

Allosterische, Wirkstoff-zugängliche Bindestellen in β -Propeller-Lektinen

Elena Shanina, Sakonwan Kuhadomlarp, Kanhaya Lal, Peter H. Seeberger, Anne Imberty und Christoph Rademacher*

Abstract: Lektine sind vielversprechende Zielproteine bei der Entdeckung von Wirkstoffen zur Bekämpfung antibiotikaresistenter Keime. Noch sind aber keine nicht-kohlenhydratbasierten Therapeutika gegen diese Proteinklasse entwickelt worden. Hier präsentieren wir eine Wirkstoff-zugängliche Bindestelle im β -Propeller-Lektin BambL aus *Burkholderia ambifaria* als mögliches Ziel für allosterische Wirkstoffentwicklung. Diese Bindestelle wurde durch ^{19}F -NMR-basiertes Fragmentscreening und einen Computer-gestützten Algorithmus zur Vorhersage von Bindetaschen (SiteMap) identifiziert. Die Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Morpholinderivaten resultierte in einem vielversprechenden Fragment mit einer Dissoziationskonstante von $0,3 \pm 0,1 \text{ mM}$ und einer Ligandeneffizienz von $0,3 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ HA}^{-1}$, das ebenfalls die orthosterische Bindestelle moduliert. Dieser Effekt wurde durch Mutagenese-Studien in den orthosterischen und sekundären Bindestellen nachgewiesen. Diese Entdeckung könnte die Entwicklung von Wirkstoffen gegen Lektine beschleunigen und als neuer therapeutischer Ansatz gegen antibiotikaresistente Erreger dienen.

Einleitung

Infektionen durch Biofilm-bildende Bakterien sind zunehmend schwierig zu behandeln, da Antibiotikaresistenzen weltweit zunehmen. Aus diesem Grund müssen neue Zielproteine und antiadhäsive Wirkstoffe identifiziert werden.

Kohlenhydratbindende Proteine (Lektine) werden von vielen pathogenen Mikroorganismen produziert und sind an der Erkennung des Wirts, der Adhäsion und der Biofilmbildung beteiligt. Daher hat sich die gezielte Inhibition von Lektinen als attraktive Strategie zur Behandlung von Pilz- und bakteriellen Infektionen erwiesen.^[1]

Lektine von Krankheitserregern weisen häufig eine hohe Affinität für Kohlenhydrate von Säugetieren auf, was vermutlich auf eine Koevolution zurückzuführen ist.^[2] So nutzen Bakterien diese Wechselwirkungen, um sich an Oberflächen des Wirts zu heften und ihn zu infizieren. Ein bekanntes Beispiel ist das β -Propellerlektin BambL des Gram-negativen Bakteriums *Burkholderia ambifaria*.^[3] Dieser opportunistische Erreger gehört zu einer Gruppe eng verwandter Bakterienstämme, dem *Burkholderia-cepacia*-Komplex, der chronische Infektionen verursacht und Resistenzen gegen zahlreiche Antibiotika aufweist. *B. ambifaria* befällt Immungeschwächte sowie Patienten mit zystischer Fibrose (Mukoviszidose; CF) und kann Lungenentzündungen, Atemwegsversagen und Bakteriämie verursachen.^[4] Darüber hinaus verursacht *B. ambifaria* sporadische Ausbrüche; die Epidemiologie ist jedoch nach wie vor nicht eindeutig bekannt.^[5] Es gibt Hinweise darauf, dass BambL neben der bekannten Rolle in der Anhaftung an das menschliche Lungenepithel weitere Funktionen in der Beeinflussung zellulärer Prozesse des Wirts hat.^[6] Daher ist die Blockierung der Kohlenhydrat-BambL-Wechselwirkungen ein potenziel-

[*] E. Shanina, Prof. P. H. Seeberger, Prof. C. Rademacher
Department of Biomolecular Systems
Max Planck Institute of Colloids and Interfaces
Am Mühlenberg 1, 14476 Potsdam (Deutschland)
E-Mail: christoph.rademacher@univie.ac.at
E. Shanina, Prof. P. H. Seeberger, Prof. C. Rademacher
Department of Chemistry and Biochemistry
Freie Universität Berlin
Arnimallee 22, 14195 Berlin (Deutschland)
Prof. C. Rademacher
Department of Pharmaceutical Chemistry
University of Vienna
Althanstraße 14, 1080 Wien (Österreich)
Prof. C. Rademacher
Department of Microbiology, Immunobiology and Genetics
Max F. Perutz Labs
Campus Vienna Biocenter 5, 1030 Wien (Österreich)
Dr. S. Kuhadomlarp, K. Lal, Prof. A. Imberty
University Grenoble Alpes, CNRS, CERMAV
38000 Grenoble (Frankreich)

Dr. S. Kuhadomlarp
Department of Biochemistry, Faculty of Science
Mahidol University
10400 Bangkok (Thailand)

Dr. S. Kuhadomlarp
Center for Excellence in Protein and Enzyme Technology
Faculty of Science, Mahidol University
10400 Bangkok (Thailand)

K. Lal
Dipartimento di Chimica via Golgi 19
Università degli Studi di Milano
20133 Milano (Italien)

Hintergrundinformationen und Identifikationsnummern (ORCID) der Autoren sind unter:
<https://doi.org/10.1002/ange.202109339> zu finden.

© 2021 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

ler Weg zur Behandlung chronischer Infektionen. Es sind dafür jedoch neue Strategien für die Entwicklung von Inhibitoren erforderlich.

Die Kristallstruktur von BambL zeigt, dass das Protein aus zwei ähnlichen Domänen besteht und zu einem 6-blättrigen β -Propeller mit 6 Fucose-Bindestellen trimerisiert.^[3] Die β -Propeller-Struktur von Lektinen aus Bakterien und Pilzen ist eine effiziente kohlenhydratbindende Proteinfaltung, in der alle Bindestellen auf einer Seite einer Donut-Form liegen.^[7] In den letzten Jahren wurden mehrere Hemmstoffe für BambL publiziert. BambL hat eine starke Affinität für α -L-fucosylierte Monosaccharide (Methyl- α -L-fucopyranosid (MeFuc), $K_d = 1 \mu\text{M}$) und komplexe Kohlenhydrate (H-Typ-2-Tetrasaccharid, $K_d = 7,5 \mu\text{M}$), weshalb sich die Entwicklung von Inhibitoren auf die Verwendung von Kohlenhydraten als Ausgangspunkt fokussierte.^[3] Dieser Ansatz lieferte potente monovalente Aryl- α -O-fucosid-basierte Inhibitoren für BambL mit einer vergleichbaren Affinität wie MeFuc.^[8] Darüber hinaus verbesserten multivalente Verbindungen mit 4 bis 6 Fucose- oder Aryl- α -O-fucosyl-Analoga die Selektivität und die Affinität gegenüber BambL mit K_d -Werten zwischen 10 und 80 nM.^[8a,9] Der größte Nachteil solcher komplexen Hemmstoffe ist jedoch ihre Molekülgröße, die ihre orale Bioverfügbarkeit einschränkt und damit die künftige klinische Zulassung erschwert.^[10] Folglich ist es erstrebenswert, kleine und oral bioverfügbare Wirkstoff-ähnliche Moleküle zu identifizieren, die auf Lektine von Krankheitserregern abzielen. Dies stellt jedoch eine Herausforderung dar.

Lektine werden wegen ihrer hydrophilen und lösungsmittel-exponierten orthosterischen Kohlenhydrat-Bindestellen mit einem niedrigen Druggability-Index assoziiert.^[10,11] Um diese Einschränkung zu überwinden, haben wir zuvor das Konzept von allosterischen Modulatoren für Säugetierlektine untersucht.^[12] Allosterische Modulatoren erkennen nicht die orthosterische Bindestelle, sondern eine alternative (allosterische) Bindetasche, welche die orthosterische Stelle beeinflusst und umgekehrt. Für C-Typ-Säugetierlektine wie DC-SIGN (CD209) wurden mehrere allosterische Taschen identifiziert, die zur Wirkstoffentwicklung dienen können.^[13] Es wurde zudem ein allosterisches Netzwerk innerhalb der Kohlenhydrat-Bindungsdomäne von Langerin (CD207) entdeckt, das die Ca^{2+} -Affinität beeinflusst. Anschließend wurden allosterische Inhibitoren für Langerin entwickelt, was das Vorhandensein einer allosterischen Kommunikation in Säugetier-Lektinen bestätigte.^[12a,14] Insgesamt zeigten diese Entdeckungen das Potenzial für weitere allosterische Bindetaschen in Lektinen auf.

Daher haben wir beschlossen, β -Propeller-Lektine auf das Vorhandensein allosterischer Bindetaschen zu untersuchen, mit Fokus auf das bakterielle Lektin BambL. Zur Identifizierung von Fragmenten gegen BambL wurde ein Fragmentenscreening mit ^{19}F - und T_2 -gefilterter (CPMG)-NMR durchgeführt. Die Validierung von Treffern erfolgte durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) und proteinbeobachtete ^1H - ^{15}N -HSQC-TROSY-NMR (TROSY-NMR). Die Affinität und potenzielle modulatorische Eigenschaften der Fragmente wurden in drei orthogonalen NMR-Experimenten (TROSY-, PROF-^[15] und ^{19}F -R₂-gefiltertes-

NMR) bestimmt. Schließlich wurde eine computergestützte Analyse zur Vorhersage von Wirkstoff-zugänglichen Bindestellen in BambL angewendet und experimentell durch zielgerichtete Mutagenese- und NMR-Studien validiert.

Ergebnisse und Diskussion

Fragmentbasiertes Wirkstoffscreening gegen β -Propeller-Lektine

Die ^{19}F - und T_2 -gefilterte (CPMG)-NMR-Methode wird häufig zum Nachweis schwacher Fragment-Protein-Interaktionen verwendet.^[16] Dies ist auf die T_2 -Relaxation des ^{19}F -Kerns zurückzuführen, die sehr empfindlich auf die Veränderung der molekularen Beweglichkeit der kleinen Moleküle im Protein-freien und -gebundenen Zustand reagiert.^[17] Daher wird das ^{19}F -NMR-basierte Fragmentenscreening häufig bei der Wirkstoffentdeckung eingesetzt, um die Druggability von Proteinen abzuschätzen. Zuvor haben wir diese Strategie erfolgreich verwendet, um Fragmente für Säugetierlektine zu identifizieren.^[11-13,18] Aus diesem Grund haben wir hier diese Methode auf BambL sowie die verwandten β -Propeller-Lektine RSL und AFL des Bakteriums *Ralstonia solanacearum* und des Pilzes *Aspergillus fumigatus* angewendet (Abbildung 1a). Beide Lektine weisen Sequenz- und Struktur-ähnlichkeiten mit BambL auf (RSL: 76% Sequenzidentität, RMSD = 0,56 Å, AFL: 39% Sequenzidentität, RMSD = 1,84 Å). Ähnlich wie BambL zeigen AFL und RSL eine niedrige mikromolare Affinität für terminale α -L-Fucose auf tierischen und pflanzlichen Kohlenhydraten mit einer Affinität (K_d) von 76,4 μM bzw. 0,64 μM .^[19]

Für die Bewertung der Druggability von β -Propeller-Lektinen wurden 350 Fragmente gegen BambL, RSL und AFL mittels ^{19}F - und CPMG-NMR gescreent. Dabei wurden die chemischen Verschiebungen (CSPs) oder die Änderungen der Peakintensitäten der ^{19}F -Resonanzen sorgfältig untersucht. Fragmente mit CSP > 0,01 ppm oder einer Peakverringerng von 25–50% wurden als ^{19}F -Treffer mit „hoher“ bzw. „niedriger“ Sicherheit definiert. In den CPMG-NMR-Spektren wurden Veränderungen der Peakintensität von 20–50% bzw. über 50% als CPMG-Treffer mit „niedrigem“ bzw. „hohem“ Vertrauen definiert. Anschließend wurden lediglich Fragmente weiterverfolgt, die eines der drei Kriterien erfüllten: 1) nur ^{19}F -Treffer, 2) ^{19}F - und CPMG-Treffer und 3) CPMG-Treffer mit „hohem“ Vertrauen. Abbildung 1b zeigt als Beispiel die Identifizierung des Fragments **24**, das im CPMG-NMR-Experiment an BambL gebunden ist. Solche Fragmente wurden zur Ableitung der Gesamttrefferquote verwendet. Interessanterweise zeigten β -Propeller-Lektine ungewöhnlich hohe Trefferquoten, nämlich 33% und 48% für RSL bzw. AFL/BambL. Gesamttrefferquoten in dieser Größenordnung in einem Fragmentenscreening lassen sich entweder auf eine große Anzahl von Frequent-Hitters (FHs) oder auf das Vorhandensein von Wirkstoff-zugänglichen Bindestellen zurückführen.^[20] Der Beitrag möglicher FHs zu den Gesamttrefferquoten ist vermutlich jedoch eher gering, da frühere Studien, die mit derselben Bibliothek 10–15% Trefferquoten gegen C-Typ-Lektine ermittelten, die meisten Treffer als spezifisch einstufen.^[11,13,18b] Um die

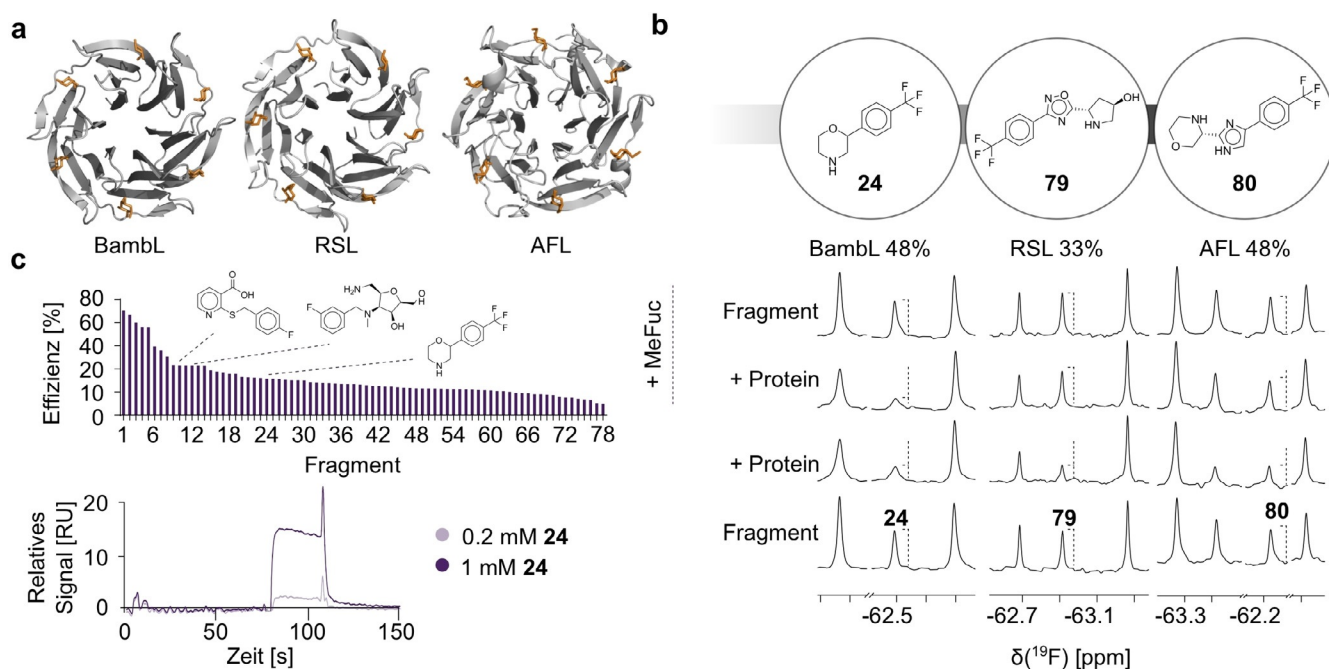


Abbildung 1. Untersuchung der Druggability von β -Propeller-Lektinen. a) Cartoon-Darstellungen der Kristallstrukturen verschiedener β -Propeller-Lektine: BamBL im Komplex mit L-Fucose (orange, PDB-ID: 3ZZV), RSL (PDB-ID: 3Z18) und AFL (PDB-ID: 4AG1). b) Die CPMG-NMR-Spektren zeigen ^{19}F -Resonanzen der Fragmente **24**, **79** und **80**, die in Gegenwart von 20 μM BamBL/AFL und 40 μM RSL einen starken Linienverbreiterungseffekt (gestrichelte Linie) zeigten. Die Fragmente **79** und **80** wurden aus ihren Bindestellen durch die Zugabe von 10 mM MeFuc entfernt. c) Abgebildet sind die Strukturen von Treffern für BamBL, die durch SPR und TROSY-NMR bestätigt wurden (oben). SPR-Sensorgramme zeigen die Bindung von **24** an BamBL bei zwei Konzentrationen: 0,2 mM und 1 mM (unten).

Anzahl der potenziellen Treffer weiter einzugrenzen, untersuchten wir die Fragmente, die auf die orthosterische Stelle abzielen, unter Verwendung von 10 mM MeFuc als Kompetitor. Überraschenderweise wurden für die orthosterischen Bindestellen von BamBL nur zwei Fragmente mit „niedrigem“ Vertrauen ($< 1\%$) identifiziert, während für AFL und RSL 17% bzw. 5% Fragmente für die orthosterischen Stellen beobachtet wurden (Fragmente **79** und **80**, Abbildung 1 b).

Zur Identifizierung der potenziellen Fragment-Bindestellen in β -Propeller-Lektinen nutzten wir einen Vorhersage-Algorithmus für Bindetaschen (SiteMap).^[21] SiteMap identifizierte drei Wirkstoff-zugängliche Bindetaschen in den Kristallstrukturen von BamBL im Komplex mit α -L-Fucose (PDB-ID: 3ZW0, Abbildung S1) oder H-Typ-2-Tetrasaccharid (PDB-ID: 3ZZV),^[3] sowie in RSL (apo und holo, Abbildung S2 a,c). Darüber hinaus wurde in AFL eine Wirkstoff-zugängliche Bindestelle mit einer anderen Form und Größe identifiziert (Abbildung S3). Im Gegensatz dazu befanden sich die vorhergesagten Bindestellen in BamBL und RSL in denselben Bereichen mit leicht abweichenden Formen und Größen, was auf Unterschiede in den Aminosäureresten der Bindestellen zurückzuführen ist (Abbildung S2 b,d).

Zusammengefasst deuten die hohen Trefferquoten in der ^{19}F -NMR sowie die Bindetaschen-Vorhersage durch SiteMap auf das Vorhandensein Wirkstoff-zugänglicher Bindetaschen in β -Propeller-Lektinen hin, die wirkstoffähnliche Moleküle aufnehmen können.

Wirkstoff-zugängliche Bindestellen in BamBL

Wir wählten BamBL als Beispiel, um das Vorhandensein Wirkstoff-zugänglicher Bindestellen in β -Propeller-Lektinen zu untersuchen. Angesichts der großen Zahl von ^{19}F -NMR-Treffern konzentrierten wir uns auf 111 Fragmente mit den stärksten Effekten in der ^{19}F - und CPMG-NMR (Abbildung S4 a). Davon wurden 13 Verbindungen aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit nicht weiter untersucht. Die verbleibenden 98 Fragmente wurden dem orthogonalen Screening mittels SPR und TROSY-NMR unterzogen. Zudem wurde die Bindung an BamBL für 78 von 91 Fragmenten bestätigt (Abbildungen 1 c und S4 b). Zur weiteren Reduzierung der Trefferzahlen wurde TROSY-NMR als „Goldstandard“ für die Validierung von Fragmentbindung eingesetzt.^[22] Zuerst wurden mittels zielgerichteter Mutagenese sieben ^1H - ^{15}N -Resonanzen durch TROSY-NMR charakterisiert, wie in den Hintergrundinformationen beschrieben. Darüber hinaus bestätigten wir mittels SPR, ^{19}F - und TROSY-NMR die Bindung von 10 aus 39 Fragmenten an BamBL (Abbildung S4 c). Diese wurden schließlich mittels TROSY-NMR auf eine dosisabhängige Bindung untersucht. Dadurch identifizierten wir die Fragmente **10**, **12** und **24** für BamBL (Abbildung S5 a). Interessanterweise folgten die CSPs nicht demselben Vektor. Dies deutete auf einen komplizierteren Bindungsmechanismus als ein 1:1-Modell hin, das wir jedoch zur näherungsweisen Bestimmung der Affinitäten (K_d) und Ligandeneffizienzen (LE) verwendeten.^[23] Fragment **24** zeigte eine zweifach

stärkere Affinität ($K_d = 0,4 \pm 0,2$ mM, Abbildung S5b) und einen besseren LE-Wert von $0,29 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ HA}^{-1}$ als **10** ($K_d = 0,8 \pm 0,4$ mM, LE = 0,23) und **12** ($K_d = 0,9 \pm 0,3$ mM, LE = 0,21). Um abzuschätzen, ob **24** als guter Ausgangspunkt für die Wirkstoffentwicklung dienen könnte, überprüfen wir seine Wechselwirkung mit BambL in einem orthogonalen ^{19}F - R_2 -gefilterten NMR-Assay (Abbildung S6), der einen vergleichbaren K_d -Wert ergab ($K_d = 0,3 \pm 0,1$ mM, LE = $0,3 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ HA}^{-1}$).

Parallel dazu untersuchten wir, ob die vorhergesagten Wirkstoff-zugänglichen Bindestellen in BambL die Fragmente **10**, **12** und **24** aufnehmen können. Drei Wirkstoff-zugängliche Bindestellen wurden mit SiteMap in BambL identifiziert. Allerdings stellten wir nur geringe Unterschiede in den vorhergesagten Stellen der Kristallstruktur (PDB: 3ZW0) fest. Zum Beispiel zeigten K23 (in drei Stellen) und L87 (in einer Stelle) Unterschiede in der Seitenkettenausrichtung, die die Form und Größe der vorhergesagten Bindestellen leicht verändern können. Wir vermuteten, dass dies auf unterschiedliche Ausrichtungen der Seitenketten in den Kristallstrukturen zurückzuführen ist, welche jedoch in Lösung vergleichbar sein könnten. Daher wählten wir nur eine der Stellen für die Docking-Studie aus, die sich an der Schnittstelle zwischen den Monomeren nahe dem C-Terminus befindet und enge Kanäle bildet (T18, N20, K23, T25, G67, T69, G86 und L87, Abbildungen 2a und S7). Außerdem können die hydrophilen Aminosäuren in der Tasche die Aufnahme von Liganden mit polaren Gruppen ermöglichen. Folglich dockten wir die Fragmente **10**, **12** und **24** mit Glide (v.7.8) erfolgreich an der vorhergesagten Stelle an (Abbildungen 2b und S8). Die Docking-Studie ergab, dass sechs Aminosäuren (T18, K23, T25, G67, Y84 und L87) eine Schlüsselrolle bei der Fragmentbindung spielen. Insbesondere **24** zeigte eine Bindung an die vorhergesagte Stelle mit nahezu identischer Position, mit einem geringen Unterschied in der Ausrichtung des Morpholinrings in verschiedenen Bindungspositionen (Abbildung S9). Ebenso wurden Fragmente **12** und **10** an die Bindestelle gedockt, welche Wasserstoffbrückenbindungen mit den identifizierten Aminosäuren zeigten.

Um diese Vorhersage experimentell zu untermauern, quantifizierten wir die Änderungen der chemischen Verschiebung in TROSY-NMR-Spektren von ^{15}N -BambL in Gegenwart der Fragmente **10**, **12** und **24**. Die Fragmente beeinflussten die gleichen Resonanzen in ^{15}N -BambL. Dies deutet darauf hin, dass sie die gleiche Bindestelle in BambL erkennen, was unsere rechnergestützte Vorhersage der Bindetasche bestätigte (Abbildung 2c–e).

Als Nächstes bestätigten wir, dass **24** eine Wirkstoff-zugängliche Tasche in BambL bindet, die sich von der orthosterischen Bindestelle unterscheidet. Dazu verwendeten wir CPMG-NMR mit **24** als ^{19}F -Reporter und 2-Desoxy-2-fluor-L-fucose (2FF) als Kompetitor (Abbildung 2f). Im Vergleich zu MeFuc bindet 2FF schwächer an die orthosterische Stelle von BambL ($K_d = 18,8 \pm 2,3 \mu\text{M}^{[24]}$) und hat daher eine bessere Chance auf eine Kompetitorbindung von **24**. In der Tat zeigte 2FF eine dosisabhängige Bindung an BambL mit einem IC_{50} -Wert von $0,19 \pm 0,02$ mM, der 10-mal schwächer ist als zuvor berichtet ($\text{IC}_{50} = 0,02$ mM,^[24] Abbil-

dung 2g). 2FF konnte **24** teilweise verdrängen. Wir folgerten daraus, dass **24** eine Wirkstoff-zugängliche Tasche in BambL bindet.

Weiterhin haben wir den Effekt der Bindung von **24** auf die orthosterische Seite von BambL mittels der Protein-basierten ^{19}F -(PrOF-)NMR-Methode untersucht.^[15] PrOF-NMR hat sich bereits bei der Identifizierung kleiner Moleküle bewährt, die auf das bakterielle Lektin LecA abzielen.^[25] Da das BambL-Monomer sechs Tryptophan-Reste in der Kohlenhydratbindestelle enthält (Abbildung S10a), überprüfen wir die Auswirkung der Fragmentbindung auf die orthosterische Bindestelle mit PrOF-NMR. Zu diesem Zweck haben wir Tryptophan-Reste in BambL durch 5-Fluortryptophan (5FW) ersetzt, wobei wir vier der sechs 5FW durch zielgerichtete Mutagenese zuordneten (Abbildung S10b). Als Nächstes bestätigten wir die Aktivität von 5FW-BambL mit MeFuc und 2FF, wobei alle sechs 5FWs einen langsamen Austausch auf der NMR-Zeitskala zeigten (Abbildung S10c,d). Es zeigte sich, dass beide natürlichen Liganden starke Binder sind. Daher war diese Methode nicht gut geeignet, um die Affinitäten von MeFuc und 2FF zu bestimmen. Dies erschwerte die genaue Ableitung der K_d -Werte (2FF: $K_d = 46 \pm 11 \mu\text{M}$ im Vergleich zu berichteten $K_d = 18,8 \pm 2,3 \mu\text{M}^{[24]}$ (Abbildung S10e)). Dies ist nicht überraschend, weil zuvor auch ähnliche Einschränkungen bei ^1H - ^{15}N -HSQC-NMR festgestellt wurden.^[26] Die PrOF-NMR verifizierte jedoch die Auswirkungen der Bindung der Fragmente (**10**, **12** und **24**) an die orthosterische Stelle von 5FW-BambL über W51, W72 und W79/W34 (W_2 und W_5 , Abbildung S11, Tabelle S1). Darüber hinaus führte die Titration von **24** an 5FW-BambL zu einer dosisabhängigen CSP-Änderung von 5FWs mit einem K_d -Wert von $0,3 \pm 0,1$ mM, was mit unseren früheren Ergebnissen übereinstimmt (Abbildung 2h,i). Als Nächstes haben wir untersucht, ob die Fragmente die Interaktion von 5FW-BambL mit 2FF hemmen können. Interessanterweise blieb **24** in Gegenwart von 2FF an 5FW-BambL gebunden (Abbildung S10f), ebenso wie **12** (Abbildung S10g). Allerdings hemmte **24** die Interaktion zwischen 2FF und 5FW-BambL in diesem Experiment nicht ($K_d = 52 \pm 3 \mu\text{M}$, Abbildung S10h), was im Widerspruch zu unserem ^{19}F -NMR-Ergebnis steht. Die modulatorischen Eigenschaften von **24** sind daher noch zu beweisen.

Insgesamt bestätigten die computergestützten und experimentellen Analysen mit ^{19}F -NMR das Vorhandensein Wirkstoff-zugänglicher Bindestellen in BambL. Trotz des nicht schlüssigen Ergebnisses bezüglich der hemmenden Eigenschaften von **24** zeigte die PrOF-NMR, dass die Bindung der Fragmente **10**, **12** und **24** die orthosterische Stelle in BambL beeinflusste, was stark auf das Vorhandensein einer Kommunikation zwischen der orthosterischen und der vorhergesagten Bindestelle hindeutet. Daher wurde **24** weiteren Studien unterzogen.

Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung (SAR) von **24**

Das Ziel der SAR-Studie war es, die Affinität von **24** mithilfe kommerziell erhältlicher Analoga zu verbessern (Tabelle S2, Abbildung 3a). Zu diesem Zweck wurden rech-

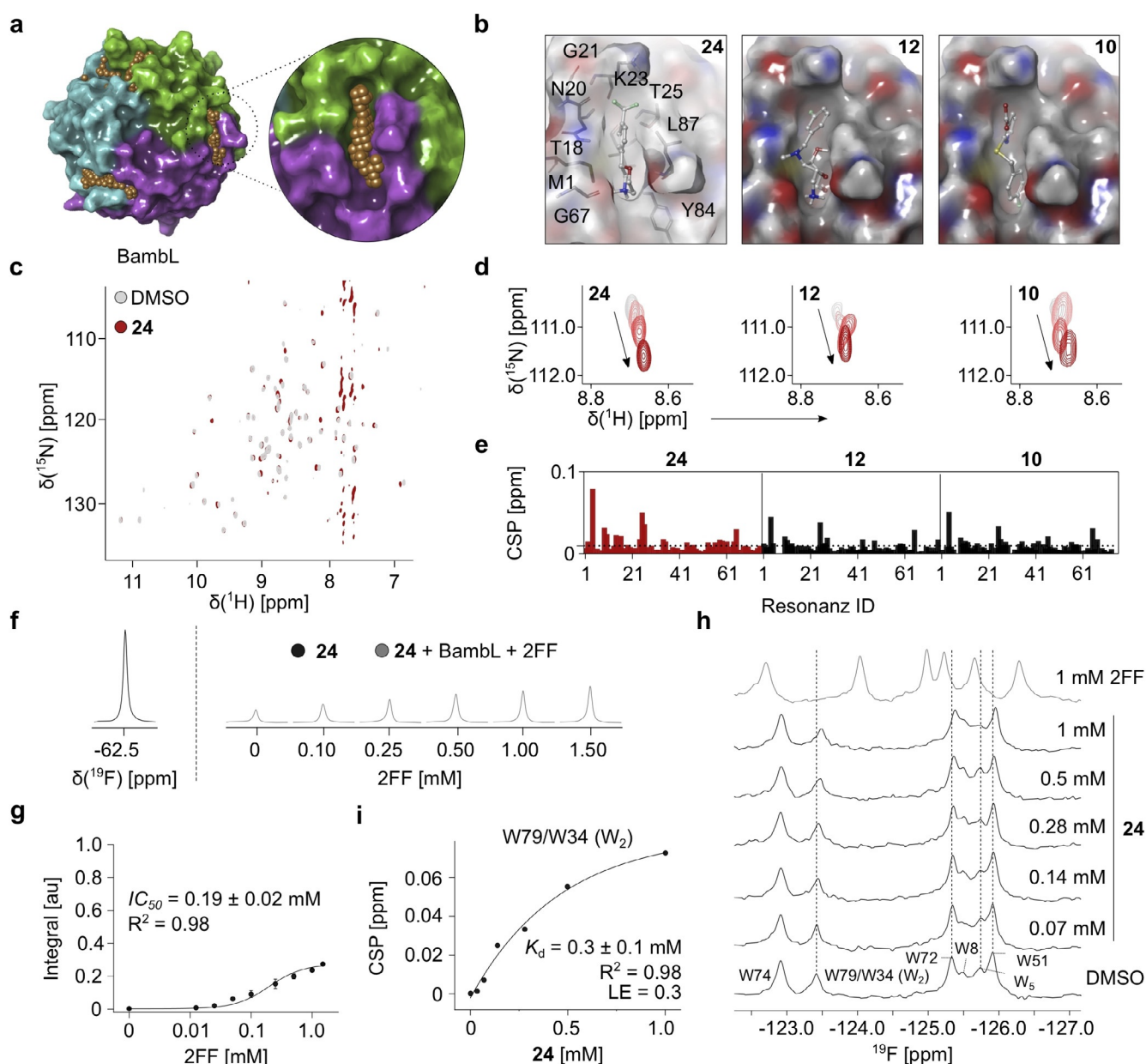


Abbildung 2. Identifizierung der Wirkstoff-zugänglichen Bindestellen in BamBL. a) BamBL beherbergt drei potenzielle Wirkstoff-zugängliche Bindestellen (PDB-ID: 3ZW0), während nur eine davon (vergrößerte Ansicht) die Fragmente **24**, **12** und **10** aufnehmen kann. b) Docking-Posen von **24**, **12** und **10**. c) TROSY-NMR von ^{15}N -BamBL mit DMSO oder **24**. d) Dargestellt ist ein Beispiel für dosisabhängige CSPs nach Zugabe von **24**, **12** und **10**. e) Die CSP-Diagramme für **24**, **12** und **10** zeigen, dass die Fragmente ähnliche Resonanzen in ^{15}N -BamBL stören, wobei **24** im Vergleich zu **12** und **10** ein größeres Ausmaß an CSPs aufweist. Die gestrichelte Linie zeigt CSPs $> 0,01$ ppm. f, g) Kompetitives T_2 -gefiltertes ^{19}F -NMR ergab den IC_{50} -Wert von 2FF in Gegenwart von 1 mM **24** und 0,1 mM BamBL. Bemerkenswert ist, dass 2FF nur teilweise mit **24** kompetitierte, was darauf hindeutet, dass **24** weit entfernt von der orthosterischen Bindestelle an BamBL bindet. h) PROF-NMR von 0,1 mM 5FW-BamBL zeigt CSPs aller sechs 5FW-Resonanzen in Gegenwart von 1 mM 2FF. Darüber hinaus wurden W79/W34 (W_2), W₅, nicht zugeordnet), W72 und W51 gestört, was eine Auswirkung von Bindern an entfernten Stellen auf die Kohlenhydratbindestelle zeigt. i) 1:1-Bindungsmodell der PROF-NMR-Titrationsdaten. Die CSPs von W79/W34 (W_2) wurden nach Zugabe von **24** genutzt, um die Affinität abzuleiten.

nerische und experimentelle Methoden verwendet. Wir testeten 16 Analoga von **24** mittels TROSY-NMR (Abbildung S12). Die Bedeutung der Morpholingroupen in **24** wurde bestätigt, da deren Austausch gegen Piperidin (**84**), Morpholin-3-on (**91**) bzw. Tetrahydro-2H-pyran-4-ol (**92**) die Bindung vollständig oder teilweise aufhob (Abbildung S13a). Weiterhin wurde die Einführung einer Aminogruppe in 4-(2-Aminoethyl)morpholin (**90**) im Gegensatz zu einer hydrophobe-

ren und sperrigeren Veränderung wie 5-Brompyrimidin (**89**, Abbildung S13b) toleriert. Allerdings verhinderte der Ersatz (**95**) oder das Entfernen (**96**) von CF_3 oder die Änderung der Position der Benzylgruppe von Position 1 (**96**) auf 2 (**87**) die BamBL-Bindung (Daten nicht gezeigt). Daher untersuchten wir die Rolle der Benzylgruppe, indem wir sie durch 1,3-Dichlorbenzol (**86**), 3-Methylpyrazol (**88**), Methylacetat (**98**), *N*-Formylpiperidin (**97**), Tetrazol (**83**), 2-Brom (**85**) oder

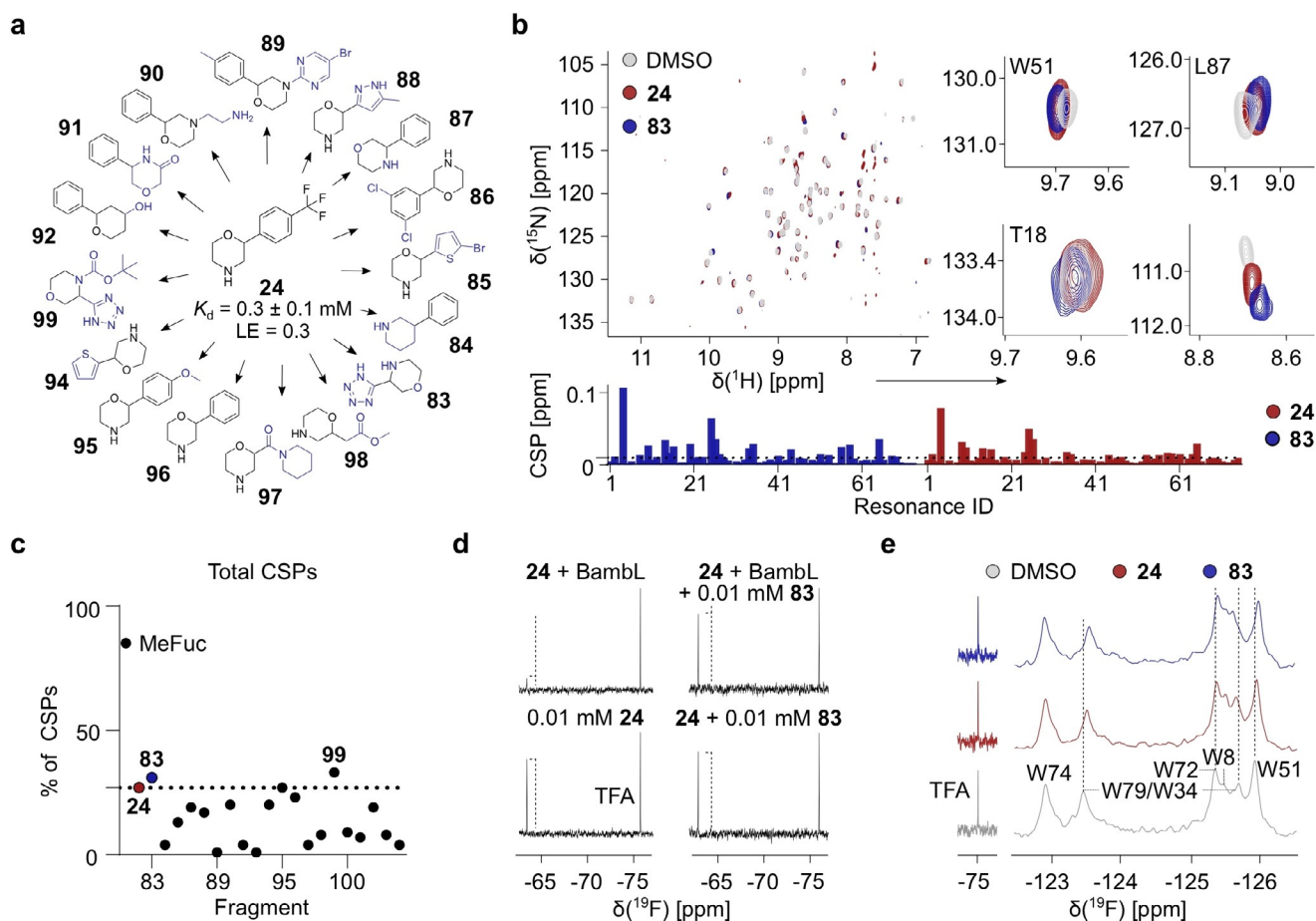


Abbildung 3. Struktur-Aktivitäts-Beziehung von **24**. a) Gezeigt sind 16 von 22 kommerziell erhältlichen strukturellen Derivaten von **24**, die mittels TROSY-NMR analysiert wurden. b) TROSY-NMR (oben) von ^{15}N -BambL in Gegenwart von DMSO (grau), **83** (blau) oder **24** (rot). Qualitative Analyse von TROSY-NMR (unten). Die gestrichelte Linie zeigt CSPs > 0.01 ppm. c) Der Gesamtprozentsatz der TROSY-NMR-abgeleiteten CSPs zeigt, dass **83** (31%) und **99** (33%) mehr CSPs in ^{15}N -BambL verglichen zu **24** (gestrichelte Linie, 27%) erzeugten. d) 0.1 mM **83** verdrängte 0.1 mM **24** von seiner Bindestelle in ^{19}F -CPMG-NMR. e) PROF-NMR von 0.1 mM 5FW-BambL mit 1 mM **83** und 1 mM **24**, die CSPs von 5FW-Resonanzen (gestrichelte Linie) zeigten, was eine Auswirkung beider Fragmente auf die orthosterische Stelle von 5FW-BambL belegt.

Thiophen (**94**) ersetzen. Die entsprechenden Analoga **83**, **85**, **86**, **88** und **94** bewahrten die Bindung an ^{15}N -BambL (Abbildungen S14a und 3b). Im Vergleich zu **24** bewirkte **83** mehr Gesamt-CSP über 0,01 ppm in ^{15}N -BambL. Dies bestätigten wir in einem kompetitiven Experiment mittels ^{19}F -CPMG-NMR (Abbildung 3c). In dieser Studie wurde 10 μM **24** vollständig durch 10 μM **83** kompetitiert. Dies zeigte, dass beide Fragmente dieselbe Bindetasche erkennen und **83** eine potenziell stärkere Bindung als **24** aufweist (Abbildung 3d). Interessanterweise bestätigten sechs Analoga von **83** (**99**–**104**, Tabelle S2) die Wichtigkeit der Tetrazol- (**100**) und Morpholingruppen (**104**) für die Bindung von **83** an die Wirkstoff-zugängliche Stelle angesichts der nicht vorhandenen Bindung in der TROSY-NMR (Abbildung S14b). Daher werden wir **83** in zukünftigen Studien weiter untersuchen.

Wir führten rechnerische Docking-Analysen von fünf Derivaten von **24** (**83**, **84**, **87**, **90** und **94**) durch, um zu prüfen, ob die vorhergesagte Bindetasche in BambL diese Verbindungen aufnehmen kann. Wir wählten diese Fragmente, um die Bedeutung der Morpholin- und Benzylgruppen zu überprüfen. Es zeigte sich, dass alle Verbindungen in der Binde-

tasche untergebracht werden konnten, während **84** keine elektrostatischen Wechselwirkungen bildete (Abbildung S15). Diese Beobachtungen bestätigten unsere experimentellen Daten, die zeigen, dass die Morpholingruppe (**24**) eine wichtige Rolle bei der Bindung von BambL spielt, wie für **87** gezeigt wurde, während andere Teile von **24** austauschbar sind (siehe z. B. **83** und **94**). Als Nächstes bestätigten wir, dass das Analogon **83** die orthosterische Bindestelle von 5FW-BambL in der PROF-NMR beeinflussen kann (Abbildung 3e). Tatsächlich störte **83** W79/W34 (W_2 und W_5), W51 und W72 ähnlich wie die ursprüngliche Verbindung **24**, jedoch mit größeren chemischen Verschiebungen (CSPs) von 5FW-Resonanzen.

Insgesamt bestätigte unsere SAR-Studie das Vorhandensein einer sekundären Stelle in BambL, die wirkstoffähnliche Substanzen binden kann. Darüber hinaus hatte die Bindung der Fragmente **24** und **83** an die sekundäre Bindetasche von BambL Auswirkungen auf die orthosterische Stelle, was eine Kommunikation zwischen beiden Bindestellen schließen lässt.

Kommunikation zwischen der Kohlenhydrat- und sekundären Bindestellen in BamBL

Um die allosterische Kommunikation in BamBL nachzuweisen, wurden vier (W8F, W51F, W72F und W74F) bzw. drei (T18S, T25S und L87R) Mutationen für die orthosterische und die sekundäre Stelle eingeführt (Abbildung 4a). Mittels TROSY-NMR wurden Faltung und Aktivität der Proteine bestätigt (Abbildung S16). Als Nächstes quantifizierten wir die chemischen Verschiebungen (CSPs) der apo-Formen von Mutanten im Vergleich zum Wildtyp (WT). Interessanterweise betrafen die CSPs die Aminosäurereste sowohl in der unmittelbaren Peripherie als auch entfernte Reste, wie es für

die Mutanten W51F und T18S gezeigt wurde. Hier wurde eine chemische Verschiebung von W72 sowohl bei WT- als auch bei T18S-Mutanten festgestellt, die sich entlang desselben Vektors bewegen (Abbildung 4b). Die Quantifizierung der CSPs von apo-WT zu anderen apo-Mutanten (W8F, W72F, W74F, L87R und T18S) zeigte, dass die Konformationsänderungen in ^{15}N -BamBL auf denselben Pfaden verlaufen, was indikativ für allosterische Proteine ist (Abbildung 4c).^[27] Weiterhin untersuchten wir, ob die Mutation in der sekundären Tasche die Affinität von BamBL zu Kohlenhydraten verändern könnte. Dazu titrierten wir 2FF und ein komplexes Kohlenhydrat (F-H Typ 2) zu BamBL-WT und -T18S (Abbildungen 4d und S17 a). Im Vergleich zu BamBL-WT behielt

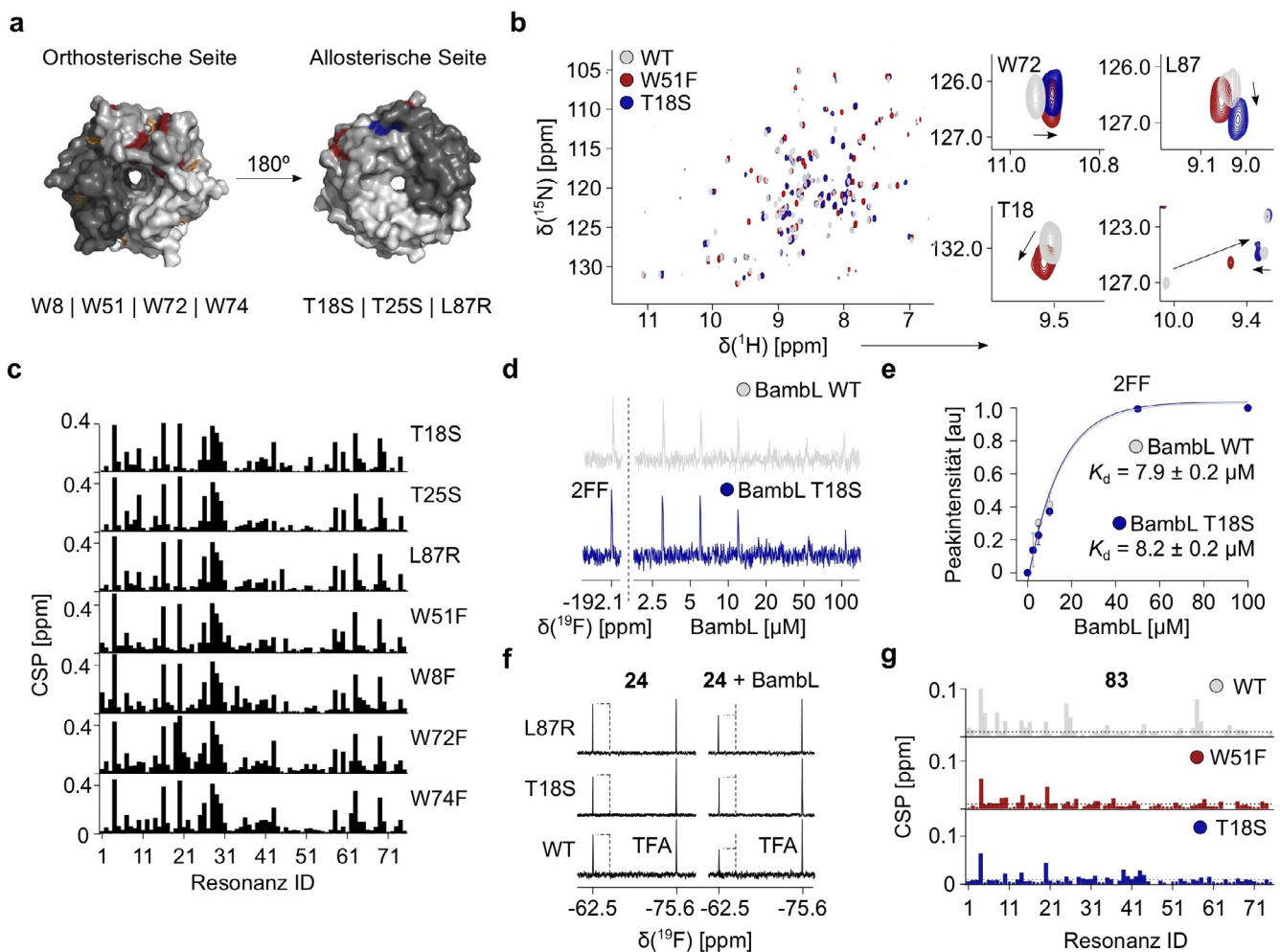


Abbildung 4. Charakterisierung der Wirkstoff-zugänglichen Bindestelle in BamBL. a) Ansichten von oben und unten auf die orthosterische (rot) und potenzielle allosterische Stelle (blau) in der Kristallstruktur von BamBL komplexiert mit L-Fucose (orange, PDB-ID: 3ZZV). Einzelpunktmutationen in der orthosterischen und sekundären Stelle wurden eingeführt, um die Kommunikation zwischen beiden Stellen zu untersuchen. b) Die Überlagerung der ^{15}N -TROSY-NMR-Spektren von BamBL-WT, -W51F und -T18S zeigt die Konformationsänderungen, die durch die beiden zielgerichteten Mutationen eingeführt wurden. Bemerkenswert ist, dass die Mutationen W51F und T18S identische Veränderungen an anderen Resonanzen in den orthosterischen (W72) und sekundären Stellen (L87R) von BamBL bewirkten. c) CSP-Untersuchungen der mutierten apo-Formen im Vergleich zu BamBL-WT zeigen ein unverändertes CSP-Muster sowohl bei Tryptophan- als auch bei allosterischen Taschenmutanten. d) ^{19}F -NMR-Spektren von 2FF in Gegenwart von BamBL-WT und -T18S. e) Die Bestimmung der 2FF- K_d -Werte für BamBL-T18S ergab eine vergleichbare Affinität im Vergleich zu BamBL-WT. f) ^{19}F -CPMG-NMR von 24 mit BamBL-WT, -T18S und -L87R bestätigt die vorhergesagte Stelle, da sich die Peakintensität bei den Mutanten nicht verändert (gestrichelte Linie). g) Die Bindung von 83 an W51F und T18S führte im Vergleich zu WT zu einer geringeren Gesamtzahl von CSPs oberhalb des Schwellenwerts von 0,01 ppm, was eine Kommunikation zwischen der orthosterischen und der entfernten Stelle bestätigt.

T18S seine Affinität für 2FF bei (Abbildung 4e, WT: $K_d = 7,9 \pm 0,2 \mu\text{M}$, T18S: $K_d = 8,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$). BambL-T18S zeigte jedoch eine fast zweifach geringere Affinität für F-H Typ 2 (Abbildung S17b, $K_d = 16,7 \pm 2,5 \mu\text{M}$) als BambL-WT ($K_d = 9 \pm 2 \mu\text{M}$ ^[28]). Um die Bindung von F-H Typ 2 an ¹⁵N-BambL-T18S zu überprüfen, verwendeten wir TROSY-NMR und verglichen die CSPs mit dem WT-Protein (Abbildung S17c). Die T18S-Mutation verringerte das Ausmaß der CSPs in ¹⁵N-BambL, was auf eine modulierende Wirkung der sekundären Bindetasche auf die orthosterische Seite hindeutet. Allerdings wurde dies nur bei der Bindung komplexer Kohlenhydrate beobachtet (Abbildung S17d). Eine Diskrepanz zwischen zwei Kohlenhydratbindestellen in der Interaktion mit komplexen Kohlenhydraten, aber nicht mit MeFuc, wurde vor Kurzem für BambL berichtet.^[9a] Angesichts der fehlenden Affinitätsänderung durch 2FF vermuten wir, dass die Hemmung der sekundären Stelle die Affinität von Kohlenhydrat-Liganden zu BambL verringern könnte, indem die orthosterische Bindestelle zwischen zwei Monomeren, aber nicht die innerhalb eines Monomers beeinflusst wird. Die hexamere Struktur von BambL erschwert jedoch die Identifizierung des allosterischen Netzwerkes, da die symmetriebezogenen Bindestellen nahe beieinander liegen und die chemischen Verschiebungen durch zwei Bindungsereignisse beeinflusst werden können. Wie bereits für RSL berichtet,^[29] könnte in Zukunft die Entwicklung eines einzigen monomeren neo-BambL mit kontrollierter Anzahl und Position der Bindestellen genutzt werden, um die Auswirkungen auf verschiedene Stellen zu unterscheiden. Diese Hypothese erfordert weitere Untersuchungen.

Schließlich untersuchten wir die Auswirkungen der Bindetaschen-Mutationen auf die Bindung der stärksten Fragmente **24** und **83** mittels ¹⁹F-CPMG- und TROSY-NMR. Bemerkenswerterweise verringerten die Mutationen in den Taschen die Bindung von **24** in der ¹⁹F-CPMG-NMR (Abbildung 4f), da die Peakintensität von **24** in BambL-T18S und -L87R nicht reduziert wurden. Darüber hinaus zeigte **24** in beiden Mutanten in TROSY-NMR-Experimenten weniger CSPs über dem Schwellenwert von 0,01 ppm (Abbildung S18a,b), woraus wir folgern, dass die Mutationen den Eingang in die vorhergesagte Tasche nur teilweise blockierten. In ähnlicher Weise beobachteten wir diesen Effekt beim Fragment **83** (Abbildung S19a), was mit der rechnerischen Docking-Analyse übereinstimmt, die das Vorhandensein von zwei Orientierungen für **83** und seinem Derivat **99** nahelegt (Abbildung S20). Interessanterweise verringerte die Mutation in der orthosterischen Stelle (W51F) die Bindung von **83** ähnlich wie bei ¹⁵N-BambL-T18S und anderen Mutationen der Tasche (Abbildungen 4g und S19b), was die „Ende-zu-Ende“-Kommunikation beider Stellen bestätigt.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass es in BambL eine sekundäre Bindestelle gibt, die für wirkstoffähnliche Substanzen zugänglich ist. Die chemischen Verschiebungen der Backbone-Resonanzen von ¹⁵N-BambL Mutanten der Bindetasche erstrecken sich bis zur Kohlenhydrat-Erkennungsstelle, was auf eine allosterische Kommunikation zwischen beiden Stellen in BambL hinweist.

Zusammenfassung

Wir identifizierten eine sekundäre Bindestelle im bakteriellen β -Propeller-Lektin BambL, die für die Entwicklung allosterischer Inhibitoren genutzt werden könnte. Mittels ¹⁹F-NMR-Screening identifizierten wir wirkstoffähnliche Substanzen, die an diese Stelle binden, welche wir mit orthogonalen Methoden (SPR und TROSY-NMR) validierten. Ein Algorithmus (SiteMap) bestätigte das Vorhandensein der sekundären Bindestelle. Wir zeigten zudem, dass die Stelle auch die wirkstoffähnlichen Substanzen **24**, **10** und **12** aufnehmen kann. Die SAR-Studie von **24** ($K_d = 0,3 \pm 0,1 \text{ mM}$, $LE = 0,3$) bewies die Identität der Bindetasche, indem sie das Bindungsepitop des vorhergesagten Teils des Gerüsts von **24** bestätigte. Zudem hatte die Bindung der Fragmente **24** und **83** in der ProOF-NMR einen Effekt auf die orthosterische Stelle von 5FW-BambL. Dies deutete auf eine Kommunikation zwischen zwei räumlich entfernten Bindestellen in BambL hin. Durch Mutagenesestudien innerhalb der sekundären und orthosterischen Stellen beobachteten wir die Konformationsänderungen der ¹⁵N-BambL-Rückgratresonanzen in der TROSY-NMR in distalen Regionen. Ein solches Verhalten ist typisch für allosterische Proteine. Da Pilz- (AFL) und bakterielle (RSL) Lektine Ähnlichkeiten mit BambL bezüglich Struktur, Trefferquoten und sekundärer Bindetaschen aufweisen, vermuten wir, dass Allosterie auch in anderen β -Propeller-Lektinen vorhanden sein könnte. Diese Beobachtungen werden die Identifizierung allosterischer Inhibitoren für mikrobielle Lektine unterstützen.

Danksagung

Wir danken der Max-Planck-Gesellschaft und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) [RA1944/7-1] für die Unterstützung dieser Arbeit, die im Rahmen des Projekts „Glycomime“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der französischen Nationalen Forschungsagentur [ANR-17-CE11-0048] durchgeführt wurde. Die Autoren danken für die Unterstützung durch das H2020 PhD4Glycodrug-Programm (MSCA 76558), ANR PIA Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02) und Labex Arcane/CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003).

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Stichwörter: Allosterie · fragmentbasiertes Wirkstoffdesign · Kohlenhydrat-Protein-Interaktionen · NMR-Spektroskopie · Wirkstoffentdeckung

- [1] a) L. C. Breitenbach Barroso Coelho, P. Marcelino dos Santos Silva, W. Felix de Oliveira, M. C. de Moura, E. Viana Pontual, F. Soares Gomes, P. M. Guedes Paiva, T. H. Napoleão, M. T. dos Santos Correia, *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *125*, 1238–1252; b) J. Meiers, E. Siebs, E. Zahorska, A. Titz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2019**, *53*, 51–67.

- [2] J. R. Bishop, P. Gagneux, *Glycobiology* **2007**, *17*, 23R–34R.
- [3] A. Audfray, J. Claudinon, S. Abounit, N. Ruvoën-Clouet, G. Larson, D. F. Smith, M. Wimmerová, J. Le Pendu, W. Römer, A. Varrot, A. Imberty, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 4335–4347.
- [4] a) K. A. Ramsay, C. A. Butler, S. Paynter, R. S. Ware, T. J. Kidd, C. E. Wainwright, S. C. Bell, *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 3975–3980; b) G. A. Pradenas, B. N. Ross, A. G. Torres, *Vaccines* **2016**, *4*, 10.
- [5] a) E. C. Nannini, A. Ponessa, R. Muratori, P. Marchiaro, V. Ballerini, L. Flynn, A. S. Limansky, *Braz. J. Infect. Diseases* **2015**, *19*, 543–545; b) T. Coenye, E. Mahenthalingam, D. Henry, J. J. LiPuma, S. Laevens, M. Gillis, D. P. Speert, P. Vandamme, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2001**, *51*, 1481–1490.
- [6] I. Wilhelm, E. Levit-Zerdoun, J. Jakob, S. Villringer, M. Frensch, R. Übelhart, A. Landi, P. Müller, A. Imberty, R. Thuenauer, J. Claudinon, H. Jumaa, M. Reth, H. Eibel, E. Hobeika, W. Römer, *Science Signaling* **2019**, *12*, ea07194.
- [7] F. Bonnardel, A. Kumar, M. Wimmerova, M. Lahmann, S. Perez, A. Varrot, F. Lisacek, A. Imberty, *Structure* **2019**, *27*, 764–775.
- [8] a) D. Goyard, V. Baldoneschi, A. Varrot, M. Fiore, A. Imberty, B. Richichi, O. Renaudet, C. Nativi, *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 83–88; b) B. Richichi, A. Imberty, E. Gillon, R. Bosco, I. Sutkeviciute, F. Fieschi, C. Nativi, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 4086–4094.
- [9] a) S. Kuhaudomlarp, L. Cerofolini, S. Santarsia, E. Gillon, S. Fallarini, G. Lombardi, M. Denis, S. Giuntini, C. Valori, M. Fragai, A. Imberty, A. Dondoni, C. Nativi, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 12662–12670; b) N. Galanos, Y. Chen, Z. P. Michael, E. Gillon, J.-P. Dutasta, A. Star, A. Imberty, A. Martinez, S. Vidal, *ChemistrySelect* **2016**, *1*, 5863–5868; c) C. Ligeour, A. Audfray, E. Gillon, A. Meyer, N. Galanos, S. Vidal, J.-J. Vasseur, A. Imberty, F. Morvan, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 19515–19524.
- [10] B. Ernst, J. L. Magnani, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2009**, *8*, 661–677.
- [11] J. Aretz, E.-C. Wamhoff, J. Hanske, D. Heymann, C. Rademacher, *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 323.
- [12] a) J. Aretz, U. R. Anumala, F. F. Fuchsberger, N. Molavi, N. Ziebart, H. Zhang, M. Nazaré, C. Rademacher, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 14915–14925; b) B. G. Keller, C. Rademacher, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2020**, *62*, 31–38.
- [13] J. Aretz, H. Baukmann, E. Shanina, J. Hanske, R. Wawrzinek, V. A. Zapol'skii, P. H. Seeberger, D. E. Kaufmann, C. Rademacher, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7292–7296; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 7398–7402.
- [14] a) T. T. Waldron, T. A. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 85–90; b) J. Hanske, S. Aleksić, M. Ballaschk, M. Jurk, E. Shanina, M. Beerbaum, P. Schmieder, B. G. Keller, C. Rademacher, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12176–12186.
- [15] C. T. Gee, K. E. Arntson, A. K. Urick, N. K. Mishra, L. M. Hawk, A. J. Wisniewski, W. C. Pomerantz, *Nat. Protocols* **2016**, *11*, 1414–1427.
- [16] C. R. Buchholz, W. C. K. Pomerantz, *RSC Chem. Biol.* **2021**, *2*, 1312–1330.
- [17] C. Dalvit, A. Vulpetti, *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 2218–2244.
- [18] a) J. Aretz, Y. Kondoh, K. Honda, U. R. Anumala, M. Nazaré, N. Watanabe, H. Osada, C. Rademacher, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 9067–9070; b) J. Schulze, H. Baukmann, R. Wawrzinek, F. F. Fuchsberger, E. Specker, J. Aretz, M. Nazaré, C. Rademacher, *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 3229–3235.
- [19] a) N. Kostlánová, E. P. Mitchell, H. Lortat-Jacob, S. Oscarson, M. Lahmann, N. Gilboa-Garber, G. Chambat, M. Wimmerová, A. Imberty, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 27839–27849; b) J. Houser, J. Komarek, N. Kostlanova, G. Cioci, A. Varrot, S. C. Kerr, M. Lahmann, V. Balloy, J. V. Fahy, M. Chignard, A. Imberty, M. Wimmerova, *PLOS ONE* **2013**, *8*, e83077.
- [20] R. F. Ludlow, M. L. Verdonk, H. K. Saini, I. J. Tickle, H. Jhoti, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 15910–15915.
- [21] T. A. Halgren, *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 377–389.
- [22] A. D. Gossert, W. Jahnke, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2016**, *97*, 82–125.
- [23] A. L. Hopkins, C. R. Groom, A. Alex, *Drug Discovery Today* **2004**, *9*, 430–431.
- [24] T. Dingjan, É. Gillon, A. Imberty, S. Pérez, A. Titz, P. A. Ramsland, E. Yuriev, *J. Chem. Inf. Model.* **2018**, *58*, 1976–1989.
- [25] E. Shanina, E. Siebs, H. Zhang, D. Varón Silva, I. Joachim, A. Titz, C. Rademacher, *Glycobiology* **2021**, *31*, 159–165.
- [26] M. P. Williamson, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, *73*, 1–16.
- [27] D. D. Boehr, J. R. Schnell, D. McElheny, S.-H. Bae, B. M. Duggan, S. J. Benkovic, H. J. Dyson, P. E. Wright, *Biochemistry* **2013**, *52*, 4605–4619.
- [28] G. Fittolani, E. Shanina, M. Guberman, P. H. Seeberger, C. Rademacher, M. Delbianco, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 13302–13309; *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 13414–13421.
- [29] J. Arnaud, K. Tröndle, J. Claudinon, A. Audfray, A. Varrot, W. Römer, A. Imberty, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9267–9270; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 9421–9424.

Manuskript erhalten: 13. Juli 2021

Veränderte Fassung erhalten: 5. Oktober 2021

Akzeptierte Fassung online: 29. Oktober 2021

Endgültige Fassung online: 23. November 2021