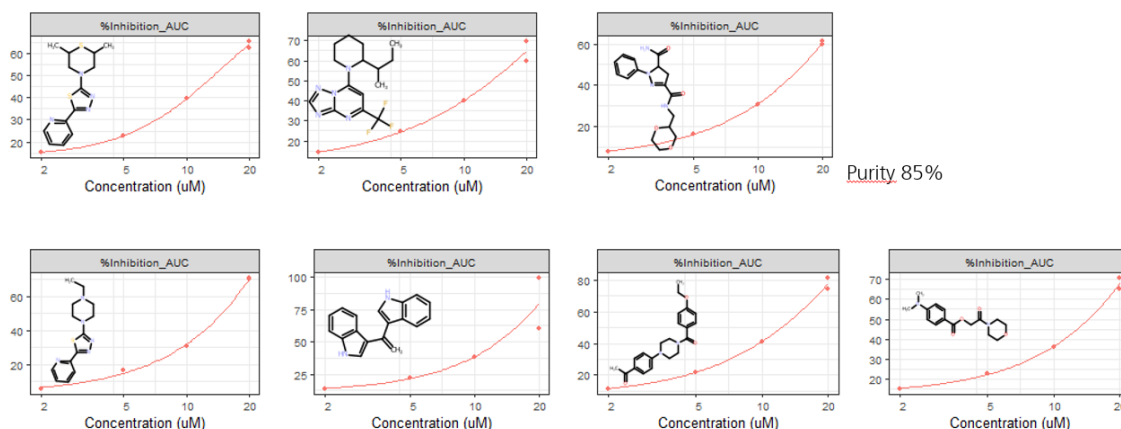
Auch die rechte Seite der Abbildung 11 bestätigt dieses Muster. Die linke Seite zeigt die Häufigkeit der aktiven Substanzen pro Platte. Für eine Platte wurde die chemische Ähnlichkeit analysiert und es zeigte sich eine Ähnlichkeit zwischen den Hits.

Alle Hits wurden manuell aus der Bibliothek ausgewählt und erneut gescreent, um die Aktivität zu bestätigen. Hier wurden zwei Messungen durchgeführt, zuerst wurden die Platten 5 Minuten lang mit Enzym ohne Substrat gemessen, danach wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von Substrat gestartet, gefolgt von einer herkömmlichen kinetischen Messung über 45 Minuten. Der 5-Minuten-Read ohne NADPH diente dazu, autofluoreszierende Verbindungen zu erkennen, die sonst den Assay stören würden. Verbindungen wurden als autofluoreszierend eingestuft, wenn ihre Fluoreszenz bei 20 µM das durchschnittliche Signal der Negativkontrolle, bestehend aus DMSO, um mehr als das dreifache der DMSO-Standardabweichung überstieg.

Insgesamt wurden 100 Verbindungen als autofluoreszierend aus der Liste der aktiven Substanzen gestrichen, und für die verbleibenden 135 wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Auf der Grundlage einer Reihe von chemischen und enzymatischen Parametern

wurden 7 Verbindungen ausgewählt und für die Prüfung durch das NONEGON-Konsortium erworben. Zu den Auswahlkriterien gehörten die chemische Ähnlichkeit, die vorhergesagte Membranpermeabilität, das Molekulargewicht und die Aktivität der Verbindung bei dreifacher NADPH- oder DXP-Konzentration.

In Abbildung 12 sind die Dosis-Wirkungs-Kurven und die chemischen Strukturen dargestellt.



**Abbildung 12: Dosis-Wirkungs-Kurven und entsprechende Strukturen der ausgewählten Treffer.** Das Farbschema entspricht der Abbildung 6. Auf der linken Seite ist die Verteilung der aktiven Substanzen

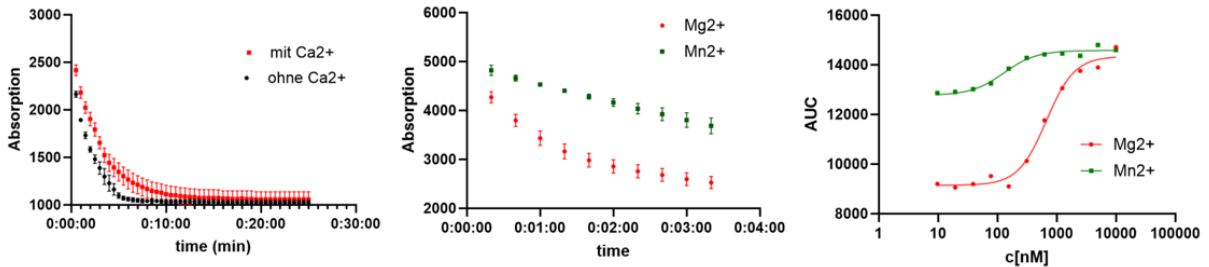
#### Detaillierte Analyse der aktiven Moleküle

Um die Daten detaillierter zu analysieren und vergleichbare IC<sub>50</sub>-Werte zu erhalten, haben wir das Assay-Verfahren neu bewertet. Dies war möglich, da der Assay für das Hochdurchsatz-Screening auf der Lieferung eines robusten und stabilen Signals aufgebaut war, während der Assay jetzt, nach der Identifizierung einiger interessanter Moleküle, für maximale Empfindlichkeit optimiert werden kann. Der neue Aufbau muss für einige wenige Verbindungen und nicht für komplette 384-Well-Platten in einem automatisierten Format angewendet werden.

Tabelle 1: Vergleich zwischen dem Fraunhofer HTS-Screening und zwei veröffentlichten DXR-Screens.

	Fraunhofer HTS assay	Mazzone et al. (2024)	Kuzuyama et al. (1998)
Enzym	E. coli DXR	T. gondii DXR	E. coli DXR
Puffer	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5)	50 mM HEPES (pH = 7,5)	100 mM Tris-HCl (pH = 7,5)
Metallion	10 mM MgCl <sub>2</sub>	4 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mM MnCl <sub>2</sub>
Zusätze	100 mM NaCl 2 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM DTT		
NADPH	100 µM	100 µM	300 µM
DXP	150 µM	100 µM	300 µM
Inkubationszeit	10 min, RT	10 min, 37°C	n.a.
Messzeit	40 min	60 min	n.a., 37°C
Evaluation	AUC	Anfangsgeschwindigkeit	ΔA
IC <sub>50</sub>	460 nM	1030 nM	8,2 nM

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, gibt es erhebliche Unterschiede zwischen den veröffentlichten Tests. Daher haben wir unseren Test im Vergleich zu den veröffentlichten Daten bewertet und einige kritische Parameter ermittelt (Abbildung 13).



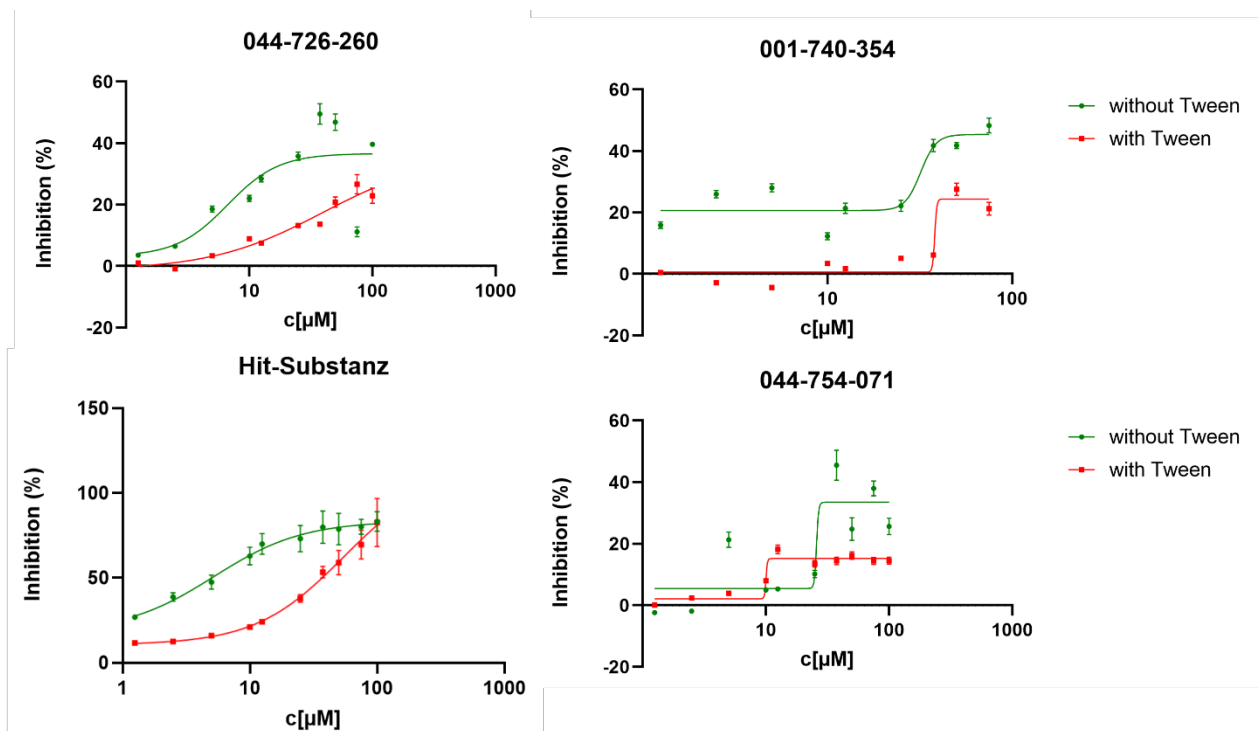
**Abbildung 913: Revalidierung der Assay-Parameter.** Assay mit (rot) und ohne (schwarz) Calcium sind links dargestellt. Der Vergleich der nicht gehemmten Enzymaktivität in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> (rot) und Mn<sup>2+</sup> (grün) ist in der Mitte dargestellt. Der Vergleich der gehemmten Enzymreaktion mit Fosmidomycin in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup> (rot) und Mn<sup>2+</sup> (grün) ist rechts dargestellt.

Wir stellten fest, dass Kalzium-Ionen die Reaktion leicht verzögern, weshalb sie in der endgültigen Testbedingung eliminiert wurden. Wir fanden auch heraus, dass die Metallionen einen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität und die Hemmwerte hatten (Tabelle 2).

Tabelle 2: Vergleich zwischen den HTS-Screening-Assay-Bedingungen von Fraunhofer und den neu bewerteten Assay-Bedingungen von Fraunhofers.

	Fraunhofer HTS assay	Fraunhofer optimierter Test (Mg <sup>2+</sup> )	Fraunhofer optimierter Test (Mn <sup>2+</sup> )
Enzym	E. coli DXR	E. coli DXR	E. coli DXR
Puffer	20 mM Tris-HCl (pH = 7,5)	40 mM Tris-HCl (pH = 7,5)	40 mM Tris-HCl (pH = 7,5)
Metallion	10 mM MgCl <sub>2</sub>	10 mM MgCl <sub>2</sub>	10 mM MnCl <sub>2</sub>
Zusätze	100 mM NaCl 2 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM DTT	10 mM DTT 0.05% Tween20	10 mM DTT 0.05% Tween20
NADPH	100 µM	300 µM	300 µM
DXP	150 µM	300 µM	300 µM
Inkubationszeit	10 min, RT	10 min, RT	10 min, RT
Messzeit	40 min	25 min	25 min
Evaluation	AUC	Anfangsgeschwindigkeit, AUC	Anfangsgeschwindigkeit, AUC
IC <sub>50</sub>	460 nM	402 nM (Anfangsgeschwindigkeit), 672 nM (AUC)	159 nM Anfangsgeschwindigkeit), 129 nM (AUC)

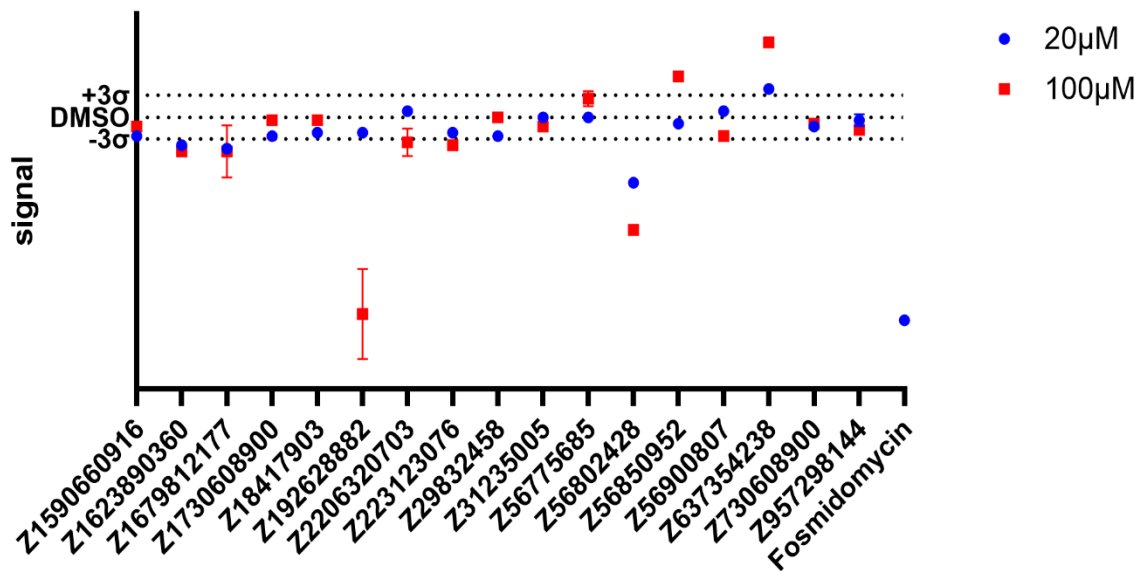
Für die endgültigen Testbedingungen haben wir auch die Verwendung von Tween20 geprüft, da viele der im HTS-Test identifizierten Verbindungen weniger löslich waren.



**Abbildung 14: Hemmung von E. coli DXR.** Der Assay wurde mit Tween20 (rot) und ohne Tween20 (grün) durchgeführt. Die Hit-Substanz wurde im HTS-Assay als aktiv identifiziert, während die anderen drei Verbindungen in Veröffentlichungen als aktiv beschrieben wurden.

Wir haben festgestellt, dass schlecht lösliche Verbindungen oder Verbindungen, die Proteine aggregieren, in hohem Maße von der Löslichkeit abhängen und die Zugabe von Tween20 in einer Konzentration von 0,05 % zu realistischeren Hemmungswerten führt.

Da die erhaltenen Inhibitionswerte im mikromolaren Bereich liegen (siehe Abbildung 12 und 14) und um möglichst genaue Messwerte zu erhalten, wurde ein weiteres Testverfahren etabliert. Bei diesem Verfahren kann die Bindung einer Substanz an ein Protein direkt bestimmt werden.



**Abbildung 15: Untersuchung der Bindung der aktiven Substanzen an *E. coli* DXR.**

Wie in Abbildung 15 gezeigt binden einige Substanzen signifikant an das *E. coli* DXR Enzym. Diese Untersuchungen werden zum gegenwärtigen Zeitpunkt fortgeführt und werden dann entsprechend verwertet.

Im Arbeitspaket 4 (Management, Training, Verbreitung) wurde vom 10.05.–12.05. 2022 ein Workshop in Hamburg organisiert. Neben Vorträgen der NONEGON-Partner wurden auch Beiträge von externen Wissenschaftlern organisiert. Zusätzlich wurden mehrere Laborführungen durchgeführt, die den Besuchern aus Thailand und der Türkei einen Einblick in die Infrastruktur und Kompetenzen am Wissenschaftsstandort Hamburg ermöglichten und zur Anbahnung von Forschungsk Kooperationen für zukünftige gemeinsame Anträge führten.

## 2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die laufenden Kosten wurden entsprechend der Zuwendungsbescheide abgerechnet. Die Positionen des zahlenmäßigen Nachweises werden dem Projektträger über die Fraunhofer-Zentrale in München separat zur Verfügung gestellt. Die wichtigste Position des zahlenmäßigen Nachweises bestand in Personalkosten.

## 3. Der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit,

Dem dringenden Bedarf nach neuen Wirkstoffen zur Bekämpfung von Infektionen mit Antibiotika-resistenten Bakterien wurde mit der geleisteten Arbeit in diesem Projekt Rechnung getragen. Aus diesem Grund waren die geleisteten Arbeiten notwendig und angemessen.

#### **4. Der voraussichtliche Nutzen, insbesondere die Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans**

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

Es wurden mehrere DXR-Inhibitoren identifiziert. Aufgrund der Zeitverzögerungen, verursacht durch die deutlich verspätete Verfügbarkeit von Protein für das Hochdurchsatzscreening, konnte eine detaillierte Charakterisierung der identifizierten Substanzen, auch im Hinblick einer möglichen Toxizität, nicht mehr durchgeführt werden.

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

Während der Projektlaufzeit wurden zwei Studien veröffentlicht, in denen neue Inhibitoren bakterieller DXR beschrieben werden (Knak et al 2024, Kesharwani 2024). Die in einer Studie durchgeführten mikrobiellen Untersuchungen zeigten allerdings keinen nennenswerten Effekt der potentesten Substanzen auf das Wachstum von *E. coli* und *Mycobacterium tuberculosis* (Knak et al 2024).

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

Es ist beabsichtigt, die Ergebnisse in einem Fachartikel zu publizieren.

Derzeit arbeiten wir an einem Review-Artikel über DXR und die bisherigen Ansätze zur Entwicklung von Inhibitoren. Dieser soll in den kommenden Monaten bei einem Peer Review-Journal eingereicht werden.

### **Literaturverzeichnis**

Buder S, (2018) Antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* in Germany: low levels of cephalosporin resistance, but high azithromycin resistance. *BMC Infect Dis* 18(1):44. doi: 10.1186/s12879-018-2944-9

Cole MJ (2017) Overall Low Extended-Spectrum Cephalosporin Resistance but high Azithromycin Resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in 24 European Countries, 2015. *BMC Infect Dis* 17(1):617. doi: 10.1186/s12879-017-2707-z

Frank A & Groll M (2017) The Methylerythritol Phosphate Pathway to Isoprenoids. *Chem Rev.* 2017 Apr 26;117(8):5675-5703. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00537

Hunter WN (2007) The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J Biol Chem* 282(30):21573-7. doi: 10.1074/jbc.R700005200

Kesharwani S et al 2024 Design and synthesis of non-hydroxamate lipophilic inhibitors of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR): in silico, in vitro and antibacterial studies. *RSC Adv* 14(38):27530-27554. doi: 10.1039/d4ra05083e

Kozuyama T et al (1998) Fosmidomycin, a specific inhibitor of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase in the nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Tetrahedron Lett* 39(43):7913. doi: 10.1016/S0040-4039(98)01755-9

Knak T (2022) Over 40 Years of Fosmidomycin Drug Research: A Comprehensive Review and Future Opportunities. *Pharmaceuticals (Basel)* 15(12):1553. doi: 10.3390/ph15121553

Knak T et al 2024. Expanding the Chemical Space of Reverse Fosmidomycin Analogs. *ACS Med Chem Lett* 16(1):136-143. doi: 10.1021/acsmedchemlett.4c00501

Mazzone F et al (2024) 1-Deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase as target for anti *Toxoplasma gondii* agents: crystal structure, biochemical characterization and biological evaluation of inhibitors. *Biochem J* 481(16):1075-1096. doi: 10.1042/BCJ20240110

Unemo M (2019) Gonorrhoea. *Nat Rev Dis Primers* 5(1):79. doi: 10.1038/s41572-019-0128-6

Wang X, Dowd CS (2018) The Methylerythritol Phosphate Pathway: Promising Drug Targets in the Fight against Tuberculosis. *ACS Infect Dis* 4(3):278-290. doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00176

WHO 2024: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>

Hamburg, den \_\_31.03.2025\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Prof. Dr. Björn Windshügel)

## Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN n.a.	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel" Verbundprojekt „Neue Inhibitoren zur Adressierung von DXR in <i>Neisseria gonorrhoeae</i> “ Teilvorhaben "Assayentwicklung und Screening (AP 1)" „Toxizitätstests (AP 3)", „Management, Training, Verbreitung (AP 4)"	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Prof. Dr. Björn Windshügel	5. Abschlussdatum des Vorhabens 30.09.2024
	6. Veröffentlichungsdatum n.a.
	7. Form der Publikation Schlussbericht
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Fraunhofer ITMP Discovery Research ScreeningPort Schnackenburgallee 114 22525 Hamburg	9. Ber. Nr. Durchführende Institution n.a.
	10. Förderkennzeichen 01DP21010
	11. Seitenzahl 17
12. Fördernde Institution (Name, Adresse)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 12
	14. Tabellen 2
	15. Abbildungen 15
16. Zusätzliche Angaben n.a.	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) DLR Projektträger, Bonn, 31.03.2025	
18. Kurzfassung Gonorrhö ist eine sexuell übertragbare Infektions-Krankheit, die durch das Bakterium <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ausgelöst wird. Ein vielversprechender Ansatz für einen neuen Wirkmechanismus von Antibiotika ist die Hemmung essenzieller biosynthetischer Stoffwechselwege, die im Menschen nicht vorkommen. Einer dieser Stoffwechselwege ist der Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg), der für die Synthese von Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP) benötigt wird. DMAPP und IPP dienen als Vorläufer für die Synthese von Isoprenoiden, die für verschiedene zelluläre Prozesse benötigt werden. Aufgrund der Abwesenheit des MEP-Weges im Menschen stellt dieser einen attraktiven Angriffspunkt für neue Antibiotika dar. In diesem Projekt sollten neue Inhibitoren für eines der Enzyme des MEP-Weges (DXP-Reduktoisomerase, DXR) identifiziert werden. Mittels eines biochemisches Testsystems sollte eine Substanz-Bibliothek nach möglichen Inhibitoren der DXR in <i>N. gonorrhoeae</i> gescreent werden. Aufgrund von Problemen mit der Expression und Aufreinigung von <i>N. gonorrhoeae</i> DXR wurde auf <i>E. coli</i> DXR umgeschwenkt, welches ein sequenziell identisches aktives Zentrum besitzt und für das die Expression und Aufreinigung bereits erfolgreich in der Literatur beschrieben wurden. Basierend auf dem erfolgreich produzierten <i>E. coli</i> DXR-Protein wurde ein biochemisches Testsystem etabliert, das mit bereits bekannten Inhibitoren erfolgreich validiert wurde. In einem Primärscreen wurden 25000 Substanzen hinsichtlich einer möglichen DXR-Inhibition untersucht. Dabei wurden einige Substanzen als mögliche DXR-Inhibitoren identifiziert.	
19. Schlagwörter Gram-negative Bakterien, <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , Methylerythritolphosphatweg, DXR, Inhibitoren	
20. Verlag n.a.	21. Preis n.a.

## Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN n.a.	2. type of document (e.g. report, publication) Final report
3. title Project Title: Novel Inhibitors targeting DXR in <i>Neisseria Gonorrhoeae</i> Subprojects "Assay Development and Screening (WP 1)", "Toxicity Tests (WP 3)", "Management, Training, Dissemination (WP 4)"	
4. author(s) (family name, first name(s)) Prof. Dr. Björn Windshügel	5. end of project 30.09.2024  6. publication date n.a.  7. form of publication Final report
8. performing organization(s) (name, address) Fraunhofer ITMP Discovery Research ScreeningPort Schnackenburgallee 114 22525 Hamburg	9. originator's report no. n.a.  10. reference no. 01DP21010  11. no. of pages 17
12. sponsoring agency (name, address)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 12  14. no. of tables 2  15. no. of figures 15
16. supplementary notes n.a.	
17. presented at (title, place, date) DLR Projektträger, Bonn, 31.03.2025	
18. abstract Gonorrhoea is a sexually transmitted infection cause by the bacterium <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . A promising approach for a novel mechanism of action for antibiotics is the inhibition of the methylerythritol phosphate (MEP) pathway which is required for the synthesis of dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) and isopentenyl pyrophosphate (IPP). DMAPP and IPP serve as precursors for the biosynthesis of isoprenoid which are required for various cellular processes. Due to the absence in humans, the MEP pathway represents an attractive target for novel antibiotics. The aim of this project was the identification of novel inhibitors for one of the MEP pathway enzymes (DXP reductoisomerase, DXR). By means of a biochemical test system a compound library should be screened for potential DXR inhibitors in <i>N. gonorrhoeae</i> . Due to problems with expression and purification of <i>N. gonorrhoeae</i> DXR <i>E. coli</i> DXR served as surrogate, sharing a sequentially identical active site and for which expression and purification has been described in literature. Based on the successfully produced <i>E. coli</i> DXR protein a biochemical test system was established which was validated with known inhibitors. In a primary screen 25,000 compounds were screened for potential DXRT inhibition. This resulted in the identification of several potential DXR inhibitors.	
19. keywords Neisseria gonorrhoeae, methylerythritol phosphate pathway, DXR, inhibitors	
20. publisher n.a.	21. price n.a.