

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Hallek

**Entwicklung eines wirtszellbasierten Testverfahrens zur  
Identifikation antivirulenter Wirkstoffe gegen  
*Pseudomonas aeruginosa***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Fynn Tristan Schreiber  
aus Siegen

promoviert am 18. Dezember 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2024

Dekan:           Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. Dr. nat. med. J. L. Rybniker
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. J. A. M. Jantsch
3. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. T. Lüdde

#### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Privatdozent Dr. Dr. Jan Rybniker und den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Sandra Winter und Frau Edeltraud van Gumpel von mir selbst ausgeführt worden.

#### Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Kiel, den 03.07.2023

  
Fynn Schreiber

## **Danksagung**

Ich möchte im Folgenden jenen Personen danken, die mich bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt und begleitet haben:

Besonderer Dank gebührt Privatdozent Dr. Dr. Jan Rybniker. Für deine Bereitschaft mich als deinen ersten medizinischen Doktoranden anzunehmen. Für ein tolles Projekt, währenddessen du mich engmaschig begleitet und beraten hast. Dafür, dass du mich Wissenschaft gelehrt und mir die Gelegenheit gegeben hast, an Konferenzen und Vorträgen teilzunehmen. Darüber hinaus hat die Tätigkeit in deiner Arbeitsgruppe mein nachhaltiges Interesse am Fachgebiet der Infektiologie mitbegründet. Bei der Entscheidung zur und Auswahl einer antiinfektiven Therapie im klinischen Alltag denke ich heute täglich an unsere Arbeit. Danke, dass ich dieses Projekt unter deiner Anleitung durchführen durfte.

Ein herzlicher Dank gilt außerdem Dr. Jessica Gräß. Neben fachlichen Ratschlägen und unzähligen gemeinsamen Kaffeepausen ist es unsere entstandene Freundschaft, die meine Zeit in der Arbeitsgruppe maßgeblich geprägt hat.

Ebenso möchte ich meiner Kommilitonin Dr. Julia von Ambüren danken. Gemeinsam haben wir nicht nur unser Studium beendet, sondern auch den Weg zur Promotion bestritten. Für deine – über das Studium hinaus andauernde – Begleitung und Unterstützung bin ich dir sehr dankbar.

Großer Dank gebührt außerdem Dr. Alexander Simonis. Insbesondere für deine Unterstützung bei der Veröffentlichung unseres Papers sowie für deine Anregungen während der Fertigstellung meiner Dissertationsschrift.

Außerdem möchte ich Sandra Winter und Edeltraud van Gumpel danken, die mich offen in der Arbeitsgruppe willkommen geheißen und stets tatkräftig unterstützt haben.

Für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums, sowie der Veranstaltung mehrerer Tagungen, insbesondere der „Autumn School“ in Lübeck (2019), danke ich dem Deutschen Zentrum für Infektionsforschung (DZIF).

Zuletzt möchte ich meiner Familie – Kirsten, Dirk und Florian Schreiber – von Herzen danken. Ich freue mich, mit der Vollendung dieser Arbeit das entgegengebrachte Vertrauen würdigen zu können. Für eure immerwährende Bereitschaft zur bedingungslosen Unterstützung, nicht nur dieses Projekt betreffend, bin ich euch zu unendlichem Dank verpflichtet.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	6
1 Zusammenfassung .....	7
2 Einleitung .....	9
2.1 Antimikrobielle Resistenzen als globale Herausforderung der Gesundheitsversorgung .....	9
2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	11
2.2.1 Mikrobiologie und Antibiotikaresistenz .....	11
2.2.2 Virulenzfaktoren .....	12
2.3 Wirtszellbasierte Screening-Plattformen zur Identifikation zytoprotektiver Leitsubstanzen zur Therapie bakterieller Infektionen .....	14
2.3.1 Grundlegende Funktionsweise .....	14
2.3.2 Vorteile wirtszellbasierter Screening-Plattformen .....	16
2.3.3 Identifikation der zytoprotektiven Substanzen und Untersuchung des Wirkmechanismus .....	17
2.4 Zielsetzung der Arbeit .....	20
3 Publikation: Comprehensive Host Cell-Based Screening Assays for Identification of Anti-Virulence Drugs Targeting <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	21
3.1 Abstract .....	21
3.2 Introduction .....	22
3.3 Materials and Methods .....	23
3.3.1 Chemical Compounds .....	23
3.3.2 Cell Culture .....	23
3.3.3 Culture Conditions of Bacteria .....	24
3.3.4 Host-Cell Survival Assays .....	24
3.3.5 Growth Inhibition Assays .....	25
3.3.6 RNA-Seq in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	25
3.3.7 T3SS-Secretion Assay .....	25
3.3.8 Statistical Analysis .....	26

3.4	Results.....	26
3.4.1	Assay Development and Validation for <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	26
3.4.2	Assay Development and Validation for <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	27
3.4.3	Identification of Novel Compounds with Anti-Virulence Activity against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	28
3.4.4	Chemical Structures of Novel Indole Compounds with Anti-Virulence Activity against <i>Salmonella</i> Typhimurium .....	30
3.5	Discussion .....	32
3.6	Appendix A .....	35
3.7	References .....	36
4	Diskussion .....	39
4.1	Etablierung der <i>Pseudomonas aeruginosa</i> gerichteten, wirtszellbasierten Screening-Plattform .....	39
4.2	„Proof of concept“ Screen und mögliche Ergänzungen des Verfahrens .....	43
4.3	Das Quorum sensing-System von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> als mögliches Ziel des Indol-Derivats G5-193 .....	46
4.4	Das Typ-III-Sekretionssystem als möglicher Angriffspunkt antivirulenter Wirkstoffe.....	49
4.5	Ausblick .....	50
5	Literaturverzeichnis.....	52
6	Anhang .....	56
6.1	Abbildungsverzeichnis .....	56
6.2	Tabellenverzeichnis .....	57
6.3	Lebenslauf.....	58
6.3.1	Persönliche Daten .....	58
6.3.2	Ausbildung und beruflicher Werdegang .....	58
6.3.3	Veröffentlichungen.....	59

## Abkürzungsverzeichnis

Da – Dalton

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimethylsulfoxid

EGTA – Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure

FCS – fetal calf serum

Gen – Gentamicin

MAPK – mitogen-activated protein kinase, Mitogen-aktivierte Proteinkinase

mM – Millimol/millimolar

μM – Mikromol/mikromolar

MOI – multiplicity of infection, Infektionsmultiplizität

Mox – Moxifloxacin

mRNA – messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure

OD – optical density, optische Dichte

*Pa* – *Pseudomonas aeruginosa*

Qs – Quorum sensing

RFU – relativ fluorescence units, relative Fluoreszenzwerte

RNA – ribonucleic acid, Ribonukleinsäure

RPKM – reads per kilobase of transcript per million mapped reads

RT – Raumtemperatur

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SPLUNC1 – Short Palate, Lung, and Nasal Epithelium Clone 1

spp – species pluralis

T3SS – Typ-III-Sekretionssystem

# 1 Zusammenfassung

Antimikrobielle Resistenzen stellen eine globale Herausforderung der Gesundheitsversorgung dar<sup>1-3</sup>. Sie verursachen in Europa jährlich rund 30.000 Todesfälle und belasten die Gesundheitssysteme Europas durch zusätzliche Kosten in Höhe von 1.500.000.000 Euro<sup>4,5</sup>. Gleichzeitig ist die Entwicklung neuer antiinfektiver Wirkstoffe zur Therapie von Infektionen durch gramnegative Krankheitserreger durch zahlreiche intrinsische und extrinsische Resistenzmechanismen der Bakterien erschwert<sup>6</sup>. In der Folge wurden in den letzten Jahren nur wenige neue Wirkstoffe entwickelt, sodass der Bedarf an innovativen Antibiotika und alternativen antiinfektiven Substanzen hoch ist<sup>7,8</sup>.

Zur Entdeckung neuer Wirkstoffe sind Screening-Projekte von Molekülen im Hochdurchsatzverfahren unerlässlich. Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung einer innovativen, wirtszellbasierten Screening-Plattform zur Identifikation von Wirkstoffen mit Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*), einem Bakterium, das für hohe Resistenzraten gegenüber antiinfektiven Wirkstoffen bekannt ist<sup>3,7,9</sup>.

Das Prinzip der vorgestellten Screening-Plattform beruht auf der Detektion zytoprotektiver Testsubstanzen, die ein gesteigertes Überleben durch *Pa* infizierter Wirtszellen bewirken können.

In einem ersten Schritt der Entwicklung wurde verifiziert, dass eine Infektion von A549-Lungenepithelzellen durch *Pa* zu einem Absterben der Wirtszellen führt. Die gleichzeitige Zugabe von Gentamicin als Kontrollsubstanz mit antibakterieller Aktivität hingegen bewirkte ein Überleben der Wirtszellen. Die Quantifizierung vitaler Wirtszellen konnte nach Zugabe von Resazurin mittels Fluoreszenzmessung erfolgen.

Im Anschluss erfolgte die Evaluation der statistischen Robustheit der Plattform mit Hilfe des Z'-Faktors<sup>10</sup>. Durch fortlaufende Variation der Konditionen und statistische Re-Evaluation konnte ein Versuchsprotokoll erstellt werden, das eine hohe statistische Belastbarkeit bei einfacher Handhabbarkeit bietet.

Ein herausragender Vorteil wirtszellbasierter Screening-Plattformen ist ein erweitertes Trefferspektrum, das sowohl antibakterielle als auch antivirulente Substanzen umfasst. Die Verwendung des mutierten *Pa* Stammes PAO1F  $\Delta pscD$ , welcher nicht in der Lage ist ein funktionelles Typ-3-Sekretionssystem (T3SS) auszubilden, führte zu einer massiven Steigerung des Wirtszellüberlebens. Dies zeigt, dass auch potente Hemmstoffe des T3SS als antivirulent wirkende Substanzen durch die vorgestellte Screening-Plattform erfasst werden können.



Im Anschluss an die Optimierung der Screening-Plattform wurde ein Screening des „World Diversity Sets 3“ durchgeführt. Diese Molekülbank der Firma Specs umfasst 10.000 synthetische Substanzen<sup>11</sup>. Es handelt sich hierbei um sogenannte „small molecules“, die eine Molekülmasse < 500 Da aufweisen. Im Rahmen dieses Screenings konnten insgesamt 6 Substanzen mit zytoprotektiver Aktivität identifiziert werden. Alle dieser Treffersubstanzen zeigen eine gemeinsames chemisches Grundgerüst und gehören der Gruppe der Indole an. Für diese Gruppe wurde bereits ein Virulenz-reduzierender Effekt auf *Pa* beschrieben, der durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden konnte<sup>12</sup>. Gleichzeitig unterstreicht dies die Möglichkeit mit der hier beschriebenen Screening-Plattform antivirulent wirkende Substanzen zu identifizieren. Ein bakteriostatischer oder bakterizider Effekt der Treffersubstanzen auf *Pa* konnte in normalem *Pa* Wachstumsmedium ausgeschlossen werden. Die im Anschluss durchgeführte RNA-Sequenzierung legt einen modulierenden Effekt der Indole auf bestimmte Virulenzfaktoren von *Pa* nahe, darunter *phzA1*, *phzB1*, *phzS*, *pchD*, *pvdM* und *pvdS*, die von Bedeutung in der Regulation der Virulenzfaktoren Phenazin, Pyochelin und Pyoverdin sind<sup>13,14</sup>.

Neben der Entdeckung antibakteriell wirksamer Substanzen erlaubt die vorgestellte Plattform die Detektion antivirulent wirkender Moleküle, wodurch das Trefferspektrum erweitert wird. Die hier vorgestellte Screening-Plattform soll zur Entwicklung innovativer, antiinfektiver Wirkstoffe auch über diese Arbeit hinaus Anwendung finden.

Die durch das Screening des „World Diversity Sets 3“ identifizierten zytoprotektiven Substanzen können nach weitergehender Untersuchung ihres Wirkmechanismus als Ausgangspunkt zur Entwicklung eines neuen antivirulenten Wirkstoffes zur Behandlung von Infektionen durch antibiotikaresistente *Pa*-Stämme dienen.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Antimikrobielle Resistenzen als globale Herausforderung der Gesundheitsversorgung**

Die Bekämpfung des Entstehens und der Verbreitung antibiotikaresistenter Krankheitserreger stellt eine der größten Herausforderungen der Gesundheitssysteme weltweit dar<sup>1-3</sup>.

Das Auftreten von Antibiotikaresistenzen erschwert die Therapie bakterieller Infektionen bis hin zum Versagen bewährter Therapiekonzepte, wodurch es zu gesteigerter Morbidität und Mortalität in den betroffenen Patientengruppen kommt<sup>15,16</sup>. Jährlich sind in Europa rund 30.000 Todesfälle auf Infektionen durch antibiotikaresistente Erreger zurückzuführen, während die Gesundheitssysteme durch zusätzliche Kosten von 1.500.000.000 Euro belastet werden<sup>4,5</sup>. Diese Zahlen unterstreichen den erheblichen negativen Einfluss, den antibiotikaresistente Krankheitserreger auf die Gesundheit der Bevölkerung und die Ökonomie der Gesundheitssysteme haben.

Einer der wichtigsten Gründe für das Auftreten von antibiotikaresistenten Krankheitserregern ist die unsachgemäße Verwendung von Antibiotika im Gesundheitswesen. Hier können insbesondere ärztliches Personal, aber auch Patienten, durch die korrekte Anwendung antiinfektiver Therapien einen Beitrag zur Vermeidung von Antibiotikaresistenzen leisten<sup>17</sup>. Darüber hinaus stellt die Verwendung antiinfektiver Wirkstoffe in der Massentierhaltung einen weiteren wichtigen Faktor für das Auftreten antibiotikaresistenter Mikroorganismen dar<sup>18</sup>.

Während die Bedrohung antibiotikaresistenter Erreger durch oben genannte Entwicklungen kontinuierlich zunimmt, konnten in den vergangenen Jahren nur wenige neuartige Wirkstoffe zur Therapie bakterieller Infektionen entwickelt und zugelassen werden, die jedoch als zusätzliche Behandlungsoptionen dringend benötigt werden<sup>19</sup>. Die wenigen neuen antiinfektiven Wirkstoffe, die in den letzten Jahren zugelassen wurden, sind häufig Derivate bereits bekannter Substanzen und bedienen sich alter Wirkmechanismen<sup>20</sup>. Ein Beispiel einer solchen Substanz ist Delafloxacin, das seit 2021 im europäischen Raum zur klinischen Anwendung zugelassen ist<sup>21</sup>. Es gehört zur Wirkstoffgruppe der Fluorchinolone. Wie andere Wirkstoffe dieser Klasse erzielt auch Delafloxacin durch die Hemmung bakterieller Topoisomerasen eine bakterizide Wirkung<sup>22</sup>. Ein weiteres Beispiel ist Eravazyklin, zugelassen seit 2018, das seine Wirkung durch eine Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese entfaltet und der Gruppe der Tetracykline zuzuordnen ist<sup>23</sup>. Da sich die genannten Wirkstoffe bereits bekannter Wirkmechanismen bedienen, ist die Gefahr einer

Resistenzentwicklung gegenüber diesen erhöht. Zudem wird die Zahl der zur Verfügung stehenden Wirkstoffe, die sich eines neuartigen, bislang nicht genutzten, Wirkmechanismus bedienen, immer geringer.

Sollte diese Entwicklung nicht aufgehalten werden können, werden für das Jahr 2050 weltweit 10.000.000 Todesfälle allein durch das Auftreten antibiotikaresistenter Erreger prognostiziert<sup>24</sup>.

Um dies zu verhindern, bedarf es der Entwicklung neuer Therapieansätze für die Behandlung bakterieller Infektionen. Insbesondere für Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) werden neuartige Wirkstoffe benötigt. Dies geht aus einer Veröffentlichung der Weltgesundheitsorganisation hervor (Tabelle 1)<sup>7</sup>. Darin wird *Pa* neben *Acinetobacter baumannii* und *Enterobacteriaceae* als eines der drei Pathogene gelistet, für die weltweit am dringendsten neue Therapieoptionen benötigt werden.

Priorität	Pathogen
Kritisch	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Carbapenem-resistent)
	<i>Acinetobacter baumannii</i> (Carbapenem-resistent)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (Carbapenem-resistent, 3. Generation Cephalosporin-resistent)
Hoch	<i>Enterococcus faecium</i> (Vancomycin-resistent)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (Methicillin-resistent, Vancomycin-resistent)
	<i>Campylobacter</i> (Fluorchinolon-resistent)
	<i>Salmonella spp.</i> (Fluorchinolon-resistent)
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (3. Generation Cephalosporin-resistent)
Mittel	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Penicillin-resistent)
	<i>Haemophilus influenzae</i> (Ampicillin-resistent)
	<i>Shigella spp.</i> (Fluorchinolon-resistent)

Tabelle 1: Liste der Pathogene, für die gemäß einer Veröffentlichung der Weltgesundheitsorganisation der Bedarf neuer antibakterieller Wirkstoffe weltweit am dringendsten ist<sup>7</sup>.

## 2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

### 2.2.1 Mikrobiologie und Antibiotikaresistenz

*Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) ist ein gramnegatives, aerob-wachsendes, stäbchenförmiges Bakterium<sup>25</sup>. Klinische Relevanz erlangt *Pa* durch akute Krankheitsverläufe, insbesondere immunkompromittierter Patienten<sup>25</sup>. Hier ist *Pa* in der Lage Pneumonien, Harnwegs- und Blutstrominfektionen hervorzurufen, die zu gravierenden Verläufen neigen und komplizierter Therapieschemata bedürfen<sup>26</sup>.

Darüber hinaus sind chronische Infektionen durch *Pa* von besonderer Bedeutung, beispielsweise im Rahmen von Lungenerkrankungen wie der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose)<sup>27</sup>.

*Pa* ist naturgemäß gegenüber vielen antiinfektiven Wirkstoffen resistent<sup>9</sup>. Dieses Phänomen wird als intrinsische Resistenz bezeichnet und beruht auf unterschiedlichen Mechanismen:

Ein Grund liegt in dem Vorhandensein einer Zellwand, die *Pa* umgibt. Sie dient als Penetrationsbarriere und verhindert, dass antiinfektive Wirkstoffe in das Bakterium eindringen und dort ihre Wirkung entfalten können<sup>28</sup>. Die besondere Effizienz dieser Barriere von *Pa* ist auf die wenigen, in der Membran vorhandenen Porine zurückzuführen. Diese stellen Kanäle innerhalb der Barriere dar, über die eine Passage stattfinden kann. Im Gegensatz zu anderen gramnegativen Bakterien, die eine Vielzahl unterschiedlicher Porine nutzen, enthält die Membran bei *Pa* lediglich ein unspezifisches Porin (OprF) mit nur schwacher Aktivität, sodass eine Penetration der äußeren Membran nur schwer möglich ist<sup>29</sup>.

Ein weiterer Mechanismus, der die ausgeprägte intrinsische Resistenz von *Pa* begründet, ist das Vorhandensein und die Aktivität von Effluxpumpen<sup>28</sup>. Dabei handelt es sich um Proteinkomplexe, die unter Aufwand von Energie Wirkstoffe aktiv aus dem Inneren der Bakterienzelle in die Umgebung transportieren und somit die Wirkstoffkonzentration im Zytosol des Bakteriums reduzieren.

Ein dritter, intrinsischer Resistenzmechanismus ist die Produktion Wirkstoff-deaktivierender Enzyme<sup>30</sup>. Ein Beispiel eines solchen Enzyms, das von *Pa* produziert werden kann, ist die AmpC  $\beta$ -Laktamase<sup>31</sup>. Sie bewirkt eine hydrolytische Spaltung und somit Inaktivierung bestimmter antiinfektiver Wirkstoffe der  $\beta$ -Laktam-Gruppe, zu denen beispielsweise Ampicillin gehört<sup>32</sup>.

Die ausgeprägten intrinsischen Resistenzmechanismen von *Pa* sind wichtige Gründe für die geringe Anzahl der zur Therapie von Infektionen zur Verfügung stehenden Wirkstoffe.

Als Beispiele gegen *Pa* wirksamer Medikamente sind Aminoglykoside und ausgewählte  $\beta$ -Laktame wie Cephalosporine der Generation 3b und 4 zu nennen<sup>33</sup>.

Zusätzlich erschwert das Auftreten erworbener, extrinsischer Resistenzmechanismen die Auswahl eines geeigneten Therapieschemas<sup>9</sup>. Diese können sporadisch auftreten oder durch horizontalen Gentransfer erworben werden<sup>34</sup>.

Da intrinsische und extrinsische Resistenzmechanismen die Therapie und Entwicklung von antibakteriellen Wirkstoffen erschweren, haben alternative Ansätze zur Behandlung von Infektionen durch *Pa* zuletzt mehr Aufmerksamkeit durch die Forschung erfahren<sup>9</sup>. Ein Beispiel für einen solchen alternativen Ansatz ist die Blockade von Virulenzfaktoren<sup>35</sup>.

## 2.2.2 Virulenzfaktoren

Virulenzfaktoren sind Eigenschaften oder bakterielle Strukturen, welche krankmachende Mechanismen wie beispielsweise die Zell-Adhäsion und Zell-Invasion, aber auch den Schutz vor Abwehrstrategien des Wirtes vermitteln<sup>36</sup>. Durch die Nutzung bestimmter Virulenzfaktoren können Schäden am Wirt hervorgerufen werden.

*Pa* nutzt eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, worunter ein herausragendes Beispiel das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) ist<sup>35,37</sup>. Dabei handelt es sich um eine komplexe Multi-Proteinstruktur mit deren Hilfe *Pa* Effektorproteine in das Zytosol einer Wirtszelle injiziert, um dort ihre zytotoxische Wirkung zu entfalten. Das T3SS besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, die sich jedoch in funktionellen Komponenten zusammenfassen lassen (Abbildung 1)<sup>38</sup>.

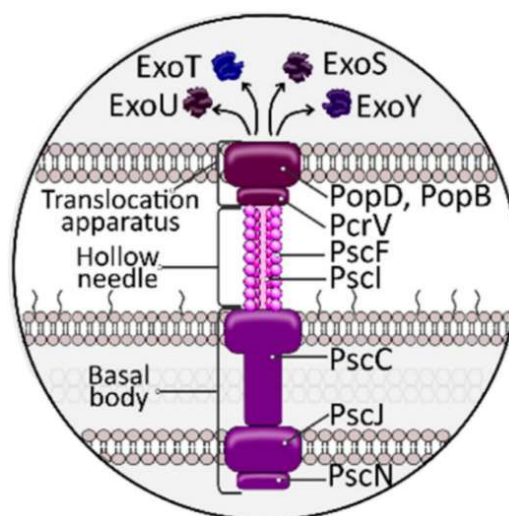


Abbildung 1: Schematische Darstellung des T3SS, bestehend aus einem Basalkörper (PscC, PscJ, PscN) und einem Nadelkomplex (PscI, PscF), dessen Spitze unter anderem aus den Strukturproteinen PopB, PopD und PcrV gebildet wird. Mittels des T3SS können Effektorproteine des Bakteriums durch Basalkörper und Nadelkomplex in das Zytosol einer eukaryoten Wirtszelle transportiert werden (Abbildung: Jurado-Martín, Sainz-Mejias, McClean; *International Journal of Molecular Sciences*, 03/2021)<sup>39</sup>.

Der Komplex des T3SS besteht aus einer basalen Haltestruktur und der Nadelstruktur. Die Effektorproteine des T3SS werden aus dem Zytosol des Bakteriums von der basalen Haltestruktur in die Nadelstruktur transportiert. An der Spitze des Nadelkomplexes befindet sich ein Translokationsapparat, bestehend aus den Proteinen PopB, PopD und PcrV, mit dessen Hilfe die Zellmembran der Wirtszelle perforiert wird, sodass die Effektorproteine in das Zytosol der Wirtszelle transportiert werden können<sup>40</sup>. Der basale Komplex des T3SS beinhaltet unter anderem die ATPase PscN, die die für die Translokation nötige Energie bereitstellt<sup>41</sup>.

Die sezernierten Effektorproteine umfassen die Exotoxine ExoS, ExoT, ExoU und ExoY, deren Gene jedoch nur selten alle von einem einzelnen Stamm exprimiert werden<sup>42</sup>. Die meisten *Pa* Stämme produzieren entweder ExoS oder ExoU, während nur selten beide oder keines dieser Exotoxine gebildet werden können<sup>43</sup>. ExoU ist eine hochpotente Phospholipase, die für die ausgeprägte zytotoxische Wirkung von *Pa* und die somit entstehenden Gewebeschäden verantwortlich ist<sup>44,45</sup>. In der Folge dieser Schäden können freigesetzte proinflammatorische Zytokine einfacher in den Blutstrom übertreten. Deshalb spielt ExoU eine Schlüsselrolle in der Entstehung schwerwiegender septischer Krankheitsbilder und ist mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert<sup>45,46</sup>.

Ein weiterer von *Pa* genutzter Virulenzfaktor ist das Quorum sensing (Qs)<sup>47</sup>. Qs dient unter Zuhilfenahme verschiedener Signalmoleküle dem Informationsaustausch durch Zell-Zell-Kommunikation<sup>48</sup>. Auf diese Weise wird die Ausschüttung von weiteren Virulenzfaktoren sowie die Ausbildung von Biofilmen reguliert und synchronisiert. Durch die konzertierte Aktion kann die bakterielle Population Effekte auf den Wirt ausüben, die einzelne Zellen nicht erwirken könnten, woraus sich ein Überlebensvorteil der Mikroorganismen ergibt<sup>49</sup>.

Die Ausbildung von Biofilmen ist ein zusätzlicher von *Pa* genutzter Virulenzfaktor und wird ebenfalls durch das Qs beeinflusst<sup>50</sup>. Es handelt sich dabei um die Produktion einer muzinösen Schutzschicht, bestehend aus Zuckern und Proteinen, die von den Bakterien gebildet wird<sup>51</sup>. Die Mikroorganismen sind im Biofilm eingebettet und entgehen so dem direkten Einfluss des Immunsystems und antiinfektiver Wirkstoffe. Sie sind somit ein weiterer Grund für therapierefraktäre Infektionen durch *Pa*<sup>52</sup>.

Neben den genannten verfügt *Pa* über eine Vielzahl weiterer Virulenzfaktoren. Hierbei handelt es sich beispielsweise um eine Flagelle und Typ-IV-Pili, die Mobilität und Zell-Adhäsion ermöglichen, sowie weitere Protein-Sekretionssysteme wie die Typ-I-, Typ-II-, Typ-V-, und Typ-VI-Sekretionssysteme, die ebenfalls Toxine sezernieren können<sup>39</sup>. Eines dieser sezernierten Toxine ist Pyocyanin, das durch das Typ-II-Sekretionssystem sezerniert wird. Das freie Radikal dieses Metaboliten bewirkt einen proinflammatorischen Effekt sowie oxidativen Stress. Es ist mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert<sup>53</sup>.

Die exemplarisch vorgestellten Virulenzfaktoren sind wichtige Faktoren in der Infektionspathogenese von *Pa* und können Schäden am Wirtsorganismus bewirken oder führen zu einer reduzierten Wirkung von antimikrobiellen Wirkstoffen<sup>35</sup>. Eine Hemmung oder Blockade dieser Faktoren kann somit die schädigende Wirkung von *Pa* begrenzen und gleichzeitig die Effektivität antiinfektiver Therapien steigern, weshalb die Entwicklung antivirulenter Arzneimittel zunehmend an Bedeutung gewinnt<sup>9</sup>.

## 2.3 Wirtszellbasierte Screening-Plattformen zur Identifikation zytoprotektiver Leitsubstanzen zur Therapie bakterieller Infektionen

### 2.3.1 Grundlegende Funktionsweise

Der Bedarf neuer Therapieoptionen zur Behandlung von Infektionen durch *Pa* ist enorm, bislang konnten in der Entwicklung derselben jedoch nur unzureichende Erfolge erzielt werden<sup>7,20</sup>. Die Verwendung von Screening-Plattformen ist eine bewährte Methode zur Entdeckung neuer antiinfektiver Wirkstoffe, die zuletzt wieder an Bedeutung gewinnt<sup>20,54,55</sup>. Im Rahmen eines Screening-Projektes wird eine möglichst große Zahl unterschiedlicher Substanzen hinsichtlich ihres inhibitorischen Einflusses auf bestimmte Mikroorganismen untersucht. Herkömmliche Screening-Plattformen verzichten auf die Verwendung von Wirtszellen und untersuchen die Substanzen lediglich auf einen bakteriostatischen oder bakteriziden Effekt auf das Pathogen in üblichen Wachstumsmedien<sup>20</sup>.

Im Folgenden soll die Funktionsweise der hier vorgestellten, wirtszellbasierten Screening-Plattform dargestellt werden (Abbildung 2):

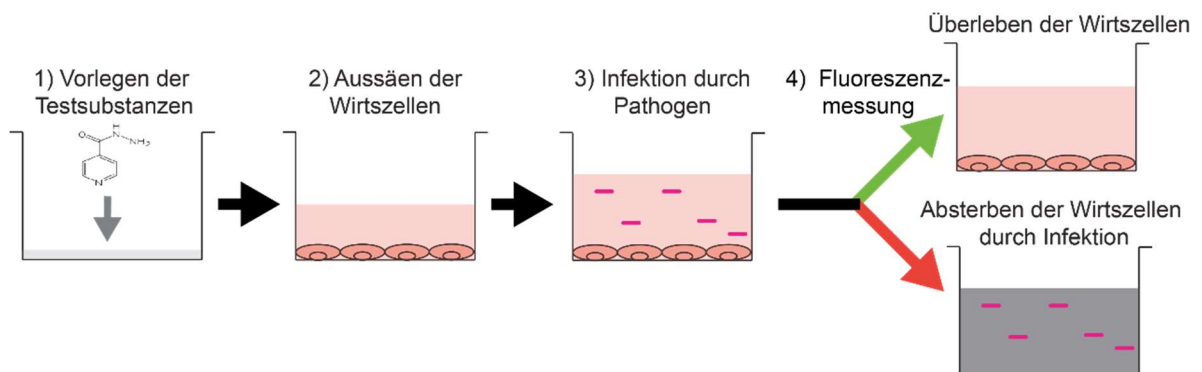


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer wirtszellbasierten Screening-Plattform: Zunächst werden die Testsubstanzen vorgelegt, bevor die Aussaat der Wirtszellen erfolgt. Im Anschluss erfolgt die Infektion durch Zugabe des Pathogens. Mittels einer Fluoreszenzmessung kann das Überleben der infizierten Wirtszellen und somit die Effektivität der Testsubstanz ermittelt werden. Als Positivkontrolle kann ein Wirkstoff mit bekannter antibakterieller Aktivität gegen das Pathogen genutzt werden, um ein Wirtszellüberleben zu erwirken.

Die Testung einer großen Zahl unterschiedlicher Substanzen bedient sich der Verwendung von Mikrotiterplatten mit beispielsweise 96 oder 384 lochförmigen Aussparungen

(Abbildung 3). In jeder dieser Kavitäten kann eine Substanz hinsichtlich ihrer Wirkung getestet werden.

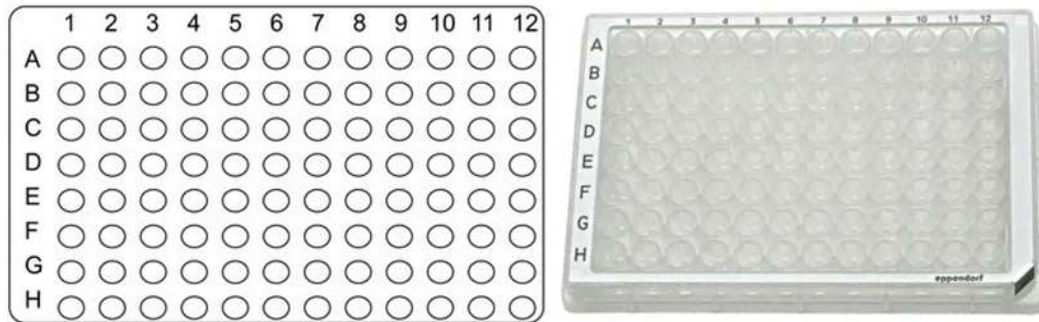


Abbildung 3: Links: Schematische Darstellung einer 96-Kavitäten-Platte<sup>56</sup>. Rechts: Abbildung einer Mikrotiterplatte der Firma Eppendorf<sup>67</sup>.

Bei Verwendung einer wirtszellbasierten Screening-Plattform werden zunächst die zu testenden Substanzen in die Kavitäten vorgelegt. Je nach Anzahl der zu testenden Substanzen werden hierfür automatisierte oder semi-automatisierte Pipettiermaschinen benötigt.

Anschließend werden die Wirtszellen in die Kavitäten der Lochplatte pipettiert. Dann erfolgt eine Ko-Inkubation der ausgesäten Wirtszellen in Präsenz der zu testenden Substanz. In dieser Periode können die Wirtszellen – falls notwendig – an die Oberfläche des Plastiks adhären. Außerdem besteht in diesem Zeitraum die Möglichkeit der Interaktion zwischen Wirtszellen und Testsubstanz.

Zur Infektion der Wirtszellen erfolgt dann die Zugabe des Pathogens. Während einer erneuten Inkubationsperiode findet die Infektion der Wirtszellen statt, die schließlich zum Absterben derselben führt. Dieses kann jedoch in Anwesenheit eines effektiven Wirkstoffes verhindert werden, sodass die Wirtszellen überleben.

Um das Wirtszellüberleben zu quantifizieren, wird jeder Kavität der Platte ein fluoreszierendes Reagenz hinzugefügt, das die Stoffwechselaktivität widerspiegelt. Somit können zytoprotektive Wirkstoffe durch ein gesteigertes Wirtszellüberleben identifiziert werden.

Ist der grundlegende Versuchsaufbau etabliert, muss vor dem Einsatz einer solchen Screening-Plattform die statistische Robustheit des Infektionsmodells evaluiert und sichergestellt werden. Als Positivkontrolle werden hierfür bekannte Substanzen benötigt, die ein Überleben der Wirtszellen zuverlässig bewirken. Hierbei kann es sich beispielsweise um antiinfektive Wirkstoffe mit nachgewiesener Aktivität gegen das zur Infektion der Wirtszellen verwendete Pathogen handeln. Ein statistisches Werkzeug, das die Eignung zum Einsatz in einem Hochdurchsatzverfahren zuverlässig evaluieren kann, ist der



Z'-Faktor<sup>10</sup>. Die Berechnung des Z'-Wertes reflektiert die Standardabweichung ( $\sigma_{c+/-}$ ) und die dynamische Breite ( $|\mu_{c+} - \mu_{c-}|$ ), also die Differenz der Mittelwerte von Positiv- und Negativkontrolle (Abbildung 4). Der sich ergebende Z'-Wert liegt definitionsgemäß zwischen 0 und 1,0. Werte größer 0,5 werden als „exzellente Qualität“ und damit als geeignet für Hochdurchsatz-Screening-Verfahren klassifiziert<sup>10</sup>.

$$Z' = 1 - \frac{3 \times (\sigma_{c+} + \sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|}$$

Formel 1: Anhand der Standardabweichungen  $\sigma_{c+/-}$  und der dynamischen Breite  $|\mu_{c+} - \mu_{c-}|$  erfolgt die Berechnung des Z'-Faktors. Dieser beurteilt die statistische Verlässlichkeit des Verfahrens. Der Z'-Wert von 1,0 gilt hierbei als ideal, Z'-Faktoren  $> 0,5$  werden als „exzellente Qualität“ und geeignet zum Einsatz im Hochdurchsatzverfahren klassifiziert<sup>10</sup>.

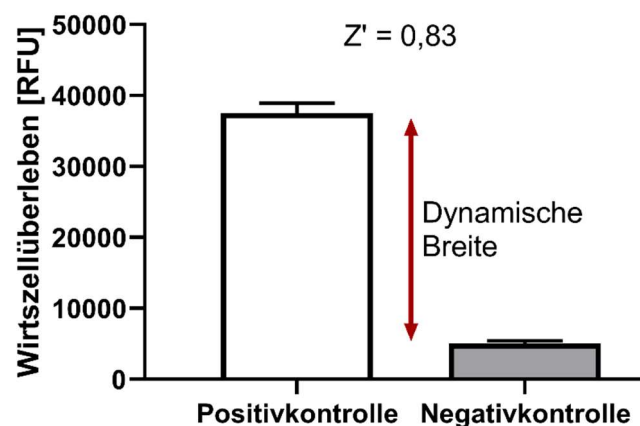


Abbildung 4: Das Überleben der Wirtszellen wird in relativen Fluoreszenzeinheiten (relative fluorescence units - RFU) angegeben, da die Messung der Stoffwechselaktivität und somit der überlebenden Wirtszellen mittels eines fluoreszierenden Agens erfolgt. In Anwesenheit eines zur Positivkontrolle genutzten, bekannten antiinfektiven Wirkstoffes wird ein hohes Wirtszellüberleben erreicht, was sich in hohen Fluoreszenzwerten widerspiegelt. In Abwesenheit eines Wirkstoffes (Negativkontrolle) zeigen sich niedrige Fluoreszenzwerte, entsprechend einem Absterben der infizierten Wirtszellen. Die dynamische Breite, die maßgeblich in die Berechnung des Z'-Faktors einfließt, wird gebildet aus der Differenz der Mittelwerte von Positiv- und Negativkontrolle  $|\mu_{c+} - \mu_{c-}|$ .

### 2.3.2 Vorteile wirtszellbasierter Screening-Plattformen

Wirtszellbasierte Screening-Plattformen sind ein effizientes Instrument zur Identifikation neuer Wirkstoffe<sup>20</sup>. Gegenüber konventioneller Screeningverfahren bieten sie einige Vorteile:

Wie auch herkömmliche Screening-Verfahren können mittels einer wirtszellbasierten Screening-Plattform antibakterielle Wirkstoffe identifiziert werden. Diese verhindern durch ihre bakteriostatische oder bakterizide Wirkung die Infektion und das Absterben der Wirtszellen.

Ein bedeutender Vorteil der wirtszellbasierten Plattform ist, dass zusätzlich zu antibakteriell wirkenden Substanzen auch antivirulente Wirkstoffe identifiziert werden, da durch eine

herabgesetzte Wirksamkeit der Virulenzfaktoren des Pathogens ebenfalls eine Steigerung des Wirtszellüberlebens bewirkt werden kann<sup>20</sup>.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit einer Interaktion der Testsubstanzen mit den Wirtszellen, die zu einer größeren Widerstandsfähigkeit führt und somit in einem gesteigerten Wirtszellüberleben resultiert<sup>58</sup>. Diese Substanzen können zum Beispiel den durch *Pa* hervorgerufenen Zelltod (Nekrose) verhindern.

Zusätzlich können mittels wirtszellbasierter Screening-Verfahren Substanzen mit hoher Zytotoxizität gegenüber eukaryotischen Zellen frühzeitig ausgeschlossen werden, da diese ein Absterben der Wirtszellen bewirken und somit nicht als Treffersubstanzen erkannt werden. Im Rahmen konventioneller Screening-Methoden werden solche Substanzen zwar als Treffersubstanzen erkannt, da sie das bakterielle Wachstum hemmen, eine klinische Nutzung ist jedoch aufgrund der hohen Zytotoxizität gegenüber humanen Zellen nicht möglich.

### **2.3.3 Identifikation der zytoprotektiven Substanzen und Untersuchung des Wirkmechanismus**

Nach Etablierung und Optimierung der wirtszellbasierten Screening-Plattform, kann diese zur Identifikation zytoprotektiver Substanzen eingesetzt werden. Hierbei können bei aktiven Substanzen antibakterielle und antivirulente Wirkmechanismen bestehen. Auch eine Modifikation der Abwehrmechanismen der Wirtszelle durch die Substanz ist möglich<sup>58</sup>. Um die Treffersubstanzen und ihre Wirkmechanismen zu erforschen, sind im Anschluss an das Screening-Projekt weitere Experimente notwendig (Abbildung 5).

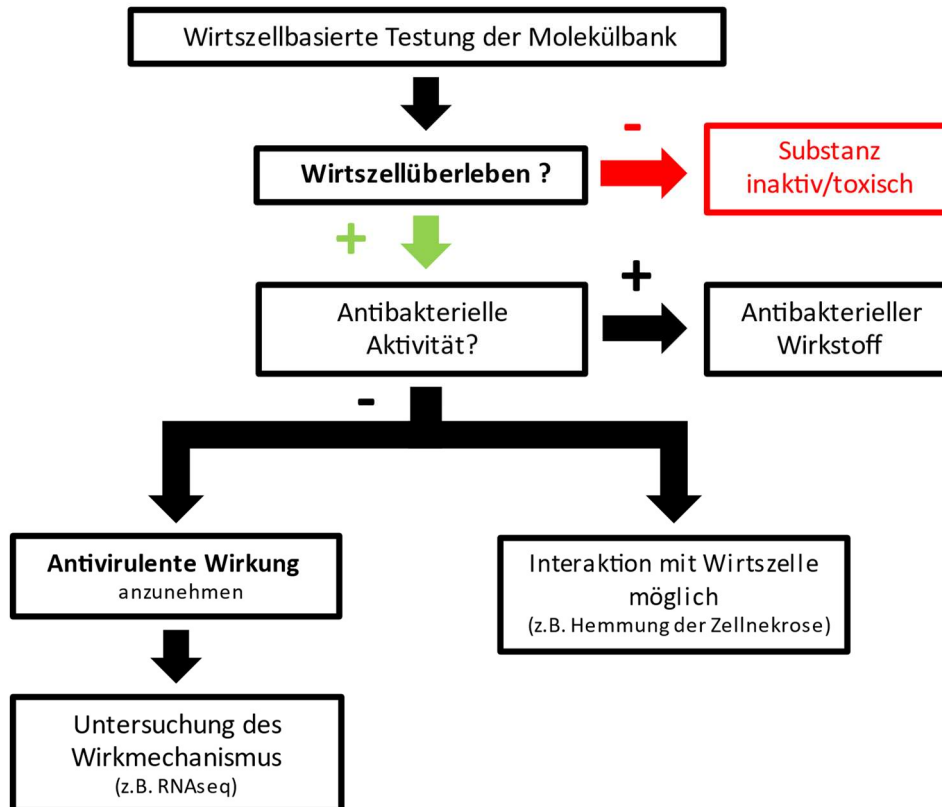


Abbildung 5: Durch Anwendung der wirtszellbasierten Screening-Plattform werden zytoprotektive Substanzen identifiziert, deren Wirkmechanismus zunächst unbekannt ist. Es erfolgt eine Testung der Treffersubstanzen auf antibakterielle Aktivität. Ist diese nicht nachzuweisen, kann eine antivirulente Wirkung angenommen werden. Weitere Experimente zur Untersuchung des Wirkmechanismus sind nötig. Neben antivirulenten Wirkmechanismen ist auch eine Interaktion der zytoprotektiven Substanz mit der Wirtszelle, die zu einem gesteigerten Überleben führt, möglich.

Zunächst werden die identifizierten zytoprotektiven Substanzen hinsichtlich ihrer antibakteriellen Wirkung untersucht. Antibakteriell wirksam sind Substanzen, die eine bakteriostatische oder bakterizide Wirkung ausüben. Um eine derartige Wirkung zu untersuchen, wird das Pathogen in Gegenwart der identifizierten Substanzen in Wachstumsmedium kultiviert und das Wachstum der Bakterien mit einer unbehandelten Kultur verglichen. Sofern eine antibakterielle Wirkung nachgewiesen wurde, kann ein indirekter Hinweis auf den Wirkmechanismus durch die Züchtung resistenter Pathogenstämme erlangt werden. Dies geschieht durch die Exposition einer Kultur des Pathogens gegenüber einer niedrigen Konzentration des Wirkstoffs. Liegt ein resistenter Stamm des Bakteriums vor, kann der Nachweis von Mutationen in Genen, die für die Produktion bestimmter Strukturen oder Enzyme verantwortlich sind, Informationen über Zielstrukturen der Treffersubstanz erbringen<sup>59</sup>.

Ist eine antibakterielle Wirkung nicht nachzuweisen, kommen als zweite Wirkstoffklasse antivirulent wirkende Substanzen in Betracht. Dies sind Wirkstoffe, die ihre zytoprotektive Wirkung über eine Hemmung von Virulenzfaktoren entfalten<sup>35</sup>.

Eine Möglichkeit potenzielle Einflüsse der identifizierten Substanzen auf die Virulenzfaktoren des Pathogens zu identifizieren ist die Genexpressionsanalyse. Diese kann beispielsweise durch eine RNA-Sequenzierung erfolgen, mittels derer die Konzentration von mRNA in unterschiedlichen experimentellen Bedingungen bestimmt wird. Somit wird ein Rückschluss auf eine veränderte Genexpression unter Einfluss der zytoprotektiven Substanz möglich, was Aufschluss über den Wirkmechanismus der Substanz geben kann<sup>60</sup>.

Eine weitere Möglichkeit Informationen über mögliche Wirkmechanismen zu erhalten, ist die Untersuchung hinsichtlich einer veränderten Produktion und Sekretion bestimmter Proteine, beispielsweise Exotoxine. Diese ist mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) möglich<sup>60</sup>. Hierbei werden die Proteine einer jeweils behandelten und einer unbehandelten Kultur des Pathogens extrahiert und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Visualisierung mittels Western Blot kann Aufschluss über die Menge einzelner extrahierter Proteine geben. Somit kann beispielsweise eine verringerte Produktion oder Sekretion von Exotoxinen gezeigt werden.

Neben den genannten existieren viele weitere Möglichkeiten, den Einfluss der Treffersubstanz auf ein Pathogen zu evaluieren. So können auch einfache, phänotypische Untersuchungen zur Identifikation des Wirkmechanismus beitragen. Die Motilität des Bakteriums kann beispielsweise beurteilt werden, indem zwei Agar-Nährmedien, von denen eines die zytoprotektive Substanz enthält, mit dem Bakterium beimpft werden. Anhand der anschließenden Ausbreitung des Bakteriums über einen bestimmten Zeitraum kann makroskopisch ein Rückschluss auf die Motilität gezogen werden<sup>61</sup>.

Ist trotz ausgiebiger Untersuchungen weder eine antibakterielle noch eine antivirulente Wirkung nachzuweisen, kommen als dritte Wirkstoffgruppe auch zytoprotektive Substanzen in Betracht, die ihre Wirkung über eine Interaktion mit der Wirtszelle entfalten.

Beispielsweise konnte für Infektionen durch *Pa* eine erhöhte Aktivität der neutrophilen Elastase beschrieben werden, die konsekutiv zum Abbau von SPLUNC1 führt, einem wirtszelleigenen Protein, das vom Epithel der Atemwege gebildet wird und für das ein bakteriostatischer Effekt auf *Pa* nachgewiesen ist<sup>62,63</sup>. Durch den gesteigerten Abbau von SPLUNC1 entgeht *Pa* also dem Abwehrmechanismus der Wirtszelle. *In vivo* Experimente konnten zeigen, dass die Behandlung von *Pa*-infizierten Mäusen mit  $\alpha$ 1-Antitrypsin zu einer gesteigerten Expression von SPLUNC1 der infizierten Wirtszellen führt. Die pulmonale Erregerlast konnte somit gesenkt sowie die Produktion proinflammatorischer Zytokine verringert werden<sup>62</sup>.

Auch für andere bakterielle Krankheitserreger sind Wirkstoffe mit zytoprotektiver Wirkung durch wirtszellgerichtete Effekte beschrieben und befinden sich in der vorklinischen Entwicklung<sup>64,65</sup>. Ein Beispiel ist Dexamethason, das *in vitro* durch eine herabgesetzte Aktivität der wirtszelleigenen p38 MAPK eine Hemmung des durch *Mycobacterium tuberculosis* induzierten, nekrotischen Zelltods bewirkt<sup>58</sup>.

Erscheint die identifizierte zytoprotektive Substanz nach Untersuchung möglicher Wirkmechanismen als geeigneter Kandidat zur Entwicklung eines neuen antiinfektiven Medikamentes, erfolgt die Optimierung ihrer pharmakologischen Eigenschaften sowie die Testung *in vivo*.

## **2.4 Zielsetzung der Arbeit**

Die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe zur Behandlung von Infektionen durch *Pa* ist von höchster Dringlichkeit<sup>7</sup>. Ziel der vorliegenden Arbeit ist deshalb die Entwicklung einer innovativen, wirtszellbasierten Screening-Plattform zur Identifikation von neuen Substanzen mit Wirksamkeit gegen *Pa*. Dies umfasst die Etablierung eines *in vitro* Infektions-assays sowie die Optimierung der Plattform zur statistisch verlässlichen und gleichzeitig effizienten Anwendung im Rahmen von Screening-Projekten.

Abschließend wird die Funktionalität und Praktikabilität der entwickelten Methode überprüft. Hierzu wird ein „proof of concept“ Screening des „World Diversity Sets 3“ der Firma Specs, das 10.000 synthetische „small molecules“ umfasst, durchgeführt. Die identifizierten zytoprotektiven Substanzen werden hinsichtlich ihres Wirkmechanismus untersucht.



### 3 Publikation:

## Comprehensive Host Cell-Based Screening Assays for Identification of Anti-Virulence Drugs Targeting *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella* Typhimurium

Julia von Ambüren <sup>1,2,†</sup>, Fynn Schreiber <sup>1,2,†</sup>, Julia Fischer <sup>1,2</sup>, Sandra Winter <sup>2</sup>, Edeltraud van Gumpel <sup>2</sup>, Alexander Simonis <sup>1,2,\*,‡</sup> and Jan Rybniker <sup>1,2,3,\*,‡</sup>

<sup>1</sup> Department I of Internal Medicine, University of Cologne, 50937 Cologne, Germany, j.vonambueren@gmx.de (J.v.A.); f.schreiber@smail.uni-koeln.de (F.S.); julia.fischer@uk-koeln.de (J.F.)

<sup>2</sup> Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), University of Cologne, 50931 Cologne, Germany, sandra.winter@uk-koeln.de (S.W.), edeltraud.van-gumpel@uk-koeln.de (E.v.G.)

<sup>3</sup> German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Bonn-Cologne, 50937 Cologne, Germany

\* Correspondence: alexander.simonis@uk-koeln.de (A.S.); jan.rybniker@uk-koeln.de (J.R.)

† Both authors contributed equally and should be considered as first authors

# Both authors contributed equally and should be considered as senior authors

Received: 7 July 2020; Accepted: 20 July 2020; Published: 22 July

### 3.1 Abstract

The prevalence of bacterial pathogens being resistant to antibiotic treatment is increasing worldwide, leading to a severe global health challenge. Simultaneously, the development and approval of new antibiotics stagnated in the past decades, leading to an urgent need for novel approaches to avoid the spread of untreatable bacterial infections in the future. We developed a highly comprehensive screening platform based on quantification of pathogen driven host-cell death to detect new anti-virulence drugs targeting *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ST), both known for their emerging antibiotic resistance. By screening over 10,000 small molecules we could identify several substances showing promising effects on *Pa* and ST pathogenicity in our *in vitro* infection model. Importantly, we could detect compounds potently inhibiting bacteria induced killing of host cells and one novel compound with impact on the function of the type 3 secretion system (T3SS) of ST. Thus, we provide proof of concept data of rapid and feasible medium- to high-throughput drug screening assays targeting virulence mechanisms of two major Gram-negative pathogens.

**Keywords:** multidrug-resistant pathogens; host-directed therapies; antibiotic drug screening; *Salmonella* Typhimurium; *Pseudomonas aeruginosa*; type 3 secretion system; antibiotic resistance

### 3.2 Introduction

Multidrug resistant microorganisms pose a major public health concern and are responsible for around 30,000 annual deaths and a loss of almost 1,000,000 disability-adjusted life-years in Europe alone [1]. Infections by drug-resistant Gram-negative pathogens are eminently challenging and related with an increased mortality and costs [2,3]. Development of novel antibiotic drugs targeting Gram-negative bacteria is complicated by intrinsic and acquired protective mechanisms including multidrug efflux pumps, a high mutation rate, structural properties of the cell wall and antibiotic resistance genes (e.g. antibiotic-degrading or antibiotic-inactivating enzymes like carbapenemases) determined chromosomally or acquired by horizontal gene transfer [4].

Two remarkable representatives of Gram-negative bacteria are *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*), a facultative pathogen that is a major cause of nosocomial infections such as pneumonia, urinary tract or bloodstream infections, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*ST*), a common cause of foodborne illness which is also able to cause life threatening infections in immune compromised hosts [5,6]. Both pathogens are known for their high resistance rates [7–10]. To overcome the existing lack of new bactericidal or bacteriostatic substances, the screening for new compounds targeting virulence factors of bacteria or abrogating detrimental effects of these factors in the host seems feasible and promising.

Pathogenicity of *Pa* and *ST* is mediated by several virulence factors including lipopolysaccharide, type 4 pili and the type three secretion system (T3SS). The T3SS has already been in the focus of the development of new drugs with anti-virulence activity but no inhibitor could be implemented in a clinical usage so far [11]. For various chemical derivatives, including synthetic small molecules, an inhibitory effect of the T3SS could be described. For instance, salicylidene acylhydrazide interferes with the secretion mechanisms of effector proteins by suppressing corresponding genetic signals on transcriptional levels. Also, several imidazole derivatives were described to target transcription factors leading to a downregulation of virulence associated genes without impact on bacterial growth [12]. A different mode of action could be shown for 2-Imino-5-arylidenethiazolidinones derivatives, which are capable of manipulating the formation of the T3SS needle complex in *ST* and thus prevent the primary infiltration of virulence factors into the host cell cytosol [13].

However, also the inhibition of other bacterial virulence factors are promising targets to fight bacterial infections: clofoctol specifically inhibits the expression of quorum sensing (QS) controlled virulence, a bacterial cell–cell communication process, which is involved in pyocyanin production, motility and biofilm formation [14]. Furthermore, in *ST* several

quinazoline compounds showed a sufficient downregulation of PhoP/PhoQ-activated genes, which are crucial for environmental adaption including survival within macrophages [15–17]. Notably, not only bacterial factors can be targeted to abrogate pathogenesis. Manipulation of the host cell can also be used for this purpose. For example reduced intracellular bacterial growth of ST and *Mycobacterium tuberculosis* could be achieved by modulation of host cell kinases [18]. In *Pa* the function of the acid sphingomyelinase (ASM), an enzyme catalyzing the breakdown of sphingomyelin to ceramide and phosphorylcholine is crucial for cellular response and defense against the pathogen [19,20]. Interestingly, function of the ASM can be modulated by a large group of pharmacological compounds (also called FIASMA = functional inhibitors of acid sphingomyelinase) including several tricyclic antidepressants, calcium channel blockers and H1 antagonists [21].

Here, we established two host cell based medium-throughput screening platforms, which exploit virulence factor dependent killing of *Pa* and ST infected of host cells. This method provides a robust, rapid and comprehensive screening platform that theoretically allows for identification of molecules with antibiotic activity, anti-virulence and host-directed drugs, as well as antibiotic prodrugs [22]. Due to the simple batchwise setup of the assay without any required washing-steps, this method is particularly suitable for medium- and high-throughput screenings. Utilizing these platforms, we performed a proof of concept screening with 10,000 diverse chemical compounds [23]. Of note, we could identify several series of novel chemical entities that were able to protect host cells from bacteria-induced cell death without affecting the viability of the eukaryotic cells or bacterial growth, indicating an anti-virulence effect of these compounds.

### **3.3 Materials and Methods**

#### **3.3.1 Chemical Compounds**

Gentamicin was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and moxifloxacin from Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). For the medium-throughput screening, “The world diversity set 3” from Specs (Zoetermeer, Netherlands) was used.

#### **3.3.2 Cell Culture**

A549 human lung adenocarcinoma cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 medium (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. J774.2 mouse macrophages (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were grown in Dulbecco’s modified



Eagle's medium (DMEM) (ThermoFisher, Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FBS at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.3.3 Culture Conditions of Bacteria

*Pseudomonas aeruginosa* O1F wildtype (WT) and PAO1F $\Delta$ *pscD* strains were grown in 2 x YT medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For growth inhibition assays PAO1F was grown in Mueller-Hinton broth (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). *Salmonella* Typhimurium strains (SL1344 WT and *invA* mutant strain) were grown in brain heart infusion (BHI) medium (FisherScientific, Hampton, NH, USA).

### 3.3.4 Host-Cell Survival Assays

Compounds of "The world diversity set 3" from Specs (dissolved in DMSO) were pre-plated into 96-well plates at a concentration of 200  $\mu$ M or 500  $\mu$ M using a volume of 10  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O (final concentration 20 or 50  $\mu$ M). As positive control, gentamicin 200  $\mu$ g/mL (for *Pa*) or moxifloxacin 100  $\mu$ g/mL (for ST) dissolved in 10  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O were pre-plated. As negative control DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in dH<sub>2</sub>O was added to match the DMSO concentration of the compounds (final volume 10  $\mu$ L). For drug screening with *Pa* A549 cells were seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cells per well in 70  $\mu$ L RPMI. After pre-incubation for 3 h at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> to ensure cell adherence, cells were infected with PAO1F with an MOI (multiplicity of infection) of 0.5 in 20  $\mu$ L RPMI. After 4 h p.i. (post infection) gentamicin and moxifloxacin dissolved in 10  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O per well were added at a final concentration of 20  $\mu$ g/mL and 10  $\mu$ g/mL respectively to prevent bacterial overgrowth. After overnight incubation the fluorescent dye resazurin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added at a final concentration of 8% (v/v, 10  $\mu$ L/well). Subsequently the assay plates were incubated at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for another 4 h. Fluorescence was measured at a wavelength of 560/590 nm (EX-max./EM-max.) using a Tecan Safire II fluorescence reader (Tecan, Maennedorf, Switzerland).

For drug screening with ST Specs compounds were dissolved in DMSO and then pre-plated at 10  $\mu$ L each into 96-well-plates using a final drug concentration as described above (50  $\mu$ M). J774.2 M $\phi$  cells were seeded at a density of  $2 \times 10^4$  cells per well in 80  $\mu$ L DMEM and incubated for 3 h at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were infected with ST SL1344 with an MOI of 0.5 in 20  $\mu$ L BHI for 3 h. To stop the infection and prevent bacterial overgrowth gentamicin (50  $\mu$ g/mL) was added and the plates were incubated for another 48 h. To quantify cell viability 10  $\mu$ L resazurin was added and fluorescence was measured as described above.

### 3.3.5 Growth Inhibition Assays

Compounds were pre-plated into 96-well plates at a concentration of 200  $\mu$ M or 500  $\mu$ M dissolved in 10  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O (final drug concentration per well: 20 or 50  $\mu$ M). As controls 10  $\mu$ L gentamicin (20  $\mu$ g/mL), 10  $\mu$ L moxifloxacin (10  $\mu$ g/mL) or 10  $\mu$ L DMSO were plated. Then bacteria were added at the same concentrations that were used for the host cell-based drug screening described above. Subsequently the plates were incubated overnight for *Pa* and 48 h for ST at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. Finally, OD600 of each well were measured by using a Hidex Sense multimodal microplate reader (Hidex, Turku, Finland).

### 3.3.6 RNA-Seq in *Pseudomonas aeruginosa*

For gene expression analysis *Pa* WT was grown to log-phase with G5-193 (Specs), 7-fluoroindole (7-FI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) or DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) using a final concentration of 100  $\mu$ M. After RNA purification with an RNAeasy Minikit (Qiagen, Venlo, Netherlands) according to the manufacturer's instructions, library preparation and sequencing were performed by the Cologne Center for Genomics (CCG): briefly, library preparation was performed with the TrueSeq Stranded Total RNA kit (Illumina, San Diego, CA, USA) with 1  $\mu$ g total RNA input. First steps of the library preparation involved the removal of ribosomal RNA using biotinylated target-specific oligos from the RiboMinus Bacteria Kit (ThermoFisher, Scientific, Waltham, MA, USA). Following purification, the RNA was fragmented and cleaved. RNA fragments were copied into first strand cDNA using reverse transcriptase and random primers, followed by second strand cDNA synthesis using DNA Polymerase I and RNase H. These cDNA fragments then had the addition of a single "A" base and subsequent ligation of the adapter. The products were purified and enriched with PCR to create the final cDNA library. After library validation and quantification (Agilent tape station), equimolar amounts of library were pooled. The pool was quantified by using the KAPA Library Quantification Kit (VWR, Radnor, PA, USA) and the 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) and sequenced on an NovaSeq6000 sequencing instrument (Illumina) and a PE100 protocol. Analysis of gene expression data were done by Rockhopper (Wellesley College, MA, USA) and Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) software.

### 3.3.7 T3SS-Secretion Assay

Bacteria were grown overnight under T3SS inducing conditions in LB media containing 5 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether) (EGTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The next day the suspension was diluted, and compounds were added to a final concentration of 50  $\mu$ M in a 50 mL tube. After another 4 h of co-incubation the supernatant was separated via centrifugation and filtered through a 0.45  $\mu$ m-pore-size low protein-binding filter (ThermoFisher, Scientific, Waltham, MA, USA). Subsequently proteins were

precipitated by trichloroacetic acid (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), washed and analyzed by SDS-PAGE using Instant Blue Coomassie dye (Expedeon, Heidelberg, Germany).

### 3.3.8 Statistical Analysis

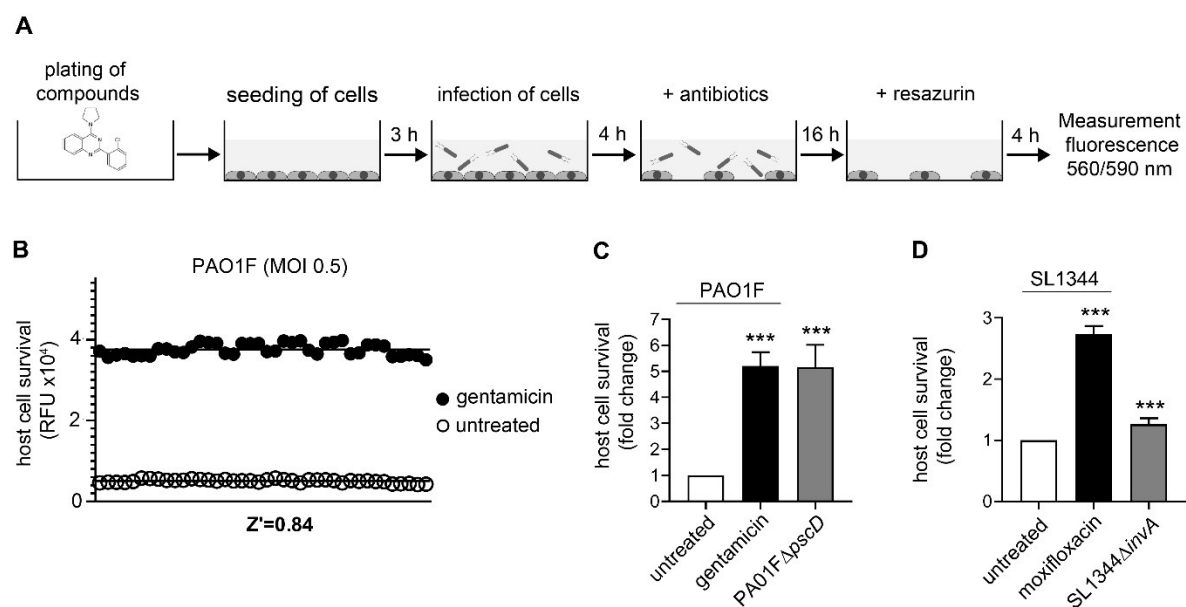
To prove assay-quality the non-dimensional statistical parameter Z'-factor was used to define the data deviation of the respective controls in relation to the corresponding mean values and the dynamic range of the assay [24]. The calculated Z' factor ( $Z' = 1 - [(3 * \sigma_{\text{pos}} + 3 * \sigma_{\text{neg}}) / (\mu_{\text{pos}} - \mu_{\text{neg}})]$ ) can range from 0 to 1 and is determined by the assay group's standard deviations  $\sigma$  and means  $\mu$  of the positive and negative control. Z' factor values of >0.5 indicating a reliable assay quality, which are suitable to perform high throughput screenings [24]. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 8.0.2 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). The quantitative data is reported as mean value. Two-tailed Student's t-test with confidence intervals of 95% was used for the statistical analysis of significance. *p*-values less than or equal to 0.05 were considered statistically significant.

## 3.4 Results

### 3.4.1 Assay Development and Validation for *Pseudomonas aeruginosa*

To establish a medium to high throughput assay based on *Pa* (PAO1F) dependent killing of host cells, we infected A549 cells in a batch assay that does not require washing steps (Figure 1A). Due to the frequent pulmonary infections caused of *Pa* we selected A549 cells which are commonly used as pulmonary epithelium and *Pa* infection model [25]. First, A549 cells were seeded in 96 well plates in the presence of putative anti-virulence compounds. Following infection with *Pa* for a sufficient amount of time to allow for significant host-cell damage, bacterial growth was stopped by addition of a combination of gentamicin and moxifloxacin. Both antibiotics were necessary to avoid bacterial overgrowth in all test wells. Continuous incubation overnight led to further reduction of A549 cell counts in *Pa* affected cells. To optimize assay quality, we tested several conditions including alteration of the host-cell number, incubation time, temperature or MOI. For optimal results A549 cells were seeded at a density of  $2 \times 10^4$  well (96 wells). After preincubation for 3 h cells were infected with an MOI of 0.5 for 4 h and antibiotics were added subsequently. After overnight incubation, resazurin was added for 4 h before cell viability was quantified by fluorescence activity at 560/590 nm (Figure 1A). We evaluated the statistical liability of our screening assays for *Pa* by calculating the Z'-factor. As representatively shown in Figure 1B, using an MOI of 0.5 resulted in a Z' value of 0.84, while a decrease of the MOI to 0.3 led to a standard deviation and a narrow separation band of the two control groups (untreated vs gentamicin-

treated cells) resulting in a decreased Z' value of 0.38 (Figure A1A). After having determined optimal conditions, we confirmed the capability of the assay to detect disruption of *Pa* virulence by testing a T3SS-deficient strain of *Pa*. Infection of A549 cells with the mutant strain PAO1F $\Delta$ pscD, which lacks the ability to produce PscD, an essential inner membrane T3SS component [26], led to a 5-fold increase of viability compared to cells infected with the PAO1F wildtype strain (Figure 1C). These data confirmed suitability of the assay for detection of anti-virulence drugs.



**Figure 1.** Screening assay validation for high throughput screenings and sensitivity to T3SS mediated toxicity. (A) Experimental setup: 96-well plates were pre-plated with compounds before A549 cells were seeded. After preincubation for 3 h to ensure cell adherence, cells were infected with *Pa* strain PAO1F at an MOI of 0.5. After 4 h p.i. (post infection) antibiotics were added and the fluorescent dye resazurin was added the next day. Subsequently assay plates were incubated for another 4 h and fluorescence was measured at a wavelength of 560/590 nm. (B) To test for assay robustness, Z' factor values was calculated under various assay conditions by determining the standard deviations and means of the positive and negative controls as explained in the methods section.  $2 \times 10^4$  A549 cells/well were seeded into a 96 well plate and subsequently infected with the WT strain PAO1F at an MOI of 0.5 in the presence of gentamicin (black dots) or left untreated (white dots). Host cell survival was determined by the fluorescent dye resazurin (RFU = relative fluorescence units). (C) Using an optimized assay protocol, A549 cells were co-incubated with the WT strain PAO1F (white bar) and the T3SS-deficient mutant strain PAO1F $\Delta$ pscD (gray bar). As positive control gentamicin (20  $\mu$ g/mL) (black bar) was added to the cells prior to infection. (D) For ST J774.2 M $\phi$  cells were infected with an MOI of 0.5 with ST WT strain SL1344 (white bar) or mutant strain SL1344 $\Delta$ invA (gray bar). Moxifloxacin (10  $\mu$ g/mL) were added as positive control (black bar). 4 h p.i. bacterial growth was stopped by addition of gentamicin and cells were incubated for 48 h. Subsequently resazurin was added and cell viability were measured by fluorescence reading (560/590 nm). Graphs show mean  $\pm$  standard error of the mean. \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3.4.2 Assay Development and Validation for *Salmonella* Typhimurium

After establishment of the screening assay for *Pa* we tried to adapt the same assay for ST. ST was chosen due to comparable structural similarities and virulence factors particularly

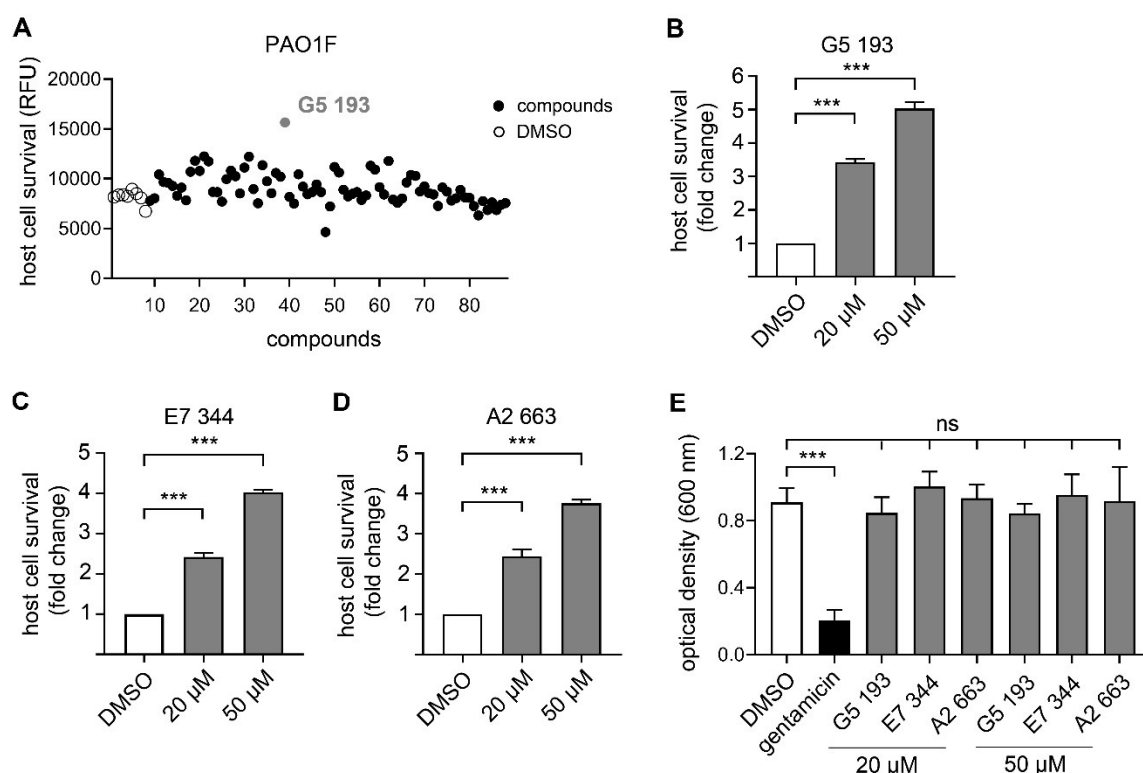
regarding the type three secretion system. Despite their supposed similarities, initial experiments failed with the same experimental conditions as used before. Importantly, no sufficient ST-mediated host-cell killing could be achieved in A549 cells (Figure A1B). The addition of gentamicin at an early stage prevented a sufficient cell invasion by ST followed by a measurable host cell cytotoxicity, whereas a prolonged incubation time led to a bacterial overgrowth of the cells, which hinder the fluorometric determination of host cell survival. To overcome this problem, we changed the *in vitro* model by using a macrophage cell line (J774.2 M $\phi$ ) [27]. Due to the presumable enhanced host cell invasion by ST, we could achieve a sufficient and timely quantifiable cell death in co-culture conditions without an imminent bacterial overgrowth.

As performed with *Pa*, we tested a large series of different conditions to achieve Z-values >0.5 (Figure A1C): In particular, we observed the necessity for a prolonged co-culture time of ST J774.2 M $\phi$  to detect sufficient host-cell killing. Finally, higher gentamicin concentrations were needed to prevent bacterial overgrowth after 4 h. To determine sensitivity to anti-virulence compounds we tested a T3SS-deficient ST strain (SL1344 $\Delta$ *invA*) in our J774.2 M $\phi$  cell-based assay. *InvA* is part of the inner membrane protein of the ST T3SS, which is genetically encoded and regulated via the *Salmonella* pathogenicity island (SPI), a key factor for ST virulence [28]. Thus, lack of the *invA* gene leads to an impaired function of the T3SS and a reduction of cytotoxicity in ST (Figure 1D). Cell viability was significantly increased using the *invA* deficient ST strain compared to the wildtype strain, indicating sufficient sensitivity of the assay for detection of potential T3SS-inhibiting or other anti-virulence compounds.

### **3.4.3 Identification of Novel Compounds with Anti-Virulence Activity against *Pseudomonas aeruginosa***

Next we performed a pilot screening with 10,000 diverse chemical small molecules using the Specs “World diversity set 3”, a library of diverse screening compounds including molecules with a molecular weight (< 500 Da), bond rotation ( $\leq 10$ ) and topological polar surface area (tPSA) ( $\leq 140\text{\AA}^2$ ) [23]. Exemplary results of a screening assay in a 96-well plate format are shown in Figure 2A. A549 cells were infected with WT strain PAO1F with an MOI of 0.5 for 4 h in the presence of 80 different library compounds tested at a concentration of 20  $\mu$ M. DMSO (solvent of the compounds) was used as control. Of note, for one compound (G5-193; gray dot) a remarkable increase of the RFU (relative fluorescence units) could be detected indicating increased host cell survival. Altogether, for 6 out of 10,000 compounds an increase of host cell survival > 150% compared to the negative control could be detected. To verify our positive results, single molecules were purchased and validated by re-testing using two different concentrations (20 and of 50  $\mu$ M)

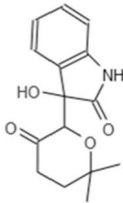
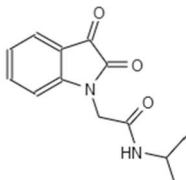
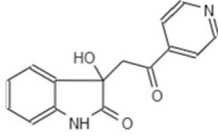
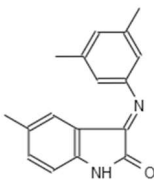
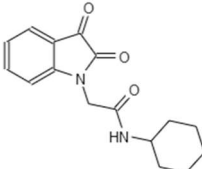
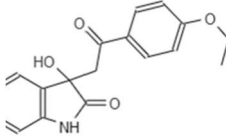
in the host cell survival assay which confirmed dose dependent protection of A549 cells (Figure 2B–D; Figure A1D–F) Interestingly, bacterial growth was not affected by these molecules indicating an anti-virulence effect (Figure 2E). Analysis of the chemical structures of the six substances revealed a common indoline-2-one core structure (Table 1). For compounds sharing this core structure, anti-virulence activity has been described previously: Lee et al. could show that indoline-derivates lead to a downregulation of several quorum sensing related virulence factors, which is associated with an increased host-cell survival upon infection [29].



**Figure 2.** Identification of compounds with antipseudomonal activity. (A) A549 cells were infected with Pa WT strain PAO1F with an MOI of 0.5 in presence of compounds of the Specs library (black dots) (20 μM). Infection was abrogated after 4 h p.i. and cell viability was measured by addition of the fluorescent dye resazurin. Graph represents one 96 well screening plate. One compound (G5-193, gray dot) shows a significant increase of cell viability compared to the negative control (DMSO; white dots). (B–D) For validation of compounds with effect on cell viability (1.5 fold increase of cell viability compared to DMSO treated cells) experiments were repeated in two different doses of 20 or 50 μM (gray bars). Host cell survival is shown as fold change compared to cells incubated with DMSO (white bars). (E) PAO1F was grown in Miller Hinton Broth overnight in the presence of DMSO, gentamicin or compounds at a concentration of 20 or 50 μM. Subsequently the OD600 were measured by using a microplate reader. Graphs show mean ± standard error of the mean. None of the tested hit compounds had a growth inhibitory effect on Pa in broth. ns = non-significant; \*\*\*  $p < 0.001$ .

To confirm a similar mode of action of our most potent hit (G5-193) we performed an RNA-seq experiment to analyze differential gene regulation in treated versus non-treated Pa. In total we were able to identify over 900 genes that were either up- or downregulated by G5-193 with at least a two-fold change. As shown for other indoline-2-one compounds we could observe a downregulation of phzA1, phzB1, phzS, pchD, pvdM and pvdS which

play a relevant role in biosynthesis of the virulence factors phenazine, pyochelin and pyoverdine (Table S1). Repressing the production of these proteins at a transcriptional level can explain the host cell protective activity of the identified hit molecule. These findings are in line with the previously described effects of indoline-2-ones by Lee et al., who also could show an inhibition of quorum sensing related proteins and other virulence factors by indole and 7-hydroxyindole [29].

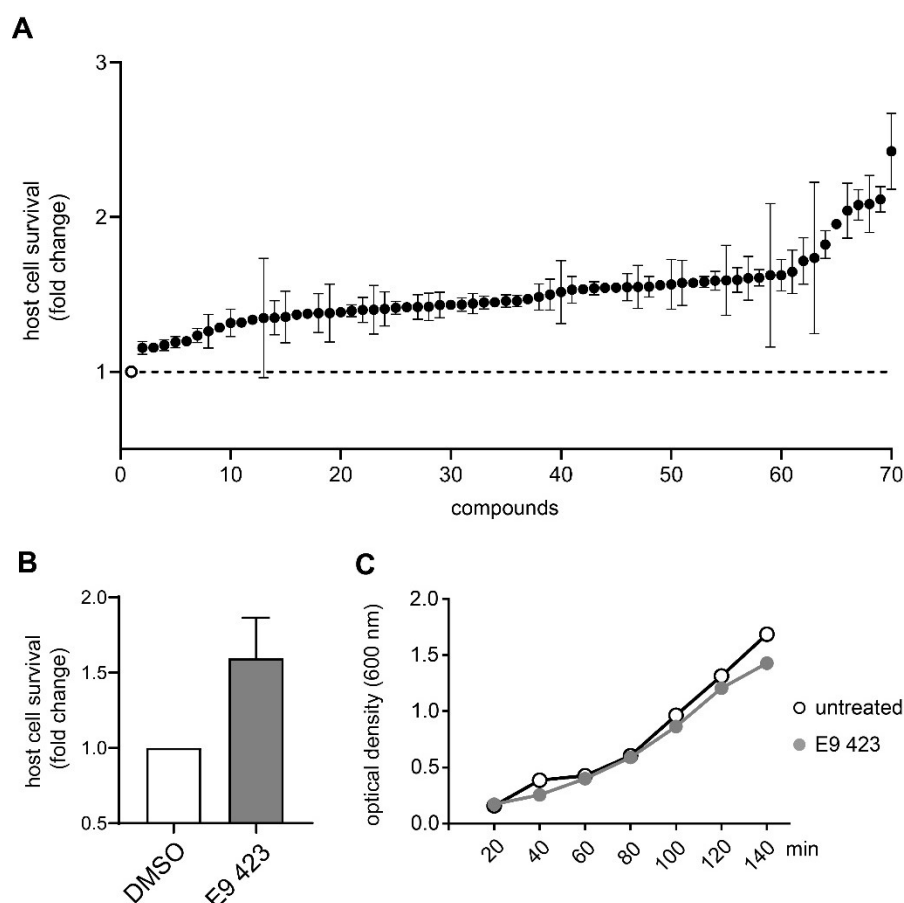
Internal Number	Specs-ID	Chemical Structure
G5 193	AJ-292/43278258	
E7 344	AK-968/11036034	
A2 663	AQ-911/40696225	
B2 442	AK-918/42028178	
B2 621	AQ-900/41921933	
D5 682	AG-219/3696225	

**Table 1.** Chemical structures of the six substances with antipseudomonal activity.

### 3.4.4 Chemical Structures of Novel Indole Compounds with Anti-Virulence Activity against *Salmonella Typhimurium*

Similar to the screening with *Pa*, we expanded our study targeting ST by measuring the protective effects of 10,000 synthetic small molecules (Specs “World diversity set 3”) on infected J774.2 Mφ. By screening two different species we tried to find compounds with a

broad effectiveness but also to reveal specific differences between the species. After pre-plating of library compounds in 96 well plates, cells were seeded and infected with ST WT strain SL1344 at an MOI of 0.5 for 3 h. We could identify 69 out of 10,000 substances leading to an increase of host cell survival (Figure 3A shows a summary of the 69 substances from all screening plates). Notably, only one compound impaired bacterial growth in broth, indicating that most of the remaining hit compounds display an anti-virulence or host-cell directed effect (Figure A1G).

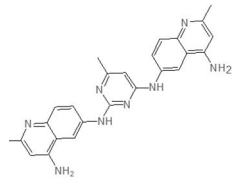


**Figure 3.** Identification of compounds with cytoprotective effect in a J774.2 M $\phi$  cell-based screening assay targeting ST. **(A)** Summary of all compounds ( $n = 69$ ) which led to an increase host cell survival in the J774.2 M $\phi$  cell-based screening assay. Graph indicates fold change of host cell survival of infected M $\phi$  cells treated with different compounds (black dots) compared to DMSO (white dot; dashed line) **(B)** Graph shows host cell survival of J774.2 M $\phi$  incubated with E9 423 (gray bar) compared to cells treated with DMSO (white bar). Graphs show mean  $\pm$  standard error of the mean. **(C)** Growth curve of ST strain SL 1344 in the presence of DMSO (white dots) or E9 423 (gray dots). Optical density measurements at 600 nm were performed at 20 min intervals.

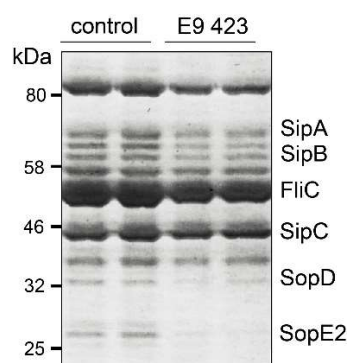
To get a better understanding of the mechanisms of action of the compounds, we performed an in depth structural analysis. In line with the results of the *Pa* screening, we also could identify compounds with an indoline-2-one core structure, which are known to have an anti-virulence capability in several bacterial species [29]. The unique chemical structure of E9 423 (Table 2) awakened our interest. This compound showed a cytoprotective effect with an increase of host cell survival to 159% compared to cells treated with DMSO (Figure 3B).



Furthermore, bacterial growth was not affected by E9 423 (Figure 3C). Thus, we hypothesized a possible T3SS-inhibitory effect of E9 423. To test this, we incubated bacteria overnight in T3SS inducing conditions by adding EGTA into LB broth. Afterwards bacteria were incubated with compounds for 4 h. After protein precipitation, the proteins of the supernatant were washed and analyzed by SDS-PAGE. Remarkably, bacteria treated with E9 423 showed decreased secretion of T3SS proteins in the supernatant (Figure 4). These data indicate that E9 423 protects infected M $\phi$  by a T3SS-inhibitory effect.

Internal number	Specs-ID	Chemical structure
E9 423	AN-584/43416482	

**Table 2.** Chemical structure of E9 423.



**Figure 4.** Analyzing of the T3SS-dependent secretion in presence of E9 423. Bacteria were grown overnight under T3SS-inducing conditions in LB media containing 5 mM EGTA. Subsequently bacteria were incubated with E9 423 or a control compound at a concentration of 50  $\mu$ M for 4 h. After protein precipitation proteins were washed and analysed by SDS-Page using a Coomassie staining. Representative example of two individual experiments performed in duplicates.

### 3.5 Discussion

In this study we describe the development of a highly comprehensive screening platform for detection of new anti-virulence drugs targeting *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella* Typhimurium. Due to its simple batchwise setup without any required washing-steps this platform is in particular suitable for medium- and high-throughput screenings.

Functionality was first confirmed with T3SS-deficient bacterial strains, which indicated the ability to detect substances with anti-virulence activity. By testing 10,000 compounds of the Specs “World diversity set 3” we were able to identify several novel compounds with cytoprotective effects. Importantly, one novel inhibitor of the ST T3SS could be identified.

Several other hit substances with chemical structures of unknown function provide the possibility for further research and the potential foundation of development of new drugs.

Since their implementation decades ago, usage of antibiotics has been accompanied by appearance of drug-resistant strains. While in the past development of new bactericidal and bacteriostatic substance was in the focus of interest, nowadays substances targeting virulence factors of bacteria and host-directed therapeutics attract more attention, not least due to the lack of new conventional antibiotics [11,30,31]. The difficulty in identification of truly novel antibiotics due to intrinsic resistance is also reflected in our screening results of 10,000 highly diverse compounds: Only one hit compound showed a reduction in bacterial viability in broth which was comparable to the conventional antibiotic moxifloxacin (Figure A1G). Nonetheless, exploiting this chemical library, several compounds with cytoprotective effects could be identified.

In both infection models, the treatment with various indoline-2-one derivatives was associated with an increased host cell survival. As previously described we could not detect any growth-inhibitory effect of indoline-2-ones on *Pa* or *ST*. [32]. However, indole and indoline derivatives such as 7-fluoroindole are known to inhibit a series of virulence factors of *Pa* such as quorum sensing, swarming and synthesis of pyocyanin, pyochelin and pyoverdine [29]. In *ST* an inhibition of motility as well as a reduced expression of SPI-1 encoded virulence genes in response to indoline exposure were described previously [33]. Indole was also shown to reduce flagellar motility and in vitro invasion of *ST* [34]. Furthermore Lee et al. described various impacts of indole and 7-hydroxyindole on the regulation of *Pa* virulence factors by microarray experiments [29]. By exploiting RNA-seq, we used a similar approach and were able to show indoline-2-one mediated downregulation of *phzA1*, *phzB1*, *phzS*, *pchD*, *pvdM* and *pvdS*, genes which are crucial for the biosynthesis of phenazine, pyochelin and pyoverdine [33,34]. The substance also led to a substantial downregulation of the T3SS export protein *pscl*. Inhibition of these factors may explain the host cell protective activity of our identified hit molecules.

Interestingly, differences in the efficacies of structurally distinct indoline-2-one derivatives in *Pa* and *ST* could be observed: Only one compound (E7 344) was associated with an increased host cell survival of > 150% for both pathogens. This observation indicates that besides the species-overarching effects of indoline-2-one derivatives, also some derivatives are species-specific most likely due to differences in transcriptional regulation of virulence factors.

In our study we also identified one novel compound (E9 423), which was able to reduce T3SS-mediated exotoxin secretion in *ST*. This compound is not an indoline-2-one derivative and, to our knowledge, similar chemical structures have not been described in the context

of anti-bacterial or anti-T3SS activity. Further analysis is needed clarify the exact mechanism of E9 423 in ST.

Interestingly, we identified several cytoprotective compounds which failed to inhibit the T3SS of ST. An in-depth structural analysis revealed striking similarities in some of these compounds with known inhibitors of NLPR3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3), a key regulator of pyroptotic cell death (Table A1) [35,36]. This indicates that these substances rather target host cell functions and that the observed cytoprotective effect may be mediated by preventing regulated necrotic cell death such as pyroptosis. Pyroptosis occurs upon activation of the innate immune response and the associated release of pro-inflammatory cytokines resulting in cell death in response to ST [37]. These findings indicate that the here described host cell-based drug screening assays can identify inhibitors targeting both bacterial virulence factors as well as their effector mechanisms on the host side.

In summary, this study provides a robust and cost effective screening platform suitable for medium- and high-throughput screens that enables to identify not only molecules with antibiotic activity, but also anti-virulence and host-directed drugs, such as antibiotic prodrugs. By screening of 10,000 chemical compounds we could detect several substances with anti-virulence properties. In particular, one novel ST T3SS inhibitor and several novel indole-like inhibitors for one of which we identified dysregulation of *Pa* virulence associated genes by RNAseq. Finally, three potential inhibitors of necrotic host cell death could be identified in our ST screening. Further studies are now required to clarify the exact mechanism of action of these compounds. In addition, larger screening campaigns with more compounds should now be performed for the identification of novel inhibitors targeting these important Gram-negative pathogens.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/8/1096/s1>, Table S1: RNAseq *Pa*.

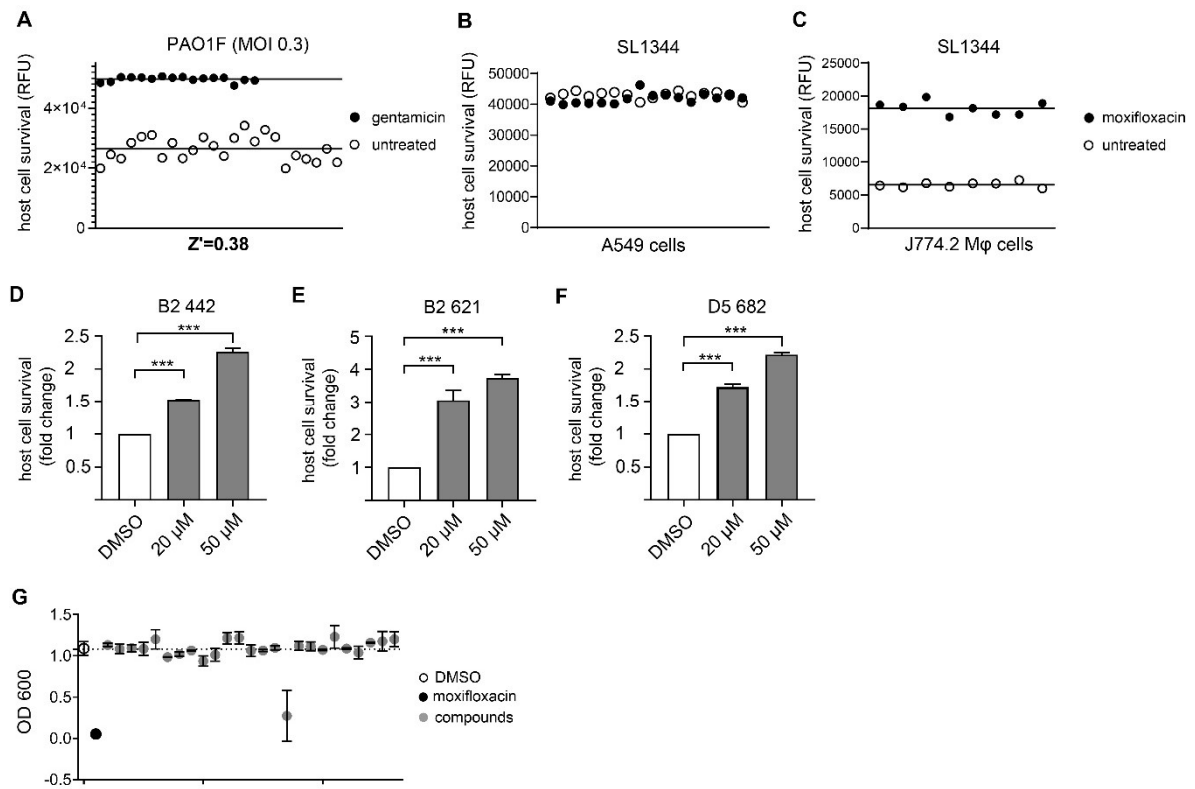
**Author Contributions:** Conceptualization and experimental design: J.R.; performed experiments and modelling: J.v.A., F.S., S.W., E.v.G.; analysis of data and model refinement: J.v.A., F.S., A.S.; supervision: J.R., A.S.; discussed the data: J.F.; discussed the data and wrote the manuscript: J.R., A.S., J.v.A., F.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by a DZIF (German center for infection research) grant to F.S. and J.v.A. A.S. is supported by a fellowship of the Cologne Clinician Scientist Program (CCSP), funded by the German Research Council (FI 773/15-1). J.F. received funding from the German Center for Infection Research (DZIF) (TI 07.005\_Fischer\_00), the Cologne Fortune Program and the medical faculty of the University of Cologne, Germany (Gusyk funding).

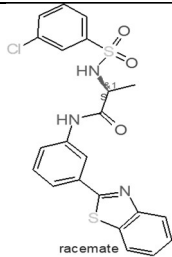
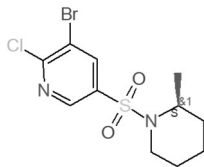
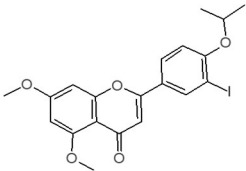
**Acknowledgments:** PAO1F wildtype (WT), PAO1F $\Delta$ pscD mutant strain were kindly provided by A. Rietsch, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA. We gratefully thank J. Altmueller, Cologne Center for Genomics (CCG) for assistance with the RNAseq experiments.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

### 3.6 Appendix A



**Figure A1.** (A) A549 cells were seeded into a 96 well plate and subsequently infected with the WT strain PAO1F with an MOI of 0.3 in the presence of gentamicin (black dots) or left untreated (white dots). Host cell survival was determined by addition of the fluorescent dye resazurin (RFU = relative fluorescence units). (B) A549 cells/well or J774.2 Mφ cells (C) were seeded into a 96 well plate and subsequently infected with the ST strain SL1344. DMSO (white dot), moxifloxacin (10 μM) (black dot). (D–F) A549 cells were infected with WT strain PAO1F with an MOI of 0.5 in presence of 20 or 50 μM of different compounds (gray bars) which could be identified in the screening assay. Infection was abrogated after 4 h p.i. and cell viability was measured by fluorescence. Graphs show mean ± standard error of the mean compared to the negative control (DMSO). \*\*\*  $p < 0.001$ . (G) SL 1344 was grown for 24 h in BHI medium in presence of DMSO (white dot), moxifloxacin (10 μM) (black dot) or compounds of the Specs library (50 μM) (gray dots). Subsequently OD600 were measured using a microplate reader. Graph shows mean ± standard error of the mean.

Internal number	Specs-ID	Chemical structure
D1 666	AQ-750/42209760	 racemate
A2 668	AF-399/42309870	 racemate
G6 120	AO-079/15259251	

**Table A1.** Selection of compounds with similarity to known NLRP3 inhibitors and cytoprotective effects in our *Salmonella*-infection model.

### 3.7 References

1. Cassini, A.; Hogberg, L.D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G.S.; Colomb-Cotinat, M.; Kretzschmar, M.E.; Devleeschauwer, B.; Cecchini, M.; et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2019**, *19*, 56–66. [CrossRef]
2. Bassetti, M.; Peghin, M.; Vena, A.; Giacobbe, D.R. Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. *Front. Med. (Lausanne)* **2019**, *6*, 74. [CrossRef] [PubMed]
3. Eichenberger, E.M.; Thaden, J.T. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* **2019**, *8*, 37. [CrossRef] [PubMed]
4. Exner, M.; Bhattacharya, S.; Christiansen, B.; Gebel, J.; Goroncy-Bermes, P.; Hartemann, P.; Heeg, P.; Ilschner, C.; Kramer, A.; Larson, E.; et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hyg. Infect. Control.* **2017**, *12*, Doc05. [CrossRef] [PubMed]
5. Pragasam, A.K.; Veeraraghavan, B.; Nalini, E.; Anandan, S.; Kaye, K.S. An update on antimicrobial resistance and the role of newer antimicrobial agents for *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J. Med. Microbiol* **2018**, *36*, 303–316. [CrossRef]
6. Uche, I.V.; MacLennan, C.A.; Saul, A. A Systematic Review of the Incidence, Risk Factors and Case Fatality Rates of Invasive Nontyphoidal *Salmonella* (iNTS) Disease in Africa (1966 to 2014). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, 0005118. [CrossRef]

7. Dodds, D.R. Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochem. Pharm.* **2017**, *134*, 139–146. [CrossRef]
8. Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B.R.; Lin, T.J.; Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 177–192. [CrossRef]
9. Peng, M.; Salaheen, S.; Buchanan, R.L.; Biswas, D. Alterations of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Antibiotic Resistance under Environmental Pressure. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*. [CrossRef]
10. Tacconelli, E.; Magrini, N.; Kahlmeter, G.; Singh, N. *Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2017.
11. Anantharajah, A.; Mingeot-Leclercq, M.P.; Van Bambeke, F. Targeting the Type Three Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Pharmacol. Sci.* **2016**, *37*, 734–749. [CrossRef]
12. Gu, L.; Zhou, S.; Zhu, L.; Liang, C.; Chen, X. Small-Molecule Inhibitors of the Type III Secretion System. *Molecules* **2015**, *20*, 17659–17674. [CrossRef] [PubMed]
13. Felise, H.B.; Nguyen, H.V.; Pfuetzner, R.A.; Barry, K.C.; Jackson, S.R.; Blanc, M.P.; Bronstein, P.A.; Kline, T.; Miller, S.I. An inhibitor of gram-negative bacterial virulence protein secretion. *Cell Host Microbe* **2008**, *4*, 325–336. [CrossRef]
14. D'Angelo, F.; Baldelli, V.; Halliday, N.; Pantalone, P.; Polticelli, F.; Fiscarelli, E.; Williams, P.; Visca, P.; Leoni, L.; Rampioni, G. Identification of FDA-Approved Drugs as Antivirulence Agents Targeting the pqs Quorum-Sensing System of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, 11. [CrossRef] [PubMed]
15. Carabajal, M.A.; Asquith, C.R.M.; Laitinen, T.; Tizzard, G.J.; Yim, L.; Rial, A.; Chabalgoity, J.A.; Zuercher, W.J.; Garcia Vescovi, E. Quinazoline-Based Antivirulence Compounds Selectively Target *Salmonella* PhoP/PhoQ Signal Transduction System. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *64*, e01744-19. [CrossRef] [PubMed]
16. Groisman, E.A. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1835–1842. [CrossRef] [PubMed]
17. Miller, S.I. PhoP/PhoQ: Macrophage-specific modulators of *Salmonella* virulence? *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 2073–2078. [CrossRef]
18. Kuijl, C.; Savage, N.D.; Marsman, M.; Tuin, A.W.; Janssen, L.; Egan, D.A.; Ketema, M.; vandenNieuwendijk, R.; van den Eeden, S.J.; Geluk, A.; et al. Intracellular bacterial growth is controlled by a kinase network around PKB/AKT1. *Nature* **2007**, *450*, 725–730. [CrossRef]
19. Becker, K.A.; Riethmuller, J.; Seitz, A.P.; Gardner, A.; Boudreau, R.; Kamler, M.; Kleuser, B.; Schuchman, E.; Caldwell, C.C.; Edwards, M.J.; et al. Sphingolipids as targets for inhalation treatment of cystic fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2018**, *133*, 66–75. [CrossRef]
20. Grassme, H.; Jendrossek, V.; Riehle, A.; von Kurthy, G.; Berger, J.; Schwarz, H.; Weller, M.; Kolesnick, R.; Gulbins, E. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 322–330. [CrossRef]
21. Kornhuber, J.; Tripal, P.; Reichel, M.; Muhle, C.; Rhein, C.; Muehlbacher, M.; Groemer, T.W.; Gulbins, E. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMs): A novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications. *Cell Physiol. Biochem.* **2010**, *26*, 9–20. [CrossRef]
22. Rybniker, J.; Vocat, A.; Sala, C.; Busso, P.; Pojer, F.; Benjak, A.; Cole, S.T. Lansoprazole is an antituberculous prodrug targeting cytochrome bc1. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7659. [CrossRef]
23. SPECS Company. Available online: <https://specs.net/pdf/SPECS-factsheet-world%20diversity%20set.pdf> (accessed on 4 June 2020).
24. Zhang, J.H.; Chung, T.D.; Oldenburg, K.R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol. Screen.* **1999**, *4*, 67–73. [CrossRef] [PubMed]
25. Chi, E.; Mehl, T.; Nunn, D.; Lory, S. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with A549 pneumocyte cells. *Infect. Immun.* **1991**, *59*, 822–828. [CrossRef] [PubMed]

26. Sun, Y.; Karmakar, M.; Taylor, P.R.; Rietsch, A.; Pearlman, E. ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 1884–1895. [CrossRef] [PubMed]
27. Foster, N.; Hulme, S.D.; Barrow, P.A. Vasoactive intestinal peptide (VIP) prevents killing of virulent and phoP mutant *Salmonella typhimurium* by inhibiting IFN-gamma stimulated NADPH oxidative pathways in murine macrophages. *Cytokine* **2006**, *36*, 134–140. [CrossRef] [PubMed]
28. Wemyss, M.A.; Pearson, J.S. Host Cell Death Response to Non-typhoidal *Salmonella* Infection. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1758. [CrossRef]
29. Lee, J.; Attila, C.; Cirillo, S.L.; Cirillo, J.D.; Wood, T.K. Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microb. Biotechnol.* **2009**, *2*, 75–90. [CrossRef]
30. Lewis, K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 371–387. [CrossRef]
31. Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327. [CrossRef]
32. Yuan, W.; Yu, Z.; Song, W.; Li, Y.; Fang, Z.; Zhu, B.; Li, X.; Wang, H.; Hong, W.; Sun, N. Indole-core-based novel antibacterial agent targeting FtsZ. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 2283–2296. [CrossRef]
33. Kohli, N.; Crisp, Z.; Riordan, R.; Li, M.; Alaniz, R.C.; Jayaraman, A. The microbiota metabolite indole inhibits *Salmonella* virulence: Involvement of the PhoPQ two-component system. *PLoS ONE* **2018**, *13*, 190613. [CrossRef] [PubMed]
34. Nikaido, E.; Giraud, E.; Baucheron, S.; Yamasaki, S.; Wiedemann, A.; Okamoto, K.; Takagi, T.; Yamaguchi, A.; Cloeckaert, A.; Nishino, K. Effects of indole on drug resistance and virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium revealed by genome-wide analyses. *Gut Pathog.* **2012**, *4*, 5. [CrossRef] [PubMed]
35. Domiciano, T.P.; Wakita, D.; Jones, H.D.; Crother, T.R.; Verri, W.A., Jr.; Arditi, M.; Shimada, K. Quercetin Inhibits Inflammasome Activation by Interfering with ASC Oligomerization and Prevents Interleukin-1 Mediated Mouse Vasculitis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41539. [CrossRef] [PubMed]
36. Lamkanfi, M.; Mueller, J.L.; Vitari, A.C.; Misaghi, S.; Fedorova, A.; Deshayes, K.; Lee, W.P.; Hoffman, H.M.; Dixit, V.M. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J. Cell Biol.* **2009**, *187*, 61–70. [CrossRef]
37. Broz, P.; Newton, K.; Lamkanfi, M.; Mariathasan, S.; Dixit, V.M.; Monack, D.M. Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against *Salmonella*. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 1745–1755. [CrossRef]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung der *Pseudomonas aeruginosa* gerichteten, wirtszellbasierten Screening-Plattform

Das Auftreten von Infektionen durch antibiotikaresistente Bakterien stellt eine globale Herausforderung der Gesundheitssysteme dar<sup>1-3</sup>. Insbesondere *Pa* ist aufgrund seines umfassenden Resistenzspektrums und der fulminanten Krankheitsverläufe von Bedeutung<sup>7,15</sup>. Um die Suche nach innovativen Wirkstoffen zur Therapie von Infektionen durch *Pa* möglichst effektiv und praktikabel zu gestalten, beschreibt diese Arbeit die Entwicklung und Anwendung einer wirtszellbasierten Screening-Plattform am Beispiel von *Pa*.

Im Anschluss an die Bestätigung des grundlegenden Prinzips stellte die Optimierung der Screening Plattform zum statistisch zuverlässigen, aber zeitgleich effizienten Einsatz eine wesentliche Herausforderung des Projekts dar.

Als Wirtszelle wurde die A549 Zelllinie verwendet. Hierbei handelt es sich um eine humane Zelllinie, die einem explantierten Adenokarzinom der Lunge entstammt<sup>66</sup>. A549 ist ein verbreitetes Modell zur Untersuchung pulmonaler Pathologien<sup>67</sup>. Dies schließt insbesondere auch verschiedene bakterielle Infektionen, auch durch *Pa*, ein<sup>68,69</sup>. Die A549 Zelllinie eignet sich somit zum Einsatz im vorliegenden Infektionsmodell.

Limitierend ist zu erwähnen, dass die Stoffwechselprozesse von Krebszellen Unterschiede zu denen physiologischer Zellen aufweisen und die Effekte der Testsubstanzen somit nur begrenzt übertragbar sind. Potenzielle neue Wirkstoffe müssen deshalb im Rahmen der Entwicklung tiefergehend hinsichtlich ihrer Verträglichkeit und ihres Wirkmechanismus getestet werden, beispielsweise durch *in vivo* Versuche.

Im Rahmen eines Screening-Projektes werden große Mengen Wirtszellen innerhalb kürzester Zeit benötigt. Ein weiterer entscheidender Vorteil der Verwendung von A549-Wirtszellen liegt deshalb in der einfachen Handhabbarkeit und dem schnellen Wachstum dieser Zelllinie, sodass ein komplikationsloser Ablauf des Screening-Projektes ermöglicht wird<sup>66</sup>.

Die statistische Verlässlichkeit der Screening-Plattform und somit die Eignung zum Einsatz im Hochdurchsatzverfahren wurde über den Z'-Wert fortlaufend evaluiert. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, bietet das Versuchsprotokoll diverse Ansatzpunkte, um die Qualität der generierten Daten und somit den Z'-Faktor zu beeinflussen. Dazu zählen unter anderem die Zahl der verwendeten Wirtszellen, die Menge der zur Infektion genutzten Bakterien (MOI – multiplicity of infection) sowie die Testung verschiedener Inkubationsdauern und -bedingungen.



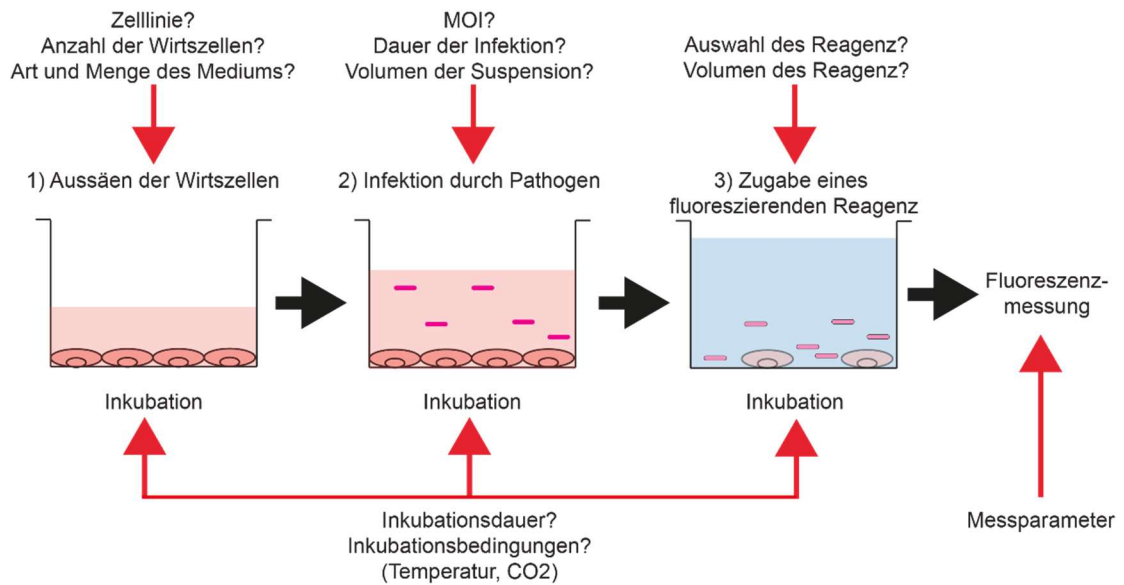


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus der beschriebenen Screening-Plattform. Es bieten sich diverse Ansatzpunkte zur Beeinflussung des Z'-Faktors. Erst nach ausgiebiger Testung verschiedener Konditionen werden zuverlässig Z'-Werte größer 0,5 und damit eine „exzellente Qualität“ erreicht, die den Einsatz der Screening-Plattform in Hochdurchsatzverfahren legitimiert<sup>10</sup>.

Erst durch die ausgiebige Testung unterschiedlicher Kombinationen ergab sich ein Versuchsprotokoll, mit dessen Hilfe zuverlässig Z'-Faktoren von über 0,5 erreicht werden konnten. Die Screening-Plattform ist somit unter Verwendung der erarbeiteten Konditionen zum Einsatz im Hochdurchsatzverfahren eines Drug-Screens geeignet<sup>10</sup>. Exemplarisch werden im Folgenden einige Möglichkeiten der Einflussnahme auf den Z'-Faktor näher diskutiert:

Während der Optimierung des Screening-Protokolls zeigte sich, dass der Zeitpunkt der Fluoreszenzmessung nach Zugabe des Resazurins die Datenqualität maßgeblich beeinflusst (Abbildung 7). Die Messung 1 Stunde nach Zugabe des Reagenzes führte zu einem geringen Unterschied zwischen den Mittelwerten der Positiv- und Negativkontrolle, einer geringen dynamischen Breite, und somit zu einem geringen Z'-Faktor (0,18). Die Verlängerung des Intervalls auf 4 Stunden führte zu einer deutlich größeren dynamischen Breite und konsekutiv zu einer Verbesserung des Z'-Faktors (0,69). Eine Inkubationsdauer von 4 Stunden ist somit geeignet, um einen ausreichenden Unterschied der Fluoreszenzsignale zu generieren und somit vitale von avitalen Wirtszellen zu unterscheiden.

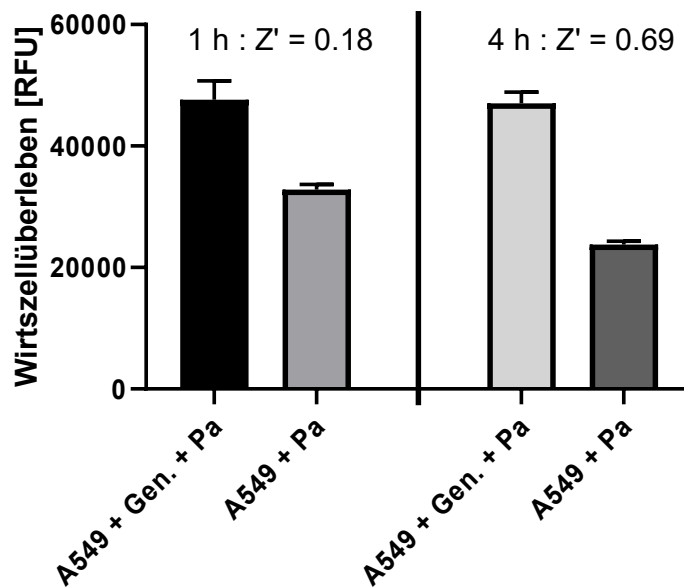


Abbildung 7: Die Abbildung zeigt das Wirtszellüberleben der Positiv- (Gentamicin) und Negativkontrollen (ohne Behandlung) 1 und 4 Stunden nach Zugabe von Resazurin. Durch die Verlängerung der Inkubationsperiode konnte eine Verbesserung des Z'-Faktors von 0,18 auf 0,69 erreicht werden.

Auch die Temperatur während der Inkubation nach Zugabe des Resazurins hat relevanten Einfluss auf die Qualität der generierten Daten. Eine Inkubation bei 37 °C führte im Vergleich zur Inkubation bei Raumtemperatur über denselben Zeitraum zu einer deutlichen Reduktion der Standardabweichung der erhobenen Daten (Abbildung 8). Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine höhere Stoffwechselaktivität der Wirtszellen in Folge der erhöhten Temperaturen. Zudem werden durch die Lagerung der Mikrotiterplatten in einem entsprechenden Inkubatorschrank Schwankungen der äußeren Einflüsse minimiert und die Bedingungen innerhalb der Mikrotiterplatte somit homogenisiert.

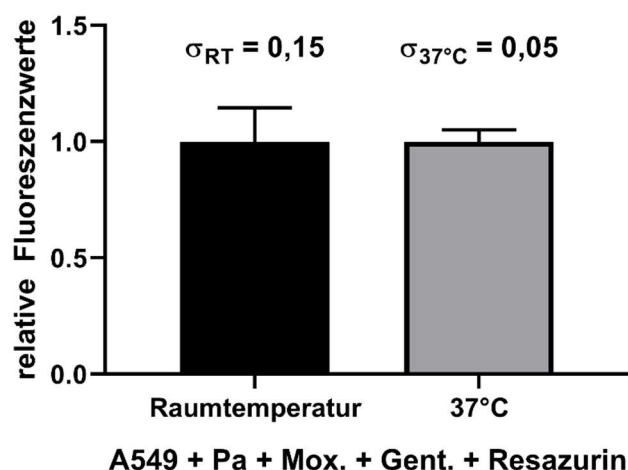


Abbildung 8: Entsprechend den Positivkontrollen des Versuchsprotokolls erfolgte die Vorlage von Gentamicin, A549-Wirtszellen, Zugabe von Pa und abschließend Moxifloxacin. 4 Stunden nach Zugabe von Resazurin wurden die Fluoreszenzwerte ermittelt. Die Inkubation bei 37 °C führte im Vergleich zur Inkubation bei Raumtemperatur zu einer Reduktion der Standardabweichung  $\sigma$ .

Der erhebliche Einfluss unterschiedlicher Konditionen wird zudem anhand der Verwendung verschiedener MOI deutlich. Durch eine Erhöhung der MOI von 0,3 auf 0,5 wurde die Standardabweichung innerhalb der Kontrollgruppen deutlich reduziert, während die dynamische Breite sich erhöhte (Abbildung 9). Dadurch ergab sich ein verbesserter Z'-Faktor von 0,38 auf 0,84. Durch die Verwendung einer höheren MOI kommt es in der Infektionsperiode zu einem suffizienteren Absterben der Wirtszellen, sodass diese im Anschluss besser von der antiinfektiv behandelten Positivkontrolle differenziert werden können.

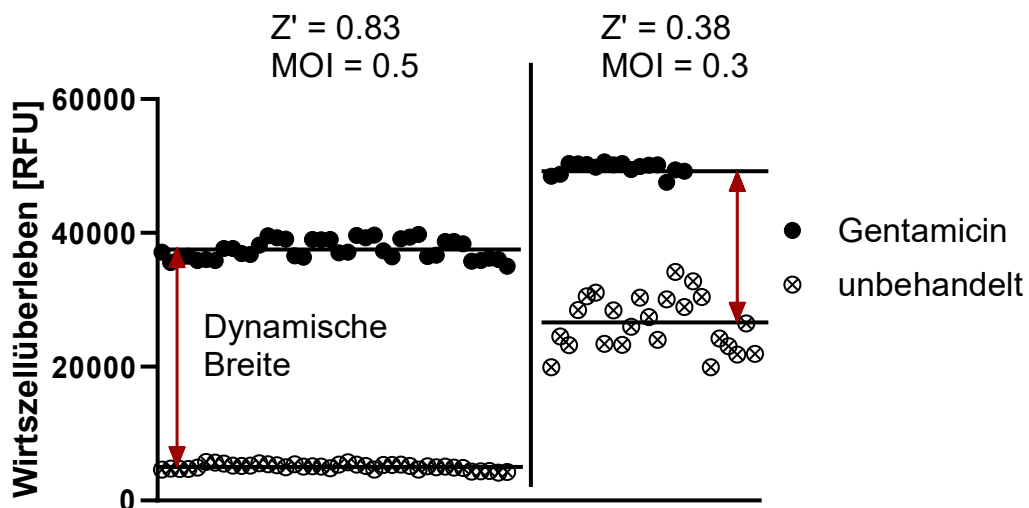


Abbildung 9: Die Abbildung stellt den Einfluss der zur Infektion verwendeten MOI auf den berechneten Z'-Faktor dar: Zu sehen sind die Fluoreszenzwerte der einzelnen Kavitäten von Positiv- (Gentamicin) und unbehandelten Negativkontrollen. Das Anheben der MOI hat eine größere dynamische Breite zur Folge, also eine größere Differenz der Mittelwerte beider Kontrollgruppen. Die Verwendung der höheren MOI führt außerdem zu einer Abnahme der Standardabweichung innerhalb der Kontrollen. Somit ergibt sich ein höherer Z'-Faktor (0,83 statt 0,38) durch die Verwendung der höheren MOI.

Obwohl eine weitere Steigerung der MOI auf beispielsweise 1,0 noch höhere Z'-Werte erzielen konnte, wurde eine MOI von 0,5 bei bereits sehr guten Z'-Werten beibehalten. Dies geschah unter der Annahme, dass hiermit eine gesteigerte Sensitivität der Plattform erreicht wird. Die Verwendung einer höheren MOI verringert demnach die Wahrscheinlichkeit, dass niedrigpotente zytoprotektive Wirkstoffe detektiert werden, da ihr Effekt unter der hohen Erregerlast nicht ausreicht, um ein signifikant gesteigertes Wirtszellüberleben zu bewirken. Die Trefferrate eines Screening-Projektes würde somit reduziert, obwohl die zunächst niedrigpotenten Substanzen durch chemische Modifikation in ihrer Wirksamkeit gesteigert werden könnten und somit vielversprechende Startpunkte zur Entwicklung neuer Antiinfektiva darstellen<sup>70</sup>.

Im Rahmen der grundlegenden Etablierung des Infektionsmodells konnte in den Kavitäten, die durch Infektion abgestorbene Wirtszellen enthielten, mikro- und makroskopisch (Trübung des Nährmediums) ein massives bakterielles Wachstum beobachtet werden. Die hieraus resultierende hohe Stoffwechselaktivität der Bakterien generierte hohe

Fluoreszenzwerte und suggerierte somit fälschlicherweise ein Wirtszellüberleben (Abbildung 10). Eine Lösung dieses Problems ergab sich durch die Zugabe von Gentamicin und Moxifloxacin nach der Infektionsperiode von 4 Stunden. Innerhalb dieser Periode konnte eine ausreichende Zytotoxizität gegenüber den Wirtszellen erreicht werden, durch die Zugabe der Antiinfektiva eine bakterielle Überwucherung jedoch verhindert werden.

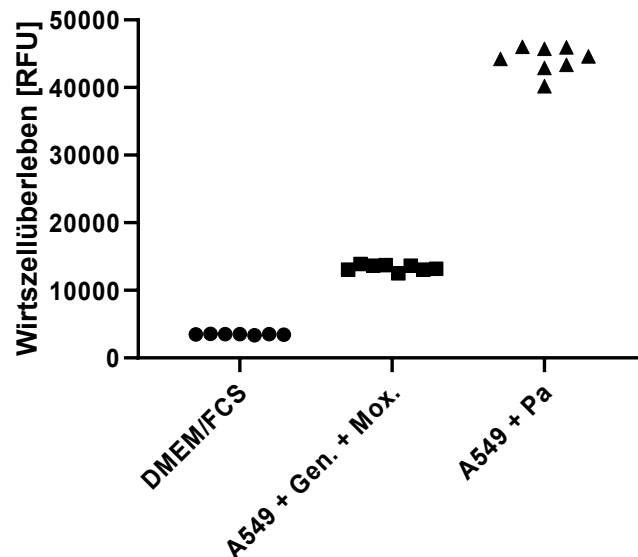


Abbildung 10: Relative Fluoreszenzwerte (RFU) einzelner Kavitäten mit Nährmedium (DMEM/FCS) gefüllt (links), A549 Wirtszellen mit Gentamicin und Moxifloxacin (mittig) sowie A549 Wirtszellen infiziert durch *Pa* (rechts). Das Nährmedium allein zeigt aufgrund fehlender Stoffwechselaktivität niedrigste Fluoreszenzwerte. Durch die Stoffwechselaktivität der vitalen A549 Zellen zeigen sich mittig höhere Fluoreszenzwerte. Trotz der durch Infektion abgestorbenen Wirtszellen zeigen sich durch bakterielle Überwucherung und somit hohe Stoffwechselaktivität rechts die höchsten Fluoreszenzwerte.

#### 4.2 „Proof of concept“ Screen und mögliche Ergänzungen des Verfahrens

Nach Optimierung der Screening-Plattform für den Einsatz im Rahmen von Screening-Projekten wurde ein „proof of concept“-Screen mit Testsubstanzen des „World Diversity Sets 3“ der Firma Specs durchgeführt<sup>71</sup>. Insgesamt konnten aus 10.000 Testsubstanzen 6 zytoprotektive Substanzen verifiziert werden, was einer Trefferquote von 0,06 % entspricht.

Die ausgeprägte intrinsische Resistenz gramnegativer Pathogene, insbesondere *Pa*, gegenüber vielen Wirkstoffen ist eine Erklärung dieser Trefferquote<sup>6</sup>. Es fällt auf, dass unter 10.000 getesteten Substanzen keine zytoprotektive Substanz mit bakterizider oder bakteriostatischer Aktivität identifiziert werden konnte, was die ausgeprägte intrinsische Resistenz von *Pa* unterstreicht. Da die intrinsische Resistenz von *Pa* unter anderem auf dem Vorhandensein und der Aktivität von Effluxpumpen beruht, die die Wirkstoffkonzentration im Zytosol der Pathogene herabsetzen, wäre das Screening unter gleichzeitiger Verwendung von Effluxpumpen Inhibitoren eine sinnvolle Erweiterung der

Screening-Plattform, um die Trefferquote zu erhöhen<sup>9,20,28</sup>. Eine Substanz, deren Einsatz in einem solchen Rahmen denkbar erscheint, ist Phenylalanin-Arginin  $\beta$ -Naphthylamid (PA $\beta$ N), ein gut erforschter Effluxpumpen-Inhibitor gramnegativer Bakterien<sup>72</sup>.

Einen Einfluss auf die Trefferquote hat zudem die Auswahl der getesteten Substanzen. Alle Substanzen des hier verwendeten „World Diversity Sets 3“ erfüllen folgende chemische Eigenschaften:

- Zahl der Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen  $\leq 5$
- Zahl der Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen  $\leq 10$
- Molekülmasse  $< 500$  Da
- Verteilungskoeffizient von  $\log P < 5$

Die getesteten Substanzen erfüllen damit die erweiterte „Lipinski Rule of Five“ und sollen somit die Eignung zum medikamentösen Einsatz möglichst maximieren<sup>73,74</sup>. Einschränkung ist anzumerken, dass die getesteten Substanzen ausschließlich synthetischer Genese sind, während ein Großteil der bekannten antibakteriellen Wirkstoffe natürlichen Ursprungs ist<sup>20</sup>. Natürlichen Ursprungs sind Substanzen, die von zumeist Bakterien oder Pilzen produziert oder aus diesen extrahiert werden. Bakteriellen Ursprungs sind unter anderem Aminoglykoside, Tetracycline, Makrolide, Glykopeptide und Carbapeneme. Aus *Penicillium chrysogenum*, einem Pilz, konnte der wohl bekannteste antibakterielle Wirkstoff, das Penicillin, gewonnen werden<sup>75</sup>.

Dennoch zeigen in der klinischen Anwendung verbreitete Wirkstoffe wie Metronidazol, Linezolid oder Fluorchinolone, die synthetischen Ursprungs sind, dass auch synthetische Substanzen erfolgreich zur antibakteriellen Therapie eingesetzt werden können<sup>75</sup>. Zudem sind die bislang beschriebenen, antivirulent wirkenden Medikamente überwiegend synthetischen Ursprungs, sodass insbesondere auf der Suche nach innovativen Wirkstoffen mit neuartigem Wirkmechanismus das Screening synthetischer Substanzen dennoch sinnvoll ist<sup>76</sup>.

Um die Anzahl möglicher Treffersubstanzen zu optimieren, sollte die Auswahl der Testsubstanzen also möglichst umfassend und divers ausfallen. Eine Möglichkeit die Auswahl der zu testenden Substanzen zusätzlich zu erweitern, ist das Testen von gegen *Pa* gerichteten Antikörpern, synthetisch oder von Patienten gewonnen, hinsichtlich ihrer zytoprotektiven Wirkung<sup>77,78</sup>.

Ein weiterer Ansatz die Trefferquote der Screening-Plattform zu maximieren ist die Verwendung einer erhöhten Konzentration der Testsubstanz. In dem durchgeführten Screening wurde eine finale Konzentration von 20  $\mu$ M verwendet, während für bereits beschriebene *in vitro* Inhibitoren des T3SS höhere Konzentrationen von bis zu 1 mM

verwendet wurden<sup>12</sup>. Zudem konnte auch für die identifizierten Treffersubstanzen des „Specs World Diversity 3“ Sets eine Dosisabhängigkeit der Wirkung gezeigt werden. Eine Erhöhung der Testdosis könnte also die zusätzliche Identifizierung von zytoprotektiven Substanzen schwächerer Potenz ermöglichen. Kritisch zu bedenken ist jedoch, dass eine höhere Konzentration auch mit gesteigerter Wahrscheinlichkeit toxisch auf die Wirtszellen wirken kann. Dies kann zu Problemen im Rahmen der Testung führen und zudem den *in vivo* Einsatz der Substanz verhindern.

Um das Screening zusätzlicher und umfassenderer Molekülbanken effizienter zu gestalten, ist eine Adaption der bisher in 96-Kavitäten-Mikrotiterplatten angewandten Plattform in ein Hochdurchsatzverfahren mit Nutzung von 384-Kavitäten pro Platte denkbar. Erste, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte, Versuche sprechen bereits für eine Umsetzbarkeit dieses Vorhabens, wenngleich einzelne Konditionen erneut optimiert werden müssen, um einen ausreichenden Z'-Faktor und somit statistische Verlässlichkeit zu gewährleisten (Abbildung 11). Hilfreich scheint hier die Verwendung einer höheren MOI zu sein.

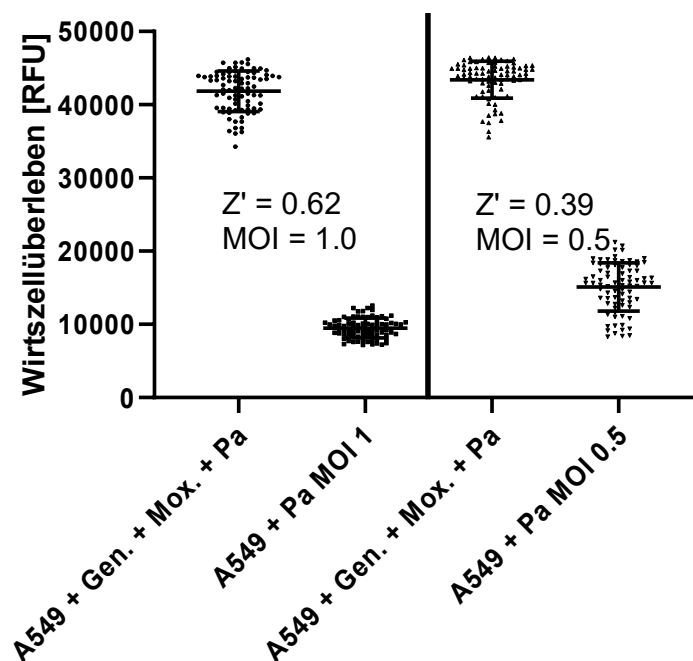


Abbildung 11: Anwendung des beschriebenen Protokolls in einer 384-Kavitäten-Mikrotiterplatte. Insgesamt zeigen sich niedrigere Z'-Werte verglichen mit der Anwendung in der 96-Kavitäten-Mikrotiterplatte. Durch die Verwendung einer höheren MOI von 1,0 konnte dennoch ein Z'-Faktor größer 0,5 erreicht werden.

Ein Problem dabei stellt die im Vergleich stärkere Ausprägung des sogenannten edge-effects bei Verwendung der 384-Kavitäten Platten dar. Der edge-effect beschreibt eine Diskrepanz zwischen den Werten peripher und zentral gelegener Kavitäten auf der Mikrotiterplatte<sup>79</sup>. Hervorgerufen wird er hauptsächlich durch die im Vergleich zu zentralen Kavitäten beschleunigte Verdunstung von Flüssigkeit in den peripheren Bereichen der Platte. Es existieren verschiedene Ansätze diesen Effekt zu reduzieren, die bei der Umsetzung des Versuchsaufbaus in 384-Kavitäten Mikrotiterplatten Beachtung finden

sollten. Beispiele sind das Abkleben der Mikrotiterplatte durch Folien, die Verwendung spezieller Mikrotiterplatten, sowie das Inkubieren der Versuchsplatten bei Raumtemperatur vor Zugabe neuer Reagenzien, die ebenfalls Raumtemperatur haben sollten.

### 4.3 Das Quorum sensing-System von *Pseudomonas aeruginosa* als mögliches Ziel des Indol-Derivats G5-193

Durch das Screening des „World Diversity Set 3“ konnten insgesamt 6 zytoprotektive Substanzen identifiziert werden. Alle 6 identifizierten Treffersubstanzen teilen sich ein gemeinsames chemisches Grundgerüst; sie gehören zur Gruppe der Indole.

Im Anschluss an das Screening konnte nachgewiesen werden, dass die protektive Wirkung gegenüber infizierten A549 dieser Substanzen dosisabhängig ist. Dies ist beispielhaft für die potenteste der Substanzen G5-193 in Abbildung 12 dargestellt.

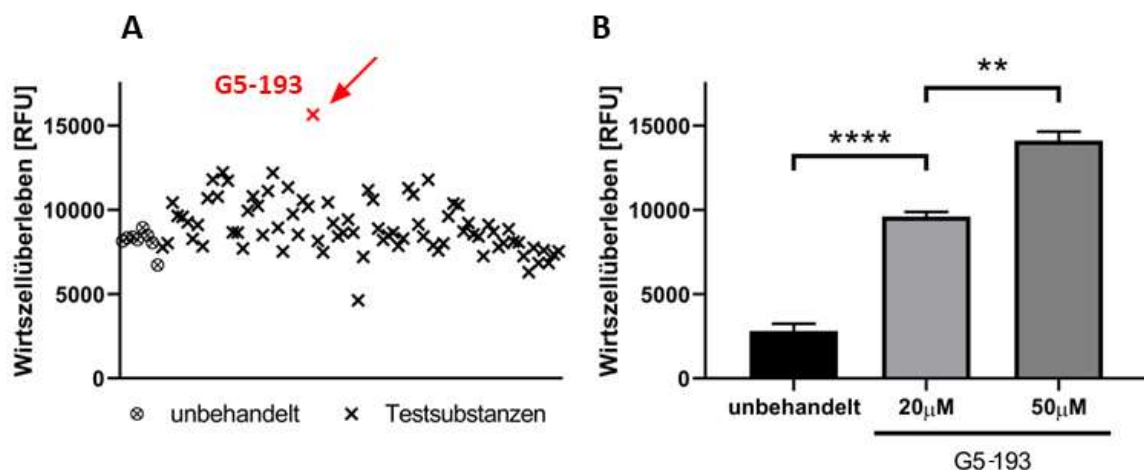


Abbildung 12: A) Darstellung der relativen Fluoreszenzwerte einzelner Kavitäten einer Mikrotiterplatte. Jeder Datenpunkt entspricht einer Testsubstanz, links ist die unbehandelte Negativkontrolle zu sehen. Die Verwendung von G5-193 führt zu signifikant erhöhten Fluoreszenzwerten, also gesteigertem Wirtszellüberleben. B) Die zytoprotektive Wirkung von G5-193 ist dosisabhängig. Eine Erhöhung der Testkonzentration von 20 µM auf 50 µM führt zu einer signifikanten Steigerung des Wirtszellüberlebens.

Um eine mögliche antibakterielle Wirkung von G5-193 zu untersuchen, wurde das Wachstum einer G5-193 behandelten *Pa* Kultur (20 µM und 50 µM) mit einer unbehandelten *Pa* Kultur verglichen. Das Wachstum wurde hierbei über die optische Dichte (OD600) ermittelt (Abbildung 13).

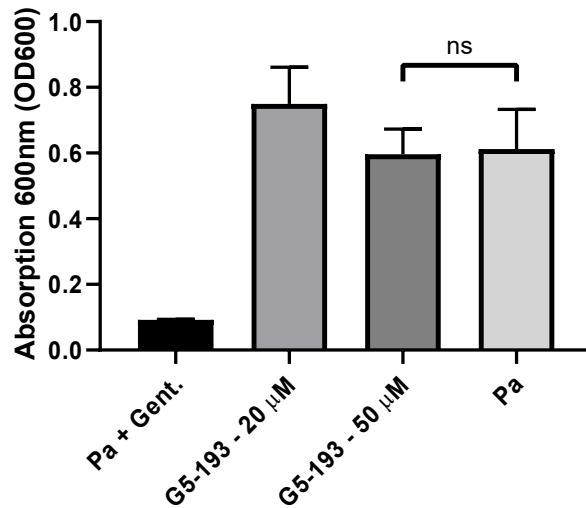


Abbildung 13: Die optische Dichte als Maß des bakteriellen Wachstums verschiedener *Pa* Kulturen wurde gemessen. Die Exposition von *Pa* Kulturen gegenüber G5-193 konnte weder in einer Konzentration von 20 µM noch von 50 µM eine signifikante Hemmung des *Pa* Wachstums erwirken (ns  $\triangleq$  nicht signifikant). Als Kontrollen dienten eine unbehandelte *Pa* Kultur (rechts) sowie die Behandlung mittels Gentamicin 20 µg/ml (links).

Ein Einfluss der Substanz G5-193 auf das bakterielle Wachstum konnte in diesem Versuch ausgeschlossen werden. Die zytoprotektive Wirkung der Substanz kann somit durch einen antivirulenten Effekt begründet sein.

Ein potenzielles Angriffsziel antivirulenter Wirkstoffe und somit des Indolin-Derivats G5-193 ist das Qs System. Lee et al. konnten bereits eine Hemmung des Qs durch Indolin und 7-Hydroxyindolin nachweisen<sup>12</sup>. Mittels Genexpressionsanalyse zeigte sich dort eine herabgesetzte Regulation derjenigen Gene, die die Virulenzfaktoren Pyocanin, Pyochelin und Pyoverdin kodieren. Diese Gene werden durch das Qs System reguliert, sodass eine hemmende Wirkung der Indole auf das Qs möglich ist<sup>12</sup>.

Eine RNA-Sequenzierung von *Pa* unter Einfluss der potentesten Treffersubstanz G5-193 im Vergleich zu einer unbehandelten Kultur konnte mehrere differenziell regulierte Gene aufzeigen (Tabelle 2). Die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung zeigen in Übereinstimmung mit Lee et al. eine reduzierte Transkription von Genen, die an der Synthese Qs-regulierter Virulenzfaktoren beteiligt sind<sup>12</sup>. Darunter befinden sich die Gene *phzA1*, *phzB1*, *phzS*, *pchD*, *pvdM* und *pvdS*, die von Bedeutung in der Produktion der Virulenzfaktoren Phenazin, Pyochelin und Pyoverdin sind<sup>13,14</sup>. Somit ist es denkbar, dass die Substanz G5-193 ihren zytoprotektiven Effekt durch eine Hemmung des Qs entfaltet<sup>80</sup>. Insbesondere für Pyoverdin ist zudem eine Assoziation mit erhöhter Zytotoxizität und schweren Krankheitsverläufen beschrieben, sodass eine Hemmung der Produktion desselben gut mit einem zytoprotektiven Effekt vereinbar ist<sup>53</sup>.

Für 2 Gene, PA2753 und PA3501, konnte zudem eine extensive Steigerung der Transkription durch G5-193 gezeigt werden, die ebenfalls von Bedeutung in Erklärung der



zytoprotektiven Eigenschaften sein kann. Eine Einordnung des Effektes dieser unterschiedlichen Regulation ist jedoch nur schwer möglich, da die Funktion der genannten Gene derzeit unbekannt ist, sodass hier zunächst eine weiterführende Untersuchung der Funktion der genannten Gene notwendig ist.

Gen	Name	G5-193 [RPKM]	DMSO-Kontrolle [RPKM]	Effekt G5-193
PA3195	gapA (housekeeping)	507	518	- 2,1 %
PA2393	pvdM	52	68	- 23,5 %
PA4228	pchD	35	48	- 27,1 %
PA4217	phzS	136	211	- 35,5 %
PA4210	phzA1	9	15	- 40,0 %
PA2426	pvdS	13	43	- 69,8 %
PA4211	phzB1	5	19	- 73,7 %
PA2753	-	67	13	+515,4 %
PA3501	-	55	4	+ 1375,0 %

*Tabelle 2: Zur Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung wurde eine Pa Kultur in Gegenwart von G5-193 (100 µM) kultiviert. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Kultur mit Zugabe von DMSO in gleicher Konzentration. Die Einheit, die das Level der Transkription beschreibt, wird in RPKM angegeben (reads per kilobase of transcript per million mapped reads). RPKM ist ein relativer Indikator für die Häufigkeit eines RNA-Transkripts, spiegelt aber nicht die absolute Menge der betreffenden RNA in der Probe wider. Die Transkription von gapA wird durch G5-193 nicht signifikant verändert. gapA ist in der Nutzung als Kontroll- beziehungsweise „housekeeping“-Gen verbreitet. Für die Gene phzA1, phzB1, phzS, pchD, pvdM und pvdS konnte eine herabgesetzte Transkription durch G5-193 gezeigt werden. Für PA2753 und PA3501 erfolgt durch G5-193 eine extensive Steigerung der Transkription.*

Lee et al. konnten zudem einen hemmenden Effekt auf die Beweglichkeit von *Pa* zeigen<sup>12</sup>. Eigene orientierende Experimente, die die Motilität von *Pa* unter Einfluss des Wirkstoffs G5-193 in semi-solidem Nährmedium untersuchten, konnten die vorbeschriebene Wirkung jedoch nicht bestätigen. Eine mögliche Erklärung hierfür kann die Verwendung einer deutlich niedrigeren Wirkstoffkonzentration in den durchgeführten Versuchen verglichen mit den genannten Veröffentlichungen sein.

Trotz der Hinweise auf eine Reduktion der Pyoverdine Produktion bleibt der genaue Effekt der zytoprotektiven Indole auf *Pa* bislang jedoch nur unzureichend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

#### 4.4 Das Typ-III-Sekretionssystem als möglicher Angriffspunkt antivirulenter Wirkstoffe

Eine weitere mögliche und bedeutende Zielstruktur antivirulenter Wirkstoffe ist das T3SS. Die Auswirkung eines insuffizienten T3SS auf das Wirtszellüberleben wurde in dem vorliegenden Infektionsmodell mit Hilfe des mutierten *Pa*-Stammes  $\Delta pscD$  untersucht. Dieser kann aufgrund der fehlenden Möglichkeit, das Strukturprotein PscD zu produzieren, kein funktionelles T3SS zusammensetzen. Die Nutzung dieses Erregerstammes zur Infektion führte zu einem deutlich gesteigerten Wirtszellüberleben (Abbildung 14)<sup>81</sup>. Dies unterstreicht die große Relevanz des T3SS als Virulenzfaktor von *Pa*<sup>38</sup>. Weiterhin deutet diese Beobachtung daraufhin, dass Wirkstoffe, die zu einer relevanten Inhibition des T3SS führen, durch die beschriebene Screening-Plattform detektiert werden können.

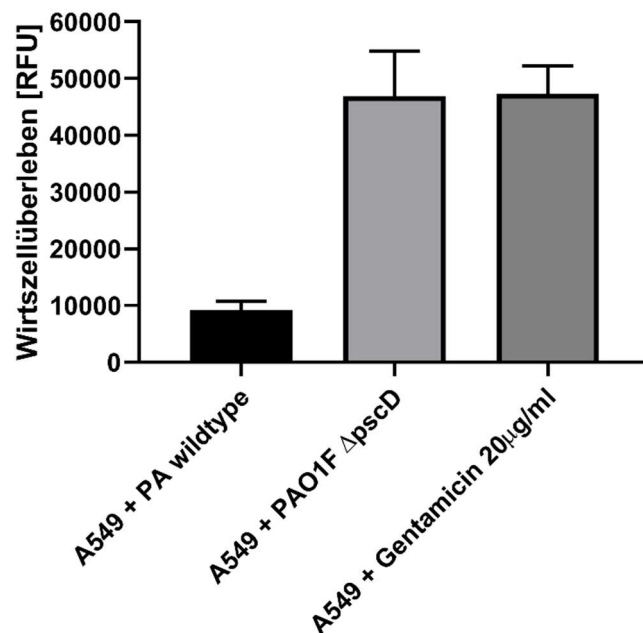


Abbildung 14: Der mutierte *Pa* Stamm PAO1F $\Delta pscD$  verfügt über kein funktionelles T3SS. Aufgrund der somit reduzierten Virulenz führt die Verwendung dieses Stammes zu einem deutlich gesteigerten Wirtszellüberleben, vergleichbar mit der Behandlung durch den potenten antibakteriellen Wirkstoff Gentamicin.

Es wurden bereits Substanzen beschrieben, die einen inhibierenden Effekt auf das T3SS von *Pa* ausüben<sup>82-84</sup>. Beispielhaft sei MBX1641 als T3SS-Inhibitor genannt<sup>83</sup>. Phänotypisch konnte für MBX1641 eine Reduktion durch *Pa* hervorgerufener Gewebsnekrosen *in vivo* am Mausmodell gezeigt werden<sup>85</sup>. Dies ist auf eine potente Hemmung der Funktion des T3SS zurückzuführen, bei der die Sekretion der Effektorproteine gehemmt wird, darunter das Exotoxin ExoT, während der Wirkmechanismus auf molekularer Ebene noch Gegenstand aktueller Forschung ist<sup>82,83</sup>. Eine Hemmung des bakteriellen Wachstums von *Pa* durch MBX1641 konnte nicht gezeigt werden<sup>85</sup>.

Im Rahmen einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot wurde der Einfluss der Substanz G5-193 auf das T3SS Strukturprotein PopD sowie das Exotoxin ExoT untersucht. Hierfür wurden Überstände von *Pa* Kulturen mit und ohne Exposition gegenüber der Treffersubstanz untersucht. Trotz einer gegenüber dem Screening erhöhten Konzentration der Substanz von 50  $\mu$ M konnte keine Inhibition der ExoT- oder PopD-Sekretion gezeigt werden. Eine Auswirkung der Substanz G5-193 auf die beiden genannten Proteine ist somit nicht anzunehmen. Als Kontrollen dienten die T3SS induzierenden Substanz EGTA sowie der für *Pa* vorbeschriebene T3SS Inhibitor MBX1641 (Abbildung 15).

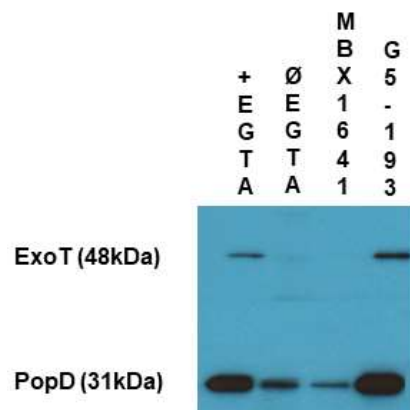


Abbildung 15: *Pa* Kulturen wurden in Anwesenheit des bekannten T3SS-Inhibitors MBX1641 und der Treffersubstanz G5-193 in einer Konzentration von je 50  $\mu$ M inkubiert. Als Kontrolle diente die T3SS-induzierende Substanz EGTA. Mit den Überständen der jeweiligen Kulturen wurde nach Proteinfällung sowie Filterung eine SDS-PAGE und anschließend ein Western Blot durchgeführt. Dargestellt wurden das T3SS-Effektorprotein ExoT und das T3SS-Strukturprotein PopD. Für MBX1641 konnte eine Reduktion von ExoT und PopD beschrieben werden. Bezüglich der Treffersubstanz G5-193 konnte weder eine Beeinflussung von ExoT noch PopD gezeigt werden.

#### 4.5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung einer umfassenden Screening-Plattform zur Identifikation antibakteriell und antivirulent wirkender Substanzen gegen *Pa*. Durch den Einsatz dieser Methode für Screening-Projekte weiterer Molekülbanken sollen auch zukünftig vielversprechende Substanzen zur Entwicklung antiinfektiver Medikamente identifiziert werden. Hier scheint insbesondere die Auswahl der Testsubstanzen und Molekülbanken entscheidend zu sein. Mögliche Optionen zur Optimierung und Ergänzung des Verfahrens wurden aufgezeigt.

Im Rahmen des Screenings des „World Diversity Set 3“ konnten 6 zytoprotektive Indole identifiziert werden. Insbesondere G5-193, die potenteste Treffersubstanz, kommt prinzipiell zur Entwicklung eines antivirulenten Wirkstoffes in Betracht. Hierzu bedarf es jedoch einer weitergehenden Untersuchung des Wirkmechanismus. Anschließend kann die Potenz der Substanz sowie pharmakokinetische Eigenschaften mittels chemischer Modifikationen optimiert werden<sup>86</sup>.

Trotz zahlreicher Versuche, die Aufmerksamkeit kommerzieller und akademischer Forschung auf die Notwendigkeit der Entwicklung neuartiger, antiinfektiver Wirkstoffe zu lenken, haben antimikrobielle Resistenzen an Aktualität nicht verloren und stellen weiterhin eine globale Herausforderung und Bedrohung dar<sup>1-3,87</sup>. Diese Arbeit soll einerseits erneut an die enorme Bedeutung dieser Herausforderung erinnern und darüber hinaus durch die zukünftige Verwendung der beschriebenen Screening-Plattform einen Beitrag zur Lösung der Problematik beitragen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Aslam B, Wang W, Arshad MI, et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist* 2018; **11**: 1645-58.
2. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; **74**(3): 417-33.
3. Dodds DR. Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochem Pharmacol* 2017; **134**: 139-46.
4. Cassini A, Hogberg LD, Plachouras D, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* 2019; **19**(1): 56-66.
5. AMR: a major European and Global challenge; online verfügbar: [https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr\\_2017\\_factsheet\\_0.pdf](https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_factsheet_0.pdf); zuletzt abgerufen am: 17.04.2023.
6. Exner M, Bhattacharya S, Christiansen B, et al. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hyg Infect Control* 2017; **12**: Doc05.
7. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2018; **18**(3): 318-27.
8. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 2: management strategies and new agents. *P T* 2015; **40**(5): 344-52.
9. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv* 2019; **37**(1): 177-92.
10. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* 1999; **4**(2): 67-73.
11. SPECS. <https://specs.net/pdf/SPECS-factsheet-world%20diversity%20set.pdf>; zuletzt abgerufen am: 07.10.2020.
12. Lee J, Attila C, Cirillo SL, Cirillo JD, Wood TK. Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microb Biotechnol* 2009; **2**(1): 75-90.
13. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 2004; **10**(12): 599-606.
14. Lamont IL, Martin LW. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)* 2003; **149**(Pt 4): 833-42.
15. Bassetti M, Peghin M, Vena A, Giacobbe DR. Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. *Front Med (Lausanne)* 2019; **6**: 74.
16. Eichenberger EM, Thaden JT. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel)* 2019; **8**(2).
17. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; **46**(2): 155-64.
18. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; **112**(18): 5649-54.
19. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* 2015; **40**(4): 277-83.
20. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2013; **12**(5): 371-87.
21. (2019) EMA. Quofenix (delafloxacin); An overview of Quofenix and why it is authorised in the EU (zuletzt abgerufen am 13.01.2021).
22. Markham A. Delafloxacin: First Global Approval. *Drugs* 2017; **77**(13): 1481-6.
23. Lee YR, Burton CE. Eravacycline, a newly approved fluorocycline. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019; **38**(10): 1787-94.

24. (2014) ON. Review on AMR, Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations; [https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nation\\_s\\_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nation_s_1.pdf) (zuletzt abgerufen am 29.09.2020).
25. Wilson MG, Pandey S. *Pseudomonas Aeruginosa*. StatPearls. Treasure Island (FL); 2020.
26. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; **171**(11): 1209-23.
27. Silva Filho LV, Ferreira Fde A, Reis FJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment. *J Bras Pneumol* 2013; **39**(4): 495-512.
28. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2015; **13**(1): 42-51.
29. Tamber S, Hancock RE. On the mechanism of solute uptake in *Pseudomonas*. *Front Biosci* 2003; **8**: s472-83.
30. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 2016; **4**(2).
31. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; **34**(5): 634-40.
32. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**(1): 161-82, Table of Contents.
33. Souha S Kanj MDJS, MD; 2020. Principles of antimicrobial therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections; [https://www.uptodate.com/contents/principles-of-antimicrobial-therapy-of-pseudomonas-aeruginosa-infections?search=pseudomonas&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/principles-of-antimicrobial-therapy-of-pseudomonas-aeruginosa-infections?search=pseudomonas&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1) (zuletzt abgerufen am 06.10.2020).
34. Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 2011; **19**(8): 419-26.
35. Fasciano AC, Shaban L, Mecsas J. Promises and Challenges of the Type Three Secretion System Injectisome as an Antivirulence Target. *EcoSal Plus* 2019; **8**(2).
36. Virulenzfaktor, Psychrembel Online; online verfügbar: <https://www.psychrembel.de/Virulenzfaktor/K0RPS>; zuletzt abgerufen am 10.05.2021.
37. Anantharajah A, Mingeot-Leclercq MP, Van Bambeke F. Targeting the Type Three Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Pharmacol Sci* 2016; **37**(9): 734-49.
38. Galle M, Carpentier I, Beyaert R. Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci* 2012; **13**(8): 831-42.
39. Jurado-Martin I, Sainz-Mejias M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci* 2021; **22**(6).
40. Mueller CA, Broz P, Cornelis GR. The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol* 2008; **68**(5): 1085-95.
41. Halder PK, Roy C, Datta S. Structural and functional characterization of type three secretion system ATPase PscN and its regulator PscL from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteins* 2019; **87**(4): 276-88.
42. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)* 2001; **147**(Pt 10): 2659-69.
43. Borkar DS, Fleiszig SM, Leong C, et al. Association between cytotoxic and invasive *Pseudomonas aeruginosa* and clinical outcomes in bacterial keratitis. *JAMA Ophthalmol* 2013; **131**(2): 147-53.
44. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 2009; **7**(9): 654-65.

45. Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, et al. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 1999; **104**(6): 743-50.
46. Pena C, Cabot G, Gomez-Zorrilla S, et al. Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2015; **60**(4): 539-48.
47. LaSarre B, Federle MJ. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 2013; **77**(1): 73-111.
48. Turkina MV, Vikstrom E. Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Innate Immun* 2019; **11**(3): 263-79.
49. Whiteley M, Diggle SP, Greenberg EP. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 2017; **551**(7680): 313-20.
50. de Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* 2009; **11**(2): 279-88.
51. Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF); Glossar; <https://www.dzif.de/de/glossar/biofilm> (zuletzt abgerufen am 15.01.2021).
52. Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, Prevost G, Bernardi T, Jehl F. Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Front Microbiol* 2019; **10**: 2894.
53. Hall S, McDermott C, Anoopkumar-Dukie S, et al. Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins (Basel)* 2016; **8**(8).
54. Ribeiro da Cunha B, Fonseca LP, Calado CRC. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go? *Antibiotics (Basel)* 2019; **8**(2).
55. Wohlleben W, Mast Y, Stegmann E, Ziemert N. Antibiotic drug discovery. *Microb Biotechnol* 2016; **9**(5): 541-8.
56. hoelzel biotech, online verfügbar: <https://www.hoelzel-biotech.com/de/infothek/mikrotiterplatten/>; zuletzt abgerufen am: 10.01.2023.
57. Eppendorf; online verfügbar: <https://www.medicalexpo.de/prod/eppendorf-se/product-68382-1009801.html>; zuletzt abgerufen am 10.01.2023.
58. Grab J, Suarez I, van Gumpel E, et al. Corticosteroids inhibit *Mycobacterium tuberculosis*-induced necrotic host cell death by abrogating mitochondrial membrane permeability transition. *Nat Commun* 2019; **10**(1): 688.
59. Schafer AB, Wenzel M. A How-To Guide for Mode of Action Analysis of Antimicrobial Peptides. *Front Cell Infect Microbiol* 2020; **10**: 540898.
60. da Cunha BR, Zoio P, Fonseca LP, Calado CRC. Technologies for High-Throughput Identification of Antibiotic Mechanism of Action. *Antibiotics (Basel)* 2021; **10**(5).
61. Ha DG, Kuchma SL, O'Toole GA. Plate-based assay for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Mol Biol* 2014; **1149**: 67-72.
62. Jiang D, Persinger R, Wu Q, Gross A, Chu HW. alpha1-Antitrypsin promotes SPLUNC1-mediated lung defense against *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Respir Res* 2013; **14**(1): 122.
63. Sayeed S, Nistico L, St Croix C, Di YP. Multifunctional role of human SPLUNC1 in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect Immun* 2013; **81**(1): 285-91.
64. Rybniker J, Vocat A, Sala C, et al. Lansoprazole is an antituberculous prodrug targeting cytochrome bc1. *Nat Commun* 2015; **6**: 7659.
65. Zumla A, Rao M, Wallis RS, et al. Host-directed therapies for infectious diseases: current status, recent progress, and future prospects. *Lancet Infect Dis* 2016; **16**(4): e47-63.
66. ATCC; Characterization data; online verfügbar: <https://www.atcc.org/products/ccl-185> (zuletzt abgerufen am 12.01.2023).
67. Garcia-de-Alba C. Repurposing A549 Adenocarcinoma Cells: New Options for Drug Discovery. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2021; **64**(4): 405-6.
68. Ahmed GF, Elkhatib WF, Noreddin AM. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adhesion to and invasion of A549 lung epithelial cells by natural extracts. *J Infect Public Health* 2014; **7**(5): 436-44.

69. Lin Y, Zhang M, Barnes PF. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 1998; **66**(3): 1121-6.
70. Chopra B, Dhingra AK. Natural products: A lead for drug discovery and development. *Phytother Res* 2021; **35**(9): 4660-702.
71. SPECS company; online verfügbar: <https://specs.net/pdf/SPECS-factsheet-world%20diversity%20set.pdf>; zuletzt abgerufen am: 06.04.2020.
72. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**(1): 105-16.
73. Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendoloski JJ. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *J Comb Chem* 1999; **1**(1): 55-68.
74. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; **46**(1-3): 3-26.
75. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 2019; **51**: 72-80.
76. Rasko DA, Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat Rev Drug Discov* 2010; **9**(2): 117-28.
77. DiGiandomenico A, Keller AE, Gao C, et al. A multifunctional bispecific antibody protects against Pseudomonas aeruginosa. *Sci Transl Med* 2014; **6**(262): 262ra155.
78. DiGiandomenico A, Warren P, Hamilton M, et al. Identification of broadly protective human antibodies to Pseudomonas aeruginosa exopolysaccharide Psl by phenotypic screening. *J Exp Med* 2012; **209**(7): 1273-87.
79. Lundholt BK, Scudder KM, Pagliaro L. A simple technique for reducing edge effect in cell-based assays. *J Biomol Screen* 2003; **8**(5): 566-70.
80. Christiaen SE, Matthijs N, Zhang XH, Nelis HJ, Bossier P, Coenye T. Bacteria that inhibit quorum sensing decrease biofilm formation and virulence in Pseudomonas aeruginosa PAO1. *Pathog Dis* 2014; **70**(3): 271-9.
81. Sun Y, Karmakar M, Taylor PR, Rietsch A, Pearlman E. ExoS and ExoT ADP ribosyltransferase activities mediate Pseudomonas aeruginosa keratitis by promoting neutrophil apoptosis and bacterial survival. *J Immunol* 2012; **188**(4): 1884-95.
82. Gu L, Zhou S, Zhu L, Liang C, Chen X. Small-Molecule Inhibitors of the Type III Secretion System. *Molecules* 2015; **20**(9): 17659-74.
83. Aiello D, Williams JD, Majgier-Baranowska H, et al. Discovery and characterization of inhibitors of Pseudomonas aeruginosa type III secretion. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**(5): 1988-99.
84. Arnoldo A, Curak J, Kittanakom S, et al. Identification of small molecule inhibitors of Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S using a yeast phenotypic screen. *PLoS Genet* 2008; **4**(2): e1000005.
85. Aburto-Rodriguez NA, Munoz-Cazares N, Castro-Torres VA, et al. Anti-Pathogenic Properties of the Combination of a T3SS Inhibitory Halogenated Pyrrolidone with C-30 Furanone. *Molecules* 2021; **26**(24).
86. Hughes D, Karlen A. Discovery and preclinical development of new antibiotics. *Ups J Med Sci* 2014; **119**(2): 162-9.
87. Bundesgesundheitsministerium; Antimikrobielle Resistenzen - Ein dringender Aufruf zum Handeln; online verfügbar: [https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3\\_Downloads/G/G7/G7\\_AMR\\_de\\_2022.pdf](https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3_Downloads/G/G7/G7_AMR_de_2022.pdf); zuletzt abgerufen am 12.01.2023.



## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des T3SS .....	12
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer wirtszellbasierten Screening-Plattform .....	14
Abbildung 3: Links: Schematische Darstellung einer 96-Kavitäten-Platte <sup>56</sup> . Rechts: Abbildung einer Mikrotiterplatte der Firma Eppendorf <sup>57</sup> .....	15
Abbildung 4: Visualisierung der dynamischen Breite, gebildet aus der Differenz der Mittelwerte von Positiv- und Negativkontrolle $ \mu_c + -\mu_c - $ , zur Bestimmung des Z'-Faktors.....	16
Abbildung 5: Algorithmus zur Bestimmung des Wirkmechanismus zytoprotektiver Substanzen.....	18
Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des Versuchsaufbaus der beschriebenen Screening-Plattform .....	40
Abbildung 7: Einfluss des Zeitpunktes der Zugabe von Resazurin auf den Z'-Faktor .....	41
Abbildung 8: Einfluss der Inkubationstemperatur auf den Z'-Faktor.....	41
Abbildung 9: Einfluss der MOI auf den Z'-Faktor .....	42
Abbildung 10: Bakterielle Überwucherung führt durch hohe Stoffwechselaktivität zu hohen Fluoreszenzwerten.....	43
Abbildung 11: Anwendung des beschriebenen Protokolls in einer 384-Kavitäten-Mikrotiterplatte .....	45
Abbildung 12: A) Identifikation der zytoprotektiven Substanz G5-193. B) Die zytoprotektive Wirkung von G5-193 ist dosisabhängig.....	46
Abbildung 13: G5-193 hat keinen Einfluss auf das Wachstum von <i>Pa</i> .....	47
Abbildung 14: Die Verwendung des T3SS-defizienten Stammes PAO1F $\Delta$ pscD führt zu deutlich gesteigertem Wirtszellüberleben .....	49
Abbildung 15: G5-193 hat keinen Einfluss auf die Produktion oder Sekretion der Proteine ExoT oder PopD durch <i>Pa</i> .....	50

## **6.2 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Liste der Pathogene, für die gemäß der Weltgesundheitsorganisation der Bedarf neuer antibakterieller Wirkstoffe am dringendsten ist.....	10
Tabelle 2: RNA-Sequenzierungsergebnisse von Pa Kulturen mit und ohne Exposition gegenüber der zytoprotektiven Substanz G5-193.....	48

## 6.3 Lebenslauf

### 6.3.1 Persönliche Daten

Fynn Tristan Schreiber, geboren am 05.08.1994 in Siegen

Adresse	Hasselmannstraße 27 24114 Kiel
Staatsangehörigkeit	deutsch
Telefon	0176 4384 6724
E-Mail	Fynn-Tristan@gmx.de

### 6.3.2 Ausbildung und beruflicher Werdegang

Seit 03/2021	<b>Arzt in Weiterbildung für Innere Medizin am Städtischen Krankenhaus Kiel</b>
08.06.2020	Abschluss des dritten Abschnitts der <b>ärztlichen Prüfung</b> in Köln (Note: <b>Sehr gut</b> )
05/2019 – 04/2020	<b>Praktisches Jahr</b> Universitätsklinik Köln <ul style="list-style-type: none"><li>• Internistische Intensivmedizin</li><li>• Infektiologischer Konsildienst</li><li>• Chirurgische Ausbildung (Viszeral-, Herz-/Thorax-, Gefäßchirurgie)</li></ul> Kreiskrankenhaus Gummersbach <ul style="list-style-type: none"><li>• Anästhesie, Intensiv- und Notfallmedizin</li></ul>
03.12.2019 – 04.12.2019	<b>DZIF Jahrestreffen</b> , Posterbeitrag, Heidelberg
25.09.2019 – 27.09.2019	<b>DZIF Herbstschule</b> , Vortrag und Posterbeitrag, Lübeck
09/2018 – 08/2019	<b>Promotionsstipendium</b> des Deutschen Zentrums für Infektionsforschung (DZIF)
10/2013 – 06/2020	<b>Studium der Humanmedizin</b> , Universität zu Köln
07/2013	<b>Allgemeine Hochschulreife (Abitur)</b> , Note 1,0 Gymnasium am Löhrtor, Siegen

### 6.3.3 Veröffentlichungen

07/2020

Comprehensive Host Cell-Based Screening Assays for Identification of Anti-Virulence Drugs Targeting

*Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella* Typhimurium

Julia von Ambüren<sup>†</sup>, Fynn Schreiber<sup>†</sup>, Julia Fischer, Sandra Winter, Edeltraud van Gumpel, Alexander Simonis, Jan Rybniker.

<sup>†</sup> geteilte Erstautorenschaft

Microorganisms. 2020 Jul 22;8(8): E1096.

doi:0.3390/microorganisms8081096

02/2019

Corticosteroids inhibit *Mycobacterium tuberculosis*-induced necrotic host cell death by abrogating mitochondrial membrane permeability transition

Jessica Gräb, Isabelle Suárez, Edeltraud van Gumpel, Sandra Winter, Fynn Schreiber, Anna Esser, Christoph Hölscher, Melanie Fritsch, Marc Herb, Michael Schramm, Laurens Wachsmuth, Christian Pallasch, Manolis Pasparakis, Hamid Kashkar, Jan Rybniker.

*Nat Commun.* 2019;10(1):688. Published 2019 Feb 8.

doi:10.1038/s41467-019-08405-9