

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Naturstoffe und ihre Derivate als molekulare
Sonden: Identifikation ihrer Angriffsziele und
Inhibition der Virulenz in pathogenen Bakterien**

Thomas Böttcher
aus
München

2009

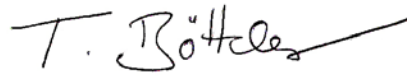
Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Professor Dr. Stephan A. Sieber betreut und von Herrn Professor Dr. Thomas Carell vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 26.10.2009

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'T. Böttcher', with a horizontal line underneath it.

Thomas Böttcher

Dissertation eingereicht am 28.10.2009

1. Gutachter	Professor Dr. Thomas Carell
2. Gutachter	Professor Dr. Stephan Sieber

Mündliche Prüfung am 21.12.2009

*„The future belongs to those who
believe in the beauty of their dreams.“*

Eleanore Roosevelt

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Beiträge in rezensierten Fachjournalen

T. Böttcher, M. Pitscheider, S. A. Sieber (2009) Naturstoffe und ihre biologischen Angriffsziele: Proteomische und metabolomische Markierungsstrategien. *Submitted*.

T. Böttcher, S. A. Sieber (2009) Showdomycin as a versatile chemical tool for the detection of pathogenesis associated enzymes in bacteria. *Submitted*.

T. Böttcher, S. A. Sieber (2009) Beta-lactones decrease the intracellular virulence of *Listeria monocytogenes* in macrophages. *ChemMedChem* 4(8):1260-1263.

T. Böttcher, S. A. Sieber (2009) Structurally refined beta-lactones as potent inhibitors of devastating bacterial virulence factors. *ChemBioChem* 10(4):663-666.

T. Böttcher, S. A. Sieber (2008) Beta-lactones as specific inhibitors of ClpP attenuate the production of extracellular virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J. Am. Chem. Soc.* 130(44):14400-14401.

T. Böttcher, S. A. Sieber (2008) Beta-lactones as privileged structures for the active-site labeling of versatile bacterial enzyme classes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47(24): 4600-4603.

Beiträge als Buchkapitel

S. A. Sieber, T. Böttcher, I. Staub, R. Orth (2009) Small Molecules as Versatile Tools for Activity-Based Protein Profiling Experiments. *In: Comprehensive Natural Products Chemistry*, Ed. Lew Mander, Elsevier, In Press.

Patentschrift

S. A. Sieber, T. Böttcher (2009) Beta-Lactones as Antibacterial Agents. New PCT patent application, N3256 PCT.

Veröffentlichung als Konferenzbeiträge in Form von Postern und Vorträgen

T. Böttcher (2009) β -Lactones for the active site labeling of versatile bacterial enzyme classes and inhibition of virulence. Hochschule trifft Industrie (Htl) 2009, 10th – 12th September, Bad Dürkheim.

T. Böttcher, S. A. Sieber (2009) Activity-based Protein profiling – a novel tool to study extremophiles? Nordic NASA Summer School “Water, Ice and the Origin of Life in the Universe, 29th June – 13th July, Reykjavik, Iceland.

T. Böttcher (2009) β -Lactones – from activity based probes to a novel strategy to combat bacterial infections. LMU-Harvard Young Scientists’ Forum, “From Molecules to Organisms”, 21st – 24th June, Munich.

T. Böttcher (2009) The *S. aureus* ClpP system – dynamic regulation of virulence. 2nd Symposium SFB 749 – Dynamics and Intermediates of Molecular Transformations (DFG), 30th March – 01st April, Wildbad Kreuth.

T. Böttcher, M. Pitscheider, I. Staub, R. Orth, S. A. Sieber (2009) Privileged structures for the active site labeling of versatile bacterial enzyme classes. LMU Synthesefest, 17th / 18th March, Munich.

T. Böttcher, M. Pitscheider, I. Staub, R. Orth, S. A. Sieber (2008) Privileged structures for the active site labeling of versatile bacterial enzyme classes. EMBL Chemical Biology Conference, 8th – 11th October, Heidelberg.

I. Staub, T. Böttcher, R. Orth, S. A. Sieber (2007) Chemical Strategies for Monitoring Proteome Dynamics in Human Diseases. DFG - SFB 749, Munich.

Danksagung

Herrn *Professor Dr. Thomas Carell* danke ich herzlich für die Vermittlung in den AK Sieber und die unkomplizierte Übernahme der Betreuung meiner Promotion. Die großzügige Möglichkeit zur Mitbenutzung der Infrastruktur seiner Arbeitsgruppe hat wesentlich zum Erfolg meiner Arbeit beigetragen.

Herrn *Professor Dr. Stephan A. Sieber* gilt mein herzlicher Dank für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die gute Betreuung. Besonders die interessanten Themenstellungen, die freie Hand bei der experimentellen Durchführung und die Möglichkeit eigene Ideen entwickeln und ihnen nachgehen zu dürfen waren eine große Motivation für mich. Ich bedanke mich herzlich für die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen, die oftmals zur Lösung von Problemen beitrugen oder die Entwicklung neuer Projekte ermöglichten.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern der Prüfungskommission für die Mitwirkung an der Beurteilung meiner vorliegenden Dissertation und der mündlichen Prüfung bedanken.

Bei der Studienstiftung des deutschen Volkes bedanke ich mich für die Förderung meiner Promotion durch ein Stipendium und die finanzielle und ideelle Unterstützung während der gesamten Zeit.

Meinen guten Freunden und Arbeitskollegen *Kerstin Kurz, Ronald Orth, Maximilian Pitscheider, Isabell Staub, Tanja Wirth* und *Evelyn Zeiler* danke ich für die angenehme Atmosphäre im Labor und die wundervolle Zeit, die ich nicht mehr missen möchte. *Ronald, Maximilian* und *Isabell* möchte ich für die nahezu drei gemeinsamen Jahre im Labor des AK Sieber, die stete Hilfsbereitschaft bei kleineren und größeren Problemen sowie die zahlreichen fachlichen Diskussionen herzlich danken. Auch wenn *Tanja* und *Evelyn* erst vor kurzem der Gruppe beigetreten sind, sind sie eine wahre Bereicherung. Ohne Euch alle wäre diese Zeit eine andere gewesen! Ich wünsche euch für eure weitere Laufbahn alles Gute. Besonders *Evelyn* danke ich für die vielen wertvollen Kommentare zum Manuskript.

Bei *Kerstin Kurz* bedanke ich mich für die Unterstützung bei den vielen kleinen Dingen des Laboralltags und der Mithilfe in organisatorischen Belangen.

Ich bedanke mich auch bei allen meinen Studenten die ich bei ihren Bachelorarbeiten oder Forschungspraktika betreute, *Veronika Ehmke, Jürgen Eirich, Sabine Frohnappel, Nora Kory, Mathias Leidl, Lukas Lercher* und *Carolin Weigl* für

ihre engagierte Mitarbeit und ihren großartigen Einsatz. Ich wünsche Euch auf eurem weiteren Studien- und Lebensweg alles Gute.

Ich danke den Mitgliedern des ganzen AK Carell für ihre unkomplizierte Hilfe bei der Mitbenutzung von Geräten und Reagenzien. Besonders *Claudia Gräf*, *Melanie Maul*, *Markus Müller* und *Ralf Strasser* haben mir in Gesprächen über biochemische Probleme oft weitergeholfen.

Dr. David Stephenson und Claudia Dubler danke ich für die großartige Unterstützung bei der Analytik mittels NMR.

Professor Dr. Patrick Cramer und seinem Mitarbeiter *Sebastian Geiger* danke ich herzlich für die Kooperation bei der Kristallstrukturbestimmung von *S. aureus* ClpP. *Sebastian Geiger* unterstützte mich mit Anleitungen und Tipps zur Kristallisation des Proteins und übernahm die Messung am Synchrotron und löste die Kristallstruktur von ClpP durch „*Molecular Replacement*“.

Ohne meine Familie und meine guten Freunde, wäre die lange Zeit der Doktorarbeit wesentlich härter und trister gewesen. Ich danke daher euch allen, dass ihr mich über all die Jahre begleitet habt. Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter, die mich stets menschlich unterstützt hat und mir bei Problemen mit gutem Rat zur Seite stand.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	9
Zusammenfassung	13
Summary	19
1. Einleitung	25
1.1. Gefahr durch pathogene Bakterien	25
1.2. Proteomik	28
1.3. Aktivitätsbasierendes Protein Profiling	29
1.3.1. Prinzip	29
1.3.2. Design einer aktivitätsbasierenden Sonde	31
1.3.3. Bioorthogonale Chemie für <i>in situ</i> Experimente	34
1.3.4. Analytische Plattformen	35
1.3.5. Identifikation markierter Ziele durch Massenspektrometrie	36
1.4. Privilegierte Strukturen und Naturstoffe	37
2. β -Lactone	39
2.1. β -Lactone als Naturstoffe	39
2.2. Synthesestrategie für β -Lacton Sonden	41
2.3. Markierungsexperimente	43
2.4. β -Lacton Sonden als Inhibitoren der Virulenz	50
2.5. Optimierung der Inhibitoren	58
2.6. Ausschaltung von PTAs	62
2.7. Bestimmung der Kristallstruktur von ClpP	64
2.8. Wechsel des Pathogens: Listeria	66
2.8.1. Markierungsversuche und Virulenzfaktoren	66
2.8.2. Inhibition der Virulenz in Makrophagen	71
2.9. Schlussfolgerung	74
3. Showdomycin	77
3.1. Showdomycin als ABPP Sonde	77
3.2. Synthesestrategie	78
3.3. Anwendung der Showdomycin Sonde auf pathogene Bakterien	80
4. Ausblicke	89
5. Experimenteller Teil	91
5.1. Allgemeine Methoden	91

5.2. Synthesen	92
Synthese von 5-Hexinal (1)	92
Allgemeine Methode zur Darstellung von Thioestern aus Säurechloriden	93
10-Undecensäurephenylthioester (2)	93
2-(4-Methoxyphenyl)ethansäurephenylthioester (3)	94
Hexansäurephenylthioester (4)	95
3,3-Dimethylbutansäurephenylthioester (5)	95
Isobutansäurephenylthioester (6)	96
Octandicarbonsäurediphenylthioester (7)	96
Cyclohexancarbonsäurephenylthioester (8)	97
2-(2-Naphthyl)ethansäurephenylthioester (9)	97
2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)ethansäurephenylthioester (10)	98
Synthese von β -Lactonen	99
Sonde A1	99
Allgemeine Methode zur Darstellung von β -Lactonen	99
Sonde D3	100
Sonde E2	101
Sonde G2	101
Sonde L1 und LT1	102
Sonde M1	102
Sonde N1	103
Sonde O1	103
Sonde P1	104
Sonde Q1	105
Lacton R1	105
Lacton S1	106
Lacton T1	107
Lacton U1	107
Synthese von Triphenylphosphoranylidensuccinimid (11)	108
Synthese von Tetrahydroxypent-1-ylidenpyrrolidin-2,5-dion (12)	109
Synthese von Showdomycin (13a) und 1'-epi-Showdomycin (13b)	110
Synthese der Showdomycin Sonde	112
5.3. Chemisch-biologische Methoden	114
5.3.1. Allgemeine Methoden	114

5.3.1.1. Formulierungen der verwendeten Medien	114
5.3.1.1.1. Flüssigmedien	114
5.3.1.1.2. Agarplatten	115
5.3.1.2. Mikrobiologie	116
5.3.1.2.1. Bakterienstämme	116
5.3.1.2.2. Kultivierung	117
5.3.1.2.3. Herstellung kompetenter Zellen	117
5.3.1.2.4. Kryostocks	118
5.3.1.3. Eukaryotische Zellkultur	118
5.3.1.3.1. Zelllinien	118
5.3.1.3.2. Kultivierung	118
5.3.1.4. Molekularbiologische Methoden	119
5.3.1.4.1. Pufferzusammensetzungen	119
5.3.1.4.2. Lösungen	121
5.3.1.4.3. Stammlösungen	122
5.3.2. Methoden der Proteomik	123
5.3.2.1. Präparation von Proteomen	123
5.3.2.2. Bradford Assay	124
5.3.2.3. ABPP Markierung von Proteomen	125
5.3.2.3.1. Analytische <i>in vitro</i> Markierung von Proteomen	125
5.3.2.3.2. Kompetitive Experimente	126
5.3.2.3.3. Präparative <i>in vitro</i> Markierung von Proteomen	126
5.3.2.3.4. Analytische <i>in situ</i> Markierung von Proteomen	127
5.3.2.3.5. Präparative <i>in situ</i> Markierung von Proteomen	128
5.3.2.4. SDS Gelelektrophorese	128
5.3.2.4.1. Prinzip der SDS Gelelektrophorese	128
5.3.2.4.2. Herstellung von Polyacrylamidgelen	130
5.3.2.4.3. Durchführung der SDS PAGE	131
5.3.2.5. Identifikation von markierten Proteinen	131
5.3.2.5.1. Gelbandenaufreinigung und tryptischer Verdau	131
5.3.2.5.2. Gelbandenextraktion der tryptischen Peptide	132
5.3.2.5.3. Massenspektrometrie und Bioinformatik	132
5.3.3. Methoden der Genomik	133
5.3.3.1. Präparation Genomischer DNA	133

5.3.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	133
5.3.3.2.1. Allgemeines zur Methodik der PCR	133
5.3.3.2.2. Primerdesign	135
5.3.3.2.3. PCR Ansatz	138
5.3.3.3. Agarose Gelelektrophorese	139
5.3.3.4. Agarose Gelbandenextraktion	139
5.3.3.5. Gateway Klonierung	140
5.3.3.5.1. BP Klonierung	141
5.3.3.5.2. Transformation des Vektors	141
5.3.3.5.3. Plasmidpräparation	142
5.3.3.5.4. LR Klonierung	143
5.3.3.5.5. Mutagenese	143
5.3.4. Rekombinante Proteine	145
5.3.4.1. Überexpression	145
5.3.4.2. Proteinaufreinigung mit Strep-Tag	145
5.3.4.3. Expression von ClpP	146
5.3.4.4. Edman-Sequenzierung von ClpP	147
5.3.4.5. Kristallisation von ClpP	148
5.3.4.6. Messungen der Enzyminhibition	148
5.3.4.6.1. Inhibition von SFGH	148
5.3.4.6.2. Inhibition von ClpP	149
5.3.4.6.3. Inhibition von MurA1	150
5.3.5. Virulenzfaktor Tests	150
5.3.5.1. Agarplattenbasierende Tests	151
5.3.5.2. Pyrogene Toxin Superantigene (PTSA)	152
5.3.5.3. Listeriolysin O (LLO)	152
5.3.6. Zytotoxizität von Lacton U1	153
5.3.7. Infektion von J774 Zellen mit <i>Listeria monocytogenes</i>	154
5.3.8. Reaktivität von Showdomycin	155
5.3.9. Bindestelle von AhpC	155
6. Anhang	157
Abkürzungsverzeichnis	197
Lebenslauf	201
Literaturverzeichnis	203

Zusammenfassung

Mit der Entwicklung von multiresistenten Bakterienstämmen stellen bakterielle Infektionskrankheiten wieder eine zunehmende Gefahr für den Menschen dar. Ursachen hierfür sind der enorme Selektionsdruck von klassischen Antibiotika, die geringe Breite an Zielen im Organismus und die fehlende Neuentwicklung innovativer Leitstrukturen. Bestehende Antibiotika verlieren somit immer öfter an Wirkung, womit die Suche nach neuen Angriffsziele und Strukturklassen mit geringerer Resistenzentwicklung zu einer der wichtigsten Herausforderungen dieses Jahrhunderts geworden ist. Aktivitätsbasierendes Proteinprofiling (ABPP) ist hierbei eine Schlüsseltechnologie, deren Potenzial für die Erforschung und Behandlung pathogener Bakterien in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte. In ABPP werden kleine reaktive Moleküle eingesetzt, die als Sonden spezifisch in die aktiven Zentren diverser Enzyme binden können und durch Modifikation mit einem Fluoreszenzmarker die Visualisierung der Enzymaktivitäten in komplexen Proteomen ermöglichen (Abbildung Z1).

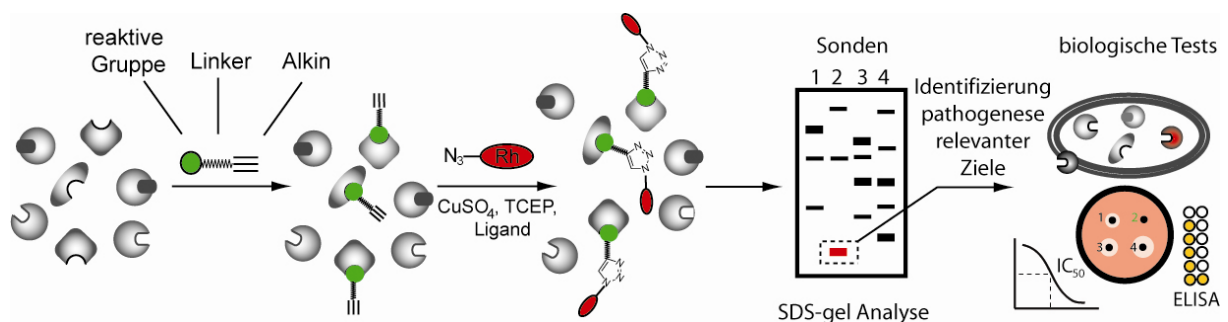


Abbildung Z1: Funktionsweise von ABPP, in der Form wie es in dieser Arbeit angewandt wird und die vielfältigen Möglichkeiten seiner weiteren Anwendung in biologischen Tests.

Hierbei wurden zwei unterschiedliche Strategien angewandt. Im einen Fall wurde eine Strukturbibliothek synthetischer, biomimetischer β -Lactone etabliert, mit der die Reaktionsmöglichkeiten dieses privilegierten Strukturtyps in komplexen Proteomen untersucht und Optimierungen auf pharmakologisch interessante Ziele durchgeführt werden konnten (Abbildung Z2A). Im anderen Fall wurde Showdomycin, ein bereits bekannter antibiotisch wirksamer Naturstoff als ABPP Sonde eingesetzt, um dessen

natürliche Angriffsziele aufzudecken und seine Eignung als Werkzeug für ABPP zu überprüfen.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, mit einer strukturell diversen Bibliothek von β -Lacton Sonden vielfältige bakterielle Enzyme zu identifizieren, welche durch diese teilweise hoch sensitiv und selektiv markiert und inhibiert wurden. Hierbei konnten viele interessante und wichtige Angriffsziele markiert werden, deren Spektrum vom Primärmetabolismus über die Nukleotidsynthese bis hin zu resistenz- und virulenzassoziierten Zielen reicht und vier verschiedene Enzymklassen, Ligasen, Oxidoreduktasen, Hydrolasen und Transferasen umfasst (Abbildung Z2B). Alle markierten Enzyme weisen einen nukleophilen Serin- oder Cysteinrest in ihrem aktiven Zentrum auf, über den die kovalente Bindung unter Öffnung des elektrophilen β -Lactonrings erfolgte. Die spezifische Markierung unterschiedlichster Enzyme zeigt das Potenzial von β -Lactonen als ABPP-Sonden für die Untersuchung der Enzymaktivitäten und Funktionen in bakteriellen Proteomen. Während diese ersten vielversprechenden Resultate bereits durch *in vitro* Markierungen bakterieller Proteome erzielt werden konnten, zeigte die *in situ* Anwendung der Sonden auf lebende Bakterien eine sogar noch größere Selektivität. Da hierbei einige β -Lactone als Hauptziel das Enzym ClpP, einen zentralen Regulator der Virulenz vieler Krankheitserreger hoch selektiv und sensitiv markierten, wurden die *in situ* Studien auf pathogene Bakterien ausgeweitet. In *Staphylococcus aureus*, einem der wichtigsten Erreger vieler schwerer Infektionen, konnte gezeigt werden, dass diese β -Lactone nicht nur ClpP markieren sondern auch dessen Aktivität inhibieren.

Die Ausschaltung von ClpP in den lebenden Bakterien führte zu einer enormen Verringerung der Produktion eines großen Spektrums verschiedenster Virulenzfaktoren. Zu diesen zählen Enzyme und Toxine, deren Freisetzung bei einer Infektion unter Kontrolle von ClpP den gezielten und koordinierten Angriff der Bakterien auf den Wirtsorganismus ermöglicht.

Diese Virulenzfaktoren bewirken eine Dysregulation des Immunsystems und sind für viele Krankheitseffekte, einschließlich der Verbreitung im Organismus verantwortlich. Neben Hämolysinen und Proteasen wurden durch ein optimiertes β -Lacton auch hoch gefährliche pyrogene Toxin Superantigene (PTSAs) ausgeschaltet, die schon in geringsten Mengen verheerende Folgen für den Wirtsorganismus haben (Abbildung Z2C).

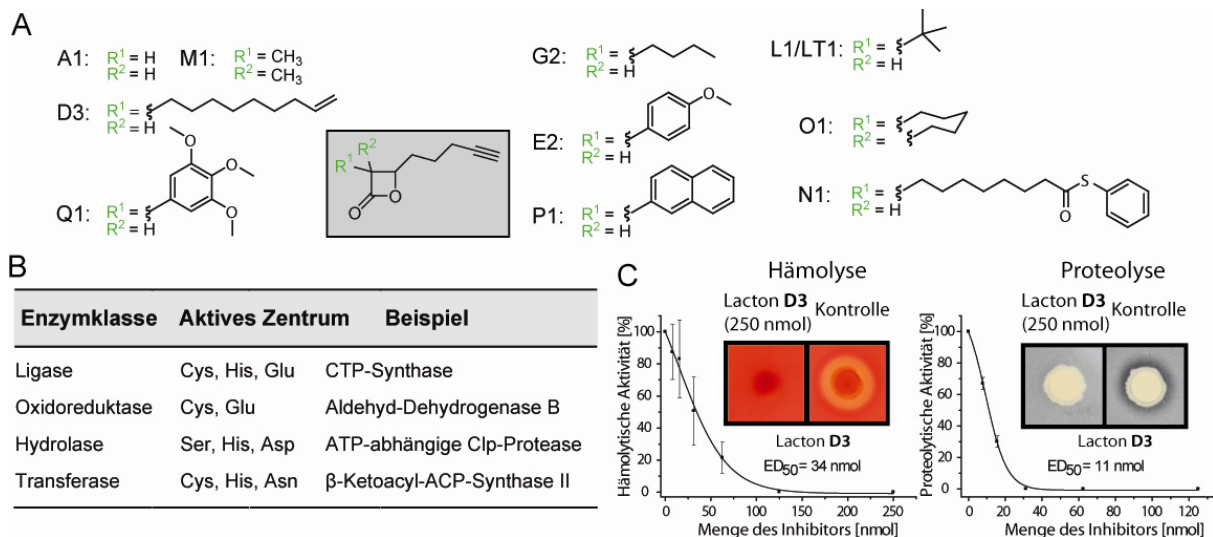


Abbildung Z2: A) β -Lacton Sondenbibliothek mit struktureller Variation, B) Beispiele für die von den Sonden markierten Enzymklassen und C) Wirkung des ClpP Inhibitors **D3** auf die Produktion der Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus*.

Diese globale Entwaffnung des bakteriellen Arsenal von Virulenzfaktoren konnte auch für klinische Stämme und die gefährlichen multiresistenten MRSA Stämme von *S. aureus* demonstriert werden. Um die sterischen Gründe für die Affinität und Spezifität der β -Lactone für ClpP zu untersuchen, wurde *S. aureus* ClpP kristallisiert und die Kristallstruktur des Proteins gelöst. Modellierungsstudien sollen in Zukunft den Weg zu neuen verbesserten Inhibitoren ebnet.

Die Strategie der Ausschaltung der Virulenz über ClpP ist jedoch nicht nur auf *S. aureus* beschränkt. In Folgeversuchen mit *Listeria monocytogenes*, einem intrazellulären Pathogen, ließ sich zeigen, dass auch hier die Produktion wesentlicher Virulenzfaktoren vermindert werden konnte. In einem Infektionsassay mit Mausmakrophagen führte dies zu einer signifikant verminderten intrazellulären Reproduktion des Pathogens, was diesen Ansatz der Virulenzinhibition auch für die große Herausforderung durch intrazelluläre Krankheitserreger qualifiziert.

Obwohl ClpP bereits als vielversprechendes Ziel zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen bekannt ist, konnten bislang keine effektiv wirksamen Inhibitoren entwickelt werden. Mit β -Lactonen ist in der vorliegenden Arbeit dieses Ziel nun erstmals erreicht worden, womit eine neue Verbindungsklasse mit möglichen Leitstrukturen für eine medizinische Anwendung zur Ausschaltung der Virulenz pathogener Bakterien etabliert werden konnte (Abbildung Z3). Ein Medikament mit

dieser Wirkungsweise hätte gegenüber herkömmlichen Antibiotika einen enormen Vorteil, da die Bakterien nicht abgetötet sondern nur entwaftet werden.

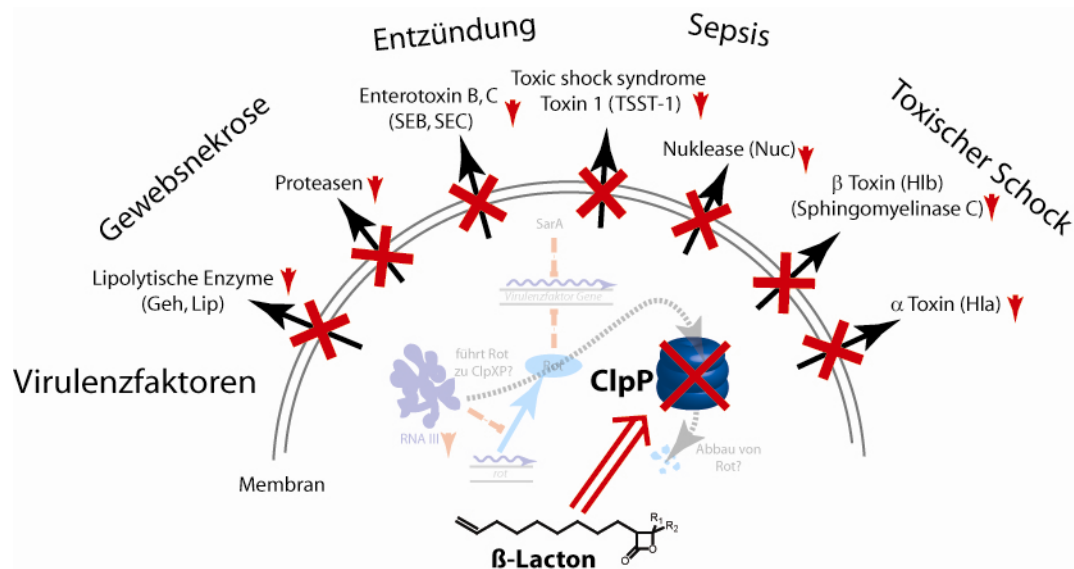


Abbildung Z3: Ausschaltung der Produktion verheerender Virulenzfaktoren durch Inhibition ihres zentralen Regulators ClpP.

Der Selektionsdruck auf die Bakterien ist somit gering, ihr koordinierter Angriff auf den Wirtsorganismus wird jedoch unterbunden und das Immunsystem erhält die Möglichkeit die entwafteten Bakterien zu beseitigen. Dadurch würde die Resistenzbildung minimiert und negative Effekte auf die nützlichen Bakterien der Magen- und Darmflora könnten vermieden werden. Die Wirksamkeit des Prinzips einer Ausschaltung von ClpP konnte bereits in genetischen ClpP *Knockout* Mutanten gezeigt werden, die sich im Maus Infektionsmodell als nicht mehr virulent erwiesen. Eine Erkrankung blieb daher aus. Eine weitere Optimierung auf chemischer und pharmakologischer Seite könnte daher Verbindungen liefern, die eine neue Strategie zur Behandlung von Infektionskrankheiten auch multiresistenter Erreger darstellen.

Während β-Lactone eine Klasse privilegierter Strukturen darstellen, die strukturell für unterschiedliche Aufgaben angepasst und je nach Optimierung somit wie gezeigt als Werkzeuge oder Wirkstoffe eingesetzt werden können, ist bei vielen Naturstoffen wie Showdomycin die Wirkung bereits bekannt. Lediglich die Angriffsziele dieses antibiotisch wirkenden Nucleosidanalogs waren noch unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine Showdomycin Sonde entwickelt, welche die Angriffsziele von Showdomycin identifizieren und darüber hinaus die Anwendbarkeit der Sonde als Werkzeug für ABPP überprüfen sollte (Abbildung Z4). Trotz der

reaktiven Maleimidgruppe von Showdomycin, wurden spezifische Markierungen bei *in situ* Experimenten mit lebenden pathogenen Bakterien erhalten. Im Vergleich zu Maleimid zeigte Showdomycin eine deutlich abgeschwächte Reaktivität mit wesentlich erhöhter Selektivität, was vermuten lässt, dass Ribose als Substituent an der Maleimiddoppelbindung von Showdomycin die entsprechende Anpassung dieses Naturstoffs für seine Biokompatibilität ermöglicht. Als Ziele wurden diverse Enzyme aus den Klassen der Oxidoreduktasen und Transferasen markiert, von denen viele in wichtige Aufgaben wie die Nukleotidsynthese, Zellwandbiosynthese oder Resistenz gegen oxidativen Stress involviert sind. Die Reaktion erfolgte jeweils über die Addition nukleophiler Cysteine im Protein an die Doppelbindung der Maleimideinheit von Showdomycin (Abbildung Z4). Hierbei wurden für verschiedene Stämme von *S. aureus* und anderen Pathogenen charakteristische Markierungssignaturen erhalten, die eine neue Strategie zur Identifizierung pathogener Organismen und Unterscheidung antibiotikaresistenter und sensibler Stämme darstellen könnte (Abbildung Z4).

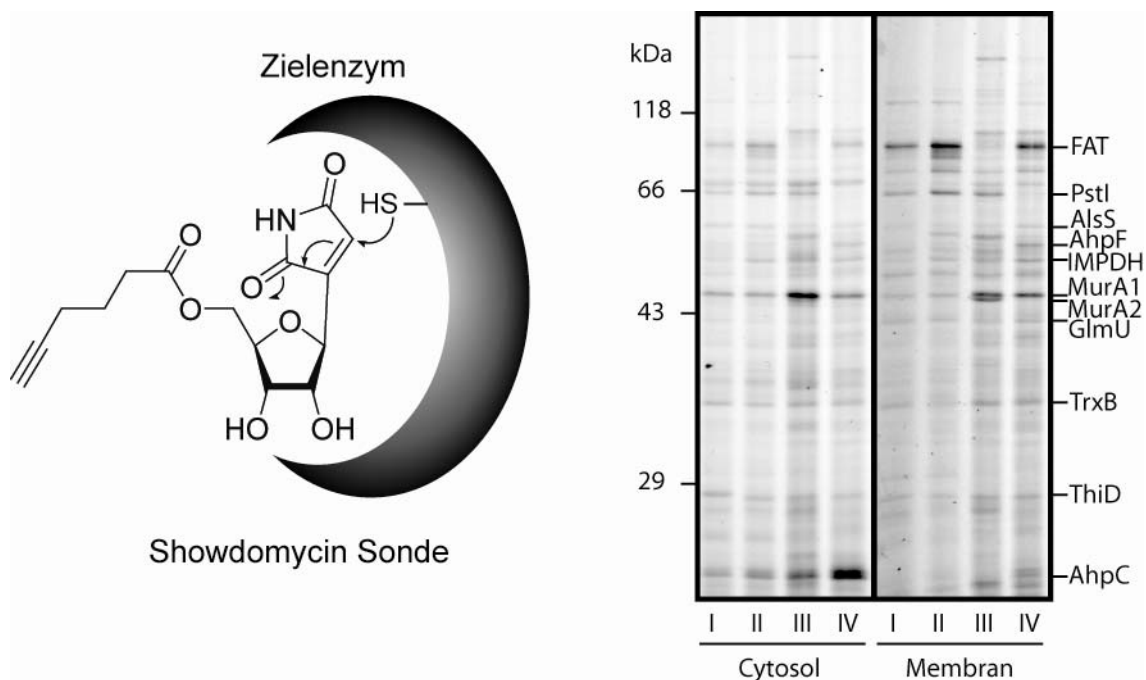


Abbildung Z4: Design und Reaktivität der Showdomycin Sonde. Die kovalente Bindung zu den Zielenzymen erfolgt über die Addition eines reaktiven Cysteins an die Maleimidgruppe. Diverse Stämme von *S. aureus* (I, II, III, IV) zeigen einzigartige Markierungsprofile der Sonde.

Letztlich konnte die Summe der essenziellen Angriffsziele im Proteom der Bakterien, besonders MurA als Enzym der Zellwandbiosynthese und Hauptziel von

Showdomycin, als wahrscheinliche Ursache für die antibiotische Wirkung gegen *Staphylococcus aureus* ermittelt werden.

Wie in dieser Arbeit demonstriert werden konnte, stellt ABPP eine attraktive Strategie für die Suche nach neuen Angriffsziele für die Behandlung von Infektionskrankheiten zusammen mit der Entwicklung bedarfsgerechter Enzyminhibitoren dar und ermöglicht ebenso die Entschlüsselung der zellulären Ziele bekannter Naturstoffe. In ihrer Anwendung als chemisch-proteomische Werkzeuge sind die entwickelten Sonden von höchstem Wert für die Erforschung der bakteriellen Pathogenese und ihrer genauen Regulationsmechanismen.

Summary

With the development of multiresistant pathogenic bacteria infectious diseases once again pose a major threat to human health. Reasons for this daunting problem are the paramount selective pressure exerted by classical antibiotic drugs, the low breadth of targets in these organisms and the lack of new innovative lead structures. Since existing antibiotics are increasingly ineffective there is an urgent quest for novel lead structures and corresponding targets with a low propensity to develop resistance. Activity-based protein profiling (ABPP) is a key technology, which was examined in the present work for the investigation and treatment of pathogenic bacteria. ABPP uses small reactive molecules that specifically bind to the active sites of a diversity of enzymes and can be modified by appending a fluorescent tag for the visualization of corresponding enzyme activities in complex proteomes (Figure S1).

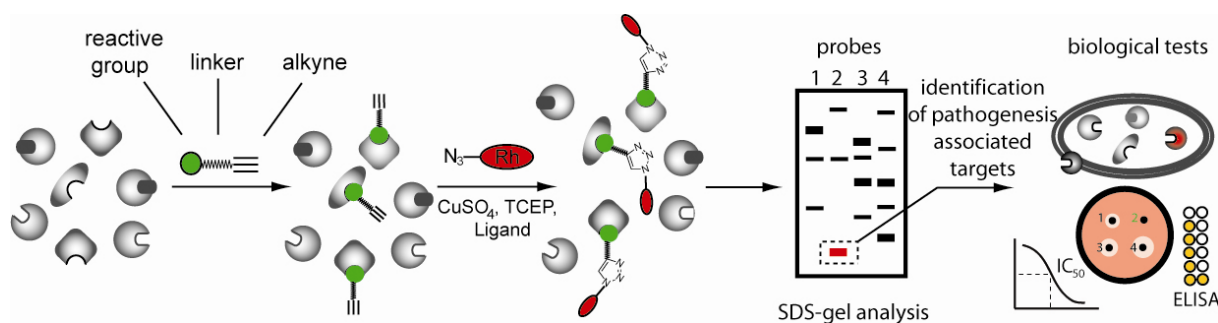


Figure S1: Concept of ABPP as used in this study and its diverse applications in biological tests.

In this work, two different approaches were used. In the first part, a small library of synthetic biomimetic β -lactones was established, which could be used to explore the reactivity of this type of privileged structure in complex proteomes and customize potent candidates for targeting pharmacologically interesting enzymes (Figure S2A). In the other part, showdomycin, a known antibiotic natural compound was applied as ABPP probe to investigate its natural targets in the proteomes of pathogenic bacteria and to prove its utility as tool.

In the present work, a wealth of diverse bacterial enzymes could be identified by the labeling of β -lactone probes of a structurally diverse library. Some of the targets were labeled and inhibited in a sensitive and selective way. Many interesting and important targets could be identified ranging from the primary metabolism such as nucleotide

synthesis to resistance and virulence associated targets. The identified targets comprise four different enzyme classes including ligases, oxidoreductases, hydrolases and transferases (Figure S2B). All labeled enzymes contained a nucleophilic serine or cysteine residue in their active sites, which were able to covalently bind to the probe by attacking the electrophilic β -lactone core. The specific labeling of different enzymes illustrates the potential of β -lactones as ABPP probes for the profiling of enzyme activities and functions in bacterial proteomes. While these promising first results already could be obtained from *in vitro* labeling of lysed bacterial proteomes, the *in situ* applications with living bacterial cells even showed much higher selectivity. As some of the β -lactones labeled ClpP, a central regulator of virulence of many pathogens with high selectivity and sensitivity, the *in situ* studies were extended to pathogenic bacteria. Using this strategy, it could be shown for *Staphylococcus aureus*, one of the most important causative of severe bacterial infections, that these β -lactones not only labeled ClpP but also inhibited its activity. Turning off ClpP in living bacteria lead to the down regulation of a broad spectrum of different virulence factors. These virulence factors are responsible for the dysregulation of the immune system and represent the direct cause of many severe effects of diseases, including the spreading of the pathogen in the organism. In addition to the inhibition of hemolysin and protease expression an optimized β -lactone further decreased the production of devastating pyrogenic toxin superantigens (PTSAs), which can be fatal for the host at even low concentrations (Figure S2C).

The global elimination of bacterial virulence factors could be further demonstrated even for clinical and challenging multiresistant strains of *S. aureus* (MRSA). To investigate the affinity and specificity of β -lactones for *S. aureus* ClpP, the protein was crystallised and its structure was solved. Modelling the active site binding of the inhibitors should pave the way to novel optimized lead structures.

This strategy of virulence inhibition via a chemical knockout of ClpP is not only restricted to *S. aureus*. Follow-up studies with *Listeria monocytogenes*, an intracellular pathogen again showed decreased production of important virulence factors after β -lactone treatment. The study resulted in a significantly reduced intracellular replication in a macrophage infection assay, which validates the approach of virulence inhibition for challenging intracellular pathogens.

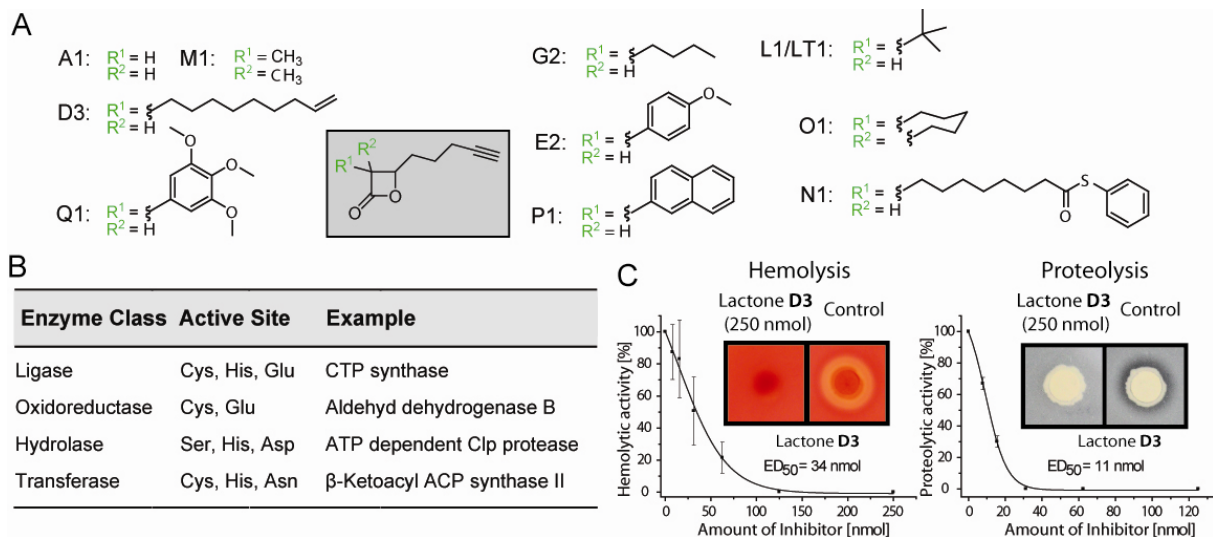


Figure S2: A) β -Lactone probe library with structural variation, B) examples for the enzyme classes labeled by the probes and C) down regulation of virulence factor production by the ClpP inhibitor **D3** in *Staphylococcus aureus*.

Although ClpP has been known as promising target for the treatment of bacterial infections, no effective inhibitors have been developed, yet. In the present work, this goal has been achieved by the design of β -lactones as potential lead structures in medical application (Figure S3). A drug based on this concept could have enormous advantages compared to conventional antibiotics. It does not kill the bacteria but simply disarms them, which creates less selective pressure, prevents the coordinated attack on the host and enables the immune response to eliminate the disarmed bacteria.

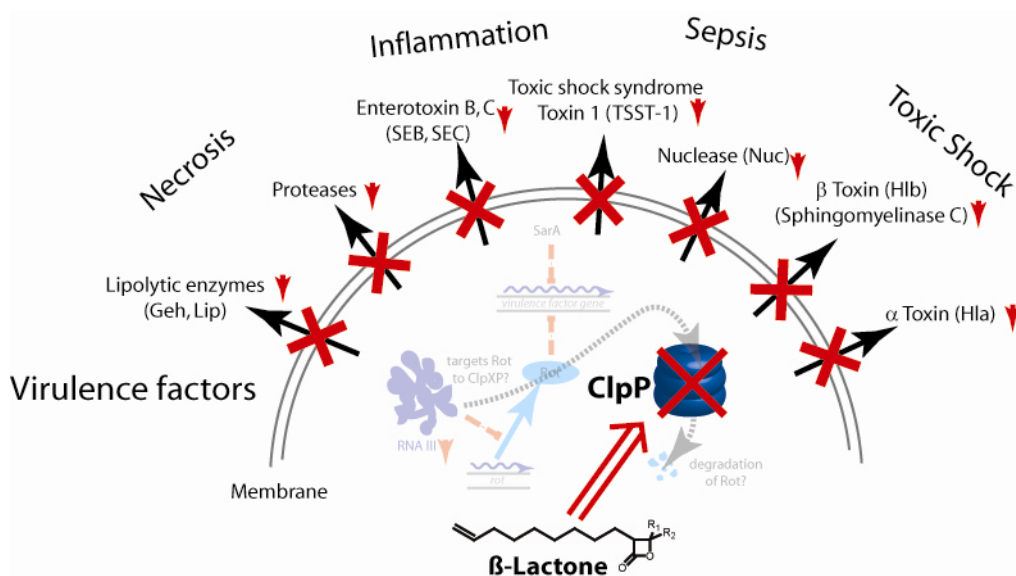


Figure S3: Turning off the production of devastating virulence factors by inhibition of the central regulator ClpP.

The development of resistance could thus be minimized and the useful cooperative bacteria of the gastro-intestinal flora could be protected from negative effects. The applicability of ClpP inhibition was already demonstrated by genetic ClpP knockout mutants that proved to be non-virulent in a mouse infection model. Finally the onset of the disease was prevented. Further chemical and pharmacological refinement might thus yield compounds, which display a novel strategy for the treatment of infectious diseases even of multiresistant pathogens.

While β -lactones are a class of privileged structures, that may be adapted for different purposes and may be used according to their optimization as tools or biologically active compounds, many natural products like showdomycin already have a known biological effect. Only the molecular targets of this antibiotic nucleoside analogue remained elusive. Thus a probe based on showdomycin was developed in the present work, aiming to identify the cellular targets of showdomycin and prove its applicability as a tool for ABPP.

Although the structure of showdomycin contains a putative highly reactive maleimide residue, many specific labeling events could be detected by *in situ* experiments with living bacterial pathogens. Compared to maleimide, showdomycin exhibited a remarkably lower reactivity but much higher selectivity, which suggests that the maleimide double bond modified by a ribose residue in showdomycin modulates its moderate reactivity and biocompatibility. Diverse enzymes of the classes of oxidoreductases and transferases were labeled, many of which are involved in important processes like nucleotide synthesis, cell wall biosynthesis or oxidative stress resistance. The reaction with the proteins occurred via the addition of a nucleophilic cysteine residue on the maleimide double bond of showdomycin. Characteristic labeling signatures were found for different strains of *S. aureus* and other pathogens, which may give rise to a novel strategy for the identification of pathogenic organisms and a differentiation in antibiotic resistant and sensitive strains.

The sum of all essential targets in the proteomes of bacteria, especially MurA, an important enzyme for cell wall biosynthesis and main target of showdomycin in *Staphylococcus aureus*, is likely to be the reason for the antibiotic effect of showdomycin.

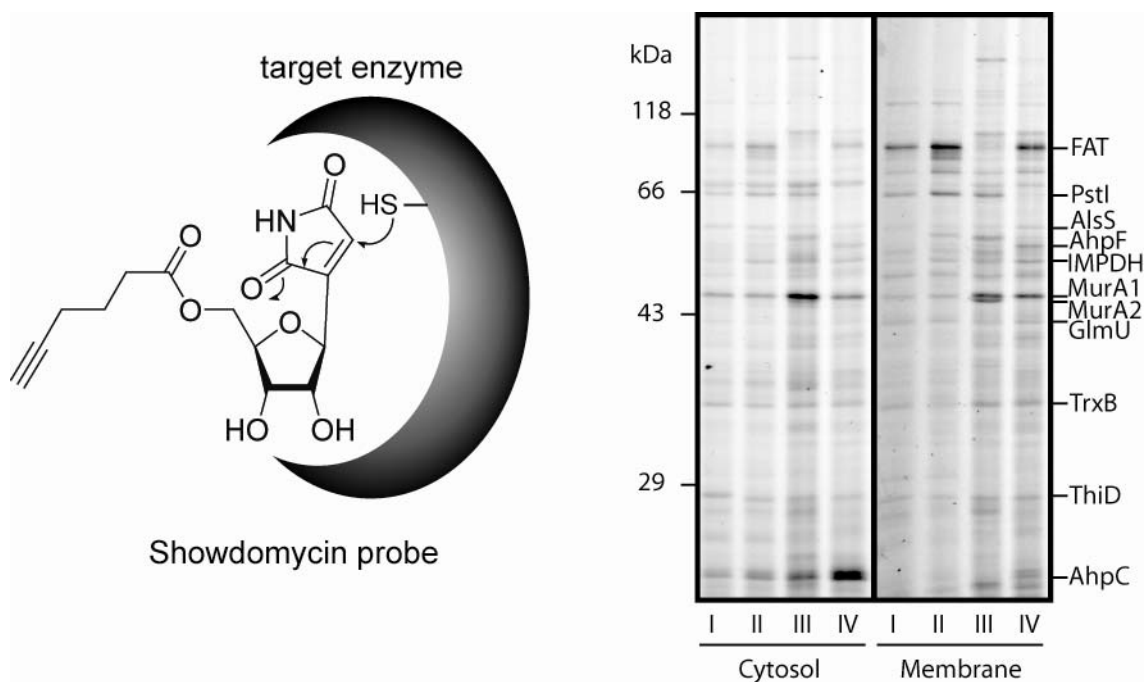


Figure S4: Design and reactivity of the showdomycin probe. Covalent binding to the target enzymes by addition of a reactive cysteine residue to the maleimide group. Diverse strains of *S. aureus* (I, II, III, IV) exhibit unique labeling profiles of the probe.

As demonstrated in this work, ABPP represents an attractive strategy for the investigation of novel targets and for the treatment of infectious diseases combined with the development of customized inhibitors. The probes which are introduced here are of high value for the research on bacterial pathogenesis and its detailed mechanisms of regulation.

1. Einleitung

1.1. Gefahr durch pathogene Bakterien

100 Millionen Menschen erkranken jährlich an bakteriellen Infektionskrankheiten, 500.000 sterben daran.^[1] Sie verloren den Kampf gegen einen Gegner, den man lange Zeit für bereits endgültig besiegt hielt. Doch die Evolution kennt keinen Stillstand. Durch den stetig wachsenden Einsatz von Antibiotika seit der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming 1928, wuchs auch der Selektionsdruck auf die Keime. Mit der Zeit entwickelten sich erste Resistenzen gegen Antibiotika, die einstigen Wunderwaffen der Medizin begannen stumpf zu werden.^[2] Krankheitserreger die erst einmal resistent waren, überlebten eine Behandlung und konnten damit noch schneller den Körper des geschwächten Patienten erobern, da ihre Konkurrenz, die natürliche Bakterienflora des Menschen, durch das Antibiotikum zerstört wurde. Die resistenten Keime breiteten sich aus. Durch horizontalen Gentransfer, dem Austausch von Genen zwischen Bakterien auch über die Grenzen von Arten und Gattungen hinaus, konnten sich die neu entstandenen Resistenzgene rasch verbreiten und neu kombinieren.^[2-5] Es entstanden Stämme mit mehrfachen Resistenzen gegen unterschiedliche Antibiotika, sogenannte multiresistente Erreger. Ihre Behandlung ist besonders schwierig und meist nur noch mit Kombinationstherapien mit mehreren Wirkstoffen möglich. Mittlerweile gibt es jedoch Stämme, die gegen nahezu alle gängigen Antibiotika resistent sind.^[6] Gegen derartige Bakterien gibt es nur noch einige wenige wirksame Waffen, neue und bisher kaum eingesetzte Antibiotika, die aus Angst vor der Entwicklung von Resistenzen jedoch zurückgehalten werden. Denn die Zeitspanne von der Zulassung eines Antibiotikums bis zum Auftreten erster Resistenzen bei dessen therapeutischen Anwendung hat sich in den letzten Jahrzehnten extrem verkürzt. So treten teilweise schon im Jahr der Zulassung die ersten Meldungen von resistenten Stämmen auf. Für die rapide Zunahme in der Entwicklung von Resistenzen gibt es mehrere Gründe.^[7] Hierzu zählen der übermäßige Einsatz von Antibiotika in der Massentierhaltung^[3] sowie der oftmals zu sorglose Umgang in der klinischen und häuslichen Anwendung.^[7, 8]

Eine weitere Schwachstelle ist die geringe Breite an Angriffsziele, auf denen die Wirkung von Antibiotika basiert.^[2] Nur eine Handvoll verschiedener Ziele in der Zelle wird von der großen Masse der Antibiotika ausgenutzt. Ihre Wirkungsweise lässt sich im Wesentlichen auf sechs grundlegende Mechanismen zurückführen: die Inhibition der Zellwandbiosynthese, der Proteinbiosynthese, der DNA Replikation, der Transkription, des Folatstoffwechsels und die Störung der Membranintegrität (Abbildung 1).^[6, 9, 10] Den größten Anteil zugelassener Antibiotika machen jedoch lediglich die ersten zwei Gruppen aus. Unter den Inhibitoren der Zellwandbiosynthese und Inhibitoren der Proteinbiosynthese finden sich nahezu alle bekannten und häufig eingesetzten Antibiotika, wie jene aus den Klassen der β -Lactame, Macrolide und Aminoglycoside.^[6, 9]

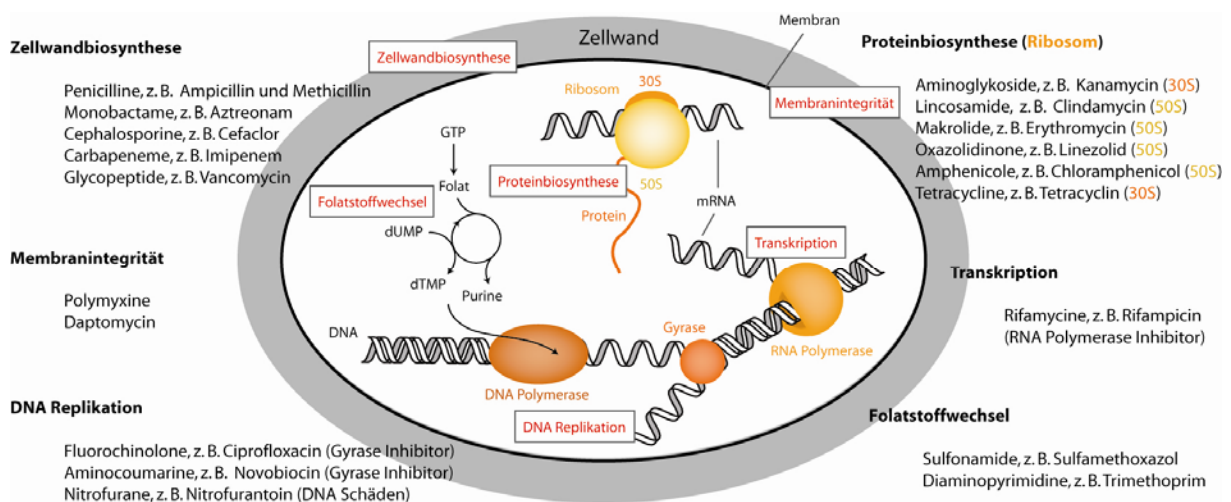


Abbildung 1: Zelluläre Angriffsziele der herkömmlich gegen pathogene Bakterien eingesetzten Antibiotika.

Viele der verwendeten Antibiotika haben eine ähnliche oder sogar gleiche Wirkungsweise.

Die einzelnen Vertreter der β -Lactamantibiotika zum Beispiel richten sich bei der Inhibition der Zellwandbiosynthese gegen die sogenannten Penicillin bindenden Proteine (PBPs), deren Ausschaltung die stabilisierende Kreuzverknüpfung von Peptidoglycan, dem Gerüstpolymer der Zellwand, verhindert.^[9, 11]

Viele β -Lactame inhibieren die gleichen Enzyme aus der PBP Familie, wodurch in der rapiden Evolution der Krankheitserreger neue PBP Varianten selektiert werden, die durch ihre strukturelle Veränderung nicht mehr durch die jeweiligen β -Lactame inhibiert werden.^[11, 12] Hat sich eine derartige PBP Variante einmal entwickelt, ist der

Organismus oft zugleich gegen einen Großteil der zugelassenen β -Lactamantibiotika resistent.^[6, 13] Als weitere Resistenzmechanismen können sich Enzyme entwickeln, welche die Antibiotika abbauen oder Transportproteine, die sie aus der Zelle ausschleusen.^[11, 14] Durch die Produktion effizienter Effluxpumpen für Antibiotika und den schnellen Austausch ihrer Gene zwischen verschiedenen Spezies können viele Pathogene ihre Resistenz um ein Vielfaches steigern und gleichzeitig eine Resistenz gegen ein breites Spektrum anderer Wirkstoffe erwerben.^[2, 14, 15] Die Resistenz gegen Antibiotika tritt somit als Ergebnis mehrerer synergistisch wirkender, also sich gegenseitig verstärkender Mechanismen auf.

Als Reaktion auf die Behandlung mit β -Lactamen haben sich sehr potente β -Lactamasen entwickelt, die den β -Lactamring dieser Antibiotika hydrolysieren und somit unwirksam machen.^[6] Da die einzelnen Vertreter aus der Klasse der β -Lactamantibiotika strukturell sehr ähnlich sind, können Bakterien durch solche β -Lactamasen rasch eine Resistenz gegen einen Großteil der verfügbaren Antibiotika erwerben.^[11]

Diese Mechanismen führen dazu, dass Methicillin resistente Stämme des opportunistischen Pathogens *Staphylococcus aureus* (MRSA) in der Regel gegen alle β -Lactamantibiotika resistent sind und gegen sie andere Behandlungsstrategien angewandt werden müssen.^[6, 16] Alleine in den USA sterben jährlich 19.000 Menschen an Infektionen mit MRSA.^[17]

Der evolutionäre Erfolg resistenter Krankheitserreger und ihre rasche Ausbreitung haben also ihre Ursache in der geringen Diversität zellulärer Angriffsziele und der strukturellen Ähnlichkeit einer Vielzahl der verwendeten Antibiotika, wodurch die Entwicklung eines einzigen Resistenzmechanismus oftmals eine gesamte Klasse von Antibiotika abdeckt. Die Kombination durch horizontalen Gentransfer ermöglicht daraufhin rasch die Entstehung von multiresistenten Erregern.^[3-5]

Während immer mehr bestehende Antibiotika beginnen unwirksam zu werden, ist auch der Rückgang in der Entwicklung neuer Wirkstoffe besorgniserregend. Lediglich zwei neue Antibiotikaklassen (Linezolid und Daptomycin) wurden in den letzten 10 Jahren zugelassen.^[10, 18] Strenge Zulassungsverfahren und die rasche Entwicklung von Resistenzen haben diesen Markt für die Pharmaindustrie immer unattraktiver werden lassen.^[7]

Durch die wieder aufkommende Bedrohung des Menschen durch bakterielle Infektionskrankheiten ist nun jedoch ein wachsender Bedarf an neuen Medikamenten

entstanden. Diese Lücke kann nur durch intensive Forschung geschlossen werden. Dabei sind die Entwicklung von Leitstrukturen für neue potente Antibiotika und die Identifikation neuer Angriffsziele von zentralem Interesse.^[17] Dies geht Hand in Hand mit der Erforschung der Mechanismen der Antibiotikaresistenzen sowie der Pathogenese, aller molekularen Vorgänge, die zu Infektion, Krankheitsentstehung und dessen weiteren Verlauf führen. Denn aus der genauen Kenntnis dieser biochemischen Prozesse eines pathogenen Bakteriums lassen sich Schlüsselpositionen finden, deren Ausschaltung das Wachstum der Bakterien hemmt, eine Infektion verhindert oder gegen die Resistenzmechanismen wirkt und somit Antibiotika ihre Wirksamkeit zurückgibt. Viele Studien auf diesem Forschungsgebiet verwenden hierbei die gut etablierten klassischen Ansätze der Genomik und Proteomik. Durch vergleichende Analyse von Genexpressionsprofilen und genetischen Mutanten, sogenannten *Knockouts*, bei denen die Produktion von einem oder mehreren Proteinen auf Genebene ausgeschaltet wurde, erhofft man sich Einblicke in die komplexen Regulationsmechanismen zu erhalten und pathogeneseassoziierte Enzymfunktionen entschlüsseln zu können. Trotz großer Erfolge, stößt die Leistungsfähigkeit dieser klassischen Methoden rasch an ihre Grenzen, denn die eigentlich entscheidende Frage nach der Aktivität und Funktion von Proteinen kann hierbei nicht direkt erfasst werden. Dies ist eine zentrale Problemstellung der modernen Proteomik.

1.2. Proteomik

In der Proteomik, der Untersuchung der Gesamtmenge aller Proteine einer Zelle, können durch Methoden wie die zweidimensionale Gelelektrophorese Änderungen in der Häufigkeit einzelner Proteine und deren Zusammensetzung im Proteom verfolgt werden.^[19-21] Doch ist es nicht die Expression oder die Häufigkeit eines Proteins, die letztlich über seine Funktion bestimmt, sondern dessen Aktivität. Expressionsprofile geben zwar wertvolle Hinweise auf mögliche Rollen eines Proteins in biochemischen Vorgängen, doch dessen genaue Funktion ist weder durch diese noch durch die anderen klassischen Methoden direkt zugänglich.^[22] Viele Faktoren sind in einer Zelle an der Regulation der Aktivität von Proteinen beteiligt, so dass die Häufigkeit eines Proteins oft nicht mit seiner Aktivität und damit seiner Funktion direkt

korreliert.^[23] Einen wesentlichen Einfluss haben zum Beispiel posttranslationale Modifikationen, also alle Veränderungen an einem Protein, die nach seiner Biosynthese und damit nach der Translation entstanden sind.^[24, 25] Derartige Modifikationen umfassen unter anderem Phosphorylierung, proteolytische Prozessierung, Glycosylierung, Acetylierung und die Verknüpfung mit nicht-proteinischen Komponenten (prothetische Gruppen).^[26] Manche Modifikationen, wie die Verbindung mit Lipiden verändern die Lokalisierung eines Proteins in der Zelle, andere wie die Phosphorylierung aktivieren oder deaktivieren ein Protein.

Aber auch nicht kovalent bindende zelleigene Aktivatoren oder Inhibitoren können zu der jeweils aktiven oder inaktiven Form eines Proteins führen. Die Aktivität und Funktionsweise eines Proteins wird somit durch eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren beeinflusst, die nicht mit den klassischen genomischen oder proteomischen Analysestrategien erfasst werden können.

Oft handelt es sich bei den Proteinen um Enzyme, Proteine mit katalytischer Aktivität. Enzyme nehmen in allen zellulären Prozessen eine zentrale Position ein. Auch bei bakteriellen Infektionskrankheiten sind Enzyme von entscheidender Bedeutung. Unter anderem regulieren sie den Angriff auf den Wirt, bauen Antibiotika ab oder produzieren Toxine und Botenstoffe. Andere werden selbst als sogenannte Virulenzfaktoren sekretiert und bauen Proteine oder Lipide des Wirts ab und schützen das Bakterium vor dem Gegenangriff des Immunsystems. Doch auch einige nicht mit der Pathogenese assoziierte Enzyme, welche für das Wachstum oder die korrekte Zellfunktion der Bakterien essenziell sind, haben als Angriffsziele für Antibiotika höchste Bedeutung.

1.3. Aktivitätsbasierendes Protein Profiling

1.3.1. Prinzip

Durch die derzeitig zunehmende Entwicklung von Antibiotikaresistenzen und die Erschöpfung bekannter Angriffsziele und Leitstrukturen, ist es von primärem Interesse, neue Angriffsziele in pathogenen Bakterien aufzuspüren und durch die Definition neuer langlebigerer Leitstrukturen wirksame Strategien für die Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten zu entwickeln.^[17] Um dieses Ziel schnell zu erreichen, ist es besonders vorteilhaft, aktivitätsbezogene Analysen der resistenz-

und pathogeneseassoziierten Proteine durchzuführen und ihre Funktion bei der Infektion aufzuklären. Da klassische Methoden der Genomik und Proteomik dies nicht leisten können, ist hierfür eine neue leistungsfähige Strategie erforderlich. Diese wurde unter dem Namen aktivitätsbasierendes Protein Profiling (ABPP) entwickelt. Wegbereitend für die heutige ABPP Technologie war die Forschung der Gruppen um Walker^[27, 28] und Powers^[29, 30] sowie weitere Modifikationen durch die Arbeiten von Cravatt^[31, 32] und Bogoy^[33]. In diesem chemisch-biologischen Ansatz werden kleine chemische Moleküle eingesetzt, die eine hohe Affinität für die aktiven Zentren einzelner Enzymklassen aufweisen und mit einem Marker zur Visualisierung (Fluoreszenzfarbstoff) oder Anreicherung (Biotin) ihrer entsprechenden Bindungspartner verknüpft werden können.

Diese kleinen Sonden binden nur in das freie aktive Zentrum des Zielenzym, was eine einfache Visualisierung und Identifikation mittels Gelelektrophorese (in der Regel SDS-PAGE) und Fluoreszenzdetektion erlaubt. Unspezifische Aminosäureseitenketten reagieren hingegen nicht mit den Sonden. Enzyme, deren aktives Zentrum blockiert und somit unzugänglich für kleine Moleküle ist, werden von den Sonden nicht gebunden und visualisiert. Dies stellt einen wichtigen Unterschied zum klassischen proteomischen Ansatz dar, da hierbei eine funktionelle Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Enzymen möglich ist und auch Proteine mit geringer Häufigkeit im komplexen Proteom detektiert werden können. Die Identifizierung der gebundenen Ziele ist durch tryptischen Verdau der Proteine und Analyse der Peptidfragmente mittels Massenspektrometrie möglich.

Mit ABPP wurde in den vergangenen Jahren eine Reihe von bahnbrechenden Entdeckungen bezüglich der Aktivität von pathogeneseassoziierten Enzymen, deren funktioneller Charakterisierung und der Entwicklung möglicher Inhibitoren gemacht. ABPP kann entweder gegen einzelne Enzymklassen gerichtet durchgeführt werden, z.B. mit Fluorophosphonaten gegen die Klasse der Serinproteasen^[34-36] oder auch ungerichtet mit privilegierten elektrophilen Gruppen, wie z.B. Phenylsulfonaten,^[37, 38] die eine Vielzahl unterschiedlicher Enzymklassen markieren können. Mit diesen beiden Klassen an Sonden ist es mittlerweile möglich viele unterschiedliche Enzymfamilien zu studieren und ihre physiologischen und pathologischen Funktionen in der Zelle zu verstehen. Ein weiteres besonders leistungsfähiges Anwendungsgebiet des ABPP besteht in der Aufklärung der zellulären Angriffsziele von Naturstoffen.^[39] Diese können sowohl als Wirkstoffe als auch als Werkzeuge in

der Erforschung bakterieller Infektionskrankheiten eingesetzt werden. Die jeweiligen Naturstoffe müssen hierbei entsprechend modifiziert werden, um als aktivitätsbasierende Sonde eingesetzt werden zu können.

1.3.2. Design einer aktivitätsbasierenden Sonde

Grundsätzlich besteht eine Sonde aus drei Elementen, einer reaktiven Gruppe, einem *Spacer* und einem Marker oder *Tag*, der zur Visualisierung oder Anreicherung der gebundenen Proteine dient (Abbildung 2).

Die reaktive Gruppe kann speziell auf die Reaktion mit einem bestimmten aktiven Zentrum zugeschnitten sein. So sind z.B. die von *Cravatt et al.* eingeführten Fluorophosphonat-Sonden (FP-Sonden, siehe Abbildung 2), ein herausragendes Beispiel für einen selektiven Inhibitor, der ausschließlich Enzyme der Serinhydrolase-Familie angreift; einer Enzymfamilie die über 1% der in eukaryotischen Zellen exprimierten Proteine ausmacht.^[34-36, 40]

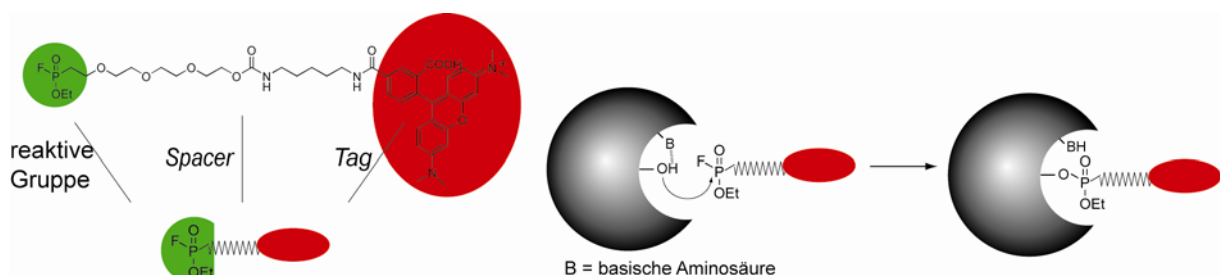


Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer FP-Sonde und der Mechanismus für die aktivitätsbasierende Markierung des nukleophilen aktiven Zentrums von Serinhydrolasen.

Der Erfolg eines jeden ABPP-Experiments hängt entscheidend von der reaktiven Gruppe der eingesetzten Sonde ab. Ist eine Sonde zu reaktiv wird sie auch mit Seitenketten von Aminosäuren reagieren, die außerhalb des katalytischen Zentrums liegen. Diese unspezifische Markierung führt bei der analytischen Untersuchung zu einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis, bei der keine oder nur wenig Selektivität für eine bestimmte Enzymklasse zu beobachten ist. Ist die Sonde hingegen zu spezifisch bleiben möglicherweise interessante biologische Ziele außen vor. Je nach Fragestellung können daher unterschiedliche reaktive Gruppen von Interesse sein.

Viele reaktive Gruppen wurden als Leitmotive für die Entwicklung von ABPP-Sonden eingesetzt. Unter anderem Fluorophosphate^[34-36], Sulfonate^[37], α -Chloracetamide^[41, 42], Michael-Akzeptoren^[43-45] sowie Epoxide, Vinylsulfone, Diazomethylketone, α -Haloketone oder Acyloxymethylketone.^[46-52] Sonden, die diese reaktiven Gruppen enthalten, binden kovalent in das aktive Zentrum von Enzymen und ermöglichen durch ihre unterschiedliche Reaktivität bereits eine Abstufung und Differenzierung von Enzymklassen. Während Fluorophosphate hoch spezifisch mit Enzymen der Serinhydrolasefamilie reagieren, zeigen Epoxide, Vinylsulfone, Diazomethylketone, α -Haloketone oder Acyloxymethylketone eine deutliche Präferenz für Cysteinproteasen. Sulfonatester, α -Chloracetamide und Michael-Akzeptoren reagieren weitgehend ungerichtet und können je nach Struktur und Seitengruppen der Sonde mit einer Vielzahl verschiedener Enzymklassen mit aktiven Zentren geeigneter Nukleophilie reagieren. Hierbei ist es auch möglich durch das strukturelle Design der Sonde die Reaktivität entsprechend einzuschränken und auf die Ansprüche bestimmter Zielenzymklassen zu optimieren. So konnten zum Beispiel reaktive Michael-Akzeptoren, wie Zimtaldehyde^[44, 45] oder Arylvinylnsulfonate und -sulfone^[53] erfolgreich für die Markierung von Phosphatasen eingesetzt werden.

Sonden mit einem Hydroxamat Motiv gehen über den Chelateffekt zu zweiwertigen Zinkionen im aktiven Zentrum von Metalloproteasen eine hoch spezifische Wechselwirkung ein. Obwohl diese reversibel erfolgt, lassen sich Hydroxamate als ABPP-Sonden verwenden. Über einen photoreaktiven Kreuzlinker wie Benzophenon oder Diazirin können die entsprechenden Sonden nach UV Bestrahlung eine kovalente Bindung zu ihren Zielenzymen aufbauen und damit eine beständige Markierung dieser Proteine erreichen.^[54, 55] Mit diesen Sonden konnte die Familie der Metalloproteasen, die an vielen Krebserkrankungen beteiligt ist, untersucht werden.^[55, 56]

Diese Beispiele zeigen die große Bandbreite möglicher reaktiver Gruppen und ihren Einsatz zur zielgerichteten Markierung von Enzymen.

Gebunden an eine reaktive Gruppe ist das zweite Element einer Sonde, ein *Spacer*. Dieser besteht üblicherweise aus einer kurzen hydrophoben Alkyl- oder einer eher hydrophilen Polyethylenglykolkette, welche die reaktive Gruppe vom *Tag* trennt (Abbildung 2). Die Hydrophobizität des *Spacers* sollte sich dabei an den Eigenschaften des Zielenzyms orientieren und kann durch spezielle elektronische und sterische Beschaffenheiten auf unterschiedliche Präferenzen der

Substratbindetaschen zugeschnitten werden. Das dritte Element einer Sonde stellt der *Tag* oder Marker dar, der zur Anreicherung, Identifizierung und Visualisierung der Zielproteine dient. Ursprünglich eingesetzte radioaktive *Tags* wurden aufgrund ihrer umständlichen und gefährlichen Handhabung weitgehend durch Biotin- und Fluoreszenzmarker, wie etwa Tetramethylrhodamin (TAMRA), ersetzt. In ABPP-Experimenten sind diese *Tags* aufgrund ihrer extremen Sensitivität, die eine Visualisierung kleinster Zielproteinmengen ermöglicht, von höchster Bedeutung. Biotin-*Tags* erleichtern zusätzlich durch die Bindung von Avidin die Markierung und ermöglichen eine massenspektrometrische Charakterisierung nach Proteinanreicherung über Avidin-Beads.

In einem klassischen Markierungsexperiment werden ausgewählte Sonden mit Proteomen, beispielsweise aus zwei verschiedenen pathogenen Stadien, inkubiert. Während der Inkubation binden die fluoreszierenden Sonden direkt an die aktiven Zentren der gewünschten Zielproteine. Analytische Verfahren, wie etwa die SDS-Gelelektrophorese kombiniert mit bildgebenden Verfahren der Fluoreszenzaufnahme erlauben schließlich eine schnelle vergleichende Analyse von Zell- oder Gewebezuständen, die auf eine krankheitsassoziierte Enzymaktivität hindeuten können (Abbildung 3). Diese pathogenitätsassoziierten Enzyme können daraufhin intensiver untersucht werden und zukünftig als Zielproteine in der Therapie oder Diagnostik dienen. In diversen Fällen konnten über die Wechselwirkung von Sonden mit ihren Zielenzymen wichtige Targets für Krebs-, Infektions- und Stoffwechselkrankheiten identifiziert werden.

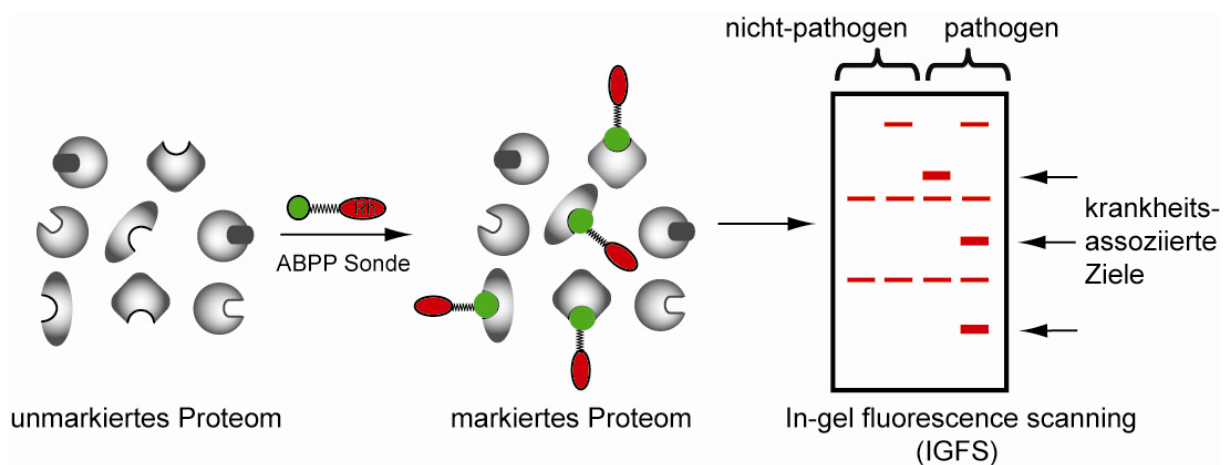
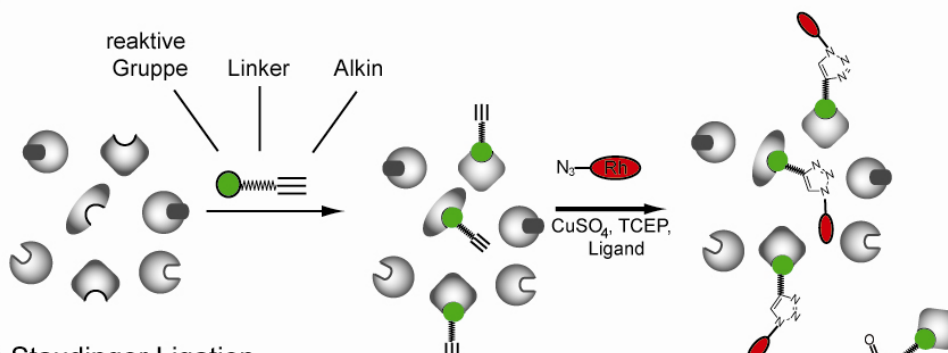


Abbildung 3: Standardmarkierungsexperiment eines Proteoms mit fluoreszierenden ABPP-Sonden und anschließender Analyse mittels Gelelektrophorese.

1.3.3. Bioorthogonale Chemie für *in situ* Experimente

Kovalent gebundene sterisch anspruchsvolle *Tags* schränken die Anwendungsgebiete des ursprünglichen ABPP ein. Durch ihre geringe Zellpermeabilität konnte in der Regel nur in Zelllysaten gearbeitet werden. Zelllysate haben den Nachteil, dass durch die Zerstörung von Organellen, verschiedenen Zellkompartimenten und letztlich der Integrität der gesamten Zelle, die natürliche Orientierung der Proteine und ihrer Interaktionspartner verändert wird und häufig Aktivatoren oder Inhibitoren freigesetzt werden, welche die Aktivität von Enzymen beeinflussen.^[57] Dieses Problem konnte durch die Einführung von bioorthogonalen Reaktionen wie z.B. der Cu(I)-katalysierten Huisgen [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition (Click Chemie, CC, Abbildung 4A) oder der Staudinger Ligation (Abbildung 4B) zwischen Aziden und Methylester modifizierten Triphenylphosphinen, gelöst werden.^[58-61] Hierbei wird der sterisch anspruchsvolle *Tag* durch kleine biokompatible Gruppen wie Azido- oder Alkingruppen ersetzt und der Biotin- oder Fluorophor-*Tag* erst nach der Markierung des Proteoms eingeführt.

A) Click Chemie



B) Staudinger Ligation

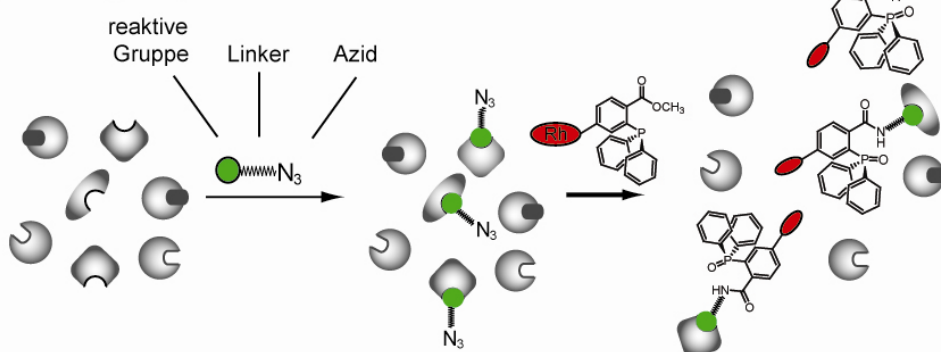


Abbildung 4: Bioorthogonale Strategien zur Modifizierung sondengebundener Proteine mit Fluoreszenzmarkern (Rh = Rhodamin, analog für Biotin): A) Die Kupfer(I) katalysierte Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition (Click Chemie) und B) die Staudinger Ligation.

Die orthogonalen Reaktionen zeigen eine geringe Reaktivität gegenüber anderen Biomolekülen wie der DNA oder unmarkierten Proteinen und lassen sich problemlos in wässrigen Medien durchführen. Somit ist es möglich, Proteine in lebenden Zellen über zellpermeable kleine Sonden zu markieren und nach anschließendem Zellaufschluss mit dem jeweiligen *Tag* zu versehen.^[31, 62] Eine vor kurzem von *Bertozzi et. al.* vorgestellte kupferfreie Variante der [3+2] Cycloaddition soll nun auch chemoselektive Kupplungen in lebenden Zellen ermöglichen.^[63]

1.3.4. Analytische Plattformen

Über die Zeit haben sich mehrere Methoden zur Detektion und Identifikation markierter Proteine entwickelt, die als komplementär anzusehen sind.

Die wohl ausgereifteste analytische Methode für das ABPP ist das „in-gel fluorescence scanning“ (IGFS), die eine einfache Handhabung und einen hohen Durchsatz an Proben ermöglicht. Hierbei wird das mit fluoreszierenden aktivitätsbasierenden Sonden markierte Proteom über eindimensionale Gelelektrophorese (SDS-PAGE) der Größe nach aufgetrennt. Die Visualisierung des Aktivitätsmusters eines Proteoms erfolgt anschließend über einen Fluoreszenzscanner (Abbildung 3). Um die Identität einer Fluoreszenzbande aufzuklären, wird in der Regel eine Biotin-Avidin Affinitätsanreicherung der sondengebundenen Proteine vorgeschaltet und nach der gelelektrophoretischen Auftrennung die entsprechende Bande isoliert. Anschließend wird das in der Gelbande befindliche Protein enzymatisch verdaut (z. B. durch Trypsin) und die extrahierten Peptidfragmente werden über eine Flüssigchromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer (LC-MS) analysiert (Abbildung 5).^[55]

Limitationen dieser Methode sind in manchen Fällen das Detektionslimit und die begrenzte Auflösung der 1D-Gelelektrophorese. Dennoch stellt das IGFS heute ein Routineverfahren dar, welches gleichzeitig die einfache und rasche Analyse vieler Aktivitätsprofile erlaubt.

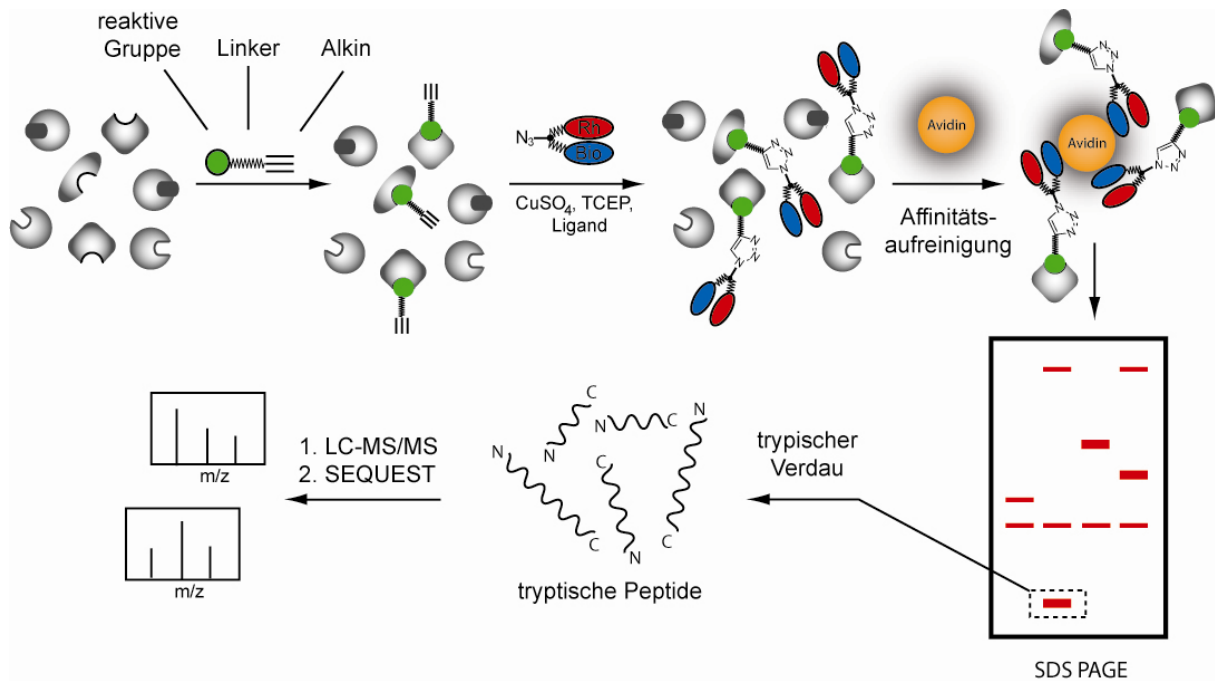


Abbildung 5: Strategie zur Identifizierung der markierten Proteine über Massenspektrometrie (Rh = Rhodamin, Bio = Biotin).

In den vergangenen Jahren sind zusätzlich eine Reihe gelfreier Methoden entwickelt worden, um verschiedenen Ansprüchen wie zum Beispiel der Erhöhung der Sensitivität oder der simultanen Bestimmung der Bindeposition einer Sonde in einem Enzym zu genügen.^[64-66] Unter anderem sind hier die „tandem orthogonal proteolysis“ (TOP) Methode^[65], Antikörper-basierende Methoden^[64, 67] sowie zweidimensionale LC-MS/MS Identifikationsverfahren (MudPIT)^[68] zu erwähnen.

1.3.5. Identifikation markierter Ziele durch Massenspektrometrie

Die aus einem Gel nach der IFGS Methode isolierten Proteine werden nach enzymatischem Verdau (in der Regel tryptisch) als Peptide über ein gekoppeltes Flüssigchromatographie Massenspektrometriesystem (LC-MS) analysiert (Abbildung 5). In der Flüssigchromatographie werden die Peptide mit einem Wasser-Acetonitril Gradienten über eine apolare stationäre Phase separiert. Bei dieser sogenannten Umkehrphasen-Chromatographie (*reversed phase chromatography*) werden die polaren Peptide zuerst eluiert, gefolgt von den apolaren Peptiden bei zunehmendem Acetonitrilgehalt im Gradienten der mobilen Phase. Die eluierten Peptide werden über ein Nanospray-ESI (Elektrospray Ionisation) als positiv oder negativ geladene

Ionen aus der Flüssigphase in die Gasphase überführt. Hierbei wird der Flüssigkeitsstrom aus der LC durch eine Kapillare mit angelegter Hochspannung positiv oder negativ ionisiert und als feine Aerosoltröpfchen in einem Vorvakuum auf einen entgegengesetzt geladenen Pol beschleunigt. Hierbei verdampft das Lösungsmittel rasch aus den Tröpfchen wodurch die Ladungsdichte bis zum Rayleigh-Limit ansteigt und nach dem *Charged Residue Modell* durch Coulomb-Explosionen in kleinere Tröpfchen zerfallen, bis letztlich nur noch einzelne ionisierte Peptide vorliegen.^[69, 70] Diese treten in ein Hochvakuum ein und werden durch einen entsprechenden Massenanalysator (MS/MS, Orbitrap oder Fouriertransformation Ionenzyklotronresonanz) detektiert. Die mit Hochauflösung ermittelten Peptidmassen werden durch eine Spezialsoftware zum Beispiel mit dem SEQUEST Algorithmus gegen eine ausgewählte Genomdatenbank mit den vorausgesagten Peptidfragmenten einzelner Genprodukte abgeglichen.^[71] Auf diese Weise lassen sich die Bindungspartner von ABPP-Sonden im Proteom eines Organismus identifizieren und so mögliche neue Zielstrukturen für die Behandlung von Krankheiten oder diagnostische Marker definieren und die Angriffsziele verschiedener Naturstoffe detailliert untersuchen.

1.4. Privilegierte Strukturen und Naturstoffe

Gerade im Hinblick auf die Behandlung von Infektionskrankheiten stellen Naturstoffe ein breites Spektrum aussichtsreicher pharmakologischer Wirkstoffe und Leitstrukturen dar, deren Potenzial bei weitem noch nicht ausgeschöpft ist. Obwohl Naturstoffe mit etwa 60% den Großteil aller zugelassenen pharmakologisch wirksamen Substanzen darstellen, sind viele ihrer Ziele und Wirkmechanismen bislang unbekannt.^[72-74] Naturstoffe mit biologischer Aktivität weisen in der Regel eine fein abgestimmte Reaktivität gegenüber ihren natürlichen molekularen Zielen auf. Sie binden dabei hoch spezifisch und selektiv an einige ausgewählte Zielstrukturen, wie Proteine, Nukleinsäuren oder deren Komplexe. Dabei sind verschiedenste Wirkungsmechanismen möglich. Naturstoffe können in das aktive Zentrum von Enzymen binden und dabei ihre Aktivität inhibieren oder allosterisch an einer regulatorischen Seite eines Proteins zu einer Veränderung der Konformation und damit der dreidimensionalen Struktur des Proteins führen. Letzteres kann eine Verringerung manchmal aber auch eine Erhöhung der Aktivität bewirken. Die

Wechselwirkung von Naturstoffen mit ihren Zielproteinen reichen von relativ schwachen Protein-Ligand Wechselwirkungen bis zu sehr stabilen kovalenten Modifikationen. In einigen Naturstoffen liegen hoch reaktive Gruppen vor, die auf den ersten Blick kaum kompatibel mit den vielen möglichen Reaktionspartnern im Proteom eines lebenden Organismus erscheinen. Durch ihre jeweilige Dekoration werden diese Stoffe jedoch in ihrer Reaktivität entsprechend angepasst, so dass sie meist eine hoch spezifische Wirkung durch Inhibition einiger weniger Enzyme im Zielorganismus ausüben können.

Da Naturstoffe über Jahrtausende der Evolution auf ihre jeweilige Wirkung optimiert wurden, stellen ihre reaktiven oder hoch affinen Zentralelemente (z.B. β -Lactonring, β -Lactamring/Penam Grundgerüst) privilegierte Strukturen dar, die für eine Anwendung als molekulare Werkzeuge oder pharmakologische Wirkstoffe besondere Relevanz aufweisen.^[39, 72-74] Die fein abgestimmte Reaktivität dieser Stoffe bildet eine vielversprechende Basis, um diese systematisch durch die Darstellung von synthetischen Derivaten zu untersuchen und zu modulieren. Dies ermöglicht es, bedarfsgerechte Veränderungen ihrer Selektivität durchzuführen oder gänzlich neue Zielproteine zu erschließen. So vielfältig wie die Bindungspräferenzen dieser Naturstoffe sind, so unterschiedlich sind auch ihre Anwendungsmöglichkeiten, die von der Leitstruktur zum Wirkstoffdesign über die Identifikation der Ziele bekannter Stoffe bis zur Verwendung als molekulare Werkzeuge reichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein privilegiertes Strukturelement (β -Lactonring) als Basis für den Aufbau einer Sondenbibliothek für ABPP verwendet und in einem weiteren Ansatz das enorme Potenzial von ABPP zur Aufklärung der molekularen Ziele von Naturstoffen anhand des nukleosidanalogen Antibiotikums Showdomycin demonstriert. Diese ABPP-Sonden wurden auf bakterielle Proteome angewendet, um dort ihre Angriffsziele und Wirkmechanismen zu identifizieren, mögliche Leitstrukturen für die zielgerichtete Inhibition relevanter Enzyme zu definieren und zugleich tiefere Einblicke in die molekularen Mechanismen der Pathogenese zu erhalten.

2. β -Lactone

2.1. β -Lactone als Naturstoffe

Lactone sind intramolekulare Carbonsäureester. Die überwiegende Mehrheit der bekannten natürlich vorkommenden β -Lactone ist unsymmetrisch mit je einem Rest in den Ringpositionen C3 und C4 substituiert. Da die absoluten Konfigurationen an den beiden Stereozentren der Ringpositionen C3 und C4 variieren, ergeben sich zwei zueinander diastereomere Enantiomerenpaare (Abbildung 6). Stehen beide Substituenten auf der gleichen Seite des Ringes spricht man von *cis*, im anderen Fall von *trans*- β -Lactonen. Interessanterweise treten in der Natur Vertreter der β -Lactone mit verschiedensten Konfigurationen auf.

Der 2-Oxetanon Ring der β -Lactone weist bereits eine erhebliche Ringspannung auf, welche sie wesentlich reaktiver im Vergleich zu normalen Estern macht. Daher kann der elektrophile 2-Oxetanonring von Gruppen mit erhöhter Nukleophilie, wie sie im aktiven Zentrum vieler Enzyme vorliegen angegriffen werden und unter Ringöffnung eine kovalente Bindung mit dem Protein eingehen.^[75] Obwohl einige Naturstoffe mit β -Lactongrundgerüst (Abbildung 6) medizinisches Potenzial aufweisen, sind ihre molekularen Angriffsziele noch weitgehend unbekannt. Einige dieser β -Lactone zeigen antibiotische Aktivität und sind daher von besonderem Interesse. Hierzu zählen unter anderem Obafluorin,^[76] das aus *Pseudomonas fluorescens* isoliert wurde, Hymeglusin^[77] (Antibiotikum 1233A) aus dem Schimmelpilz *Scopulariopsis* sp. und das Antibiotikum SQ 26,517^[78] aus *Bacillus* sp.

Einige β -Lactone sind bereits als Inhibitoren bestimmter Enzyme bekannt. So inhibiert Hymeglusin in Eukaryoten die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) Synthase,^[79, 80] was eine therapeutische Anwendungsmöglichkeit als Cholesterinsenker offen hält.^[81] Esterastin ist als Inhibitor lysosomaler Lipase beschrieben^[82] und Valilacton zeigt neben einer Aktivität gegen Lipase auch Wirkung als Inhibitor einer Esterase.^[83]

Auch die aus Actinomyceten isolierten β -Lactone Ebelacton A und B wurden als potente Esterase Inhibitoren charakterisiert^[84] und zeigten Wirksamkeit gegen Cutinasen pflanzenpathogener Pilze, welche diese benötigen, um bei ihrer Invasion die Wachsschicht der Cuticula zu durchdringen.^[85]

Das bei weitem am besten erforschte β -Lacton ist Lipstatin aus *Streptomyces toxytricini*. Als Inhibitor der pankreatischen Lipase^[86] erlangte es in der Humanmedizin Bedeutung für die Behandlung von Adipositas (Fettleibigkeit) und wurde zum Wirkstoff Tetrahydrolipstatin (THL) weiterentwickelt^[87], der als Arzneistoff Orlistat mit dem Handelsnamen Xenical[®] als Medikament auf dem Markt ist. Dieses ist bisher das einzige β -Lacton, das als pharmakologischer Wirkstoff in der Medizin Einsatz findet.

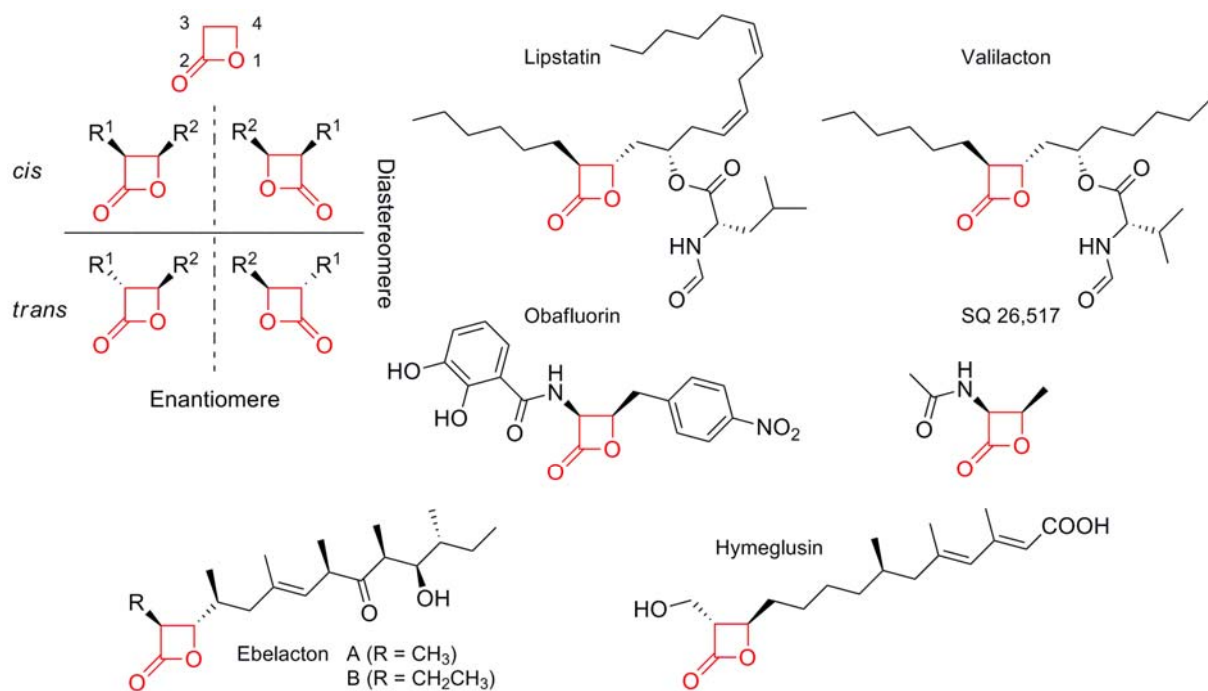


Abbildung 6: Stereoisomerie bei β -Lactonen, Ringpositionen im 2-Oxetanon Grundgerüst und Beispiele für die diversen natürlich vorkommenden β -Lactone.

Die strukturell mit THL eng verwandten Panclicine A bis E, die aus *Streptomyces* sp. isoliert wurden, weisen eine ähnliche Aktivität gegen die pankreatische Lipase auf.^[88, 89] Während für Hymeglusin bereits gezeigt werden konnte, dass die Inhibition der HMG-CoA Synthase durch die kovalente Modifikation des Cysteins im aktiven Zentrum des Enzyms erfolgt,^[90] ist über die anderen β -Lacton Naturstoffe mit Ausnahme von Lipstatin und THL relativ wenig bekannt. In der Regel wurden die Aktivitäten in *in vitro* Versuchen gegenüber aufgereinigten Enzymen untersucht, so dass ihre Selektivitäten und weiteren Angriffsziele sowohl in Eukaryoten als auch in bakteriellen Proteomen noch weitgehend im Dunkeln liegen.

2.2. Synthesestrategie für β -Lacton Sonden

Um die molekularen Angriffsziele von β -Lactonen in bakteriellen Proteomen zu untersuchen, wurde eine kleine Bibliothek biomimetischer β -Lactonsonden hergestellt. Voraussetzung für die Anwendung als Sonde und deren einfachen Einsatz für *in vitro* und *in situ* Versuche war die Einführung eines Alkynylrests für die bioorthogonale Fluoreszenzmarkierung mittels Click Chemie.

Das β -Lactongrundgerüst wurde daher mit einem Alkynylrest in Ringposition C4 und diversen Seitengruppen modifiziert. Als solche wurden nach dem natürlichen Vorbild vorwiegend apolare, aliphatische oder aromatische Gruppen mit unterschiedlicher Verzweigung eingesetzt. Die Mehrzahl der natürlich vorkommenden β -Lactone liegt als *trans*-Isomere vor, wobei jedoch die jeweilige absolute Konfiguration an den Stereozentren des Lactonrings variieren kann. Für eine Markierung möglichst vieler Ziele im Proteom sollte es daher vorteilhaft sein, die *trans*-Isomeren als racemisches Gemisch einzusetzen. Daher wurde eine Synthesestrategie ausgewählt, die es erlaubt, für einen Bibliotheksansatz *trans- β -Lactone als Racemate in wenigen Synthesestufen zu erhalten.*

Der terminale Alkynylrest für die spätere Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung über Click Chemie wurde hierbei durch die Verwendung von 5-Hexinal eingeführt. 5-Hexinal konnte aus 5-Hexinol durch Oxidation mit dem Dess-Martin-Periodinan in 55% Ausbeute erhalten werden (siehe Abbildung 7).

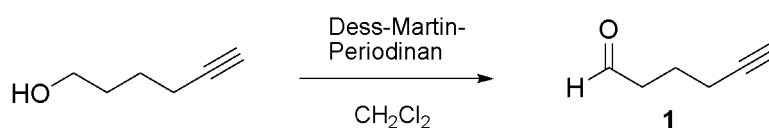


Abbildung 7: Dess-Martin Oxidation von 5-Hexinol zu 5-Hexinal.

In einem ersten Ansatz wurde eine $\text{Al}(\text{SbF}_6)_3$ katalysierte [2+2] Cycloaddition eines aus Acetylchlorid *in situ* generierten Ketens mit einem Aldehyd angewendet, um ein in Ringposition C3 unsubstituiertes β -Lacton zu erhalten.^[91] Mit 5-Hexinal **1** konnte über die Halid-Aldehyd Cyclokondensation das entsprechende 4-(4-Pentynyl)oxetan-2-on **2**, die Lacton Sonde **A1**, mit 28% Ausbeute dargestellt werden (siehe Abbildung 8).

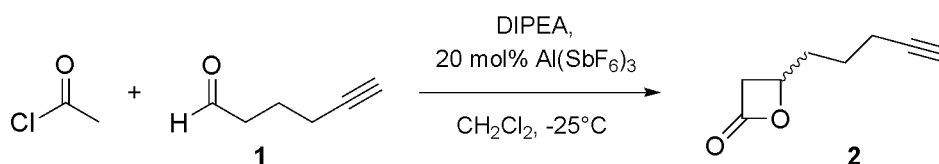


Abbildung 8: Katalysierte [2+2] Cycloaddition zur Darstellung einer in Ringposition C3 unsubstituierten β -Lacton ABPP Sonde.

Da in Vorversuchen mit bakteriellen Proteomen die Sonde **A1** aussichtsreiche Markierungsergebnisse zeigte, wurde eine größere Diversität an Sonden mit Substitution in Ringposition C3 angestrebt. Die für Sonde **A1** verwendete [2+2] Cycloaddition schlug jedoch als Strategie für den Aufbau komplexerer Strukturen fehl. Daher wurde eine weitere einfache und elegante Methode für die Darstellung von β -Lactonen herangezogen. Hierbei wurde eine leicht veränderte Synthese nach Danheiser und Nowick eingesetzt, mit der die entsprechenden 2-Oxetanone aus Aldehyden und Phenylthioestern erhalten werden können.^[92] Der Alkynylrest wurde wieder durch 5-Hexinal bereitgestellt und die Diversität in Ringposition C3 durch die Verwendung unterschiedlicher Thioester mit einer CH oder CH₂ Gruppe in α -Position eingeführt. Das Reaktionsschema dieser Eintopfreaktion ist in Abbildung 9 gegeben.

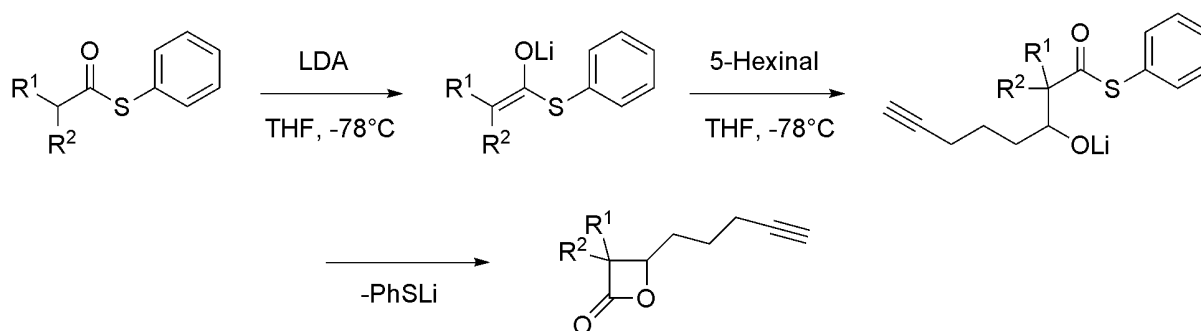


Abbildung 9: Reaktionsschema der Darstellung von β -Lactonen aus Phenylthioestern und 5-Hexinal.

Die jeweiligen Phenylthioester wurden aus der Umsetzung von Säurechloriden oder DCC aktivierten Carbonsäuren mit Thiophenol erhalten. Durch Lithiumdiisopropylamin (LDA) wurde aus einem Phenylthioester das Enolat gebildet und nach nukleophiler Addition an die Carbonylgruppe von 5-Hexinal der

Ringschluss durch intramolekulare nukleophile Substitution mit Thiophenolat als Abgangsgruppe eingeleitet.

Die pK_s Werte des terminalen Alkin-H (Literaturwert für Phenylacetylen in DMSO $pK_s = 28,8^{[93]}$) des Aldehyds und des aciden α -H der verwendeten Thioester (Literaturwert für 2-Phenylethylsäurephenylthioester in DMSO $pK_s = 16,9^{[94]}$) dürften weit genug voneinander entfernt sein, um nach Deprotonierung des Thioesters eine Reaktion mit der Carbonylgruppe des Aldehyds ohne größere Störeinflüsse der Alkingruppe zu gewährleisten. Auf die Verwendung von Schutzgruppen wurde somit verzichtet. Mögliche Einbußen der Ausbeute bei variierenden Substituenten wurden der raschen, geradlinigen Erstellung einer Strukturbibliothek untergeordnet.

2.3. Markierungsexperimente

Für einen kleinen Bibliotheksansatz wurden über diese Strategie 10 verschiedene β -Lacton Sonden dargestellt, die durch ihre diversen Seitengruppen in Ringposition C3 unterschiedliche Präferenzen für die Substratbindetaschen möglicher Zielenzyme abdecken sollten (Abbildung 10A). Eine Sonde wurde exemplarisch für vergleichende Studien als *cis* (**L1**) und *trans* (**LT1**) Isomer isoliert, wobei beide Isomeren ähnliche Markierungsprofile aufwiesen (Abbildung A1). Die gesamte Sondenbibliothek wurde jeweils zur *in vitro* Markierung verschiedener Bakterienproteome aus lysierten Zellen mit Trennung in Cytosol- und Membranproteom eingesetzt (Abbildung 10B).

Hierbei wurden gram-positive und gram-negative Bakterien wie *Pseudomonas putida*, *Listeria welshimeri*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* getestet, die eine phylogenetisch nahe Verwandtschaft zu pathogenen Stämmen aufweisen. Zusätzlich wurde das Cytosol- und Membranproteom aus Mausleber als eukaryotische Referenz verwendet. Erste Markierungsexperimente wurden mit einer Sondenkonzentration von 50 μ M im Proteom durchgeführt, was sich als ausreichend für die vollständige Markierung der meisten Zielenzyme erwies. Die einzelnen Verbindungen der Sondenbibliothek zeigten interessanterweise äußerst unterschiedliche Reaktivitätsprofile mit allen untersuchten nativen Proteomen (Abbildung A2), was darauf hinweist, dass die Substitution in Ringposition C3 in der Tat einen erheblichen Einfluss auf die Spezifität der Sonden-Protein-Wechselwirkung

ausübt. Außer für *L. welshimeri* wiesen die Membranfraktionen im Vergleich zum Cytosol weniger intensive und spezifische Markierungen auf.

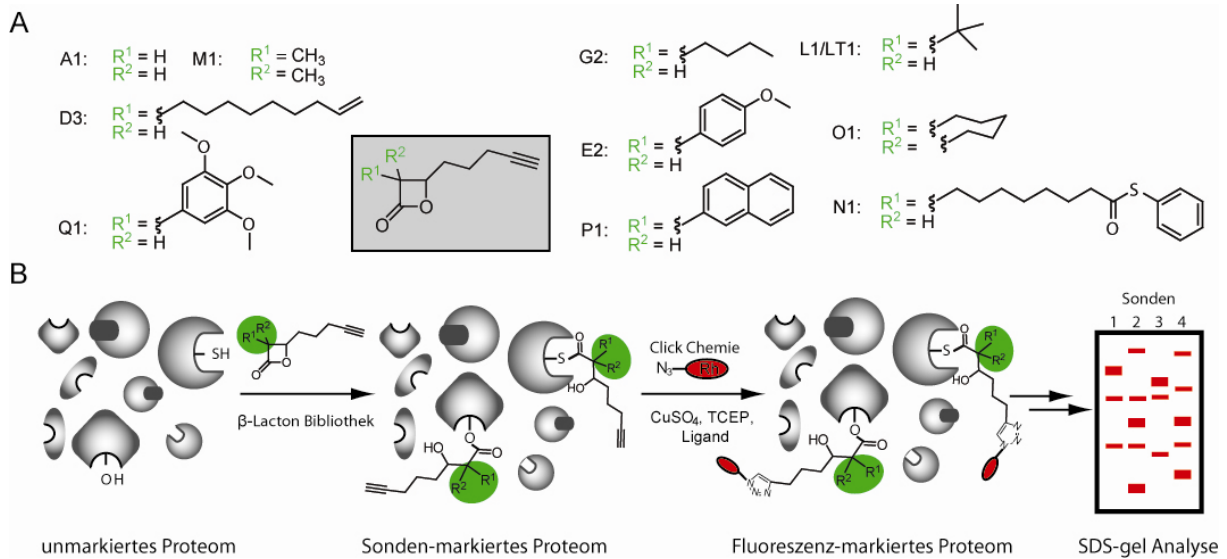


Abbildung 10: A) Bibliothek der β -Lacton ABPP-Sonden und B) *in vitro* Markierungsversuche mit bakteriellen Proteomen.

Als Beispiel hierfür ist in Abbildung 11A und B die Markierung von *L. welshimeri* Cytosol- und Membranproteom sowie *B. subtilis* Cytosolproteom mit einer Auswahl der komplementärsten Sonden gezeigt. Beispiele für Hitze-SDS-denaturierte Proteom Kontrollen sind in Abbildung 11C gegeben. Hierbei wird vor der Zugabe der Sonden das Proteom in Gegenwart von SDS aufgekocht, wodurch alle Proteine entfaltet werden. Ihre Renaturierung beim Abkühlen wird durch SDS verhindert. Ohne ihre native Struktur ist die räumliche Orientierung des aktiven Zentrums, die für den nukleophilen Angriff am β -Lactonring erforderlich ist nicht mehr gegeben. Proteine, die eine spezifische kovalente Bindung zu einer Sonde über ihr aktives Zentrum eingehen, können somit nicht mehr markiert werden.

Die Mehrheit aller Markierungen erwies sich als hitzesensitiv und kann daher als Resultat spezifischer aktivitätsbasierender Bindungsereignisse erachtet werden. Nur eine einzige unspezifische Bindung trat in der durch Hitze denaturierten Proteom Kontrolle von *L. welshimeri* auf, was die Präferenz von β -Lactonen für native Proteine verdeutlicht (Abbildung 11C, Abbildung A3). Die meisten markierten Proteine waren von geringer Häufigkeit im Proteom, was ein direkter Vergleich der relativen Intensitäten von Coomassie Färbung mit Fluoreszenzaufnahmen belegte (Abbildung A4). Die anschließende Identifizierung der markierten Zielenzyme mittels LC-MS Analyse ergab etwa 20 verschiedene Enzyme (Tabelle 1).

Die wichtigsten Ziele, die durch Massenspektrometrie identifiziert wurden, wurden mithilfe rekombinanter Expression und anschließender Markierung durch die entsprechenden Sonden bestätigt (Abbildung 11D, Abbildung A5).

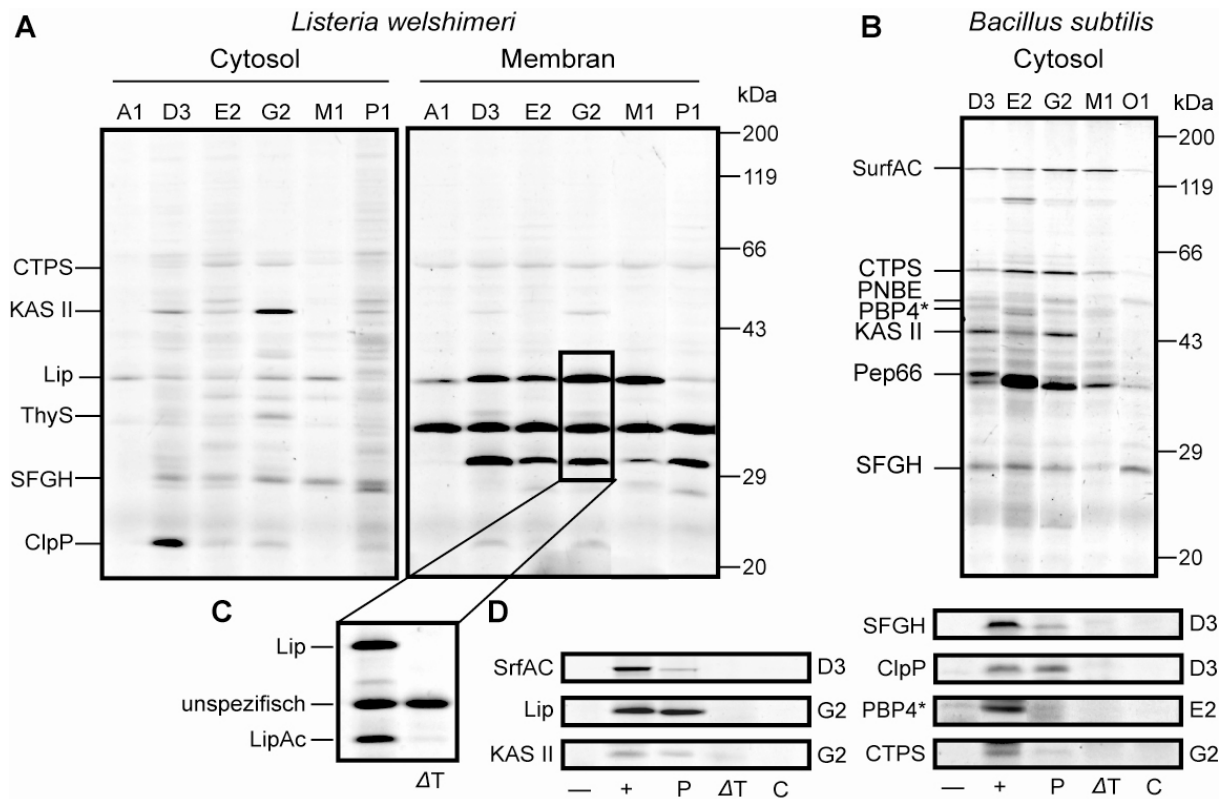


Abbildung 11: Fluoreszenzaufnahmen der Markierungsprofile der β -Lacton Bibliothek in bakteriellen Proteomen. A) *L. welshimeri* Cytosol- und Membranproteome nach Markierung mit ausgewählten Sonden der Bibliothek (Abkürzungen der Enzyme siehe Tabelle 1). B) *B. subtilis* Cytosol Proteom mit identifizierten Zielenzymen. C) Beispiel für eine Hitzekontrolle (ΔT) in *L. welshimeri*. D) Rekombinant exprimierte Enzyme (– vor Induktion, + nach Induktion, P natives Proteom, ΔT nach Induktion/Hitzekontrolle, C Nach Induktion/ohne Sonde).

Tabelle 1: Identifizierte Enzyme der Experimente mit *in vitro* Proteomen (nach Funktionen gruppiert) mit den jeweiligen Abkürzungen.

Funktion	Enzym (Abkürzung)	Identifizierte Proteome
Primärmetabolismus		
	AcetylCoA-Hydrolase (ACoAH)	<i>P. putida</i>
	Aldehyd-Dehydrogenase B (ADB)	<i>E. coli</i>
	Formiat-C-Acetyltransferase (FCA)	<i>B. licheniformis</i>
	Lipase (Lip)	<i>L. welshimeri</i>
	Lipase/Acylhydrolase (LipAc)	<i>L. welshimeri</i>

	Lysophospholipase (LPL)	<i>Mus musculus</i>
	β -Ketoacyl-Acyl-Carrier-Protein-Synthase I (KAS I)	<i>E. coli, P. putida</i>
	β -Ketoacyl-Acyl-Carrier-Protein-Synthase II (KAS II)	<i>B. subtilis, B. licheniformis, E. coli, L. welshimeri</i>
	β -Ketoacyl-Acyl-Carrier-Protein-Synthase III (KAS III)	<i>B. licheniformis</i>
	β -Ketothiolase (BKT)	<i>P. putida</i>
Sekundärmetabolismus		
	Surfactin-A-Synthetase-Untereinheit C (SrfAC)	<i>B. subtilis</i>
Nukleotidsynthese		
	CTP-Synthase (CTPS)	<i>B. subtilis, B. licheniformis, E. coli, L. welshimeri</i>
	Thymidylat-Synthase (ThyS)	<i>L. welshimeri</i>
Resistenz/Zellwandbiosynthese		
	Penicillin bindendes Protein 4* (PBP4*)	<i>B. subtilis</i>
virulenzassoziiert		
	ATP-abhängige Clp-Protease (ClpP)	<i>P. putida, L. welshimeri</i>
	Prolin-Imino-peptidase (PIP)	<i>P. putida</i>
Entgiftung		
	S-Formylglutathion-Hydrolase (SFGH)	<i>B. subtilis, E. coli, L. welshimeri, Mus musculus</i>
	Dienlacton-Hydrolase (DLH)	<i>P. putida</i>
Unbekannte Funktion		
	AB-Hydrolase (ABH)	<i>Mus musculus</i>
	<i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase (PNBE)	<i>B. subtilis</i>
	Peptidase S66 (Pep66)	<i>B. subtilis</i>
	Putative ATP-abhängige Protease (PADP)	<i>P. putida</i>
	Putative Esterase (PutE)	<i>B. licheniformis</i>

Die identifizierten Enzyme umfassen vier Enzymklassen bestehend aus Ligasen, Oxidoreduktasen, Hydrolasen und Transferasen (Tabelle 2). Alle diese Klassen erfordern für die Katalyse ein Nukleophil (Cystein oder Serin) in ihrem aktiven Zentrum, das einen Angriff am elektrophilen β -Lactonring ermöglicht.

Tabelle 2: Mit β -Lactonsonden markierte Enzymklassen.

Enzymklasse	EC	Aktives Zentrum	Beispiel
Ligase	EC 6.3.4.	Cys, His, Glu	CTP-Synthase
Oxidoreduktasen	EC 1.2.1.	Cys, Glu	Aldehyd-Dehydrogenase B
Hydrolasen	EC 3.1.2.	Ser, His, Asp	S-Formylglutathion-Hydrolase
	EC 3.1.1.	Ser, His, Glu	<i>para</i> -Nitrobenzyl-Esterase
	EC 3.4.11.	Ser, His, Asp	Prolin-Imino-peptidase

	EC 3.4.21.	Ser, His, Asp	ATP-abhängige Clp-Protease
Transferasen	EC 2.3.1.	Cys, His, Asn	β -Ketoacyl-ACP-Synthase II
	EC 2.3.1.	Gly, Cys, Cys	Formiat-C-Acetyltransferase
	EC 2.3.1.	Cys, His, Cys	β -Ketothiolase
	EC 2.1.1.	Cys	Thymidylat-Synthase

Eine Vorinkubation verschiedener Proteine mit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Cerulenin, die als Inhibitoren der aktiven Zentren von Serin-Proteasen^[40] beziehungsweise β -Ketoacyl-Acyl-Carrier-Protein-Synthasen (KAS)^[95] bekannt sind, zeigte in der Tat, dass hierbei eine anschließende Markierung durch die Sonden unterbunden wurde, was auf eine Bindung der β -Lactone in das aktive Zentrum der jeweiligen Enzyme hinweist (Abbildung A6). Um als direktes Resultat einer solchen Markierung die Inhibition der katalytischen Aktivität eines Enzyms messen zu können, wurde ein Substratinhibitionstest mit aufgereinigter S-Formylglutathion-Hydrolase (SFGH) durchgeführt. Mit dem chromogenen Modellsubstrat *para*-Nitrophenylacetat konnte der Umsatz von SFGH verfolgt und die Inhibition durch Lacton **G2** gemessen werden. Hierbei ergab sich ein IC₅₀ von 5 μ M (Abbildung A6). Die Inhibition der Enzymaktivitäten und die breite Abdeckung unterschiedlicher Enzymklassen verdeutlichen das enorme Potenzial von β -Lactonen für ABPP. Mehrere der identifizierten Enzyme sind in wichtige Zellfunktionen involviert, wie in Primär- (KAS I und II) und Sekundärmetabolismus (Surfactin-A-Synthetase C, SurfAC), Nukleotidsynthese (CTP-Synthase), Detoxifikation (SFGH), Antibiotikaresistenz (Penicillin bindendes Protein 4*, PBP4*) sowie in die Virulenz (ATP-abhängige caseinolytische Protease, ClpP). Mit Ausnahme von SFGH wurden keine Homologen dieser Enzyme im Mausleberproteom gefunden. Einige Enzyme sind von besonderem medizinischem Interesse: KAS II, ein essenzieller Bestandteil der Fettsäurebiosynthese^[96] ist unter Pathogenen hoch konserviert^[97] und wurde durch die aliphatischen β -Lacton Sonden **D3** und **G2** markiert (Abbildung 11A und B). Weiterhin wurde PBP4*, ein Enzym mit β -Lactamase Aktivität,^[98] in *B. subtilis* markiert (Abbildung 11B). Obwohl hier vorerst Proteome nicht pathogener Bakterien in den Experimenten verwendet wurden, konnten zwei virulenzassoziierte Enzyme, ClpP und die Prolin-Imino-peptidase (PIP), die entscheidende Rollen in vielen pathogenen Stämmen spielen, in *L. welshimeri* und *P. putida* identifiziert werden.

Besonders ClpP erweist sich wegen seiner fundamentalen Bedeutung für die Stresstoleranz und Virulenz in vielen pathogenen Bakterien wie *S. aureus*, *L. monocytogenes* und *P. aeruginosa* als interessantes Zielenzym.^[99-101] Um die Stärke der Sonden-Protein-Wechselwirkung beurteilen zu können, wurden die Reaktivitätsprofile ausgewählter β -Lactone über einen weiten Konzentrationsbereich von 10 μM bis 5 nM untersucht. Einige Zielenzyme zeigten ein sehr robustes Markierungsverhalten. Zum Beispiel erwies sich das β -Lacton **G2** als sehr sensitive Sonde für Lipase (Lip, bis zu 20 nM Sondenkonzentration), war jedoch kaum empfindlich für Lipase/Acylhydrolase (LipAc) in *L. welshimeri* (Abbildung 12A).

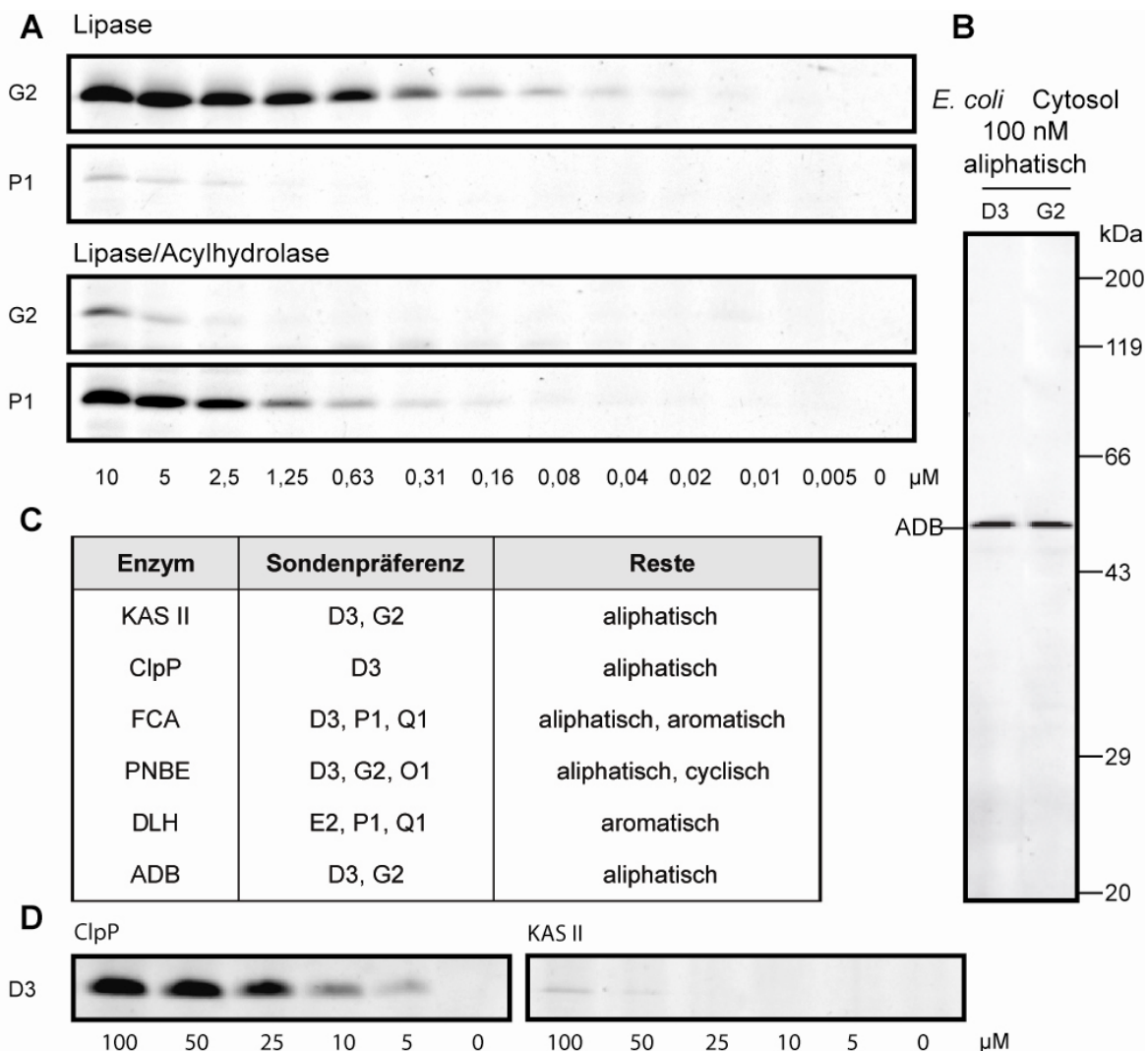


Abbildung 12: Sensitivität und Spezifität der β -Lacton Sonden für einzelne Enzyme. A) Konzentrationsreihe ausgewählter Sonden im Proteom von *L. welshimeri*. B) ADB ist das einzige Enzym im Cytosol von *E. coli*, das durch die Sonden **D3** und **G2** noch bei 100 nM markiert wird. C) Liste ausgewählter Enzyme mit ihren entsprechenden Sondenpräferenzen. D) *In situ* Markierung von *L. welshimeri* mit β -Lacton **D3** bei verschiedenen Konzentrationen.

Das aromatische **P1** zeigte die gegensätzliche Sensitivität (bis zu 160 nm für LipAc), was die Empfindlichkeit und Zielenzymselektivität von **G2** und **P1** verdeutlicht. Im Cytosol von *E. coli* zeigte ADB bei einer Sondenkonzentration von 100 nm eine deutliche Präferenz für aliphatische β -Lactone (**D3**, **G2**; Abbildung 12B). Einige andere Enzyme konnten auf ähnliche Weise basierend auf ihren bevorzugten Bindungspartnern gruppiert werden (Abbildung 12C). Diese Information ist nützlich, um Einblicke in die nativen Substratpräferenzen von allen markierten Enzymen erhalten zu können, besonders von jenen, die weniger untersucht oder noch uncharakterisiert sind. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass das unsubstituierte **A1** Enzyme offensichtlich nur schlecht markiert. Sterisch anspruchsvolle Sonden wie **O1** und **L1** sind ebenfalls durch eine geringe Zahl spezifischer Markierungen gekennzeichnet. Daher sind β -Lactone mit aliphatischen und aromatischen Resten offensichtlich die potentesten Sonden: sie könnten die Basis für das zukünftige Design spezifischer Inhibitoren bilden. Die Markierung im aktiven Zentrum essentieller Enzyme wie KAS II wirft die Frage nach einem möglichen antibakteriellen Effekt auf.

Einige Sonden wurden auf die Inhibition von Bakterienwachstum getestet, jedoch konnte keine antibiotische Aktivität beobachtet werden. Der Grund hierfür könnte in der begrenzten zellulären Aufnahme der Sonden durch lebende Bakterien liegen. Um dies zu untersuchen, wurden lebende Zellen von *L. welshimeri* mit verschiedenen Sondenkonzentrationen *in situ* behandelt und nach Aufschluss der Zellen Cytosol- und Membranproteome gewonnen. Diese Experimente ergaben, dass KAS II, das wichtigste Angriffsziel für die Viabilität, nur geringfügig bei den höchsten Konzentrationen (100 μ M) markiert wurde und daher vermutlich keine Absättigung für dessen vollständige Inhibition erreicht wurde.

Im Gegenzug wurde jedoch eine starke Markierung des virulenzassoziierten Enzyms ClpP auch noch bei Sondenkonzentrationen von 5 μ M erhalten (Abbildung 12D). Die spezifische und selektive *in situ* Markierung eines bekannten Virulenzfaktors, der nicht essenziell für die Viabilität, jedoch unabdingbar für die bakterielle Pathogenese ist, belegt, dass diese Sonden für *in situ* Studien anwendbar sind; zugleich lässt sich auf ihnen eine vielversprechende zukünftige Strategie für die Inhibition neuer bakterieller Angriffsziele aufbauen.

2.4. β -Lacton Sonden als Inhibitoren der Virulenz

Bei ClpP handelt es sich um eine phylogenetisch konservierte Serinprotease, die neben ihrer Funktion in der Virulenz pathogener Bakterien auch weitere Rollen als *Heatshock* Protein bei der zellulären Homöostase von Bakterien einnimmt.^[102] Als solche bildet ClpP einen tetradekameren Komplex, der sich aus zwei übereinander gestapelten heptameren Ringen aus einzelnen ClpP Einheiten zusammenlagert. Die aktiven Zentren mit einer katalytischen Triade aus Serin, Histidin und Aspartat liegen in der Äquatorialebene im Inneren dieser fassartigen Struktur. Proteine, die für den Abbau bestimmt sind, werden in der Regel über hexamere Komplexe von ATP-abhängigen AAA+ Chaperonen (ClpX oder ClpA) erkannt, die an ClpP binden können. Diese entfalten die Proteine und überführen sie in die zentrale Pore von ClpP, wo sie von den aktiven Zentren in kleine Peptide gespalten werden, die äquatorial den Komplex verlassen.^[102, 103]

Neben der allgemeinen Rolle in der Regulation des Proteinhaushalts und der Beseitigung fehlgefalteter Proteine in einer Zelle, ist von ClpP aus *Knockout* Mutanten in vielen Pathogenen bekannt, dass es einen wesentlichen Beitrag zu deren Virulenz leistet.^[99-101, 104-106] Die ersten *in situ* Untersuchungen mit *Listeria welshimeri* zeigten bereits, dass β -Lacton Sonden zellgängig sind und ClpP als Ziel von diesen markiert wird. Obwohl es sich hierbei um ein nicht pathogenes Bakterium handelt, gibt die hohe phylogenetische Konserviertheit der Protease Anlass dazu, dieses Protein in seiner Wechselwirkung mit β -Lactonen auch in pathogenen Bakterien näher zu untersuchen.

Besondere Aufmerksamkeit erhielt ClpP im opportunistischen Pathogen *Staphylococcus aureus* in einer Vielzahl von Studien mit ClpP *Knockout* (Δ ClpP) Mutanten, denen das ClpP Protein als Resultat einer genetischen Veränderung fehlt.^[107] Interessanterweise erwies sich eine solche Δ ClpP Mutante als nicht-virulent in einem Abszessmodell in der Maus.^[107] Die verringerte Virulenz zeigte sich auch in der Unterdrückung sogenannter Virulenzfaktoren, einer Reihe sekretierter Proteine, die sich als Enzyme und Toxine gegen das Immunsystem des Wirtes richten und zu den eigentlichen Krankheitssymptomen führen.

Zu diesen gehören Proteasen, die Immunglobuline und andere Wirtsproteine abbauen, Enzyme, die Nährstoffe aus dem Wirt verfügbar machen und eine Vielzahl von Toxinen, die unter anderem eine Dysregulation des Immunsystems bewirken.

Die Ausschüttung dieser Virulenzfaktoren wird durch das *agr* Quorum Sensing System von *Staphylococcus aureus* in Abhängigkeit von der Dichte der Bakterien reguliert.^[108] Hierbei werden kleine Moleküle (Autoinducing Peptide, AIP) als Quorum Sensing Mediatoren ausgesandt, die über Rezeptoren eine positive Rückkopplung ihrer eigenen Produktion und des Ablesens der Virulenzfaktorgene bewirken.^[109] Befindet sich die Dichte der Bakterien unterhalb eines gewissen Schwellenwerts, ist die Konzentration von AIP gering, die Virulenzgene bleiben inaktiv und die Bakterien verhalten sich als normaler Teil des menschlichen Microbioms.

Konnten sich jedoch die Bakterien zum Beispiel bei einer Wundinfektion entsprechend vermehren, steigt die AIP Konzentration an und führt ab einem bestimmten Schwellenwert zum gleichzeitigen koordinierten Angriff der Bakterien auf den Wirt. Induziert durch AIP wird hierbei RNA III exprimiert, die als komplex gefaltetes RNA Molekül im Wesentlichen für die Regulation der Virulenz entscheidend ist.^[109] Man geht davon aus, dass sie ein Repressorprotein, den *repressor of toxins* (Rot) zu dessen Abbau geleitet.^[110]

Rot bindet im Normalfall an die Virulenzgene und verhindert dadurch deren Expression. Durch den Abbau von Rot werden diese Gene für die Transkription freigegeben und eine Fülle an verschiedenen Virulenzfaktoren kann produziert und ausgeschüttet werden.^[111] Der Abbau von Rot erfolgt hierbei durch ClpXP (Komplex aus ClpP und dem Chaperon ClpX), welches somit eine zentrale Rolle in der Regulation der Virulenz einnimmt.

Eine Ausschaltung von ClpP führt somit zur Herabregulierung des *agr* Quorum Sensing Systems und zusätzlich zur Hochregulierung transkriptionaler Repressoren der SarA Familie, welche die Expression der Virulenzgene unterdrücken (Abbildung 13).^[99] Auch wenn die exakten Regulationsmechanismen teilweise im Dunkeln liegen und sich von Stamm zu Stamm gravierend unterscheiden können, ist die zentrale Rolle von ClpP für die Virulenz von *S. aureus* durch die entsprechenden *Knockout* Experimente mehrfach belegt worden. Daher wurde ClpP bereits als aussichtsreiches Angriffsziel zur Behandlung bakterieller Infektionen in der Literatur beschrieben.^[99-101, 104-106]

In einer anderen Studie wurde ClpP durch Acyldepsipeptide überaktiviert, was vermutlich zu einem unkontrollierten Selbstverdau der Zellen führte und somit ähnlich wie bei bestehenden Antibiotika bakteriozid wirkte.^[112]

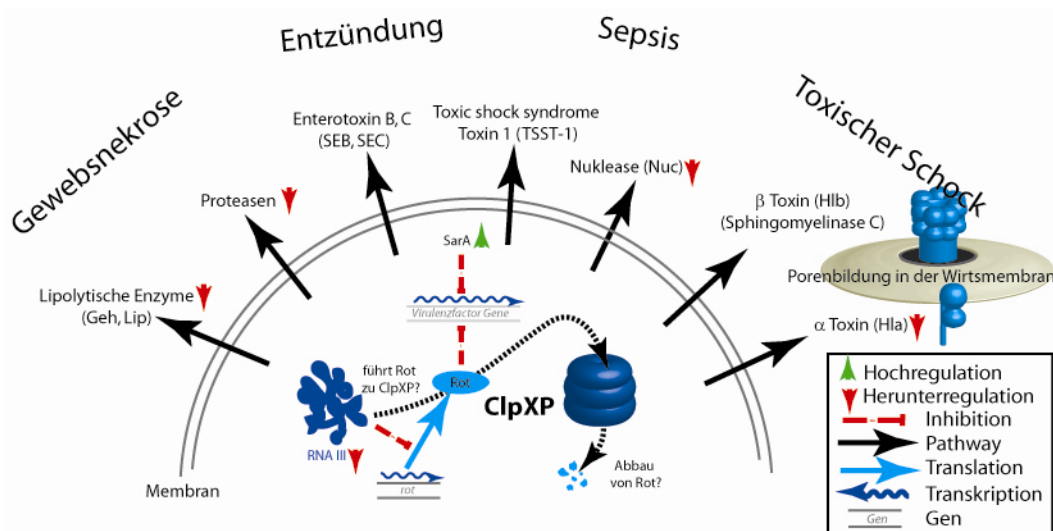


Abbildung 13: Überblick über die Virulenzfaktoren von *S. aureus* und die bisher aus genetischen Studien bekannten oder vermuteten regulatorischen Zusammenhänge.

Eine Inhibition von ClpP hingegen würde eine völlig neue Strategie darstellen. Bislang konnten allerdings keine effektiv wirksamen Inhibitoren für dieses Enzym identifiziert werden.^[99] Mit der Entdeckung von ClpP als Zielstruktur für bestimmte β -Lactonsonden bei *in situ* Experimenten mit lebenden Bakterienzellen konnte nun erstmals eine Stoffklasse als potentielle Inhibitoren für dieses virulenzassoziierte Enzym definiert werden.

In situ Identifizierung der Angriffsziele

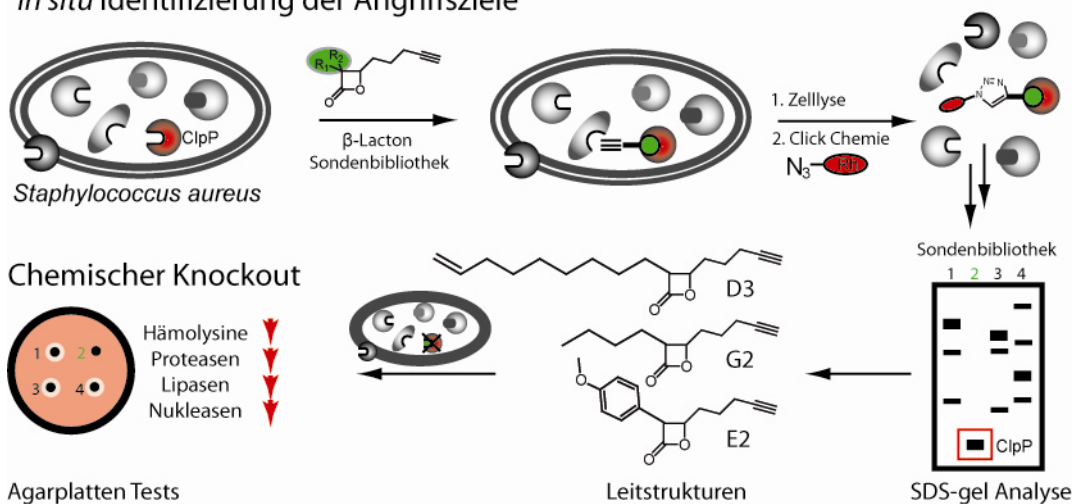


Abbildung 14: Eine chemisch-proteomische Strategie für die *in situ* Markierung von ClpP durch zellpermeable β -Lactonsonden und anschließende Identifikation durch Fluoreszenzanalyse von SDS-Gelen und Massenspektrometrie. Leitstrukturen für die Markierung und Inhibition von ClpP werden auf ihre biologischen Effekte bezüglich der Virulenzfaktorenexpression untersucht.

Um deren Eignung näher zu untersuchen, wurden lebende *Staphylococcus aureus* Zellen mit β -Lactonsonden der etablierten ABPP Bibliothek inkubiert, anschließend lysiert und die markierten Proteine in Cytosol- und Membranfraktion durch Click Chemie mit einem Fluoreszenz-tag markiert (Abbildung 14). Die markierten Proteome wurden mittels SDS-PAGE nach Proteingrößen aufgetrennt, durch Fluoreszenzaufnahmen analysiert und die entsprechenden Proteine mittels MS identifiziert. Interessanterweise wurde ClpP in lebenden Zellen von *S. aureus* (Stamm NCTC 8325) von drei Sonden der Bibliothek, **D3** und **G2** mit aliphatischen und **E2** mit einem kleinen aromatischen Rest in hoher Intensität und als Hauptziel im Proteom markiert (Abbildung 15A).

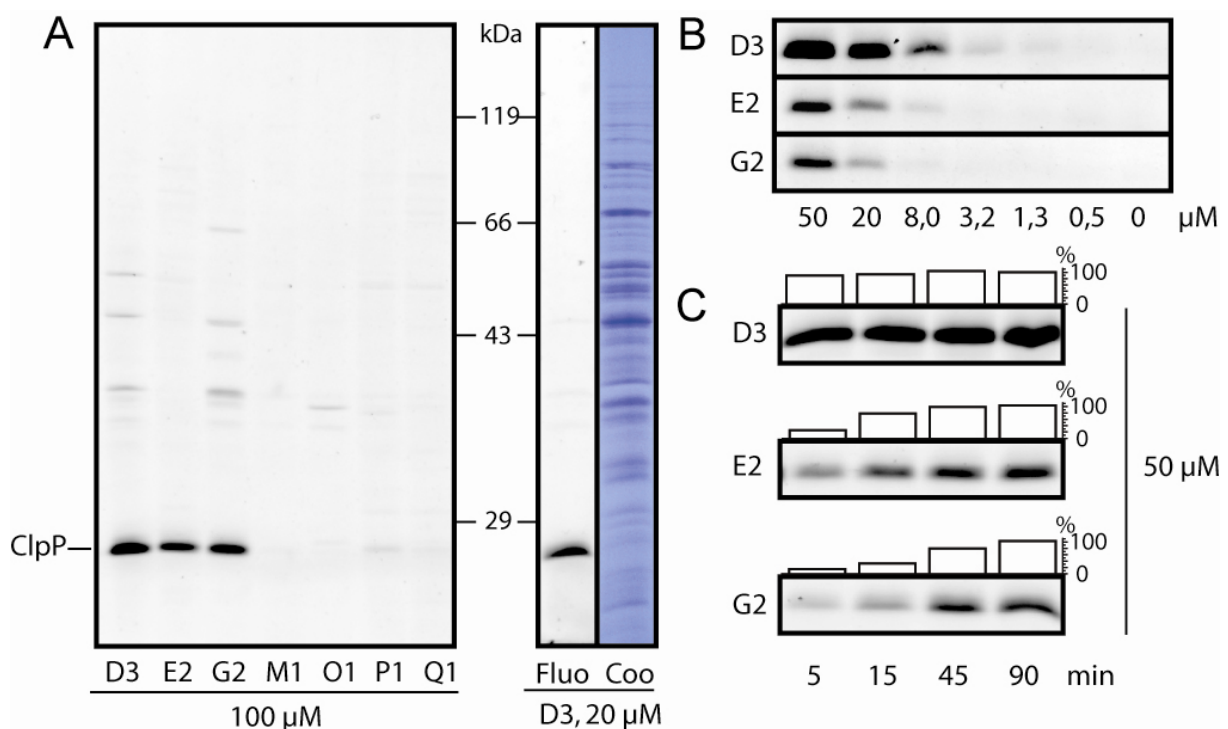


Abbildung 15: Identifikation potenter β -Lactonsonden für die Markierung von ClpP in lebenden Zellen von *S. aureus*. A) Nur drei Sonden, **D3**, **E2** und **G2** zeigen eine spezifische Markierung von ClpP. Vergleich der Fluoreszenzanalyse (Fluo) und der Coomassiefärbung bei 20 μ M Sondenkonzentration ergibt eine außergewöhnlich hohe Spezifität von **D3** für ClpP als Protein mit geringer Häufigkeit im Proteom. B) Die *In situ* Konzentrationsreihen zeigen höchste Sensitivität der ClpP Markierung für **D3** gefolgt durch **E2** und **G2**. C) Variierende Inkubationszeiten ergeben im Gegensatz zu **E2** und **G2** eine fast unmittelbare Sättigung des Angriffsziels durch **D3**.

ClpP erwies sich hierbei als cytosolisches Protein von geringer Häufigkeit im Proteom, wie aus einem Vergleich der Fluoreszenzaufnahme mit der Coomassie-Färbung hervorgeht.

Bei einer Sondenkonzentration unterhalb von 100 μM liegt eine bemerkenswerte Selektivität der Markierung für ClpP vor, wobei dieses als nahezu einziges Ziel in der Fluoreszenzaufnahme mit hoher Intensität markiert wurde und auch in Membran und extrazellulärem Proteom keine weiteren Bindungspartner auftraten. Anschließende *in situ* Dosisexperimente zeigten, dass die Sensitivität der Markierung in der Reihe **G2** < **E2** << **D3** zunahm und bereits geringe Konzentrationen ab 1,3 μM von **D3** für die Markierung und Detektion von ClpP ausreichten (Abbildung 15B). Die Sättigung der ClpP Markierung wurde für Sonde **D3** nahezu unmittelbar (90% in 15 min) erreicht, während 45 min für **E2** und ≥ 90 min für **G2** benötigt wurden. Dies lässt darauf schließen, dass das langkettige hydrophobe Lacton **D3** am besten geeignet ist, die zelluläre Lipidmembran zu durchdringen (Abbildung 15C).

Um zu testen, ob die Markierung des nativen ClpP Komplexes auch tatsächlich im aktiven Zentrum erfolgt, wurde eine genetische Mutation durchgeführt, bei welcher der Code für das aktive Serin 98 durch einen für Alanin ersetzt (Mutation Ser98Ala) und das resultierende Protein rekombinant in *E. coli* exprimiert wurde. Um weiterhin zu ermitteln, ob die Aktivität von ClpP durch die β -Lactone inhibiert wird, wurde rekombinantes *S. aureus* Wildtyp ClpP aufgereinigt und dessen Aktivität in einem Peptidaseassay mit dem fluorogenen Modellpeptid *N*-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcumarin verfolgt.^[113] Durch die Peptidaseaktivität von ClpP wird das Substrat gespalten und 7-Amido-4-Methylcumarin freigesetzt, dessen Fluoreszenz bei 450 nm gemessen werden kann. Alle drei β -Lactone, die ClpP markierten, konnten die Peptidaseaktivität von ClpP vollständig inhibieren.

Während **G2** den geringsten Effekt auf die Peptidaseaktivität mit einem IC_{50} von 31 μM hatte, zeigten die Sonden **D3** und **E2** wesentlich stärkere inhibitorische Effekte mit vergleichbaren IC_{50} Werten von 6 μM und 4 μM (Abbildung A7). Die Sonde **M1** hingegen, für die keine Markierung von ClpP beobachtet werden konnte, ergab keine Inhibition der Peptidaseaktivität von ClpP bei Konzentrationen bis zu 1,6 mM. Das mutierte Enzym (ClpP Ser98Ala) wurde durch die Sonde **D3** nicht markiert, was bestätigt, dass das aktive Zentrum mit Ser98 als katalytisch aktiver nukleophiler Rest der katalytischen Triade für die kovalente Bindung zum elektrophilen β -Lactonring verantwortlich ist (Abbildung A8). Die erfolgreiche *in situ* Markierung von ClpP und

die Inhibition seiner Aktivität durch β -Lactonsonden warfen die Frage auf, ob diese Moleküle auch die natürliche Funktion von ClpP in pathogenen Bakterien ausschalten und so die Produktion von Virulenzfaktoren reduzieren können, wie es für eine genetische Δ ClpP Mutante beschrieben wurde.^[107]

Hämolsine sind wichtige Virulenzfaktoren von *S. aureus*, welche Erythrozyten hauptsächlich durch die Wirkung von α - und β -Toxinen lysieren.^[114] Diese Toxine sind jeweils die Hauptursache für die Entwicklung von Hirnabszessen und Entzündungen der Sklera.^[115, 116] Tatsächlich konnte in Agarplatten-basierenden Tests mit 5% Schafblut die Inhibition der Hämolyse bei *S. aureus* NCTC 8325 für die β -Lactone **D3**, **E2** und **G2** gezeigt werden, während die Kontrollsonde **M1** keinen Effekt aufwies (Abbildung 16A, Abbildung A9A und Abbildung A10). Die relative Effizienz der Sonden korrelierte genau mit den Intensitäten der *in situ* Markierung von ClpP im Proteom mit **G2** < **E2** << **D3**. Die Verbindung **D3** vermochte bei Dosen über 125 nmol die Hämolyse sogar vollständig zu unterbinden ($ED_{50} = 34$ nmol). Die extrazelluläre Proteolyse stellt eine weitere wichtige Virulenzstrategie vieler pathogener Bakterien dar, die es ihnen ermöglicht in Gewebe einzudringen und der Immunantwort des Wirts zu entgehen.^[117] Entsprechende Assays auf 1% Milchagarplatten ergaben wiederum die Sonde **D3** als potenteste Verbindung ($ED_{50} = 11$ nmol) für die vollständige Inhibition der extrazellulären Proteolyse (Abbildung 16B, Abbildung A9B und Abbildung A10).

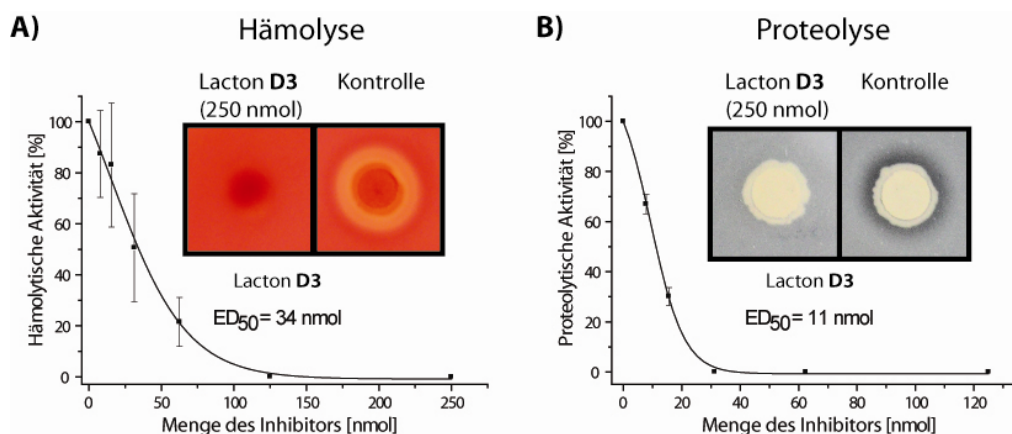


Abbildung 16: Inhibition der extrazellulären Virulenz durch β -Lactone in *S. aureus* NCTC 8325: A) Inhibition der Hämolyse und B) Inhibition der Proteolyse durch Sonde **D3** in Agarplatten-basierenden Assays.

Zusätzlich schützen auch DNasen und Lipasen die Bakterien vor der Antwort des wirtseigenen Immunsystems. Für Staphylococcus Lipase konnte so zum Beispiel

demonstriert werden, dass sie die phagozytische Zerstörung von *S. aureus* durch Granulozyten gravierend reduziert.^[118] Die Anwendung der Sonde **D3** auf *S. aureus* auf entsprechendem Testagar zeigte eine signifikante Reduktion der lipolytischen und DNase Aktivitäten (Abbildung A11). Basale Level der beiden Exoenzymaktivitäten wurden jedoch sogar noch bei den höchsten β -Lactondosen beobachtet, was vermuten lässt, dass eine Teilmenge der Lipasen und DNasen entweder weniger stark der Regulation durch ClpP unterliegen, oder sich nicht unter dessen Kontrolle befinden. Auch hier zeigte die Sonde **M1** als Kontrolle wiederum keinen Effekt (Abbildung A10). Es ist zu bemerken, dass die phänotypischen Eigenschaften unseres chemischen ClpP *Knockouts* in *S. aureus* exakt denen entsprechen, die für eine genetische Δ ClpP Mutante beschrieben wurden (Tabelle 3).^[107] Die jedoch größte Herausforderung in der Forschung nach neuen antibakteriellen Strategien ist die Behandlung von Infektionen, die durch hoch pathogene MRSA Stämme verursacht werden. Für diese wurden bislang jedoch keine Studien mit ClpP *Knockout* Mutanten beschrieben.

Tabelle 3: Vergleich der Inhibition von Virulenzfaktoren in Δ ClpP Mutanten mit den Effekten der phänotypischen und expressionalen Inhibition durch die β -Lactone.

Virulenzfaktoren herunterreguliert in einer Δ ClpP Mutante	Inhibition der Effekte extrazellulärer Virulenzfaktoren durch β -Lactone
α -Toxin (<i>hla</i>)* [#]	
β -Toxin (<i>hly</i>)* [#]	Hämolytische Aktivität
δ -Toxin (<i>hld</i>) (RNA III)*	
V8 Protease (<i>sspA</i>)*	
Aureolysin (<i>aur</i>)*	
Staphopain (<i>scpA</i>)*	Proteolytische Aktivität
Serin Protease (<i>spIB</i>)*	
Serin Protease (<i>spIC</i>)*	
Serin Protease (<i>spID</i>)*	
Triacylglycerin-Lipase (<i>lip</i>)*	Lipolytische Aktivität

*Herabsetzung auf Transkriptionslevel.^[99]

#Verminderte Proteinlevel im extrazellulären Medium.^[107]

Um herauszufinden, ob die Inhibition von ClpP einen globalen Ansatz zur Ausschaltung von Virulenzfaktoren darstellt, wurde der Effekt von Sonde **D3** auf die hämolytischen und proteolytischen Aktivitäten von klinischen MRSA Isolaten (DSM 18827 und Mu50) untersucht. Wie sich zeigte, wurden in der Tat die Aktivitäten jeweils um 70% beziehungsweise 100% verringert, was vermuten lässt, dass ClpP seine zentrale Rolle in der Regulation der Virulenz auch bei resistenten Stämmen ausübt (Abbildung A12). Dies verdeutlicht den Wert von β -Lactonen als mögliche Leitstrukturen zur Behandlung von MRSA Infektionen.

Somit konnte demonstriert werden, dass einige synthetischen β -Lactone der ABPP Sondenbibliothek als neue potentielle Leitstrukturen für die spezifische und selektive Markierung und Inhibition des zentralen Virulenzregulators ClpP in *S. aureus* und MRSA Stämmen verwendet werden können. Die Inhibition von ClpP in lebenden Zellen von *S. aureus* ergab in der Tat die Ausschaltung eines breiten Spektrums vieler verheerender Virulenzfaktoren wie Hämolysine, Proteasen, Lipasen und DNasen, die für die Eliminierung der Immunantwort des Wirts und viele Krankheitssymptome verantwortlich sind.^[107] Die meisten aggressiven Stämme produzieren zusätzlich Pyrogene Toxin-Superantigene (PTSAs), wie Enterotoxine oder das Toxische Schock Syndrom Toxin 1 (TSST-1).^[119]

Anders als die übrigen Virulenzfaktoren wurden PTSAs als direkte Ursache für viele schwere Krankheiten identifiziert. Unter anderem das toxische Schocksyndrom, das zu einer hohen Mortalität von infizierten Patienten führt sowie die Staphylococcal Lebensmittelvergiftung. Medikamente, welche die Expression von PTSAs verhindern oder reduzieren könnten, wären daher vielversprechende Kandidaten zur Behandlung schwerer Infektionskrankheiten, für die es bislang keine anderen Behandlungsoptionen gibt. Obwohl bisher keine direkte Verbindung zwischen der Expression von PTSAs und der Aktivität von ClpP bekannt ist, wird vermutet, dass zumindest Enterotoxin B, sich unter dessen Kontrolle befindet.^[120] Bei ClpP handelt es sich daher möglicherweise um ein Ziel für die Inhibition von PTSAs. Da ClpP in

vielen Pathogenen hoch konserviert ist, könnte diese Strategie einen globalen Ansatz für die Behandlung von Infektionskrankheiten durch die Entwaffnung des bakteriellen Virulenzrepertoires und anschließende Eliminierung der Bakterien durch die Immunantwort darstellen. Die Inhibition der Virulenz bietet viele Vorteile gegenüber konventionellen Antibiotika, wie die Bewahrung der nützlichen kommensalen Organismen der Magen- und Darmflora und den geringeren Selektionsdruck auf die Krankheitserreger, der zu verminderter Resistenzentwicklung führen dürfte.^[121, 122]

2.5. Optimierung der Inhibitoren

Da Sonde **D3** in ihrem Effekt den anderen Sonden der ursprünglichen Bibliothek weit überlegen war, wurde die Frage nach einer weiter optimierten ClpP Inhibitorstruktur aufgeworfen. Basierend auf **D3** wurden Strukturvarianten erzeugt, bei denen der Alkin-tag in Ringposition C4 für die Click Chemie der ABPP-Sonden durch weitere diverse Gruppen ersetzt wurde. Hierbei wurde eine Auswahl verschiedener Substituenten mit kleinem (**R1**), zyklischem (**S1**), langkettig aliphatischem (**T1**) und aromatischen (**U1**) Rest eingesetzt (Abbildung 17). Da ohne den Alkintag keine Markierung durch Click Chemie mehr möglich war, konnten diese β -Lactone nur als potentielle Inhibitoren, nicht jedoch als ABPP-Sonden eingesetzt werden. Mit diesen Derivaten der Sonde **D3** wurde die Inhibition von ClpP im fluorogenen Aktivitätsassay bestimmt und die Wirksamkeit gegen wichtige Virulenzfaktoren, insbesondere die gefährlichen PTSA's, durch *in situ* Experimente untersucht, um die sterischen Ansprüche für eine optimale Inhibition und Zellgängigkeit im lebenden Organismus zu evaluieren.

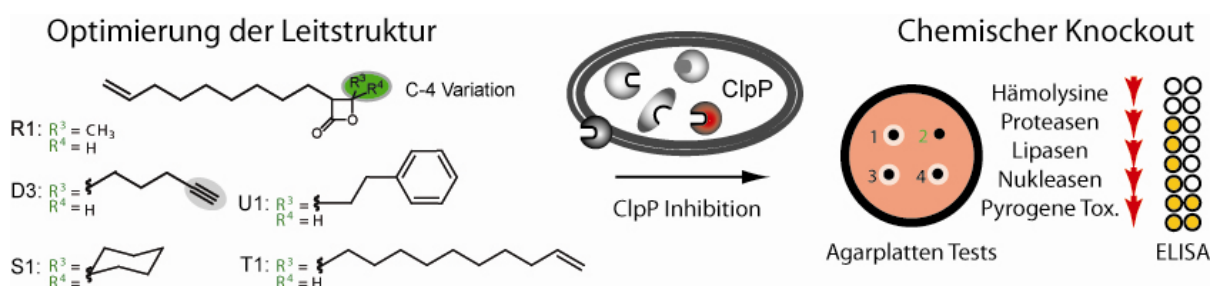


Abbildung 17: Sonde **D3** wurde als Leitstruktur für die Markierung und Inhibition von ClpP zur weiteren Optimierung verwendet. Hierbei wurden synthetische Derivate mit

Variation in Ringposition C4 auf ihre ClpP Inhibition und biologische Wirksamkeit gegen die Produktion von Virulenzfaktoren getestet.

Hierzu wurden zunächst lebende Zellen von *S. aureus* NCTC 8325 mit verschiedenen Konzentrationen der neuen β -Lactone **R1**, **S1**, **T1** und **U1** inkubiert (Abbildung 17). Nach der Lyse der Zellen wurde die Sonde **D3** zur kompetitiven Markierung der verbliebenen ungebundenen aktiven Zentren von ClpP hinzugegeben. Anschließende Click Chemie mit Rhodaminazid und Fluoreszenzanalyse der SDS-Gele ermöglichte die Ermittlung der relativen Stärke der Inhibitor-Enzym Wechselwirkung. Potente Inhibitoren sollten somit zu einer signifikanten Verringerung des Fluoreszenzsignals der kompetitiv wirkenden Sonde **D3** führen.

In der Tat vermochten die β -Lactone **R1** und **U1** die Markierungsintensität der Sonde **D3** signifikant zu reduzieren (Abbildung A13). Diese Resultate befinden sich in Übereinstimmung mit den entsprechenden Peptidase Aktivitätsassays mit rekombinantem ClpP, welches durch **R1** mit einem IC_{50} von 3 μ M und durch **U1** mit einem EC_{50} von 7 μ M inhibiert wurde (Abbildung A14). Die Hydrophobizität von **U1** führte jedoch zu Löslichkeitsproblemen im Assaypuffer und schränkte daher die Auswertung der vollständigen Peptidaseaktivität ein. Dennoch war für **U1** die Ermittlung eines EC_{50} Wertes möglich. Keine Inhibition der ClpP Aktivität wurde durch die β -Lactone **S1** und **T1** unterhalb von 40-60 μ M beobachtet. Bei höheren Konzentrationen zeigten diese Verbindungen zu geringe Löslichkeit, so dass keine EC_{50} oder IC_{50} Werte ermittelt werden konnten.

Das biologische Potenzial aller neuen Verbindungen und ihre Effekte auf die Expression der Virulenzfaktoren wurden in verschiedenen Agarplatten-basierenden Experimenten getestet, mit denen die Hämolyse, Proteolyse sowie Lipase und DNase Aktivitäten der Pathogene leicht visualisiert werden konnten. Hämolyseassays mit Antibiotika-sensitivem *S. aureus* NCTC 8325 ergaben, dass der Inhibitor **U1** mit einer Phenethylgruppe in Ringposition C4 eine stark erhöhte Wirksamkeit (4,9fach) mit einer Effektiven Dosis (ED_{50}) von 7 nmol im Vergleich zu der besten β -Lactonsonde **D3** (ED_{50} = 34 nmol) aufwies (Abbildung 18A und B).

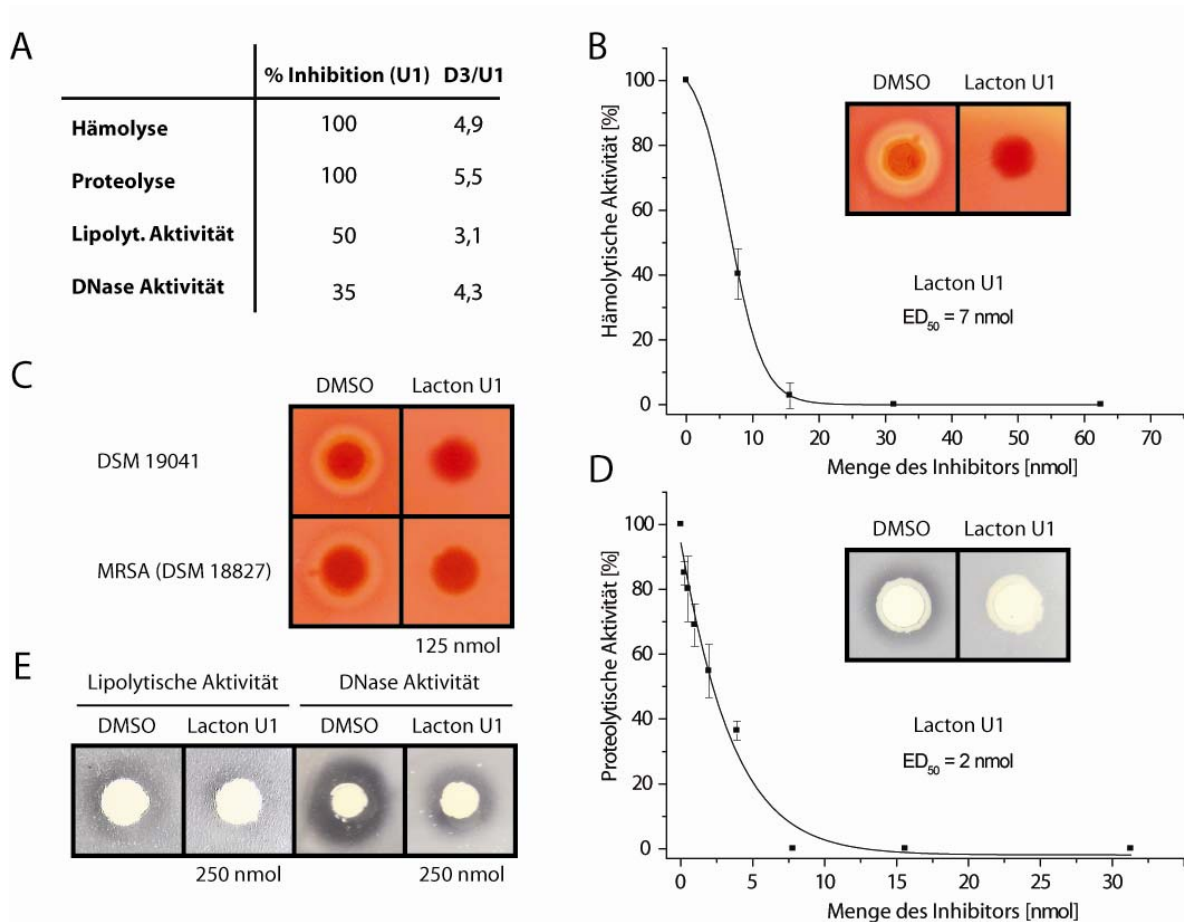


Abbildung 18: Inhibition der extrazellulären Virulenz durch β -Lactone. A) Inhibition der Virulenzfaktoren und relative Verbesserung des strukturell optimierten Inhibitors **U1** (250 nmol) relativ zum besten Lacton (**D3**) der ABPP Sondenbibliothek B) Inhibition der Hämolyse in Antibiotika-sensitivem *S. aureus* NCTC 8325 und C) Inhibition der Hämolyse im MRSA Stamm DSM 18827 und dem toxinproduzierenden Stamm DSM 19041 bei 125 nmol. D) Inhibition der Proteolyse in NCTC 8325 durch Lacton **U1** und E) partielle Inhibition der lipolytischen und DNase Aktivitäten.

Alle anderen Inhibitoren waren biologisch weniger aktiv (Abbildung A15 und Abbildung A16). Trotz dieser vielversprechenden Resultate, liegt die größte Herausforderung in der Behandlung von schweren Infektionen durch enterotoxinproduzierende multiresistente Stämme von *S. aureus*. Daher wurden die Effekte der ClpP Inhibition mit dem neuen optimierten β -Lacton **U1** in einem Methicillin resistenten *S. aureus* Stamm (MRSA, DSM 18827) und einem hochvirulenten toxinproduzierenden klinischen Isolat (DSM 19041) untersucht. Die Behandlung beider Stämme mit 125 nmol **U1** in Hämolyseassays ergab für das klinische Isolat eine vollständige und für den MRSA Stamm eine signifikant reduzierte

(80%) Hämolyse (Abbildung 18C und Abbildung A17). Das sperrige Lacton **T1** erwies sich als das einzige der neuen Generation, welches keinen Effekt auf die Hämolyse aufwies (Abbildung A16). Die Resultate weisen darauf hin, dass kurze hydrophobe Substituenten wie der Phenethylrest von **U1** in Ringposition C4 für die *in situ* Inhibition von ClpP besonders geeignet sind. Da über die verwendete Synthesestrategie das *trans*- β -Lacton **U1** nur als racemische Mischung zugänglich war, ergab sich die Fragestellung ob nur eines oder beide Enantiomere für die Inhibition von ClpP und die biologischen Effekte verantwortlich waren.

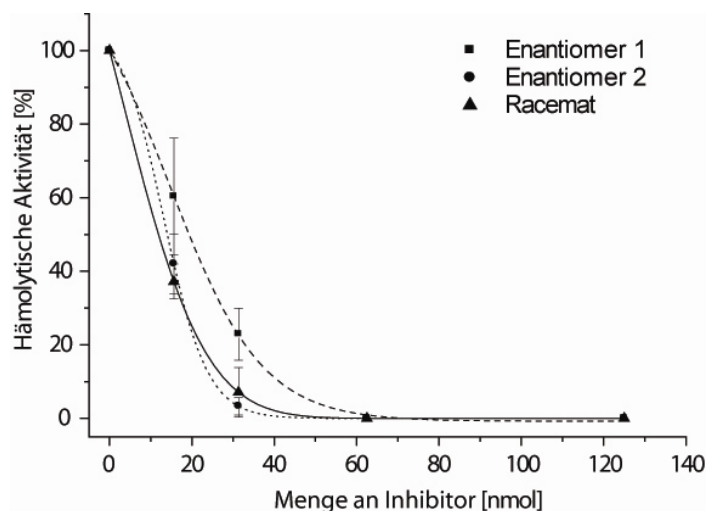


Abbildung 19: Agarplatten-basierender Hämolyseassay für beide Enantiomere und die racemische Mischung von Lacton **U1** mit *S. aureus* NCTC 8325.

Daher wurden die Enantiomere durch chirale HPLC aufgetrennt (Abbildung A18) und separat in Hämolyseassays eingesetzt. Das Enantiomer 1 zeigte nur eine geringfügig reduzierte (1,3fach) anti-hämolytische Aktivität im Vergleich zu Enantiomer 2, welches eine vergleichbare Aktivität wie das Racemat aufwies (Abbildung 19). Das racemische Gemisch ist daher dem besseren einzelnen Enantiomer gegenüber mindestens gleichwertig, womit für alle Studien das synthetisch leicht zugängliche Racemat weiterverwendet werden konnte.

Assays zur Messung der extrazellulären Proteolyseaktivität ergaben erneut **U1** als potenteste Verbindung mit $ED_{50} = 2$ nmol (5,5fach potenter als **D3**) zur vollständigen Inhibition dieses Virulenzeffekts in einem Agarplatten-basierendem Testsystem (Abbildung 18D). Auch die Aktivitäten der weiteren Virulenzfaktoren wie Lipasen und DNasen, wurden durch **U1** signifikant und wesentlich stärker als durch **D3** inhibiert (Abbildung 18A und E, Abbildung A19). Die β -Lactone **T1** und das Kontrolllacton **M1**,

welches als ABPP Sonde ClpP nicht inhibiert, zeigten in diesen Tests keine Effekte auf die Virulenzfaktoren (Abbildung A16).

2.6. Ausschaltung von PTSAs

Mit dem optimierten Inhibitor **U1** konnten nun die Effekte einer ClpP Inhibition auf die Expression der gefährlichen PTSAs von *S. aureus* evaluiert werden, deren Regulation noch nicht in früheren genetischen *Knockout* Studien untersucht worden waren. Der Grund hierfür liegt in dem großen Spektrum diverser PTSAs, die in unterschiedlicher Kombination in den einzelnen Stämmen von *S. aureus* auftreten. Während manche Stämme keine PTSAs produzieren, stellen andere nur ein einziges oder sogar eine ganze Palette von ihnen her. Neben dieser Heterogenität in der Expression von Virulenzfaktoren in *S. aureus* Stämmen, sind auch ihre Regulationsnetzwerke sehr verschieden.

Daher wurden verschiedene Stämme von *S. aureus* (DSM 19041, Mu50) die unterschiedliche PTSAs produzieren mit **U1** (2,5 mM) in Kulturmedium inkubiert und anschließend das extrazelluläre Medium gewonnen. In einem Sandwich ELISA Immunoassay Toxin Test konnte gezeigt werden, dass der chemische *Knockout* von ClpP durch **U1** zu einer signifikanten Verringerung der Mengen vieler wichtiger sekretierter Toxine führte. Hierbei wurden die PTSA Level von Enterotoxin B (SEB) im Stamm DSM 19041 um 68% und von Enterotoxin C3 (SEC3) im MRSA Stamm Mu50 um 89% vermindert (Abbildung 20). Anders als Enterotoxin A (SEA), das weniger stark inhibiert wurde, gehören SEB und SEC3 zur gleichen Gruppe von Enterotoxinen und bilden zusammen mit dem Toxischen Schock Syndrom Toxin 1 (TSST-1) die Gruppe der für Infektionskrankheiten am meisten relevanten PTSAs. Konsistent mit diesen Daten zeigte sich, dass auch die Expression von TSST-1 nach Behandlung der Kulturen mit 2,5 mM **U1** um 90% inhibiert und sogar bei nur 156 µM **U1** noch zu 75% reduziert wurde. Dies ergab sich aus einem reversen passiven Latexagglutinationstest mit den Kulturüberständen des MRSA Stamms Mu50 (Abbildung A20).

Diese Resultate weisen auf die bisher unerreichte Nützlichkeit des optimierten ClpP Inhibitors **U1** für eine globale Inhibition der Virulenz von *S. aureus* Stämmen hin. Dies ist besonders im Hinblick auf Infektionen mit schwer bis nicht behandelbaren MRSA

und hoch virulenten Stämmen wichtig wie Mu50 und DSM 19041, die große Mengen an PTSAs produzieren.

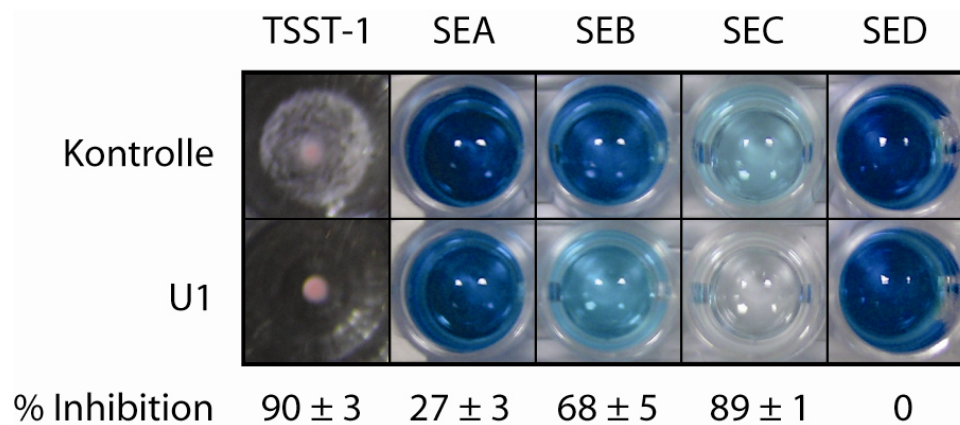


Abbildung 20: Immunoassays der Inhibition wichtiger Pyrogener Toxine (PTSAs) von *S. aureus*. Die filtrierten Überstände von *S. aureus* Kulturen, gewachsen in Gegenwart von Lacton **U1** (2,5 mM) und DMSO (Kontrolle), wurden für die Ermittlung der Inhibition der Enterotoxine A (SEA), B (SEB), C (SEC) und D (SED) und des Toxischen Schock Syndrom Toxins 1 (TSST-1) in Immunoassays herangezogen. Starke Effekte zeigten sich für SEB (Stamm DSM 19041) sowie für SEC3 und TSST-1 (MRSA Stamm Mu50).

Während die Regulation von PTSAs durch ClpP bisher nicht in genetischen *Knockout* Studien untersucht wurde, lassen die Resultate aus der chemischen Inhibition von ClpP darauf schließen, dass die krankheitsrelevanten PTSAs SEB, SEC3 und TSST-1 ebenfalls unter der Kontrolle von ClpP liegen.

Zusammenfassend konnte mit **U1** also eine optimierte Struktur basierend auf der ABPP Sonde **D3** mit vier- bis fünffach verbesserter *in situ* Wirksamkeit für die Inhibition von ClpP in *S. aureus* etabliert werden. Der chemische *Knockout* von ClpP ermöglicht die Ausschaltung eines breiten Spektrums diverser Virulenzfaktoren einschließlich Hämolytinen und hoch toxischer PTSAs, was im Fall der bereits untersuchten Virulenzfaktoren mit den genetischen *Knockout* Studien von ClpP korreliert. Vorausgehende Untersuchungen demonstrierten bereits die enorme Verringerung der Virulenz eines genetischen ClpP *Knockout* Stamms im Abszess-Mausmodell.^[107] In diesem Fall erwiesen sich die Bakterien ohne ClpP als nicht mehr virulent und wurden durch das Immunsystem eliminiert. ClpP stellt daher ein vielversprechendes Ziel und die entsprechenden β -Lactone aussichtreiche

Kandidaten für die Entwaffnung pathogener Bakterien als zukünftige medizinische Behandlungsstrategie bei Infektionskrankheiten dar. Solche Inhibitoren virulenzassoziierter Enzyme könnten erhebliche Vorteile gegenüber konventionellen Antibiotika bieten, wie die Bewahrung des wirtsendogenen Microbioms sowie einen verringerten Selektionsdruck, was durch verminderte Resistenzbildung zu Medikamenten führen könnte, die auch über einen längeren Zeitraum noch wirksam sind.^[121]

2.7. Bestimmung der Kristallstruktur von ClpP

Die strukturellen Eigenschaften des neuen Inhibitors **U1** und seiner strukturverwandten Sonden und Inhibitoren ermöglichen Rückschlüsse auf die Präferenzen der Substratbindetaschen von ClpP und sollen die Entwicklung neuer Strukturen auf dem Weg zu einem klinischen Kandidaten für den therapeutischen Einsatz und weitere Studien zur Rolle von ClpP in der Regulation der Virulenz ermöglichen.

In diesem Zusammenhang ergab sich die Frage, wie die Bindung des Inhibitors im aktiven Zentrum von ClpP zustande kommt und welche sterischen Ansprüche die Bindungsaffinität bedingen. Daher wurde in einem Kooperationsprojekt[#] die Kristallstrukturbestimmung von ClpP vorgenommen. Unter vielen Kristallisationsbedingungen im *hanging drop* Verfahren konnten Kristalle von hoher Qualität erhalten werden. In Abbildung A21 sind Beispiele dieser Kristalle aufgeführt. Während sich unter den meisten Bedingungen mit 50% PEG 3350 und verschiedenen Salzen flache, aber sehr dünne Kristalle bildeten (Abbildung A21A), wurden unter einigen Bedingungen mit Ammoniumsulfat und Natriumacetat große hexagonale, sphärische Kristalle erhalten, die sich für eine Strukturanalyse eigneten (Abbildung A21B, C und D). Die Analyse des N-Terminus von ClpP mittels Edman Abbau von ClpP ergab als N-terminale Sequenz MNLI, was bedeutet, dass keine posttranslationale Prozessierung des N-Terminus von *S. aureus* ClpP stattgefunden hat, wie es für den verlängerten N-Terminus von *E. coli* ClpP der Fall ist. Eine Kristallstruktur mit gebundenem Inhibitor im aktiven Zentrum konnte zwar weder

[#]Kooperation mit Dipl. Chem. Sebastian Geiger aus der Gruppe von Professor Dr. Patrick Cramer, Genzentrum München, LMU, Feodor-Lynen-Strasse 25, 81377 München. Unpublizierte Ergebnisse.

durch Cokristallisation noch durch das *soaking* Verfahren mit bereits bestehenden Proteinkristallen erhalten werden, doch ließ sich erstmals eine die Struktur von nativem ClpP von *S. aureus* mit einer hohen Auflösung von 2,4 Å ermitteln. Die Struktur konnte aus dem Röntgenbeugungsmuster direkt durch *molecular replacement* unter Zuhilfenahme der bereits bekannten ClpP Struktur von *Streptococcus pneumoniae*^[123] gelöst werden (Abbildung 21).

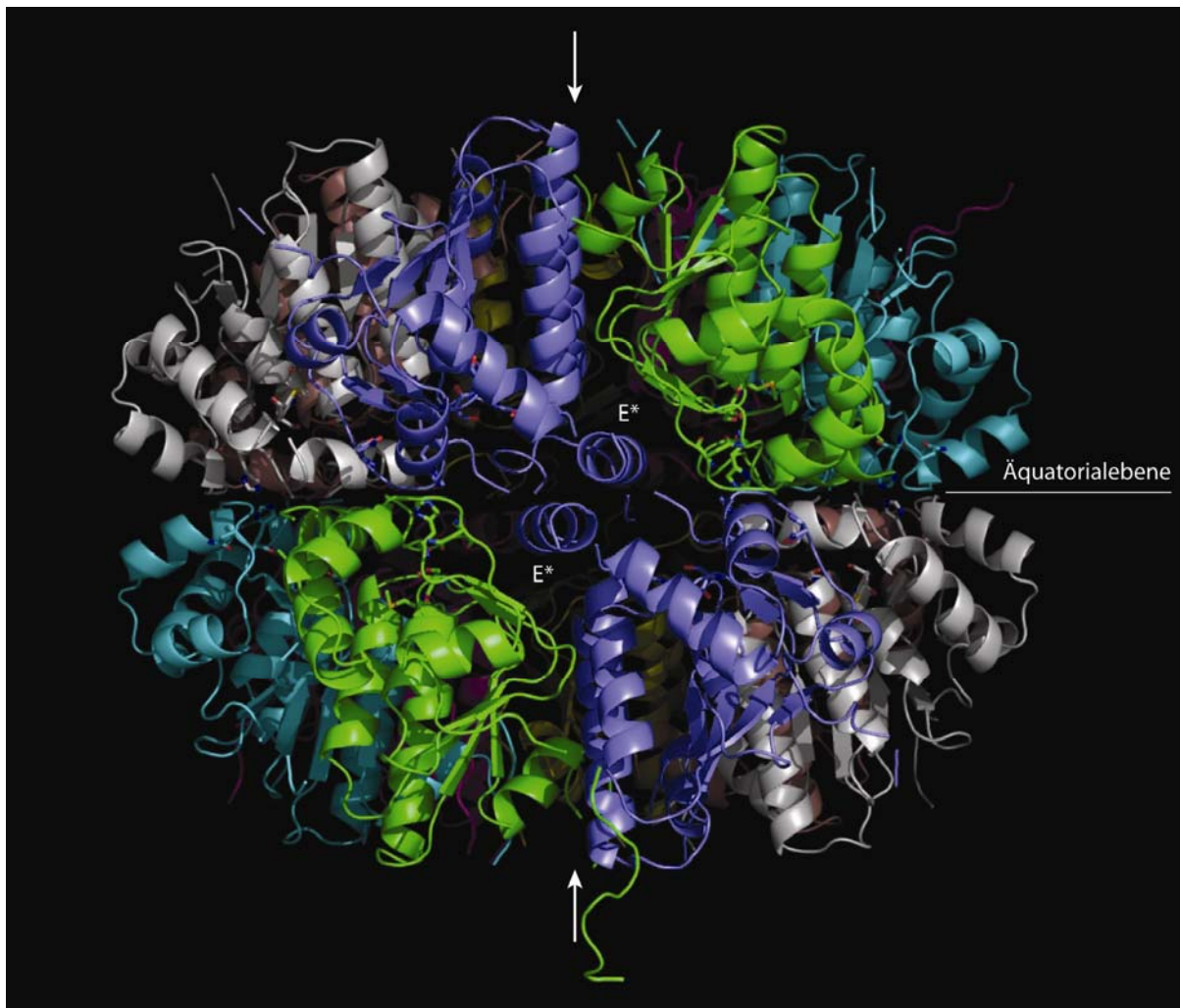


Abbildung 21: Kristallstruktur des tetradekameren ClpP Komplexes (ClpP₁₄). Der Zugang von Proteinen und Peptiden für den Abbau erfolgt über die beiden Poren (durch Pfeile markiert), die zur zentralen Kavität führen, in welcher der Abbau der Peptide erfolgt.

Im Vergleich mit der ClpP Kristallstruktur anderer Spezies ergeben sich zwar einige Unterschiede, wie eine einzigartige abgewinkelte Helixstruktur (Helix E*) am C-Terminus, doch im Wesentlichen sind sich die Strukturen sehr ähnlich, was auf die hohe Homologie der Strukturen in verschiedenen Spezies zurückzuführen ist (Abbildung A22). Wie bereits beschrieben, baut auch ClpP von *S. aureus* einen

homotetradekameren Komplex aus zwei übereinander liegenden heptameren Ringen auf. Die aktiven Zentren mit jeweils einer katalytischen Triade bestehend aus Ser98, His123 und Asp172 liegen in der Äquatorialebene an der Schnittstelle beider Ringe (Abbildung 21). Bei allen Versuchen einer Cokristallisation oder dem *soaking* von β -Lacton zeigten die erhaltenen Kristalle mit gebundenem Inhibitor im Röntgenstrahl keine ausreichende Streuung mehr. Dies ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Bindung in das aktive Zentrum zu einer Konformationsänderung führt, die letztlich eine Auflösung der Kristallkontakte bewirkte. Die Orientierung des Inhibitors bei der Bindung in das aktive Zentrum konnte in ersten Modellierungsansätzen noch nicht festgelegt werden. Eine genaue Analyse der Ausstattung und Dimensionen der Bindetaschen sollen es ermöglichen, durch strukturbasierendes Design neue potentere Inhibitoren mit verbesserter Affinität und Löslichkeit zu entwickeln.

2.8. Wechsel des Pathogens: *Listeria*

2.8.1. Markierungsversuche und Virulenzfaktoren

ClpP ist als hoch konserviertes Protein in allen pathogenen Bakterien vorhanden. Daher stellte sich die Frage, ob auch die Inhibition von ClpP durch β -Lactone als globaler Ansatz mit breiter Anwendung gegen verschiedene Krankheitserreger eingesetzt werden könnte. *S. aureus* wird vorwiegend als extrazellulär lebendes bakterielles Pathogen betrachtet, das die Schädigung des Wirts durch die spezifische Interaktion bakterieller Enzyme und Toxine mit den Wirtsproteinen erreicht. Diese Virulenzfaktoren helfen den Bakterien der Erkennung und Zerstörung durch die Immunantwort des Wirtes zu entgehen, tragen zur Freisetzung und Aufnahme von Nährstoffen bei und erleichtern die Verbreitung auf angrenzende Gewebe. Im Gegensatz zu *S. aureus* haben viele andere bakterielle Pathogene einen vorwiegend intrazellulären Infektionsweg. Unter diesen finden sich wichtige Pathogene wie *Salmonella typhimurium*,^[124] *Legionella pneumophila*,^[125] und *Yersinia pestis*,^[126] die jeweils die Ursache für schwere bakterielle Infektionen sind. Die intrazelluläre Umgebung schützt diese Bakterien vor der Immunantwort und verringert ihre Suszeptibilität für antibiotische Medikamente, was ihre Behandlung zu einer besonderen Herausforderung macht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es

daher von großem Interesse die Anwendbarkeit der Virulenzinhibition durch Ausschaltung von ClpP mit β -Lactonen für ein intrazelluläres Pathogen zu untersuchen. Der intrazelluläre Lebenszyklus von *Listeria monocytogenes*, welche bei Lebensmittelvergiftungen Bedeutung erlangt hat, wurde besonders gut charakterisiert und wurde daher als Modellsystem für die intrazelluläre Pathogenese etabliert.^[127, 128] Darüber hinaus ist *L. monocytogenes* die Ursache von Listeriose, einer schweren humanen Erkrankung. Obwohl die Inzidenzrate für Listeria Infektionen gering ist, haben etwa 30% der Listeriosefälle im Menschen einen tödlichen Ausgang, trotz frühzeitiger Behandlung mit Antibiotika.^[129] *L. monocytogenes* startet die Invasion in eukaryotische Zellen entweder passiv (Aufnahme durch Makrophagen) oder über die hoch entwickelte Manipulation des wirtseigenen Signalsystems. Einmal in der Zelle, beginnen die Bakterien die azidifizierten Phagosomen durch die Wirkung von Listeriolysin O (LLO) zu lysieren und das Aktin der Wirtszelle zu rekrutieren und polymerisieren (Abbildung 22). Der sich hinter dem Bakterium aufbauende Aktinschweif stößt die Zelle nach vorne und gibt somit dem Pathogen die Motilität, sich selbst durch die Membranen in eine Nachbarzelle zu bohren, ohne dabei die intrazelluläre Umgebung zu verlassen.^[128, 129] Die Lyse der sekundären Doppelmembran Vakuolen wird erneut durch LLO und die Listeria Phospholipasen C (PLC) ermöglicht.^[130, 131]

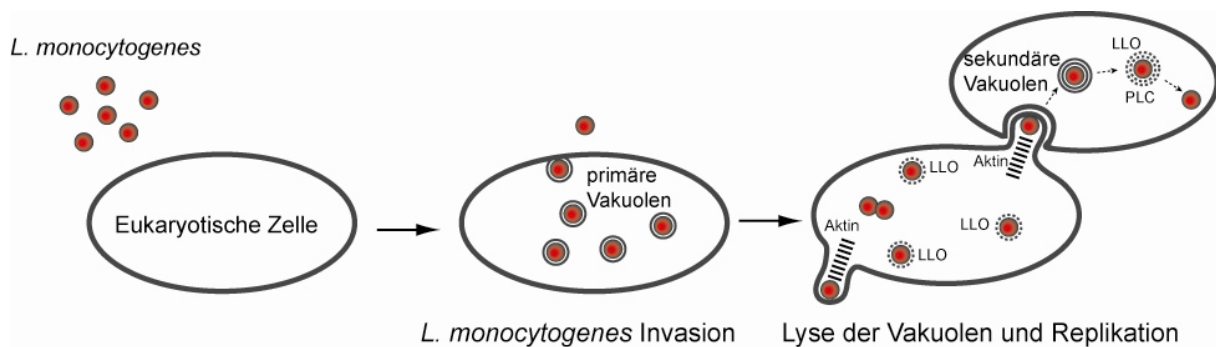


Abbildung 22: Invasion von *L. monocytogenes* in eukaryotische Zellen. Nach Lyse der primären Vakuolen durch LLO stoßen sich die Pathogene durch Polymerisation von Aktin in benachbarte Zellen, wo sie sich mittels LLO und PLC aus den sekundären Vakuolen befreien.

Vorhergehende Studien mit einem genetischen *Knockout* von ClpP in *L. monocytogenes* ergaben eine erheblich verringerte Virulenz in einem Makrophagen Infektionsassay, vermutlich über die Herabregulierung von LLO. In einem Maus

Infektionsmodell war dieser ClpP *Knockout* Stamm wie bei *S. aureus* nicht mehr pathogen.^[101]

In den anfänglichen Versuchen mit der β -Lacton Bibliothek konnte bereits gezeigt werden, dass einige ABPP-Sonden spezifisch ClpP in Lysaten und lebenden Zellen von nicht pathogenen *L. welshimeri* markieren. Als Folgeexperimente wurden nun diese Studien auf Stämme der verwandten pathogenen *L. monocytogenes* ausgeweitet. Ein Vergleich von *L. welshimeri* mit den *L. monocytogenes* Stämmen EGD-e und F2365 ergab eine starke Markierung von ClpP auch für diese pathogenen Stämme (Abbildung A23). Es wurde daher eine *in situ* Markierung von *L. monocytogenes* EGD-e durch die bestehende Bibliothek von *trans*- β -Lacton ABPP-Sonden durchgeführt (Abbildung 10A). Nach der Zellyse wurden die markierten Proteine mit Rhodaminazid über Click Chemie verbunden und die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse der Fluoreszenzmarkierung ergab, dass die Verbindungen **D3** und **N1** bei einer Konzentration von 50 μ m als potenteste Sonden für die Markierung von ClpP auftraten, gefolgt von **G2** und **E2** (Abbildung 23). Während ClpP als Hauptziel dieser Sonden auftrat, wurden nur sehr schwache Markierungen anderer Enzyme beobachtet. Eine Identifizierung über Massenspektrometrie (Abbildung 23, Tabelle A3) ergab, dass außer ClpP keines der weiteren markierten Ziele eine wichtige Rolle in der Virulenz aufweist.

Interessanterweise wurde selbst bei 1 mM **D3** keine stärkere Markierung von anderen Zielen als ClpP gefunden (Abbildung 23). Lediglich eine schwache Verstärkung der Markierungsintensität von KAS II, das in die Fettsäurebiosynthese involviert ist, konnte beobachtet werden. Daher ist es plausibel, dass selbst bei diesen hohen Konzentrationen die biologischen Effekte der β -Lactone einzig auf die Inhibition von ClpP zurückzuführen sind.

Wie bereits für *S. aureus* gezeigt werden konnte, erfolgt die Inhibition der Aktivität von ClpP über die kovalente Modifikation des Serinrests im aktiven Zentrum. *S. aureus* ClpP und *L. monocytogenes* ClpP teilen über 79,1% Sequenzidentität (Abbildung A24) und können daher als nahezu identisch behandelt werden.

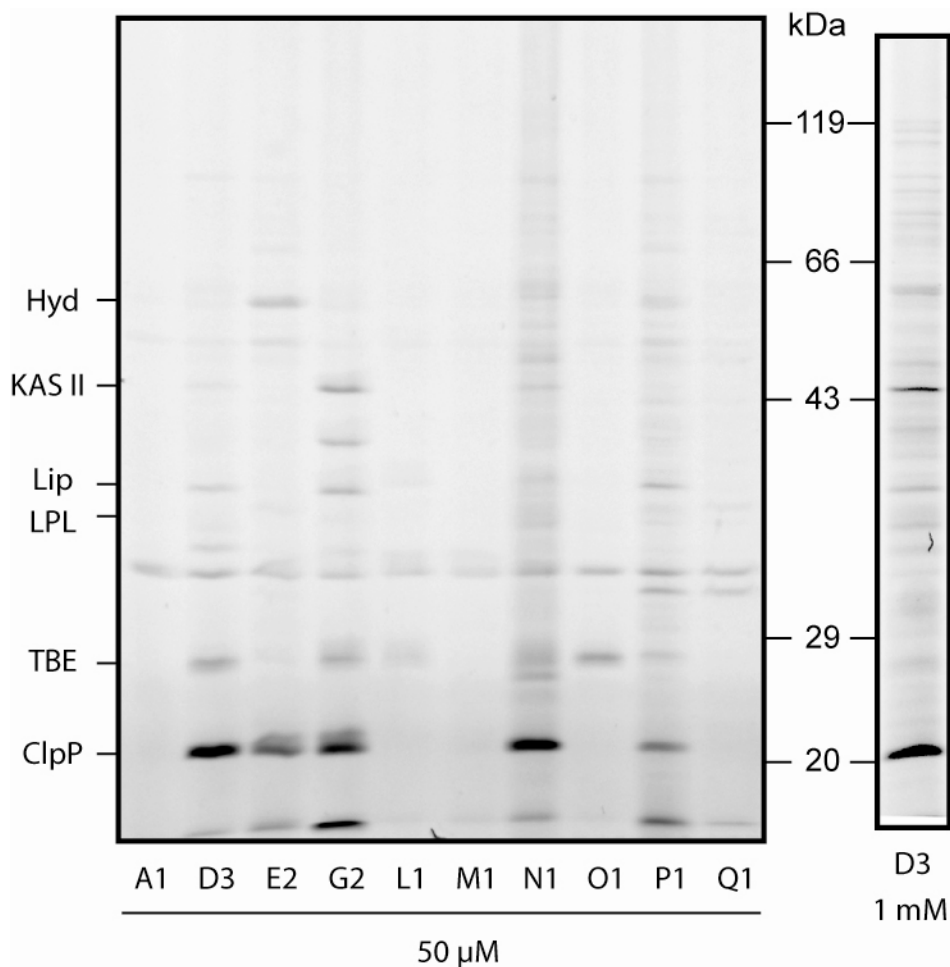


Abbildung 23: Markierungsprofil lebender *L. monocytogenes* EGD-e Zellen (Cytosol) mit allen β -Lacton ABPP-Sonden bei 50 μ M (links) und 1 mM der Sonde **D3** (rechts). ClpP wird präferentiell durch die Sonden **D3**, **E2**, **G2** und **N1** markiert.

Ihre enge phylogenetische Verwandtschaft lässt darauf schließen, dass in *Listeria* neben der starken Markierung von ClpP durch die Sonden **D3** und **N1** das Enzym auch von diesen inhibiert wird. Ein entscheidender Virulenzfaktor für die Pathogenese von *L. monocytogenes* ist LLO, ein porenbildendes Protein, das zur Familie der cholesterinabhängigen Cytolysine gehört. LLO erfüllt mehrfache Funktionen in der Pathogenese, wie die Lyse von primären und sekundären Vakuolen in den eukaryotischen Zellen, die das Entkommen der Bakterien aus diesen ermöglicht sowie die Induktion proinflammatorischer Reaktionen.^[132] Durch die Bildung von Poren kann LLO die Membranen von Säugetier Erythrozyten zerstören (Hämolyse), was quantitativ zur Messung der hämolytischen Aktivität herangezogen werden kann. Da die Hämolyse Aktivität von *Listeria* sich als wesentlich geringer ausgeprägt als in *S. aureus* erwies, konnten hierbei keine Agarplatten-basierenden Tests eingesetzt werden. Um zu ermitteln, ob eine

chemische Inhibition von ClpP durch β -Lactone in lebenden *L. monocytogenes* die Expression von LLO herunterregulieren kann, wurden daher Hämolyseassays mit den Kulturüberständen von *L. monocytogenes* EGD-e Kulturen durchgeführt, die mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen β -Lactone inkubiert worden waren. Diese Kulturüberstände wurden in seriellen Verdünnungen in Microtiterplatten mit Schaferythrozyten inkubiert. Anschließende Zentrifugation ermöglichte die Sedimentation intakter Blutzellen, während lysierte Zellen eine klare rote Lösung ergaben.^[133] Neben den Sonden **D3** und **N1**, die eine effiziente Markierung von *L. monocytogenes* ClpP aufwiesen, wurde auch der Effekt des für *S. aureus* optimierten Inhibitors **U1** untersucht, sowie die weniger intensiv markierenden Sonden **G2** und **E2** und als Kontrollen die Sonden **M1** und **O1**. Es zeigte sich, dass in der Tat **U1** und **N1** eine signifikante Reduktion der hämolytischen Aktivität bis zu 90% mit einem EC_{50} von jeweils 30 μ M bewirkten, während **D3** weniger effektiv war (80% Inhibition, $EC_{50} = 80 \mu$ M; Abbildung 24A und Abbildung A25). Geringere Aktivitäten wurden für die Sonden **G2** und **E2** mit EC_{50} Werten von 180 und 120 μ M ermittelt. Die Sonden **M1** und **O1**, die beide nicht ClpP markierten, ergaben keinen Effekt auf die Hämolyse. Diese Resultate befinden sich in guter Übereinstimmung mit den Markierungsexperimenten und weisen darauf hin, dass *L. monocytogenes* ClpP eine Präferenz für lange aliphatische Ketten (**D3** und **N1**) und in geringerem Maße auch aromatische Gruppen (**E2**) aufweist. Daher besitzt **U1** offensichtlich die ideale Kombination aus einer langen aliphatischen und einer aromatischen Seitengruppe für die Inhibition von ClpP. Zusätzlich zu LLO sind auch Phospholipasen C (PLC) entscheidende Virulenzfaktoren, die mit pathogenen Listeria Stämmen in Verbindung stehen. Der chromogene ALOA (Agar Listeria Ottaviani & Agosti) Listeria Nachweisagar ermöglicht es auf einfache Weise die Aktivität der virulenzassoziierten Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) durch das Auftreten einer opaken Zone um die Kolonien zu messen.

Diese Zone entsteht durch die Hydrolyse von zugesetztem Phosphatidylinositol durch PI-PLC.^[134] Von dieser Phospholipase ist bekannt, dass sie zum Überleben von Listeria in der Wirtszelle beiträgt und ihre Ausschaltung zu einer verringerten Virulenz in der Maus führt.^[131, 135] Wie in Abbildung 24B gezeigt führt eine Behandlung mit **U1** zu einer um etwa 50% verringerten PI-PLC Aktivität. Hierbei ist zu bemerken, dass weder LLO als porenbildendes Protein noch PI-PLC, dessen aktives Zentrum keine

entsprechenden nukleophilen Reste enthält,^[136] zum Zielspektrum der β -Lactone gehören.

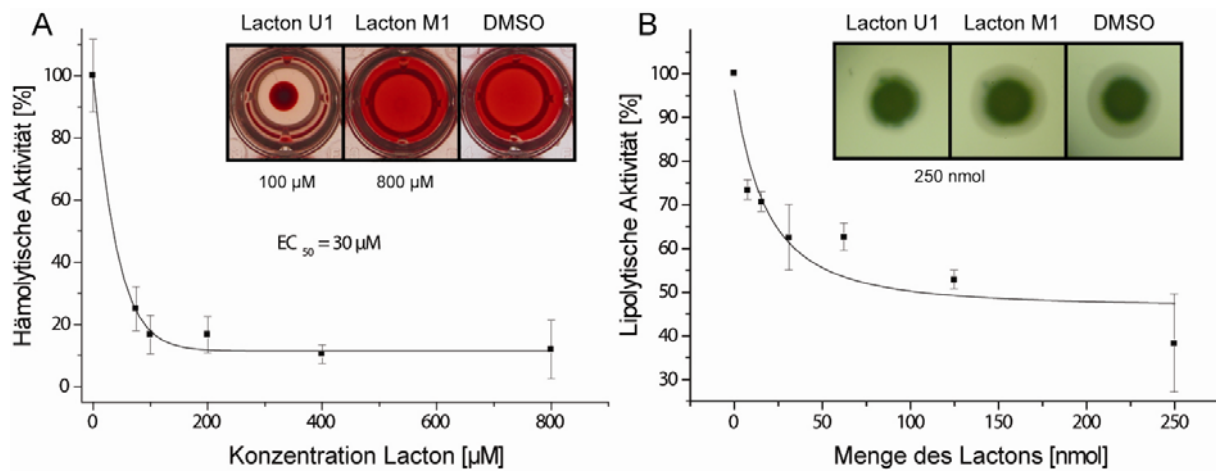


Abbildung 24: Verringerung der extrazellulären hämolytischen und lipolytischen Aktivitäten. A) Die hämolytische Aktivität von LLO von *L. monocytogenes* EGD-e wird bei Kulturen, die in Gegenwart von Lacton **U1** wuchsen mit einem EC_{50} von 30 μ M stark inhibiert. Die geringen LLO Level sind durch die Sedimentation intakter Blutzellen für die Behandlung mit **U1** sichtbar, während die Vorbehandlung mit dem Kontrolllacton **M1** (sogar bei 800 μ M) oder DMSO die vollständige Lyse der Blutzellen nicht unterbinden. B) Die Anwendung von **U1** in einem Agarplatten-basierenden Assay führt zu einer verringerten PI-PLC Aktivität (bis zu 50%).

Dies unterstützt die Hypothese, dass die Inhibition von ClpP die einzige Ursache für die beobachtete Herabregulierung dieser Virulenzfaktoren ist. Im Fall von LLO wurde dieser Effekt bereits für einen genetischen ClpP *Knockout* beschrieben,^[101] während der Effekt einer ClpP Deletion auf die Expression von PI-PLC bisher noch nicht untersucht worden ist. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass in der Tat die LLO und PI-PLC Expression unter der Kontrolle von ClpP liegen, da beide koordiniert exprimiert werden.^[137]

2.8.2. Inhibition der Virulenz in Makrophagen

Die herabgesetzte Aktivität zweier wichtiger Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* durch den ClpP Inhibitor **U1** warf die Frage auf, ob diese Methode auch dazu verwendet werden könnte, um die Invasion oder intrazelluläre Replikation von *L. monocytogenes* in eukaryotischen Zellen zu inhibieren oder zu verringern. Um toxische Effekte des β -Lactons **U1** auf eukaryotische Zellen bereits im Vorfeld

ausschließen zu können, wurden dessen biologische Effekte auf menschliche HeLa Zellen untersucht. Hierbei wurde der WST-1 Zellproliferationstest angewandt, mit dem in lebenden Zellen die metabolische Aktivität durch die Spaltung eines chromogenen Tetrazoliums Salzes (WST-1) durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Reduktase System verfolgt werden kann. Es ergaben sich hierbei 24 h nach Behandlung weder mikroskopisch erkennbare Veränderungen der Zellmorphologie, noch kam es zu einer signifikanten Inhibition der Zellproliferation von HeLa Zellen sogar bei hohen Konzentrationen von 1 mM Lacton **U1** (Abbildung A26). Im nächsten Schritt wurde das Potenzial von **U1** in einem Listeria Infektionsassay mit eukaryotischen Zellen getestet. In diesem Assay wurde eine Monoschicht der Maus Makrophagen-ähnlichen Zelllinie J774 in 96-Well Platten ($\sim 2 \cdot 10^5$ Zellen pro Well) mit *L. monocytogenes* EGD-e mit 1 mM **U1** oder DMSO als Kontrolle infiziert.^[101] Extrazelluläre Bakterien wurden nach der Infektion durch DMEM Medium mit 10 mg/mL Gentamicin abgetötet, eine Konzentration des Antibiotikums, bei der nur extrazelluläre, nicht jedoch intrazelluläre Bakterien beeinträchtigt werden. Die Makrophagen wurden durch eine eiskalte Lösung von 0,05% Triton X-100 in sterilem deionisiertem Wasser lysiert und intrazelluläre Bakterien durch Ausplattieren von Verdünnungsreihen auf ALOA Agar und Zählung der Kolonien quantifiziert. Als Kontrolle wurden Makrophagen mit 1 mM **U1** auf gleiche Weise wie bei den Infektionsexperimenten behandelt und der Anteil an intakten Zellen nach 5 h mit Trypanblaufärbung bestimmt. Der Diazofarbstoff wird hierbei nur von beschädigten oder toten Zellen aufgenommen, während intakte lebende Zellen diesen nicht aufnehmen können, so dass der Unterschied durch Mikroskopie ausgewertet werden kann. Die Anzahl der lebenden Zellen in einer mit **U1** behandelten Probe war vergleichbar mit denen einer unbehandelten Probe, was darauf schließen lässt, dass die Verbindung die Viabilität der Makrophagen nicht beeinflusst.

Obwohl die Invasion der Bakterien bei Lacton und Kontrolle sich als etwa gleich stark erwies, ergab die Lyse der Macrophagen nach 3 h und 5 h nach der Infektion ein signifikant geringeres Wachstum in den eukaryotischen Zellen bei Behandlung mit **U1** (reduziert auf etwa 76% des Kontrollansatzes; Abbildung 25).

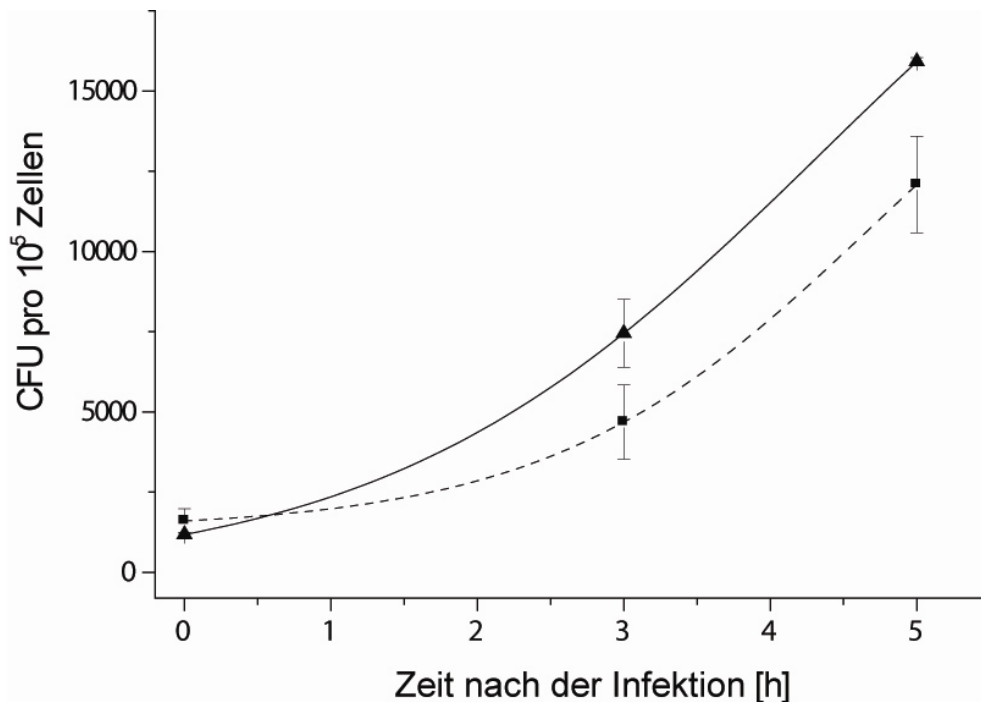


Abbildung 25: Intrazelluläre Replikation von *L. monocytogenes* EGD-e in der Maus Makrophagen-ähnlichen Zelllinie J774 als koloniebildende Einheiten (colony-forming units, CFU) pro 10⁵ eukaryotischen Zellen. Das Wachstum der mit **U1** behandelten Bakterien (----■----) verringerte sich signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DMSO (—▲—).

Dennoch, das Wachstum von *L. monocytogenes* konnte nicht vollständig unterbunden werden. Die Ursache hierfür dürfte in der eingeschränkten Aufnahme des Lactons liegen, welches mindestens zwei Membranen überwinden muss, um die intrazellulären Bakterien zu erreichen. In den kritischen Phasen des Infektionszyklus, wenn die Inhibition von LLO und PLCs einen maximalen Effekt leisten kann, befinden sich die Bakterienzellen in primären oder sekundären Vakuolen, womit ihre cytosolischen Enzyme durch drei oder sogar vier Membranen geschützt werden.

Es ist hierbei zu beachten, dass auch in einem genetischen ClpP *Knockout* in *L. monocytogenes* keine vollständige Inhibition der bakteriellen Invasion über die Zeit gegeben war, auch wenn der Effekt wesentlich stärker war, als im hier beschriebenen chemischen *Knockout*.^[101] Im Maus Infektionsmodell zeigte dieser genetische *Knockout* Stamm dennoch keine Virulenz, was darauf hindeutet, dass die Bakterien zumindest ausreichend geschwächt wurden, um keine Gefahr mehr für den Wirt darzustellen und von diesem beseitigt zu werden.

Die meisten Antibiotika sind sogar bei einem mehr als 100fachen ihrer minimalen Hemmkonzentration (MIC) für extrazelluläre Anwendungen nicht in der Lage alle intrazellulären Bakterien abzutöten. So überleben zum Beispiel selbst nach einer 24 h Behandlung mit mehr als dem 600fachen MIC Wert von Tetrazyklin (20 mg/mL) noch 60% der intrazellulären Bakterien, während bei dieser Konzentration Ciprofloxacin und Erythromycin gar keinen negativen Effekt auf das Überleben von intrazellulären *L. monocytogenes* aufweisen.^[138] Diese Beispiele machen die Herausforderung der heutigen antibiotischen Therapien für die Behandlung intrazellulärer Pathogene deutlich. Darüber hinaus werden ihre Anwendungserfolge durch die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen, die zusätzlich durch die unvollständige Beseitigung der intrazellulären Bakterien unterstützt wird, stark limitiert.

Obwohl in den beschriebenen Versuchen mit *Listeria* zwar eine signifikante, aber dennoch nur schwache Verringerung der intrazellulären Replikation von *L. monocytogenes* gezeigt werden konnte, demonstriert dies das Potenzial von Virulenzinhibitoren sogar gegen die herausfordernden intrazellulären Pathogene. Weitere Verbesserung des Inhibitors **U1** in Zusammenarbeit mit einer pharmakokinetischen Optimierung könnte eine neue Anti-Virulenz Leitstruktur hervorbringen, die viele Vorteile gegenüber herkömmlichen Antibiotika aufweisen dürfte.

2.9. Schlussfolgerung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine kleine Strukturbibliothek biomimetischer ABPP-Sonden auf Basis des privilegierten Strukturtyps der β -Lactone etabliert und erfolgreich zur Markierung diverser Enzyme unterschiedlicher Familien und Klassen angewandt. Einige β -Lactone zeigten eine hoch spezifische Aktivität für ClpP, den zentralen Regulator der Virulenz vieler pathogener Bakterien und konnten in *S. aureus* und *L. monocytogenes* durch dessen Inhibition die Ausschüttung verheerender Virulenzfaktoren unterbinden und in einem Makrophagen Infektionsassay die Pathogenität von *L. monocytogenes* deutlich abschwächen.

Während hierbei synthetische naturstoffanaloge Sonden eingesetzt wurden, um mit struktureller Variation des Grundmotivs pathogeneserelevante oder pharmakologisch

interessante Zielstrukturen in bakteriellen Proteomen zu identifizieren und maßgeschneiderte Inhibitoren zu entwickeln, gibt es viele Naturstoffe mit bereits bekannter Wirkung, deren molekulare Angriffsziele in der Zelle jedoch noch im Dunkeln liegen. Auch hierfür bietet ABPP eine nützliche analytische Plattform. Um dieses Potenzial zu demonstrieren, wird im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit Showdomycin, ein bereits seit langem bekannter reaktiver Naturstoff mit antibiotischer Wirksamkeit, eingesetzt. Dessen Möglichkeiten als analytisches Werkzeug in ABPP sollen hierbei ausgelotet und die natürlichen Angriffsziele, die für seine Wirkungsweise verantwortlich sind, aufgeklärt werden.

3. Showdomycin

3.1. Showdomycin als ABPP Sonde

Die Natur ist eine riesige Quelle bioaktiver Moleküle, die in medizinischen Anwendungen zur Behandlung vieler schwerer Krankheiten einschließlich bakterieller Infektionen verwendet werden können. Das Repertoire niedermolekularer Naturstoffe, die von Mikroorganismen und Schwämmen produziert werden, weist eine hohe Diversität biologischer Aktivitäten auf, die Resultate der evolutionären Entwicklung bedarfsgerechter Verteidigungsstrategien gegen Konkurrenten und Feinde im Kampf um limitierte Ressourcen sind. Die dringliche Suche nach neuen biologisch aktiven Naturstoffantibiotika für die Behandlung multiresistenter bakterieller Pathogene führte zu beträchtlichen Bemühungen auf den Gebieten der Naturstoffisolation und ihrer entsprechenden Totalsynthese. In vielen Fällen jedoch wird ihre medizinische Anwendung dadurch limitiert, dass die genauen Wirkungsmechanismen und die molekularen Ziele in einer Zelle unbekannt sind. Im Anschluss an den erfolgreichen Einsatz von ABPP für die Identifizierung der Ziele von β -Lactonen soll nun diese Strategie auf den Naturstoff Showdomycin ausgeweitet werden und die volle Breite seiner biologischen Ziele in pathogenen Bakterien erforscht werden. Hierzu soll eine Showdomycin Sonde etabliert und in ABPP Experimenten eingesetzt werden.

Showdomycin ist ein potentes nukleosidanalogenes Antibiotikum, das aus *Streptococcus showdoensis* isoliert wurde.^[139] Es weist eine große strukturelle Ähnlichkeit zu Uridin und Pseudouridin auf mit dem Unterschied, dass sich an Stelle der Base eine elektrophile Maleimideinheit befindet (Abbildung 26). Es wurde daher vermutet, dass dieses Nukleosidanalogen als Suizidinhibitor entwickelt wurde, um mit dem Uridinmetabolismus zu interferieren.^[140] Eine detaillierte Analyse der Ziele dieses ungewöhnlichen hoch reaktiv erscheinenden Naturstoffs wurde jedoch bislang nicht durchgeführt. Um seine biologischen Ziele zu entschlüsseln, wurde zunächst eine Totalsynthese von Showdomycin durchgeführt.

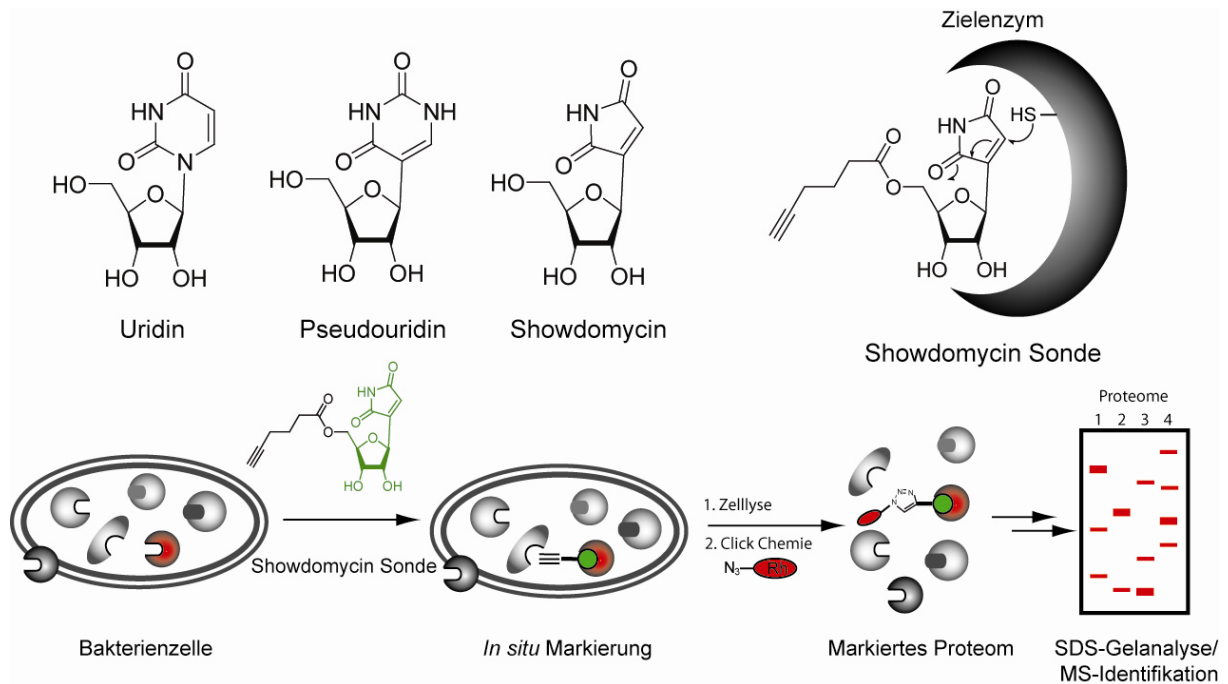


Abbildung 26: Struktureller Vergleich von Showdomycin mit Uridin und Pseudouridin. Thiolgruppen in der Bindetasche von Enzymen können den reaktiven Maleimidrest angreifen und die Sonde kovalent binden. Die Alkingruppe der Sonde ermöglicht anschließend nach Lyse der Zellen die Visualisierung und Identifikation der markierten Enzyme durch Einführung eines Fluoreszenzmarkers über Click Chemie.

3.2. Synthesestrategie

Für die Synthese von Showdomycin wurde eine Strategie von Barrett *et al.*^[141] angewandt und ein Hexinoylrest über die freie primäre 5'-Alkoholgruppe der Riboseeinheit angehängt, um ein terminales Alkin für die spätere Modifikation mit einem Fluorophor oder Biotinkonjugat mittels Click Chemie zur Verfügung zu stellen (Abbildung 27).

Im ersten Schritt wurde ein Triphenylphosphoranylidsuccinimid durch Addition von Triphenylphosphin an Maleimid dargestellt.^[142] Das Produkt, das mit 72% Ausbeute isoliert werden konnte, wurde in einer salzfreien Wittig Reaktion mit D-(-)-Ribose umgesetzt. Die Reaktion des Ylids mit der nur teilweise zugänglichen Aldehydfunktion der großteils in der Ribofuranosidform vorliegenden Ribose läuft langsam ab und ergab nach Refluxieren für 210 h in THF eine Ausbeute von nur 35%.

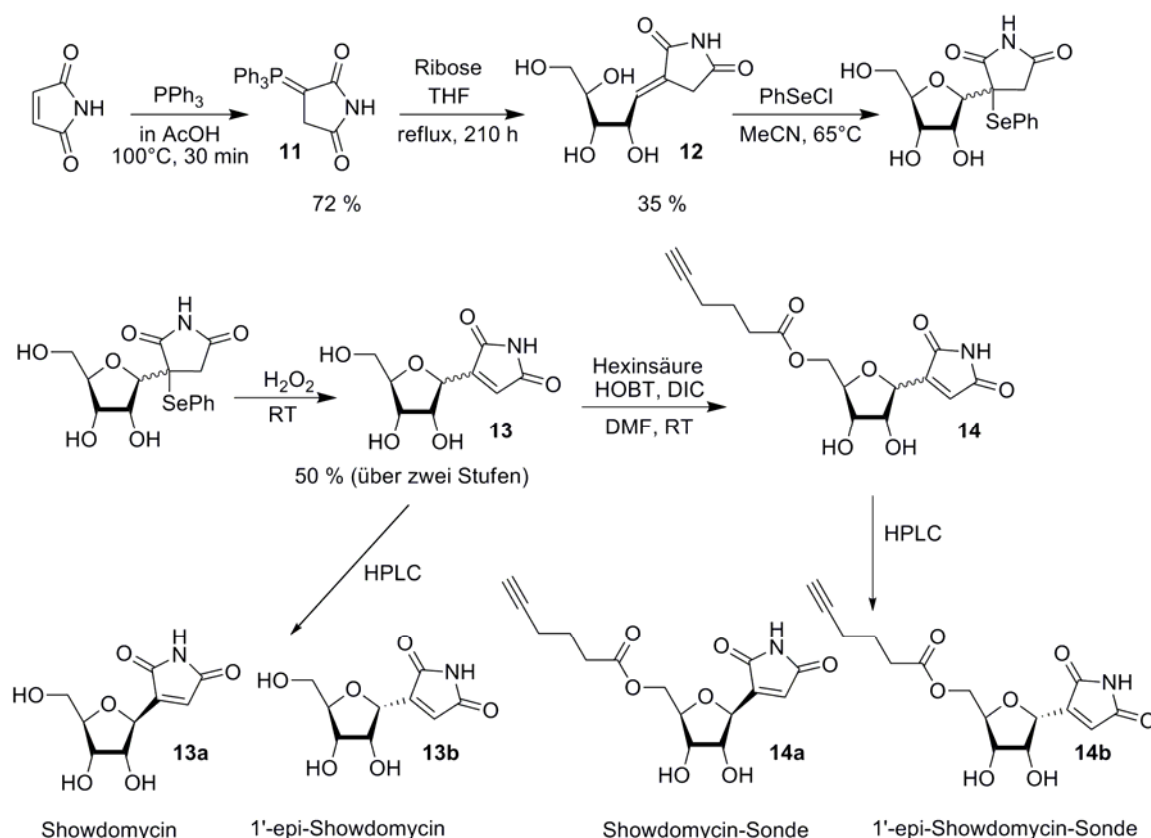


Abbildung 27: Synthese von Showdomycin und seiner entsprechenden Sonde.

Das entstandene (*E*)-3-[2(S),3(S),4(R),5-Tetrahydroxypent-1-yliden]pyrrolidin-2,5-dion wurde mit Phenylselenylchlorid umgesetzt, wobei zunächst eine Addition an die Doppelbindung unter Bildung eines Selenonium Ions erfolgte, das durch Angriff der 4'-Hydroxylgruppe der Riboseeinheit den Ringschluss zum Ribofuranosid ermöglichte. Das Rohprodukt wurde ohne Aufreinigung einer anschließenden Selenoxideliminierung durch Zugabe von H_2O_2 unterworfen, womit die Doppelbindung der Maleimidgruppe von Showdomycin wieder hergestellt wurde. Das Produkt dieser über zwei Stufen ablaufenden Reaktionssequenz wurde mit einer Ausbeute von 50% erhalten. Bei der Ringschlussreaktion wurden jedoch zwei Isomere gebildet. Showdomycin und sein Diastereomer 1'-epi-Showdomycin, die sich durch die Stellung der Maleimidgruppe am anomeren C-Atom der Ribose unterscheiden, konnten leicht durch semi-präparative HPLC getrennt werden. Für die Darstellung der Showdomycin Sonde wurde jedoch zunächst das Isomerengemisch verwendet und nach Reaktion der freien primären 5'-Hydroxylgruppe des Riboserests mit einer DIC/HOBT aktivierten Hexinsäure die Diastereomere der Sonde durch HPLC getrennt. Für alle folgenden Markierungsexperimente wurde Showdomycin als natürlich vorkommendes Isomer eingesetzt.

3.3. Anwendung der Showdomycin Sonde auf pathogene Bakterien

Um zu testen, ob die Showdomycin Sonde trotz ihrer Modifikation mit einem Alkinrest noch immer antibakterielle Aktivität aufweist, wurden die MIC Werte der Sonde und des reinen Showdomycins nach Behandlung der *S. aureus* NCTC 8325 Bakterien in Mikrotiterplatten mit verschiedenen Konzentrationen dieser Verbindungen verglichen. Wie sich zeigte wurden identische MIC Werte von 500 μM für Showdomycin und seine Sonde erhalten, was darauf hinweist, dass die Modifikation durch den kurzen Alkinrest die Aktivität des Naturstoffes nicht behindert. Ein Vergleich zwischen beiden Diastereomeren Sonden ergab erstaunlicherweise ein sehr ähnliches Markierungsprofil mit etwas höherer Intensität für die Showdomycin Sonde (Abbildung A27). Maleimid ist ein starkes Elektrophil, das vorrangig mit Cysteinresten von Proteinen reagiert. Dabei reagiert es auch mit denen der Peripherie des Proteins, die keine erhöhte Nukleophilie durch eine besondere Lage im aktiven Zentrum des Proteins aufweisen. Da es sich bei Showdomycin um einen Naturstoff handelt, der spezifische biologische Wirkungen aufweist, ist es wahrscheinlich, dass seine reaktive Gruppe durch die sterische Umgebung des angehängten Riboserests in der Reaktivität entsprechend abgestimmt ist, um vorwiegend spezifische Interaktionen mit seinen molekularen Zielen zu gewährleisten.

Für einen Vergleich der Reaktivität von Showdomycin und einem an dieser Position ungehinderten *N*-fluoreszenzmarkierten Maleimid (Atto 550 Maleimid) wurden Proteom Lysate von *S. aureus* mit jeweils 50 μM der beiden Moleküle inkubiert und die Markierungsmuster verglichen (Abbildung A28A). Während die Maleimidsonde einen Großteil aller Proteine im Lysat markierte, zeigte Showdomycin eine Selektivität für eine nur limitierte Anzahl an Proteinen. Eine entsprechende Kontrolle, bei der das Proteom vor der Markierung bei 95°C für 5 min hitzeinaktiviert wurde, demonstrierte weiterhin, dass die Markierung bei den entsprechenden entfalteten Proteinen ausblieb und somit die Mehrheit der Ziele in aktivitätsbasierender Weise markiert wurde (Abbildung A28B).

Untersuchungen mittels Massenspektrometrie ergaben, dass in wässriger Lösung Showdomycin nur mit Thiolen (DTT), nicht jedoch mit primären Aminen (Isopropylamin) reagiert, was bedeutet, dass Cysteinreste in Proteinen die bevorzugten kovalenten Bindungspartner sind. Diese ersten Experimente deuten darauf hin, dass die Showdomycin Sonde in den meisten Fällen ein selektives

chemisches Werkzeug für die Markierung verschiedener Enzyme in komplexen Proteomen darstellt.

Um zu testen, ob die Sonde zellpermeabel ist und Enzyme in lebenden Pathogenen wie *S. aureus*, einschließlich MRSA, *P. aeruginosa* und *L. monocytogenes* Stämmen unter *in situ* Bedingungen zu markieren vermag, wurden Zellen mit der Showdomycin Sonde inkubiert und nach Waschschriften und Lyse der Zellen ein Rhodaminazid als Fluoreszenzmarker an die markierten Proteine über Click Chemie angehängt. Anschließende SDS-PAGE und Fluoreszenzanalyse der Gele ergaben diverse Banden, die mit MS identifiziert wurden. Die Showdomycin Sonde ist also offensichtlich fähig die Zellmembran zu überwinden und Ziele im Proteom der Bakterien zu markieren. Einige der Zielproteine waren hierbei von geringer Häufigkeit im Proteom, wie ein direkter Vergleich der relativen Intensitäten zwischen Coomassie Färbung und Fluoreszenzaufnahmen zeigt (Abbildung 28A).

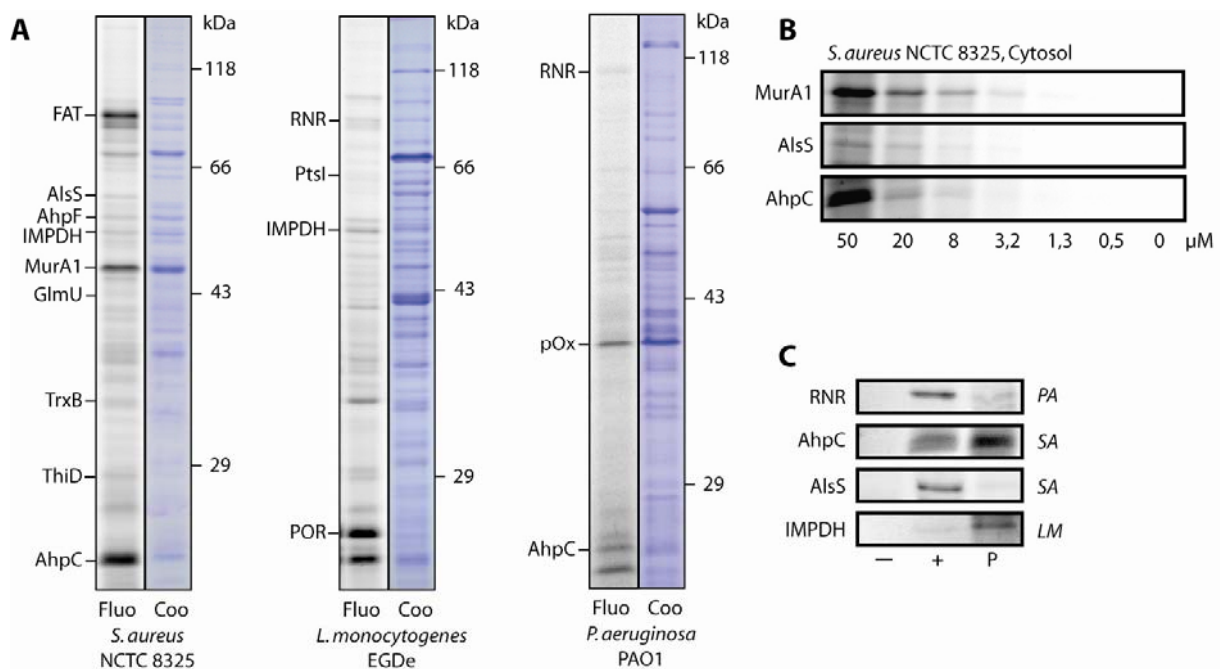


Abbildung 28: Markierung des Proteoms von bakteriellen Pathogenen durch die Showdomycin Sonde. A) Vergleich der Fluoreszenzanalyse (Fluo) und Coomassie Färbung (Coo) für die *in situ* Markierung von Enzymen in drei verschiedenen Spezies. Für die Abkürzungen der Enzymidentitäten siehe Tabelle 4. B) Die Sonde weist bemerkenswerte Sensitivität für ausgewählte Ziele auf, wie MurA1 das bis 1,3 µM markiert wird. C) Beispiele für rekombinant exprimierte Enzyme (– vor Induktion, + nach Induktion, P natives Proteom).

Die optimale Konzentration für die Markierung von Zielen im *in situ* Proteom wurde durch Variation der Konzentrationen der Sonde in unterschiedlichen Bakterienspezies ermittelt (Abbildung 28, Abbildung A29).

Hierbei ergaben sich 50 µM als optimale Konzentration für die vollständige Saturierung der meisten Ziele. Einzelne Enzyme wiesen eine sehr sensitive Markierung durch die Showdomycin Sonde bis zu 1,3 µM auf (Abbildung 28B). Eine Vorinkubation der Proteome mit 1 mM bis 100 µM von unmodifiziertem Showdomycin (bzw. Maleimid) und anschließende Markierung durch 10 µM der Sonde resultierte in einem kompletten Verlust des Fluoreszenzsignals, was bestätigt, dass Showdomycin und die entsprechende Sonde um die gleichen Bindungsstellen im Proteom konkurrieren (Abbildung A30). Zusätzlich zeigten Experimente mit verschiedenen Inkubationszeiten, dass die Sonde sehr schnell in die Zelle eindrang und eine vollständige Saturierung der Ziele bereits innerhalb von 7,5 min erreicht wurde. (Abbildung A29). Alle bakteriellen Pathogene zusammen genommen, konnten 13 verschiedene Enzyme über MS identifiziert werden (Tabelle 4). Einige MS Resultate wurden zur Absicherung rekombinant überexprimiert und mit der Showdomycin Sonde markiert (Abbildung 28C).

Tabelle 4: Durch die Showdomycin Sonde markierte Enzyme verschiedener Funktionen und Enzymklassen (EC), die in pathogenen und nicht pathogenen Bakterienstämmen identifiziert wurden.

Funktion	Enzyme	EC	Organismen*
Resistenz gegen oxidativen Stress			
	Alkylhydroperoxid-Reduktase-Untereinheit C (AhpC)	EC 1.11.1.	<i>S. aureus</i> NCTC 8325, Mu50, <i>P. putida</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	Alkylhydroperoxid-Reduktase-Untereinheit F (AhpF)	EC 1.6.4.	<i>S. aureus</i> NCTC 8325, Mu50
	Thioredoxin-Reduktase (TrxB)	EC 1.8.1.	<i>S. aureus</i> NCTC 8325, Mu50
Virulenzassoziiert			
	Phosphoenolpyruvat-Protein Phosphatase (PtsI)	EC 2.7.3.	<i>S. aureus</i> Mu50, <i>L. monocytogenes</i> EGD-e

Acetolactat-Synthase (AlsS)	EC 2.2.1.	<i>S. aureus</i> NCTC 8325
Nukleotidbiosynthese		
Inosin-5'-monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH)	EC 1.1.1.	<i>S. aureus</i> NCTC 8325, Mu50, <i>L. monocytogenes</i> EGD-e
Ribonucleotid-Diphosphat-Reduktase-Untereinheit alpha (RNR)	EC 1.17.4.	<i>L. monocytogenes</i> EGD-e, <i>P. aeruginosa</i>
Primärmetabolismus		
Phosphomethyl-Pyrimidin-Kinase (ThiD)	EC 2.7.4.	<i>S. aureus</i> NCTC 8325
Format-Acetyltransferase (FAT)	EC 2.3.1.	<i>S. aureus</i> NCTC 8325, Mu50
Cystein-Desulfurase (CDS)	EC 2.8.1.	<i>P. aeruginosa</i>
Resistenz/Zellwandbiosynthese		
UDP-N-Acetylglucosamin-1-Carboxyvinyltransferase 1 (MurA1)	EC 2.5.1.	<i>S. aureus</i> NCTC 8325, Mu50
UDP-N-Acetylglucosamin-1-Carboxyvinyltransferase 2 (MurA2)	EC 2.5.1.	<i>S. aureus</i> Mu50
UDP-N-Acetylglucosamin-Pyrophosphorylase, putativ (GlmU)	EC 2.7.7.	<i>S. aureus</i> NCTC 8325

*identifiziert durch MS, nicht angegeben sind jene, identifiziert durch das Markierungsprofil

Die identifizierten Enzyme gehören zu zwei Enzymklassen, den Oxidoreduktasen und Transferasen (Tabelle 4). Viele der dazu gehörenden Familien benötigen einen nukleophilen Cysteinrest in ihrem aktiven Zentrum für die Katalyse, der dafür geeignet ist, die elektrophile Maleimidgruppe von Showdomycin anzugreifen. Tatsächlich ergab ein Substratinhibitionsassay mit MurA1 eine Inhibierung der Enzymaktivität durch Showdomycin mit einem IC₅₀ von 10 µM (Abbildung A31). Darüber hinaus wurden auch die exakten Positionen der Modifikation im Protein für eine repräsentative Reduktase (AhpC, siehe unten) analysiert, wobei gezeigt werden konnte, dass Showdomycin selektiv mit nur zwei Cysteinen eine kovalente Bindung einging (Abbildung 29 und Abbildung A32). Die gezeigte Inhibition der Aktivität und die große Breite an mechanistisch verschiedenen Enzymfamilien, die zuvor nicht

durch ABPP abgedeckt werden konnte, hebt die Verwendbarkeit von Showdomycin als neues proteomisches Werkzeug zur Identifizierung pathogeneseassoziierter Zielenzyme hervor.

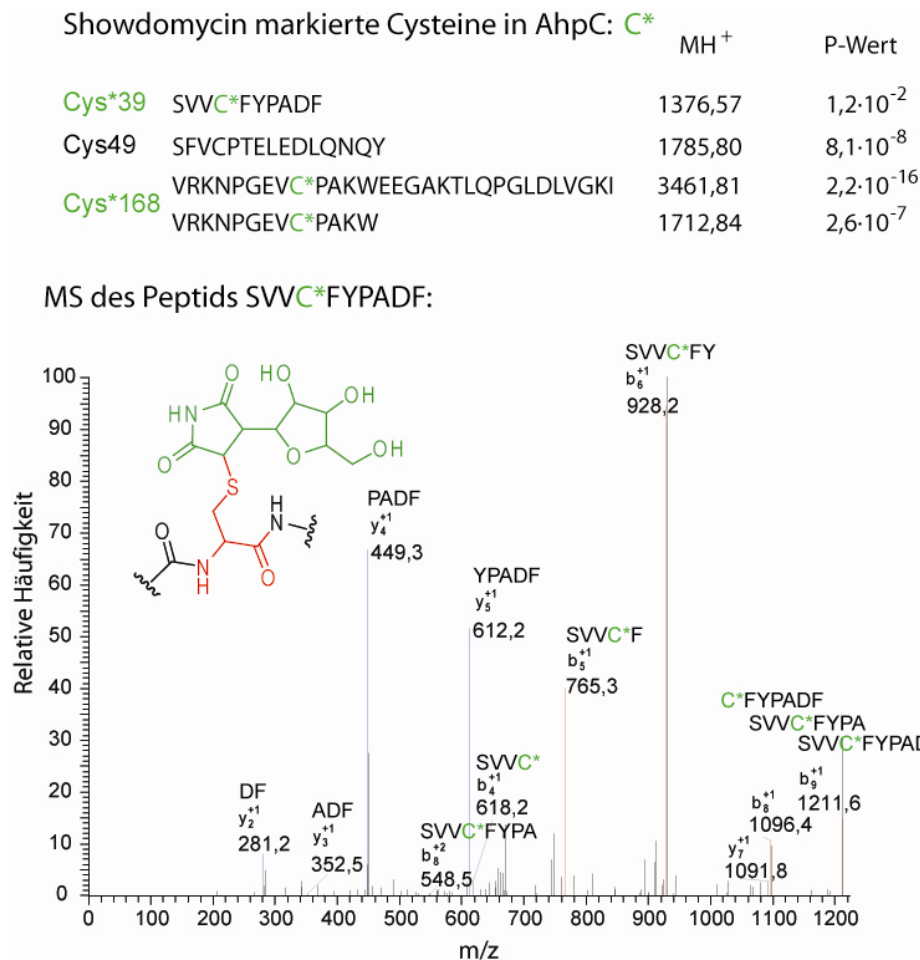


Abbildung 29: Identifikation der Bindestellen von Showdomycin durch Massenspektrometrie (MS). Die Peptidmassen (MH⁺) und p-Werte sind für jedes Peptid mit Cysteinrest gegeben. Nur Cys39 und Cys168 wurden durch Showdomycin modifiziert vorgefunden. Ein MS Fragmentierungsmuster ist als Beispiel für das chymotryptische Peptid von Cys39 gegeben.

Interessanterweise ist eine große Fraktion der identifizierten Enzyme in wichtige zelluläre Funktionen involviert, wie die Zellwandbiosynthese, die Resistenz gegen oxidativen Stress, die Nukleotidbiosynthese und Aminosäurebiosynthese. Einige Ziele sind hierbei von besonderem medizinischen Interesse, so zum Beispiel Enzyme, die für die Resistenz gegen oxidativen Stress in *S. aureus* verantwortlich sind, wie die Alkylhydroperoxid-Reduktase C (AhpC), die Alkylhydroperoxid-Reduktase F (AhpF) und die Thioredoxin-Reduktase (TrxB). Diese Enzyme spielen

eine entscheidende Rolle für die Kolonisierung und das Überleben des Pathogens in seinem Wirtsorganismus.^[143] Die Inosin-5'-monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) wird für die Biosynthese von GMP und somit für die Aufrechterhaltung des Guanosinphosphat Pools der Zelle benötigt.^[144] Neben der Rolle in der Synthese verzweigter Aminosäuren hat die Acetolactat-Synthase (AlsS) auch eine entscheidende Bedeutung für die Virulenz von *S. aureus*, wie durch die verminderte Biofilmbildung in einem genetischen *Knockout* gezeigt wurde.^[145] Die UDP-N-Acetylglucosamin-1-Carboxyvinyltransferase 1 (MurA1) katalysiert den ersten Schritt in der Zellwandbiosynthese und ist daher ein essenzielles bakterielles Enzym mit großer Bedeutung als Ziel für antibiotische Behandlungen.^[146]

Eine der größten Herausforderungen in der Behandlung bakterieller Infektionen ist die schnelle Identifikation des krankheitsverursachenden Pathogens. Hierfür werden geeignete Biomarker benötigt, die einzigartige Charakteristiken für einen Bakterienstamm liefern und eine verlässliche Detektion ermöglichen. Der Vergleich der Enzymmarkierungsprofile zwischen resistenten und nicht resistenten sowie pathogenen und nicht pathogenen Bakterien mit der Showdomycin Sonde ergab einige solcher einzigartigen Signaturen (Abbildung 30 und Abbildung A33).

Die vergleichende Analyse vier verschiedener Stämme von *S. aureus*, des Referenzstamms *S. aureus* NCTC 8325, des toxinproduzierenden klinischen Isolats DSM 19041 und der MRSA Stämme Mu50 und DSM 18827 (klinisches Isolat) ergaben, dass die Phosphoenolpyruvat-Protein-Phosphatase (PtsI) nur in den MRSA Stämmen und dem toxinproduzierenden Stamm, nicht jedoch im Laborstamm NCTC 8325 markiert wurde (Abbildung 30). PtsI wurde als wichtiges Protein für die Virulenz von *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* und *Haemophilus influenzae* beschrieben, wie durch die verringerte Pathogenizität von $\Delta ptsI$ Mutanten dieser Spezies im Mausmodell gezeigt werden konnte.^[147] Dies deutet darauf hin, dass die pathogeneren Stämme und klinischen Isolate konstitutiv höhere PtsI Aktivitäten auch unter Kulturbedingungen im Vergleich zu dem weniger infektiösen Labor-Referenzstamm aufweisen. Umgekehrt fand sich eine höhere Aktivität der Peroxidase AhpC in NCTC 8325, jedoch nicht in den anderen resistenten oder toxischen Stämmen. Weiterhin ergab der Vergleich der Stämme eine ausgeprägte Markierung von MurA2, die nur im MRSA Stamm Mu50 und dort auch nur *in situ* nicht jedoch *in vitro* auftrat (Abbildung 30 und Abbildung A34).

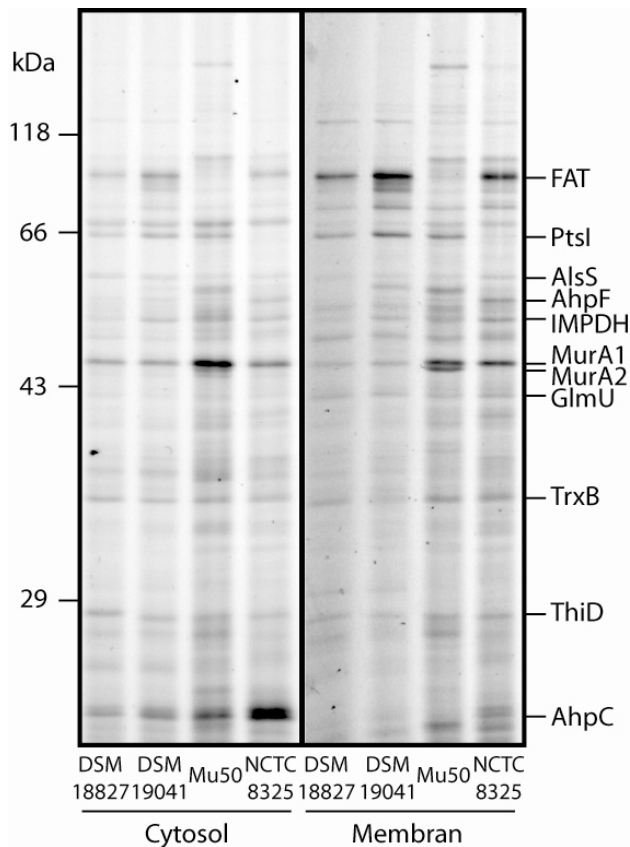


Abbildung 30: Vergleich des *in situ* Markierungsprofils vier verschiedener *S. aureus* Stämme bei 50 μM Sondenkonzentration. Die Abkürzungen der Enzymidentitäten sind in Tabelle 4 gegeben.

Es wurde bereits in der Literatur vermutet, dass MurA2 phylogenetisch aus einer Genduplikation von MurA1 in gram-positiven Bakterien hervorging. Die zwei verschiedenen Versionen von MurA sind funktionell identisch und können sich gegenseitig ersetzen, wenn eine von beiden ausgeschaltet wird.^[146] Im vergleichenden Experiment wies interessanterweise nur der MRSA Stamm Mu50 gleichzeitig zwei aktive MurA Enzyme auf, obwohl allen *S. aureus* Stämmen die genetische Information für beide Enzyme gemeinsam ist. Zwei aktive Kopien des MurA Enzyms könnten daher einen Beitrag zur Antibiotikaresistenz dieses Stammes leisten. Es soll auch darauf hingewiesen werden, dass die *S. aureus* Stämme im Coomassie gefärbten Gel nicht zu unterscheiden waren, was erneut den Wert der spezifischen Enzymmarkierung durch die Sonde hervorhebt (Abbildung A35).

Zusammenfassend war es also möglich eine ABPP Sonde auf Basis des reaktiven Nukleosidantibiotikums Showdomycin zu entwickeln und diese als Werkzeug für die Markierung und Identifizierung von Enzymen in pathogenen Bakterien zu validieren. Viele der identifizierten Enzyme waren entweder für das Überleben oder die Virulenz

der Bakterien entscheidend. Die Summe aller essenziellen Enzyme, die durch Showdomycin markiert und inhibiert wurden, unter diesen vor allem MurA, das als eines der stärksten Ziele in *S. aureus* auftrat, dürfte die antibiotische Aktivität von Showdomycin erklären und betont die Nützlichkeit dieses Ansatzes für die Aufdeckung der molekularen Ziele von Naturstoffen. Darüber hinaus bietet der Vergleich von Enzymaktivitätsprofilen verschiedener pathogener Stämme und zwischen eng verwandten pathogenen und nicht pathogenen Spezies neue Erkenntnisse und Einblicke in die regulatorischen Unterschiede dieser Stämme sowie einzigartiger, stammspezifischer Signaturen. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Showdomycin Sonde ein großes Potenzial als analytische Sonde besitzt, die somit das Repertoire der ABPP-Sonden vergrößert und eine einfache Möglichkeit zur Entschlüsselung der biologischen Angriffsziele eines vielversprechenden Naturstoffs darstellt.

4. Ausblicke

In der vorliegenden Arbeit konnte das enorme Potenzial von aktivitätsbasierendem Protein Profiling (ABPP) in der Anwendung auf pathogene Bakterien demonstriert werden. Sonden auf Basis von Naturstoffen oder privilegierten Strukturen haben vielseitige Einsatzmöglichkeiten sowohl als Werkzeuge für die Erforschung der Resistenz- und Pathogenesemechanismen von bakteriellen Krankheitserregern als auch als potenzielle Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Strategien in der Behandlung von Infektionskrankheiten.

Die enorme Leistungsfähigkeit von ABPP beruht hierbei auf der gleichzeitigen Identifikation von Proteinen und ihren Inhibitoren, was die rasche Aufdeckung und Charakterisierung der Angriffsziele von Naturstoffen wie Showdomycin oder die strukturelle Optimierung von Wirkstoffen wie im Fall der β -Lactone ermöglicht.

Durch die Showdomycin Sonde konnten weiterhin charakteristische Proteomsignaturen für pathogene und nicht pathogene sowie antibiotikaresistente und sensitive Stämme erhalten werden, was eine neue diagnostische Strategie zur Identifizierung von Krankheitserregern für eine gezielte therapeutische Intervention darstellen könnte. Die hier beschriebenen β -Lacton Sonden erwiesen sich als vielseitige Werkzeuge zur Untersuchung einer Vielzahl bakterieller Enzyme *in vitro* und *in situ*. Hierbei konnten hohe Selektivitäten für die Markierung und Inhibition einzelner Proteine je nach struktureller Variation der Sonden erhalten werden. Dies hält weitere Optimierungsmöglichkeiten für die Entwicklung maßgeschneiderter Sonden und Inhibitoren offen, die sowohl für analytische oder pharmakologische Anwendungen interessant sind. Ein Beispiel mit besonders großem Potenzial konnte mit der strukturellen Optimierung von β -Lactonen als Inhibitoren für ClpP, einen zentralen Regulator der Virulenz von pathogenen Bakterien gezeigt werden. Seine gezielte Ausschaltung führte zur Inhibition eines breiten Spektrums wichtiger und verheerender Virulenzfaktoren auch in multiresistenten Bakterien und könnte eine neue therapeutische Strategie zur Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten darstellen. Hierbei können nun durch die gelöste Kristallstruktur von ClpP neue optimierte Wirkstoffe entworfen werden und ihre Wirksamkeit nach chemischen und pharmakologischen Optimierungsschritten zunächst im Tiermodell, später auch im Menschen untersucht werden. Vorbereitungen zur Entwicklung eines klinischen Kandidaten werden bereits getroffen und könnten bei erfolgreicher Anwendung zu

einem neuen Medikament basierend auf einem völlig neuartigen Wirkmechanismus mit geringeren Nebenwirkungen und kaum zu erwartender Resistenzentwicklung führen.

5. Experimenteller Teil

5.1. Allgemeine Methoden

Alle in Reaktionen verwendeten kommerziell erhältlichen Chemikalien waren vom Reinheitsgrad *puriss.*, *p. a.* oder *purum* und wurden von Sigma Aldrich oder Acros Organics bezogen. In Reaktionen wurden im Allgemeinen nur *puriss.* Lösungsmittel eingesetzt, die über Molekularsieb getrocknet und unter Argonatmosphäre aufbewahrt wurden. Lösungsmittel für die Säulenchromatographie und Aufarbeitungstechniken waren von Reagenzgrad Qualität und wurden vor Gebrauch durch Destillation gereinigt.

Bei Versuchen unter Schutzgas (N₂) wurde Glasmaterial unter Hochvakuum dreimal bei 500°C ausgeheizt und abwechselnd mit Stickstoff geflutet.

Säulenchromatographie wurde als Standard mit Kieselgel der Korngrößenverteilung 0,035 – 0,070 mm und Porengröße von 60 Å (Acros Organics) durchgeführt.

¹H und ¹³C NMR Spektren wurden an einem Varian Mercury 200 (200 MHz), Varian NMR-System 300 (300 MHz), Varian NMR-System INOVA 400 (400 MHz) oder Varian NMR-System 600 (600 MHz) aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ wurde auf die Signale der remanenten Protonen beziehungsweise Kohlenstoffe der deuterierten Lösungsmittel kalibriert und ist in ppm angegeben. Die Multiplizitäten der Signale sind als s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), quin. (Quintett) und sept. (Septett) oder deren Kombinationen gekennzeichnet.

Massenspektren über GC-MS wurden mit einem Varian 3400 Gaschromatographen gekoppelt mit einem Finnigan MAT 95 Massenspektrometer in EI Modus (70 eV, 250°C Quelle) aufgenommen. Die Gaschromatographie erfolgte mit einer 25 m CS Supreme-5 Kapillartrennsäule (Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25 μ m, Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland) und Helium als Trägergas mit einer Flussrate von 1,5 mL/min und einem Gradienten von 50°C (1 min isotherm) auf 300°C (4 min isotherm) mit 25°C/min. Für DEI Messungen wurden die Proben durch Direktverdampfung von einem Platinfaden mit einem Temperaturgradienten von 20°C auf 1600°C mit 120°C/min in die Gasphase überführt und mittels EI ionisiert.

ESI Spektren wurden an einem Thermo Finnigan LTQ FT mit einer Spraykapillarenspannung von 4 kV aufgenommen.

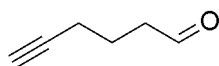
Für HPLC Analysen wurde ein Waters 2695 Separationsmodul mit einem Waters 2996 PDA Detektor verwendet. Analytische Trennungen wurden mit einer X-Bridge™ BEH130 C18 5µm (4,6·100 mm) Säule und präparative Trennungen mit einer X-Bridge™ BEH130 PREP C18 5µm (10·150 mm) Säule durchgeführt.

Die Proteinanalytik wurde an einer LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) durchgeführt. Für die Dünnschichtchromatographie wurden nachfolgende Färbelösungen als Tauchlösungen mit Entwicklung unter Hitzeeinwirkung verwendet.

Lösung	Anwendung	Zusammensetzung
Molybdato-phosphorsäure	universell	10 g Molybdato-phosphorsäure. 100 mL Ethanol
2,4-Dinitrophenylhydrazin	Aldehyde/ Ketone	12 g 2,4-DNPH 60 mL H ₂ SO ₄ konz. 80 mL H ₂ O 200 mL Ethanol
Ninhydrin	Amine	1,5 g Ninhydrin 100 mL n-Butanol 3 mL Essigsäure

5.2. Synthesen

Synthese von 5-Hexinal (1)



In einem 25 mL Einhalsrundkolben wurde eine Lösung von Dess-Martin-Periodinan (848 mg, 2,0 mmol) in 10 mL Dichlormethan vorgelegt und in einem Eisbad gekühlt. Unter Rühren wurde 5-Hexinol (217 µL, 2,0 mmol) innerhalb von 1 min zugetropft. Die Reaktionslösung wurde für 5 min unter Eiskühlung (0°C) und anschließend 3 h bei RT gerührt, bis die Reaktion gemäß DC Analyse (n-Pentan/Diethylether 10:1; R_f = 0,39) vollständig abgelaufen war. Die entstandene Suspension wurde mit 10 mL Diethylether in ein 50 mL Falcon-Röhrchen transferiert und anschließend zentrifugiert

(4000 rpm; 10 min). Der Überstand wurde durch vorsichtiges abdekantieren gesammelt und der Rückstand mit 20 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer aufkonzentriert (40°C, >600 mbar). Nach Säulenchromatographie über Kieselgel (n-Pentan/Diethylether 10:1) und vorsichtigem Abziehen des Lösungsmittels wurde das Produkt als farbloses Öl erhalten (105 mg, 1,1 mmol, 55%).

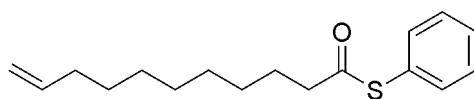
$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 9,80 (t, $J = 1,3$ Hz, 1 H, $-\text{CHO}$), 2,60 (dt, $J = 7,2, 1,3$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CHO}$), 2,26 (dt, $J = 6,8, 2,7$ Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2$), 1,97 (t, $J = 2,6$ Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1,84 (quint., $J = 6,8$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$).

GC Retentionszeit = 2,2 min, TIC-MS (m/z): 95,0485 $[\text{M-H}]^+$, ber.: 95,0497.

Allgemeine Methode zur Darstellung von Phenylthioestern aus Säurechloriden

In einem 50 mL Einhalsrundkolben wurden Triethylamin (0,70 mL, 5,0 mmol) und Thiophenol (0,51 mL, 5,0 mmol) in 10 mL Toluol vorgelegt. Unter kräftigem Rühren wurde eine Lösung des entsprechenden Säurechlorids (5,0 mmol) in 15 mL Toluol über einen Tropftrichter innerhalb von 30 min zugegeben. Präzipitierendes Triethylammoniumchlorid ergab während der Reaktion eine zunehmende Trübung. Nach weiterem Rühren für 10 min war die Reaktion gemäß DC Kontrolle vollständig abgelaufen. Das Reaktionsgemisch wurde zweimal mit 25 mL gesättigter NaHCO_3 und einmal mit 25 mL gesättigter NaCl Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde anschließend über wasserfreiem MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die entstandenen Thioester waren in der Regel bereits von genügend hohem Reinheitsgrad, dass auf eine weitere Aufreinigung durch Säulenchromatographie verzichtet werden konnte.

10-Undecensäurephenylthioester (2)

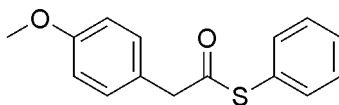


10-Undecensäurechlorid (1,10 mL, 5,1 mmol) in 15 mL Toluol wurde einer vorgelegten Lösung von Triethylamin (0,70 mL, 5,0 mmol) und Thiophenol (0,51 mL, 5,0 mmol) in 10 mL Toluol zugesetzt. Nach erfolgter Reaktion (DC Kontrolle iso-Hexan/Ethylacetat 25:1, $R_f = 0,43$) und Aufarbeitung wurde das Produkt als fahl-gelbes Öl erhalten (1,27 g, 4,6 mmol, 92%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,43 (app. s, 5 H, C_6H_5), 5,83 (tdd, $J = 16,9, 10,2, 6,7$ Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,05-4,93 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 2,67 (t, $J = 7,5$ Hz, 2 H, $\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2$), 2,09-1,99 (m, 2 H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 1,73 (quint., $J = 7,5$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})$), 1,44-1,29 (m, 10 H, $(\text{CH}_2)_5$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 197,8, 139,4, 134,7, 129,5, 129,4, 128,2, 114,4, 43,9, 34,0, 29,5, 29,4, 29,3, 29,2, 29,1, 25,8.

2-(4-Methoxyphenyl)ethansäurephenylthioester (3)

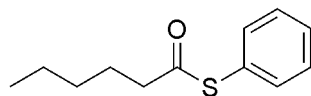


In diesem Fall wurde der Standardansatz auf die vierfache Menge skaliert. 2-(4-Methoxyphenyl)ethansäurechlorid (3,06 mL, 20,0 mmol) wurde in 60 mL Toluol einer vorgelegten Lösung von Triethylamin (2,80 mL, 20,1 mmol) und Thiophenol (2,04 mL, 20,0 mmol) in 40 mL Toluol zugegeben. Nach erfolgter Reaktion (DC Kontrolle iso-Hexan/Ethylacetat 25:1, $R_f = 0,29$) und Aufarbeitung wurde das Produkt als kristalliner gelber Feststoff erhalten (4,99 g, 19,3 mmol, 97%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,40 (app. s, 5 H, C_6H_5), 7,27 (d, $J = 7,3$ Hz, 2 H, Phenylen C-H), 6,91 (d, $J = 8,7$ Hz, 2 H, Phenylen C-H), 3,87 (s, 2 H, $\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2$), 3,83 (s, 3 H, $\text{O}-\text{CH}_3$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 196,1, 159,3, 134,7, 131,0, 129,6, 129,3, 128,1, 125,5, 114,4, 55,5, 49,5.

Hexansäurephenylthioester (4)

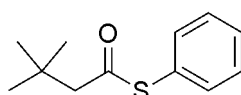


In diesem Fall wurde der Standardansatz auf die vierfache Menge skaliert. Hexansäurechlorid (2,76 mL, 19,7 mmol) wurde in 60 mL Toluol einer vorgelegten Lösung von Triethylamin (2,80 mL, 20,1 mmol) und Thiophenol (2,04 mL, 20,0 mmol) in 40 mL Toluol zugegeben. Nach erfolgter Reaktion (DC Kontrolle iso-Hexan/Ethylacetat 100:1, $R_f = 0,20$) und Aufarbeitung wurde das Produkt als fahl-gelbes Öl erhalten (3,89 g, 18,7 mmol, 95%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,41 (app. s, 5 H, C_6H_5), 2,66 (t, $J = 7,5$ Hz, 2 H, C(O)-CH_2), 1,72 (quint., $J = 7,4$ Hz, 2 H, $\text{C(O)-CH}_2\text{-CH}_2$), 1,39-1,31 (m, 4 H, $(\text{CH}_2)_2\text{-CH}_3$), 0,91 (t, $J = 7,1$, 2 H, CH_3).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 197,8, 134,7, 129,5, 129,4, 128,2, 43,9, 31,4, 25,5, 22,6, 14,1.

3,3-Dimethylbutansäurephenylthioester (5)

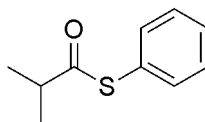


3,3-Dimethylbutansäurechlorid (695 μL , 5,0 mmol) in 15 mL Toluol wurde einer vorgelegten Lösung von Triethylamin (0,70 mL, 5,0 mmol) und Thiophenol (0,51 mL, 5,0 mmol) in 10 mL Toluol zugesetzt. Nach erfolgter Reaktion (DC Kontrolle iso-Hexan/Ethylacetat 25:1, $R_f = 0,63$) und Aufarbeitung wurde das Produkt als fahl-gelbes Öl erhalten (941 mg, 4,5 mmol, 90%).

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7,40 (app. s, 5 H, C_6H_5), 2,55 (s, 2 H, C(O)-CH_2), 1,08 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 196,1, 134,6, 129,5, 129,4, 128,7, 56,5, 32,1, 29,9.

Isobutansäurephenylthioester (6)

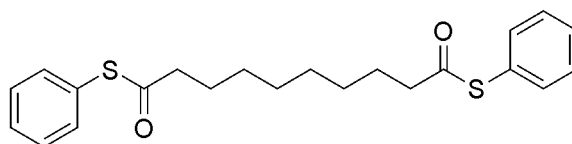


Isobutansäurechlorid (528 μL , 5,0 mmol) in 15 mL Toluol wurde einer vorgelegten Lösung von Triethylamin (0,70 mL, 5,0 mmol) und Thiophenol (0,51 mL, 5,0 mmol) in 10 mL Toluol zugesetzt. Nach erfolgter Reaktion (DC Kontrolle iso-Hexan/Ethylacetat 25:1, $R_f = 0,47$) und Aufarbeitung wurde das Produkt als fahl-gelbes Öl erhalten (653 mg, 3,6 mmol, 72%).

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7,40 (app. s, 5 H, C_6H_5), 2,87 (sept., $J = 6,9$ Hz, 1 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,27 (d, $J = 6,9$ Hz, 6 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$).

^{13}C NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 202,1, 134,8, 129,4, 129,3, 128,1, 43,2, 19,6.

Octandicarbonsäurediphenylthioester (7)

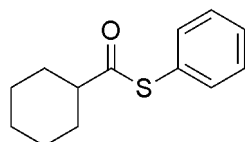


In diesem Fall wurde der Standardansatz auf die Hälfte skaliert. 1,8-Octandicarbonsäurechlorid (267 μL , 1,25 mmol) in 7,5 mL Toluol wurde einer vorgelegten Lösung von Triethylamin (350 μL , 2,5 mmol) und Thiophenol (255 μL , 2,5 mmol) in 5 mL Toluol zugesetzt. Nach erfolgter Reaktion (DC Kontrolle iso-Hexan/Ethylacetat 25:1, $R_f = 0,19$) und Aufarbeitung wurde das Produkt als farbloser Feststoff erhalten (492 mg, 1,27 mmol, 100%).

^1H NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 7,41 (app. s, 10 H, 2x (C_6H_5)), 2,65 (t, $J = 7,4$ Hz, 4 H, 2x $\text{C}(\text{O})\text{-CH}_2$), 1,71 (quint., $J = 7,2$ Hz, 4 H, 2x $\text{C}(\text{O})\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 1,45-1,26 (m, 8 H, $(\text{CH}_2)_4$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 197,7, 134,7, 129,5, 129,4, 128,2, 43,9, 29,2, 29,1, 25,8.

Cyclohexancarbonsäurephenylthioester (8)

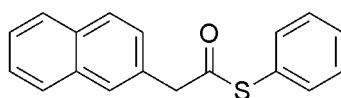


Cyclohexancarbonsäurechlorid (669 μL , 5,0 mmol) in 15 mL Toluol wurde einer vorgelegten Lösung von Triethylamin (0,70 mL, 5,0 mmol) und Thiophenol (0,51 mL, 5,0 mmol) in 10 mL Toluol zugesetzt. Nach erfolgter Reaktion (DC Kontrolle iso-Hexan/Ethylacetat 25:1, $R_f = 0,45$) und Aufarbeitung wurde das Produkt als farbloser kristalliner Feststoff erhalten (1016 mg, 4,6 mmol, 92%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7,42 (app. s, 5 H, C_6H_5), 2,63 (tt, $J = 11,4, 3,6$ Hz, 1 H, CH-C(O)), 2,05-1,19 (m, 10 H, $(\text{CH}_2)_5$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 201,0, 134,8, 129,4, 129,3, 128,2, 52,7, 29,8, 25,8, 25,7.

2-(2-Naphthyl)ethansäurephenylthioester (9)

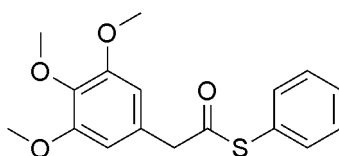


In diesem Fall wurde der Ansatz auf 3/10 des Standardansatzes skaliert. 2-(2-Naphthyl)ethansäurechlorid (308 mg, 1,5 mmol) in 4,5 mL Toluol wurde einer vorgelegten Lösung von Triethylamin (210 μL , 1,5 mmol) und Thiophenol (153 μL , 1,5 mmol) in 3 mL Toluol zugesetzt. Nach erfolgter Reaktion (DC Kontrolle iso-Hexan/Ethylacetat 25:1, $R_f = 0,33$) und Aufarbeitung wurde das Produkt als gelblicher Feststoff erhalten (376 mg, 1,35 mmol, 90%).

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7,88 – 7,80 (m, 4 H, naphthyl C-H), 7,54-7,44 (m, 3 H, naphthyl C-H), 7,39 (app. s, 5 H, C_6H_5), 4,09 (s, 2 H, C(O)-CH_2)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 195,6, 134,7, 133,7, 132,9, 131,0, 129,7, 129,4, 128,9, 128,7, 128,0, 127,9, 127,8, 127,7, 126,5, 126,3, 50,6.

2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)ethansäurephenylthioester (10)



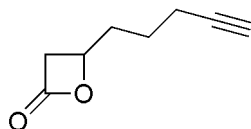
Abweichend vom Standardprotokoll wurde dieser Thioester direkt aus der entsprechenden Carbonsäure dargestellt. In einem 10 mL Einhalsrundkolben wurden 2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)ethansäure (566 mg, 2,5 mmol), DMAP (31 mg, 0,25 mmol) und Thiophenol (1,0 mL, 9,9 mmol) in 2,5 mL Dichlormethan vorgelegt und in einem Eisbad gelüht. Es wurde DCC (619 mg, 3,0 mmol) hinzugefügt und für 5 min im Eisbad gerührt. Nach Entfernen des Eisbads wurde das Reaktionsgemisch bei RT weiterhin für 3 h gerührt. Die durch ausgefallenem *N,N*-Dicyclohexylharnstoff entstandene Suspension wurde filtriert und die organische Lösung mit Dichlormethan auf 30 mL verdünnt. Anschließend wurde die Lösung zweimal mit 30 mL 0,5 M HCl und einmal mit 30 mL gesättigter NaHCO_3 Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Aufreinigung durch Säulenchromatographie über Kieselgel (iso-Hexan/Ethylacetat 50:11, $R_f = 0,48$) ergab das Produkt als farblosen Feststoff (484 mg, 1,5 mmol, 61%).

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7,40 (app. s, 5 H, C_6H_5), 6,54 (s, 2 H, Phenylen C-H), 3,87 (s, 6 H, 2x CH_3), 3,5 (m, 5 H, CH_3 , CH_2).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 195,5, 153,6, 137,7, 134,6, 129,7, 129,4, 129,0, 127,9, 106,9, 61,1, 56,4, 50,5.

Synthese von β -Lactonen

4-(4-Pentynyl)oxetan-2-on (Sonde A1)



In einem 10 mL Einhalsrundkolben wurde wasserfreies AlCl_3 (10,6 mg, 0,08 mmol) in 600 μL Dichlormethan vorgelegt und auf -30°C in einem Wasser-Isopropanol-Trockeneis Bad gekühlt. Anschließend wurde Diisopropylethylamin (41,8 μL , 0,24 mmol) und eine vorgekühlte Lösung von AgSbF_6 (82,4 mg, 0,24 mmol) in 600 μL Dichlormethan gefolgt von einer weiteren Portion Diisopropylethylamin (69,8 μL , 0,40 mmol), Acetylchlorid (42,6 μL , 0,60 mmol) und 5-Hexinal (38,4 mg, 0,40 mmol) hinzugegeben. Nach 2,5 h rühren war die Reaktion gemäß DC Kontrolle (iso-Hexan/Ethylacetat 5:1, $R_f = 0,23$) vollständig. Die Reaktionslösung wurde filtriert und im Vakuum aufkonzentriert. Aufreinigung mittels Säulenchromatographie über Kieselgel (iso-Hexan/Ethylacetat 5:1) ergab das Produkt als farbloses Öl (15,6 mg, 0,11 mmol, 28%).

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 4,60-4,49 (m, 1 H, H-4), 3,54 (dd, $J = 16,3, 5,8$ Hz, 1 H, H-3), 3,10 (dd, $J = 16,3, 4,3$ Hz, 1 H, H-3), 2,28 (dt, $J = 6,8, 2,7$ Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$), 1,99 (t, $J = 2,6$ Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1,97-1,57 (m, 4 H, $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}$).

GC Retentionszeit = 5,1 min, EI-MS (m/z): 137,0612 $[\text{M}-\text{H}]^+$, ber.: 137,0603.

Allgemeine Methode zur Darstellung von β -Lactonen aus Carbonsäurephenylthioestern

In einem gut ausgeheizten 10 mL Dreihalsrundkolben mit Gummiseptum und Stickstoffeinlaufadapter wurde unter Stickstoffatmosphäre Diisopropylamin (36,5 μL , 0,26 mmol) in 2 mL THF vorgelegt und in einem Eisbad gekühlt. Anschließend wurde n-Butyllithium (96,0 μL einer 2,5 M Lösung in Hexan, 0,24 mmol) innerhalb von 2 min über eine Spritze in die Reaktionslösung injiziert. Das Reaktionsgemisch wurde für 20 min bei 0°C gerührt. Anschließend wurde das Eisbad durch ein Aceton-Trockeneisbad ausgetauscht und die Reaktionslösung auf -78°C gekühlt. Über eine Spritze wurde der jeweilige Carbonsäurephenylthioester (0,20 mmol) in 250 μL THF

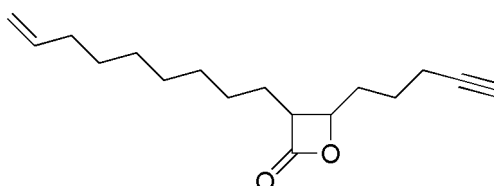
über 5 min langsam zugetropft. Nach Rühren für 2 h bei -78°C wurde eine Lösung des jeweiligen Aldehyds (0,20 mmol) in 250 μL THF unter Außenkühlung der Injektionsspritze mit Trockeneis innerhalb von 25 min tropfenweise zugegeben. Die Reaktion wurde 30 min bei -78°C gerührt, dann graduell in 75 min auf 0°C aufgewärmt und mit 1 mL halbgesättigter NH_4Cl Lösung versetzt.

Die Reaktionslösung wurde mit 30 mL Diethylether verdünnt und zweimal mit je 30 mL 10%iger K_2CO_3 Lösung und einmal mit 30 mL gesättigter NaCl Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit 30 mL Diethylether rückextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säulenchromatographie über Kieselgel mit jeweils nach DC optimierten Laufmittelgemischen.

Einige β -Lactone wurden zusätzlich zur chemischen Charakterisierung mit analytischer HPLC auf ihre Reinheit untersucht. Hierbei wurde ein Wasser-Acetonitril Gradient gefahren mit A = Wasser, 0,1 % (v/v) TFA, B = Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA. Der Gradient aus beiden Lösungsmitteln A und B ergab sich nach T_{min} :

T_0 : A = 100%; T_{25} : A = 5%; T_{29} : A = 5%; T_{37} : A = 100%; T_{40} : A = 100%.

trans-3-(8-Nonen-1-yl)-4-(4-pentin-1-yl)oxetan-2-on (Sonde D3)

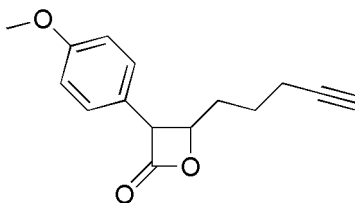


Die Reaktion wurde mit 10-Undecensäurephenylthioester (55,3 mg, 0,20 mmol) und 5-Hexinal (19,2 mg, 0,20 mmol) durchgeführt. Standardaufarbeitung und Aufreinigung durch Säulenchromatographie (iso-Hexan/Ethylacetat 50:3, $R_f = 0,31$) ergab das Produkt als fahlgelbes Öl (3,9 mg, 0,015 mmol, 7%).

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 5,80 (tdd, $J = 16,9, 10,1, 6,7$ Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,04-4,89 (m, 2 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,24 (dt, $J = 6,5, 3,9$ Hz, 1 H, H-4), 3,20 (ddd, $J = 8,7, 6,8, 4,2$ Hz, 1 H, H-3), 2,28 (dt, $J = 6,9, 2,6$ Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$), 1,99 (t, $J = 2,6$ Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 2,05-1,31 (m, 18 H, $(\text{CH}_2)_2$ and $(\text{CH}_2)_7$).

GC Retentionszeit = 9,0 min, DEI-MS (m/z): 262,1929 $[\text{M}]^+$, ber.: 262,1933.

trans-3-(4-Methoxyphenyl)-4-(4-pentin-1-yl)oxetan-2-on (Sonde E2)

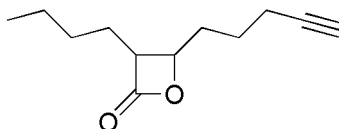


Die Reaktion wurde mit 2-(4-Methoxyphenyl)ethansäurephenylthioester (51,7 mg, 0,20 mmol) und 5-Hexinal (19,2 mg, 0,20 mmol) durchgeführt. Standardaufarbeitung und Aufreinigung durch Säulenchromatographie (iso-Hexan/Ethylacetat 5:1, $R_f = 0,35$) ergab das Produkt als fahlgelbes Öl (6,3 mg, 0,026 mmol, 13%).

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 7,19 (d, $J = 8,5$ Hz, 2 H, Phenylen C-H), 6,91 (d, $J = 8,7$ Hz, 2 H, Phenylen C-H), 4,51 (dt, $J = 6,6, 4,3$ Hz, 1 H, H-4), 4,38 (d, $J = 4,3$ Hz, 1 H, H-3), 3,81 (s, 3 H, O-CH₃), 2,29 (dt, $J = 6,8, 2,7$ Hz, 2 H, HC \equiv C-CH₂), 2,17-2,04 (m, 2 H, CH₂), 2,00 (t, $J = 2,6$ Hz, 1 H, HC \equiv C), 1,87-1,55 (m, 2 H, CH₂).

GC Retentionszeit = 8,0 min, DEI-MS (m/z): 244,1090 [M]⁺, ber.: 244,1099.

trans-3-Butyl-4-(4-pentin-1-yl)oxetan-2-on (Sonde G2)

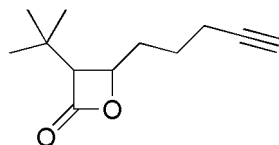


Die Reaktion wurde mit Hexansäurephenylthioester (41,7 mg, 0,20 mmol) und 5-Hexinal (19,2 mg, 0,20 mmol) durchgeführt. Standardaufarbeitung und Aufreinigung durch Säulenchromatographie (iso-Hexan/Ethylacetat 25:1, $R_f = 0,19$) ergab das Produkt als fahlgelbes Öl (4,8 mg, 0,025 mmol, 12%).

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 4,25 (dt, $J = 6,5, 4,0$ Hz, 1 H, H-4), 3,19 (ddd, $J = 8,6, 6,6, 4,0$ Hz, 1 H, H-3), 2,28 (dt, $J = 6,9, 2,6$ Hz, 2 H, HC \equiv C-CH₂), 1,99 (t, $J = 2,7$ Hz, 1 H, HC \equiv C), 1,82-1,16 (m, 10 H, (CH₂)₃ und (CH₂)₂), 0,92 (t, $J = 6,7$ Hz, 3 H, CH₃).

GC Retentionszeit = 6,7 min, TIC-MS (m/z): 193,1235 [M-H]⁺, ber.: 193,1229.

***cis* und *trans*-3-Dimethylethyl-4-(4-pentin-1-yl)oxetan-2-on
(Sonde L1 und LT1)**



Die Reaktion wurde mit 3,3-Dimethylbutansäurephenylthioester (41,7 mg, 0,20 mmol) und 5-Hexinal (19,2 mg, 0,20 mmol) durchgeführt. Standardaufarbeitung und Aufreinigung durch Säulenchromatographie (iso-Hexan/Ethylacetat 25:1, $R_f^{\text{cis}} = 0,22$, $R_f^{\text{trans}} = 0,28$) ergab die Produkte jeweils als fahlgelbes Öl:

cis-3-Dimethylethyl-4-(4-pentin-1-yl)oxetan-2-on, L1 (6,9 mg, 0,036 mmol, 18%) und *trans*-3-Dimethylethyl-4-(4-pentin-1-yl)oxetan-2-on, LT1 (2,1 mg, 0,011 mmol, 5%).

cis isomer **L1**:

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 4,55 (dd, $J = 13,6, 6,8$ Hz, 1 H, H-4), 3,56 (d, $J = 6,8$ Hz, 1 H, H-3), 2,34-2,25 (m, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$), 2,13-2,02 (m, 2 H, CH_2), 1,98 (t, $J = 2,7$ Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1,93-1,52 (m, 2 H, CH_2), 1,14 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

GC Retentionszeit = 6,4 min, TIC-MS (m/z): 193,1224 $[\text{M}-\text{H}]^+$, ber.: 193,1229.

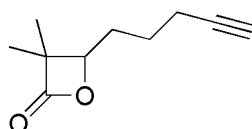
trans isomer **LT1**:

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 4,34 (dt, $J = 7,8, 4,8$ Hz, 1 H, H-4), 3,04 (d, $J = 4,1$ Hz, 1 H, H-3), 2,29 (m, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$), 1,99 (t, $J = 2,6$ Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1,96-1,85 (m, 2 H, CH_2), 1,75-1,59 (m, 2 H, CH_2), 1,06 (s, 9 H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 170,4, 83,5, 74,1, 69,5, 67,6, 34,0, 30,9, 27,4, 24,4, 18,3.

GC Retentionszeit = 7,0 min, TIC-MS (m/z): 193,1205 $[\text{M}-\text{H}]^+$, Calc.: 193,1229.

***trans*-3,3-Dimethyl-4-(4-pentin-1-yl)oxetan-2-on (Sonde M1)**



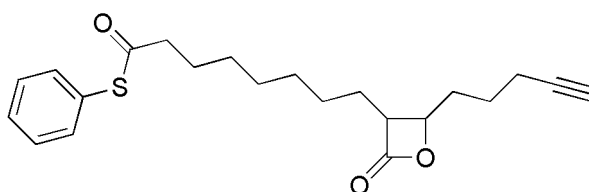
Die Reaktion wurde mit Isobutansäurephenylthioester (36 mg, 0,20 mmol) und 5-Hexinal (19,2 mg, 0,20 mmol) durchgeführt. Standardaufarbeitung und

Aufreinigung durch Säulenchromatographie (iso-Hexan/Ethylacetat 50:3, $R_f = 0,21$) ergab das Produkt als fahlgelbes Öl (11,3 mg, 0,068 mmol, 34%).

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 4,24 (t, $J = 6,7$ Hz, 1 H, H-4), 2,33-2,24 (m, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$), 1,98 (t, $J = 2,7$, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1,90-1,49 (m, 4 H, $(\text{CH}_2)_2$), 1,42 (s, 3 H, CH_3), 1,27 (s, 3 H, CH_3).

GC Retentionszeit = 5,4 min, TIC-MS (m/z): 166,0977 $[\text{M}-\text{H}]^+$, ber.: 166,0994.

***trans*-8-(2-Oxo-4-(4-pentin-1-yl)oxetan-3-yl)octansäurephenylthioester (Sonde N1)**

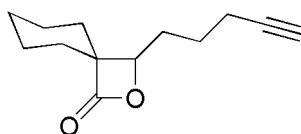


Die Reaktion wurde mit Octandicarbonsäurediphenylthioester (38,7 mg, 0,20 mmol) und 5-Hexinal (28,8 mg, 0,30 mmol) durchgeführt. Standardaufarbeitung und Aufreinigung durch Säulenchromatographie (iso-Hexan/Ethylacetat 25:3, $R_f = 0,30$) ergab das Produkt als fahlgelbes Öl (4,0 mg, 0,011 mmol, 5%).

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 7,41 (app. s, 5 H, C_6H_5), 4,25 (dt, $J = 6,5, 4,0$ Hz, 1 H, H-4), 3,20 (ddd, $J = 8,5, 6,8, 3,9$ Hz, 1 H, H-3), 2,65 (t, $J = 7,4$ Hz, 2 H, $\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2$), 2,28 (dt, $J = 6,9, 2,6$ Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$), 1,99 (t, $J = 2,7$ Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1,95-1,28 (m, 16 H, $(\text{CH}_2)_2$ und $(\text{CH}_2)_6$).

HPLC Retentionszeit (254 nm) = 27,05 min, ESI-MS (m/z): 373,1826 $[\text{M}+\text{H}]^+$, ber.: 373,1837.

4-(4-Pentin-1-yl)oxetan-2-on-3-spirocyclohexan (Sonde O1)



Die Reaktion wurde mit Cyclohexancarbonsäurephenylthioester (44,1 mg, 0,20 mmol) und 5-Hexinal (19,2 mg, 0,20 mmol) durchgeführt. Standardaufarbeitung

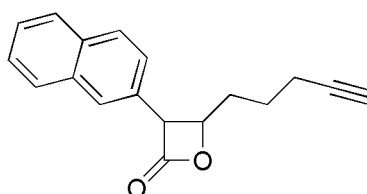
und Aufreinigung durch Säulenchromatographie (iso-Hexan/Ethylacetat 20:1, $R_f = 0,28$) ergab das Produkt als fahlgelbes Öl (10,1 mg, 0,049 mmol, 24%).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 4,16 (dd, $J = 9,8, 3,7$ Hz, 1 H, H-4), 2,34-2,23 (m, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$), 1,98 (t, $J = 2,6$ Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1,94-1,33 (m, 11 H, CH and $(\text{CH}_2)_5$).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 174,9, 83,6, 82,9, 69,4, 58,3, 33,3, 29,1, 26,7, 25,5, 24,7, 23,0, 22,8, 18,3.

GC Retentionszeit = 7,5 min, TIC-MS (m/z): 205,1222 $[\text{M}-\text{H}]^+$, ber.: 205,1229.

***trans*-3-(2-Naphthyl)-4-(4-pentin-1-yl)oxetan-2-on (Sonde P1)**



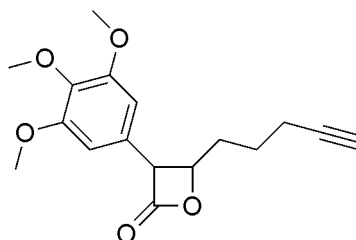
Die Reaktion wurde in doppelter Ansatzgröße mit 2-(2-Naphthyl)ethansäurephenylthioester (111,4 mg, 0,40 mmol) und 5-Hexinal (38,4 mg, 0,40 mmol) durchgeführt und alle übrigen Reagenzien und Lösungsmittel entsprechend hochskaliert. Standardaufarbeitung und Aufreinigung durch Säulenchromatographie (iso-Hexan/Ethylacetat 100:11, $R_f = 0,34$) ergab das Produkt als fahlgelbes Öl (6,8 mg, 0,026 mmol, 6%).

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7,88 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H, Naphthyl C-H), 7,85-7,82 (m, 2 H, Naphthyl C-H), 7,76 (s, 1 H, Naphthyl C-H), 7,53-7,49 (m, 2 H, Naphthyl C-H), 7,36 (dd, $J = 8,4, 1,8$ Hz, 1 H, Naphthyl C-H), 4,66 (dt, $J = 6,6, 4,3$, 1 H, H-4), 4,61 (d, $J = 4,3$ Hz, 1 H, H-3), 2,32 (dt, $J = 7,0, 2,6$ Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$), 2,19-2,15 (m, 2 H, CH_2), 2,01 (t, $J = 2,6$ Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1,84-1,69 (m, 2 H, CH_2).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 169,2, 133,6, 133,1, 130,0, 129,5, 128,1, 128,0, 127,0, 126,8, 126,7, 124,8, 83,3, 79,5, 69,8, 61,8, 33,7, 24,2, 18,3.

HPLC Retentionszeit (254 nm) = 25,5 min, DEI-MS (m/z): 264,1160 $[\text{M}]^+$, ber.: 264,1150.

***trans*-4-(4-Pentin-1-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)oxetan-2-on (Sonde Q1)**



Die Reaktion wurde mit 2-(3,4,5-Trimethoxyphenyl)ethansäurephenylthioester (63,7 mg, 0,20 mmol) und 5-Hexinal (19,2 mg, 0,20 mmol) durchgeführt. Standardaufarbeitung und Aufreinigung durch Säulenchromatographie (iso-Hexan/Ethylacetat 5:2, $R_f = 0,34$) ergab das Produkt als fahlgelbes Öl (5,2 mg, 0,017 mmol, 9%).

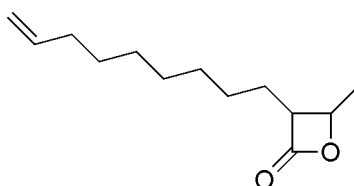
$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ 6,46 (s, 2 H, Phenylen C-H), 4,55 (dt, $J = 6,6, 4,3$, 1 H, H-4), 4,36 (d, $J = 4,3$ Hz, 1 H, H-3), 3,86 (s, 6 H, 2x CH_3), 3,83 (s, 3 H, CH_3), 2,31 (dt, $J = 6,8, 2,7$ Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$), 2,17-2,06 (m, 2 H, CH_2), 2,01 (t, $J = 2,6$ Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1,86-1,61 (m, 2 H, CH_2).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3) δ 169,2, 154,1, 138,3, 128,2, 104,6, 83,3, 79,4, 69,8, 61,8, 61,1, 56,5, 33,6, 24,2, 18,3.

GC Retentionszeit = 10,2 min, DEI-MS (m/z): 304,1295 $[\text{M}]^+$, ber.: 304,1311.

HPLC Retentionszeit (254 nm) = 20,2 min.

***trans*-4-Methyl-3-(8-nonen-1-yl)oxetan-2-on (Lacton R1)**



Dieser leicht modifizierte Ansatz wurde auf die dreifache Menge des Standardansatzes skaliert. Die in der Reaktion von Diisopropylamin (0,72 mmol) und *n*-Butyllithium (0,72 mmol) entstehende Lithiumdiisopropylamid (LDA) Lösung wurde 15 min bei 0°C gerührt und weitere 30 min bei -78°C. Es wurde 10-Undecensäurephenylthioester (166 mg, 0,60 mmol) in 1 mL THF innerhalb von 15 min tropfenweise hinzugegeben. Nach 45 min rühren bei -78°C wurde eine

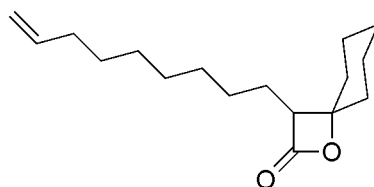
Lösung von Acetaldehyd (33,9 μ L, 0,60 mmol) in 1 mL THF über 40 min unter Außenkühlung der Spritze durch Trockeneis zugetropft. Die Reaktion wurde für 40 min bei -78°C gerührt und in 80 min auf 0°C aufgewärmt und 2,5 mL halbgesättigte NH_4Cl Lösung zugegeben. Standardaufarbeitung und weitere Aufreinigung durch Säulenchromatographie (iso-Hexan/Ethylacetat 50:3, $R_f = 0,29$) ergab das Produkt als fahlgelbes Öl (17,6 mg, 0,084 mmol, 14%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5,82 (tdd, $J = 17,0, 10,2, 6,7$ Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,05-4,93 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 4,41 (dq, $J = 6,1, 4,0$ Hz, 1 H, H-4), 3,18 (ddd, $J = 8,8, 6,6, 4,0$ Hz, 1 H, H-3), 2,10-2,02 (m, 2 H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 1,91-1,67 (m, 2 H, C(3)H- CH_2), 1,56 (d, $J = 6,1$ Hz, 1 H, CH_3), 1,48-1,26 (m, 10 H, $(\text{CH}_2)_5$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 171,3, 139,0, 114,2, 74,6, 57,6, 33,7, 29,2, 29,1, 28,9, 28,8, 27,7, 26,9, 20,3.

GC Retentionszeit = 8,1 min, TIC-MS (m/z): 210,1638 $[\text{M}-\text{H}]^+$, ber.: 210,1620.

3-(8-Nonen-1-yl)oxetan-2-on-4-spirocyclohexan (Lacton S1)



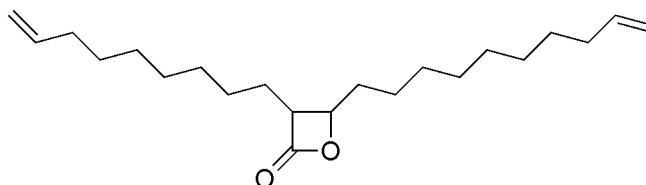
Dieser Ansatz wurde analog zu dem veränderten Protokoll von Lacton **R1** durchgeführt. Hierbei wurde 10-Undecensäurephenylthioester (166 mg, 0,60 mmol) und Cyclohexanon (62 μ L, 0,60 mmol) eingesetzt. Standardaufarbeitung und Aufreinigung durch Säulenchromatographie (iso-Hexan/Ethylacetat 50:3, $R_f = 0,35$) ergab das Produkt als fahlgelbes Öl (58 mg, 0,22 mmol, 37%).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 5,81 (tdd, $J = 16,9, 10,2, 6,7$ Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,04-4,91 (m, 2H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 3,06 (dd, $J = 8,5, 7,5$ Hz, 1 H, H-3), 2,09-2,01 (m, 2 H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$), 1,96-1,47 (m, 12 H, C(3)H- CH_2 und C(4)- $(\text{CH}_2)_5$), 1,45-1,26 (m, 10 H, $\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_5$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 172,2, 139,1, 114,2, 82,1, 58,2, 37,4, 33,7, 31,3, 29,4, 29,1, 29,0, 28,8, 27,7, 25,0, 24,0, 22,9, 22,2.

DEI-MS (m/z): 264,2085 [M]⁺, ber.: 264,2089.

***trans*-4-(9-Decen-1-yl)-3-(8-nonen-1-yl)oxetan-2-on (Lacton T1)**



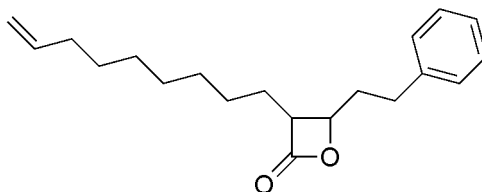
Dieser Ansatz wurde analog zu dem veränderten Protokoll von Lacton **R1** durchgeführt. Hierbei wurde 10-Undecensäurephenylthioester (166 mg, 0,60 mmol) und 10-Undecenal (125 μ L, 0,60 mmol) eingesetzt. Standardaufarbeitung und Aufreinigung durch Säulenchromatographie (iso-Hexan/Ethylacetat 50:3, R_f = 0,39) ergab das Produkt als fahlgelbes Öl (30,5 mg, 0,091 mmol, 15%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5,81 (tdd, J = 16,9, 10,2, 6,7 Hz, 1 H, CH=CH₂), 5,80 (tdd, J = 16,9, 10,2, 6,7 Hz, 1 H, CH=CH₂), 5,03-4,90 (m, 4 H, 2x CH=CH₂), 4,20 (ddd, J = 7,3, 6,0, 4,0 Hz, 1 H, H-4), 3,15 (ddd, J = 8,7, 6,7, 4,0 Hz, 1 H, H-3), 2,07-2,02 (m, 4 H, 2x CH₂-CH=CH₂), 1,91-1,58 (m, 4 H, C(3)H-CH₂ und C(4)H-CH₂), 1,48-1,22 (m, 22 H, (CH₂)₅ und (CH₂)₆).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171,6, 139,1, 139,0, 114,2 (2x), 78,1, 56,2, 34,4, 33,8, 33,7, 29,3 (2x), 29,2 (2x), 29,1, 29,0, 28,9, 28,8 (2x), 27,9, 27,0, 25,0.

DEI-MS (m/z): 334,2857 [M]⁺, ber.: 334,2872.

***trans*-3-(8-Nonen-1-yl)-4-phenethyl-1-oxetan-2-on (Lacton U1)**



Dieser Ansatz wurde analog zu dem veränderten Protokoll von Lacton **R1** durchgeführt und auf doppelte Ansatzgröße skaliert. Hierbei wurde Diisopropylamin (1,50 mmol) und n-Butyllithium (1,50 mmol) sowie 10-Undecensäurephenylthioester (333 mg, 1,20 mmol) und 3-Phenylpropionaldehyd (160 μ L, 1,20 mmol) eingesetzt. Standardaufarbeitung und Aufreinigung durch Säulenchromatographie (iso-Hexan/Ethylacetat 20:1, R_f = 0,26) ergab das Produkt als fahlgelbes Öl (72,9 mg, 0,24 mmol, 20%).

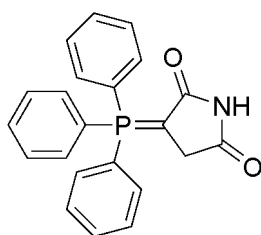
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7,33-7,19 (m, 5 H, C_6H_5), 5,81 (tdd, J = 16,9, 10,2, 6,7 Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}_2$), 5,00 (tdd, J = 17,2, 2,1, 1,6 Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}(\text{H})$), 4,94 (tdd, J = 10,1, 2,3, 1,3 Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}(\text{H})$), 4,22 (ddd, J = 8,0, 5,4, 4,0 Hz, 1 H, H-4), 3,18 (ddd, J = 8,4, 6,9, 4,0 Hz, 1 H, H-3), 2,82 (ddd, J = 14,5, 9,3, 5,5, 1 H, $\text{CH}(\text{H})-\text{C}_6\text{H}_5$), 2,71 (ddd, J = 14,0, 9,0, 7,2, 1 H, $\text{CH}(\text{H})-\text{C}_6\text{H}_5$), 2,21-2,02 (m, 4 H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ und C(4)H- CH_2), 1,81-1,63 (m, 2 H, C(3)H- CH_2), 1,44-1,25 (m, 10 H, $(\text{CH}_2)_5$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3) δ 171,3, 140,1, 139,0, 128,6, 128,3, 126,4, 114,2, 77,1, 56,2, 36,1, 33,7, 31,3, 29,2, 29,1, 28,9, 28,8, 27,7, 26,9.

DEI-MS (m/z): 300,2089 $[\text{M}]^+$, ber.: 300,2089.

Die Enantiomeren wurden durch HPLC auf einer isokratisch gefahrenen chiralen Daicel chiralpak IB Säule mit n-Heptan und 2% Isopropanol getrennt. Die entsprechenden Peaks von Enantiomer 1 und Enantiomer 2 wurden bei Retentionszeiten von 21 min und 28 min gesammelt (siehe HPLC Spektrum). Die Identität der separierten Enantiomere wurde durch ^1H NMR und Massenspektrometrie bestätigt. Die jeweiligen Messwerte entsprachen den oben angegebenen Analysedaten.

Synthese von Triphenylphosphoranylidensuccinimid (11)



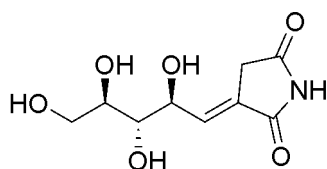
Maleimid (5,0 g, 51 mmol) wurde in 100 mL Eisessig vorgelegt, mit Triphenylphosphin (13,0 g, 50 mmol) versetzt und bei 100°C unter Rückfluss gerührt. Nach 30 min war die Reaktion gemäß DC Analyse (iso-Hexan/Ethylacetat 1:1) vollständig abgelaufen. Die Reaktionslösung wurde mit Diethylether versetzt, bis sich ein fahlrotes Präzipitat ergab. Dieses wurde abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Hierbei wurde das Produkt als amorpher farbloser Feststoff erhalten (12,89 g, 36 mmol, 72%).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,64-7,61 (m, 9 H, Phe), 7,54-7,51 (m, 6 H, Phe), 3,03 (s, 2 H, CH_2).

$^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 177,9 ($J_{\text{C-P}} = 16,8$ Hz, C=O), 171,0 ($J_{\text{C-P}} = 15,1$ Hz, C=O), 133,6 ($J_{\text{C-P}} = 10,5$ Hz, Phe), 133,0 ($J_{\text{C-P}} = 2,2$ Hz, Phe), 129,4 ($J_{\text{C-P}} = 12,6$ Hz, Phe), 125,6 ($J_{\text{C-P}} = 92,3$ Hz, Phe), 38,5 ($J_{\text{C-P}} = 10,2$ Hz, CH_2), 36,9 ($J_{\text{C-P}} = 136,8$ Hz, P=C).

DEI-MS (m/z): 258,0932 $[\text{M-H}]^-$, ber.: 358,0997.

Synthese von (E)-3-(2(S),3(S),4(R),5-Tetrahydroxypent-1-yliden)pyrrolidin-2,5-dion (12)



Zu einer gerührten Lösung von Triphenylphosphoranyliden-succinimid **11** (10,8 g, 30 mmol) in 75 mL trockenem THF wurde D-(-)-Ribose (2,3 g, 15 mmol) gegeben und das Reaktionsgemisch bei 80°C unter Rückfluss in Stickstoffatmosphäre gekocht. Gemäß DC Kontrolle (Chloroform/Methanol 9:1) war die Reaktion nach 210 h vollständig. Nachdem das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt worden war, wurde das Rohprodukt in 75 mL Wasser und 75 mL Dichlormethan aufgenommen, die wässrige Phase gesammelt und unter reduziertem Druck aufkonzentriert. Chromatographische Trennung über ein Gemisch aus C_{18} Umkehrphasenmaterial und Kieselgel (100:1 w/w) mit Wasser als mobiler Phase ergab das rasch eluierende

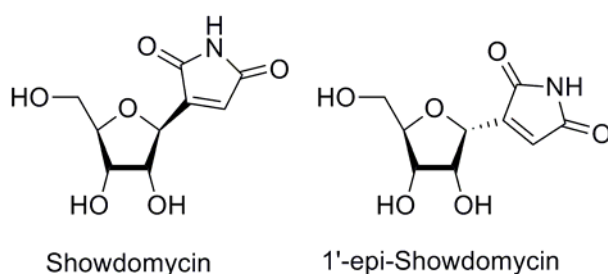
Rohprodukt, das anschließend unter Vakuum getrocknet und durch Säulenchromatographie über Kieselgel mit Ethylacetat und einem Gradienten von Acetonitril/Methanol (4:1), angefangen mit reinem Ethylacetat bis auf Ethylacetat/(Acetonitril/Methanol) 3:1, aufgereinigt. Das Produkt wurde nach Entfernen des Lösungsmittels und trocknen als fahloter Feststoff erhalten (1,20 g, 5,2 mmol, 35%)

^1H NMR (200 MHz, D_2O) δ 6,59 (dt, $J = 8,4, 2,3$ Hz, 1 H, C=CH), 4,44 (dd, $J = 8,4, 4,4$ Hz, 1 H, CH-CH=C), 3,69-3,60 (m, 2 H), 3,60-3,52 (m, 2 H), 3,36 (d, $J = 2,4$ Hz, 2 H, CH₂-C(O)).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 178,9, 173,1, 134,4, 129,8, 73,5, 71,7, 69,6, 62,7, 33,2.

ESI-MS, positiver Modus (m/z): 232,0588 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (ber.: 232,0816), 249,1052 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (ber.: 249,1081); negativer Modus (m/z): 230,0678 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (ber.: 230,0670), 276,0739 $[\text{M}+\text{FA}-\text{H}]^-$ (ber.: 276,0725), 461,1446 $[2\text{M}-\text{H}]^-$ (ber.: 461,1413).

Synthese von Showdomycin (13a) und 1'-epi-Showdomycin (13b)



Eine gerührte Lösung von **12** (462 mg, 2,0 mmol) in 28 mL trockenem Acetonitril wurde auf 65°C erwärmt und mit Phenylselenylchlorid (400 mg, 2,1 mmol) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 29 h bei 65°C gerührt, dann auf RT abkühlen gelassen und 10 mL einer 10%igen wässrigen H_2O_2 Lösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde mittels DC (Ethylacetat/Acetonitril/Methanol 15:4:1) kontrolliert und gerührt, bis das reduzierte selenhaltige Edukt vollständig verbraucht worden war. Dies wurde durch Behandlung der DCs mit 1% PdCl_2 in 0,1 M HCl als Färbereagenz visualisiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt und die Produkte durch Säulenchromatographie über Kieselgel (Ethylacetat/Ethanol 19:1, $R_f = 0,25$) aufgereinigt. Hierbei wurde das Produkt als Gemisch der Diastereomeren **13a** und **13b**

erhalten (230 mg, 1,0 mmol, 50%). Eine Aufreinigung mittels HPLC und anschließende Lyophilisierung ergab die einzelnen Isomere jeweils als weißen Feststoff. Die Diastereomere wurden mittels zweidimensionalen NMR Spektren identifiziert.

Showdomycin 13a

HPLC Analyse, mobile Phase (HPLC grade): A = Wasser, B = Acetonitril. Gradient (T_{\min}): T_0 : B = 0%; T_9 : A = 3%. Retentionszeit: 5,1 min.

^1H NMR (400 MHz, Aceton- d_6) δ 6,72 (d, $J = 1,7$ Hz, 1 H, C=CH), 4,71 (dd, $J = 4,8$, 1,6 Hz, 1 H, 1'-H), 4,44 (br, 1 H, OH), 4,20 (dd, $J = 4,9$, 4,9 Hz, 1 H, 2'-H), 4,16 (dd, $J = 5,1$, 5,1 Hz, 1 H, 3'-H), 4,09 (br, 1 H, OH), 3,95 (td, $J = 5,1$, 3,3 Hz, 1 H, 4'-H), 3,89 (app. t, 1 H, 5'-OH), 3,81-3,76 (m, 1 H, CH(H)), 3,68-3,62 (m, 1 H, CH(H)).

^{13}C NMR (151 MHz, Acetone- d_6) δ 171,3, 170,6, 148,7, 129,1, 84,7, 78,0, 75,4, 71,4, 61,7.

ESI-MS, positiver Modus (m/z): 229,9854 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (ber.: 230,0659), 247,0896 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (ber.: 247,0924); negativer Modus (m/z): 228,0516 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (ber.: 228,0513), 264,0283 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ (ber.: 264,0280), 274,0572 $[\text{M}+\text{FA}-\text{H}]^-$ (ber.: 274,0568), 457,1107 $[2\text{M}-\text{H}]^-$ (ber.: 457,1099).

1'-epi-Showdomycin 13b

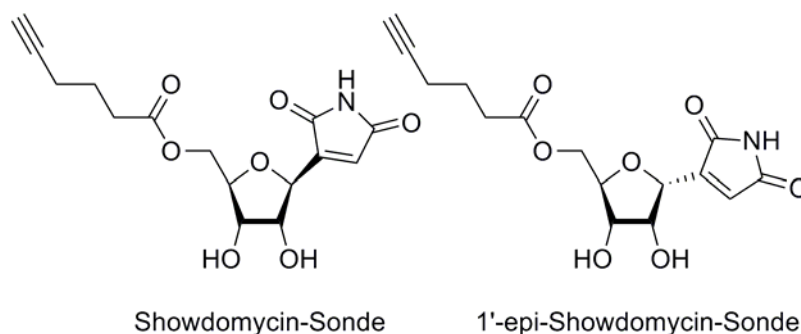
HPLC Analyse, mobile Phase (HPLC grade): A = Wasser, B = Acetonitril. Gradient (T_{\min}): T_0 : B = 0%; T_9 : A = 3%. Retentionszeit: 4,5 min.

^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ 6,48 (d, $J = 2,1$ Hz, 1 H, C=CH), 4,94 (dd, $J = 3,7$, 2,1 Hz, 1 H, 1'-H), 4,40-4,33 (m, 2 H, 2'-H und 3'-H), 4,24 (d, $J = 3,1$ Hz, 1 H, OH), 4,12 (br, 1 H, OH), 3,94 (ddd, $J = 7,3$, 4,1, 2,8 Hz, 1 H, 4'-H), 3,81 (ddd, $J = 11,5$, 4,6, 2,9, 1 H, CH(H)), 3,73 (app. t, 1 H, 5'-OH), 3,63 (ddd, $J = 11,6$, 6,5, 4,1 Hz, 1 H, CH(H)).

^{13}C NMR (151 MHz, Acetone- d_6) δ 170,9, 148,7, 128,3, 82,8, 76,7, 72,8, 71,5, 61,8.

ESI-MS, positiver Modus (m/z): 229,9854 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (ber.: 230,0659), 247,0896 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (ber.: 247,0924); negativer Modus (m/z): 228,0516 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (ber.: 228,0513), 264,0283 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ (ber.: 264,0280), 274,0572 $[\text{M}+\text{FA}-\text{H}]^-$ (ber.: 274,0568), 457,1107 $[2\text{M}-\text{H}]^-$ (ber.: 457,1099).

Synthese von 5'-O-Hex-5-inoyl-showdomycin (14a) und 5'-O-Hex-5-inoyl-1'-epi-showdomycin (14b).



HOBt (40,5 mg, 0,30 mmol) wurde in 800 μ L DMF gelöst und Hex-5-insäure (33,1 μ L, 0,30 mmol) sowie *N,N*-Diisopropylcarbodiimid, DIC (46,4 μ L, 0,30 mmol) hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 min bei RT gerührt. Anschließend wurde das Gemisch der Diastereomeren **13a** und **13b** (40 mg, 0,17 mmol) in 200 μ L DMF zugefügt und für 12 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde vollständig abgezogen und der Rückstand durch HPLC aufgereinigt, wobei die reinen Isomere der Sonden, die Showdomycin Sonde **14a** und die 1'-epi-Showdomycin Sonde **14b** nach Lyophilisierung jeweils als weißer Feststoff erhalten wurden.

5'-O-Hex-5-inoylshowdomycin 14a

HPLC Analyse, mobile Phase (HPLC grade): A = Wasser, B = Acetonitril. Gradient (T_{\min}): T_0 : B = 0%; T_{40} : A = 40%. Retentionszeit: 20,8 min.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, Acetone- d_6) δ 6,60 (d, $J = 1,8$ Hz, 1 H, C=CH), 4,75 (dd, $J = 3,7, 1,8$ Hz, 1 H, 1'-H), 4,38-4,34 (dd, $J = 11,9, 2,5$ Hz, 1 H, 5'-H), 4,27-4,23 (m, 2 H, 2'-H und 5'-H), 4,13-4,08 (m, 2 H, 3'-H und 4'-H), 2,50 (t, $J = 7,4$ Hz, 2 H, C(O)-CH $_2$), 2,36 (t, $J = 2,7$ Hz, 1 H, C \equiv CH), 2,26 (dt, $J = 7,1, 2,7$ Hz, 2 H, CH $_2$ -C \equiv CH), 1,82 (Ψ -quin., $J = 7,4$ Hz, 2 H, C(O)-CH $_2$ -CH $_2$).

ESI-MS, negativer Modus (m/z): 322,0944 [M-H] $^-$ (ber.: 322,0932), 358,0730 [M+Cl] $^-$ (ber.: 358,0699), 645,2015 [2M-H] $^-$ (ber.: 645,1937).

5'-O-Hex-5-inoyl-1'-epi-showdomycin 14b

HPLC Analyse, mobile Phase (HPLC grade): A = Wasser, B = Acetonitril. Gradient (T_{\min}): T_0 : B = 0%; T_{40} : A = 40%. Retentionszeit: 21,9 min.

^1H NMR (400 MHz, Acetone- d_6) δ 6,38 (d, $J = 2,11$ Hz, 1 H, $\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}$), 4,88 (dd, $J = 3,6, 2,1$ Hz, 1 H, 1'-H), 4,30-4,26 (m, 2 H, 2'-H and 5'-H), 4,19 (dd, $J = 8,2, 4,5$ Hz, 1 H, 3'-H), 4,08 (dd, $J = 11,8, 5,5$ Hz, 1 H, 5'-H), 4,01 (ddd, $J = 8,2, 5,5, 2,7$ Hz, 1 H, 4'-H), 2,39 (t, $J = 7,3$ Hz, 2 H, $\text{C}(\text{O})-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2,25 (t, $J = 2,7$ Hz, 1 H, $\text{C}\equiv\underline{\text{C}}\text{H}$), 2,16 (dt, $J = 7,1, 2,7$ Hz, 2 H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 1,71 (Ψ -quin., $J = 7,8$ Hz, 2 H, $\text{C}(\text{O})-\text{C}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2$).

^{13}C NMR (MHz, Acetone- d_6) δ 172,2, 170,8, 148,2, 128,4, 83,1, 79,6, 76,7, 73,4, 72,4, 69,6, 63,9, 32,3, 23,7, 17,2.

ESI-MS, positiver Modus (m/z): 664,2332 [$2\text{M}+\text{NH}_4$] $^+$ (ber.: 664,2348); negativer Modus (m/z): 322,0942 [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ (ber.: 322,0932), 368,1009 [$\text{M}+\text{FA}-\text{H}$] $^-$ (ber.: 368,0987), 645,2011 [$2\text{M}-\text{H}$] $^-$ (ber.: 645,1937).

5.3. Chemisch-biologische Methoden

5.3.1. Allgemeine Methoden

5.3.1.1. Formulierungen der verwendeten Medien

5.3.1.1.1. Flüssigmedien

Die in der Mikrobiologie verwendeten Medien wurden wie im Folgenden beschrieben hergestellt und anschließend durch Autoklavieren sterilisiert.

LB Medium

- 10 g/L Tryptisch verdautes Casein („Pepton aus Casein“, Roth)
 - 5 g/L Hefeextrakt (Merck)
 - 5 g/L NaCl
- pH Wert eingestellt auf 7,5

BHB Medium

37 g Fertigmischung Hirn-Herz-Bouillon (Fluka) auf 1 L deionisiertes Wasser.

HeLa Kulturmedim

DMEM (HeLa) + 10% FBS, mit Antibiotikum
500 mL Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM D5796, Sigma) mit 4500 mg/L Glucose, L-Glutamin, NaHCO₃ und Pyridoxin·HCl wurden mit 56 mL FBS und 1 µL Antibiotikum/Antimycoticum (GIBCO, PenG, Streptomycin, Amphotericin)

Makrophagen J774 Kulturmedium

DMEM (J774) + 10 % FBS, mit Antibiotikum

500 mL Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM D6046, Sigma) mit 1000 mg/L Glucose, L-Glutamin, NaHCO₃ und Pyridoxin·HCl

5.3.1.1.2. Agarplatten

LB Agarplatten mit Antibiotika

500 mL frisch hergestelltes LB Medium pH 7,5 mit 7,5 g Agar Agar autoklaviert, nach Abkühlen auf ca. 60°C mit 500 µL Antibiotika Stammlösung versetzt und in Platten gegossen.

Schafblut-Agar (5 %)

Fertigplatten von heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim, Deutschland

Zusammensetzung:

14 g/L	Caseinpepton
4,5 g/L	Fleischpepton
4,5 g/L	Hefextrakt
16 g/L	Agar
50 mL/L	Hammelblut
5 g/L	NaCl

Milchagarplatten (1%)

10 g	Tryptisch verdautes Casein („Pepton aus Casein“, Roth)
5 g	Hefeextrakt (Merck)
5 g	NaCl
15 g	Agar

900 mL deionisiertes Wasser

pH Wert eingestellt auf 7,5

Autoklaviert

nach abkühlen auf 70°C, 100 mL Lösung von 100 g/L Milchpulver (Skim Milk Powder, Fluka) in sterilem deionisiertem Wasser eingerührt.

Tributylin-Agarplatten (1%)

5,0 g Tributyrin Agar (Fluka) in 250 mL deionisiertem Wasser gelöst, autoklaviert und nach Abkühlen auf 80°C 2422 µL Tributyrin eingerührt und durch kräftiges Schütteln emulgiert.

5.3.1.2. Mikrobiologie

5.3.1.2.1. Bakterienstämme

In Tabelle 5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienarten sowie ihre Stämme mit Bezugsquelle angegeben.

Tabelle 5: Übersicht über alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

Spezies	Stamm	Bezugsquelle
<u>nicht-pathogen (S1)</u>		
<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	DSMZ, Deutschland
<i>Bacillus subtilis</i>	168	DSMZ, Deutschland
<i>Escherichia coli</i>	K12	DSMZ, Deutschland
	BL21	Novagen, Deutschland
	TOP10	Invitrogen, Deutschland
	XL1-Blue	Stratagene, Deutschland
<i>Listeria welshimeri</i>	SLCC 5334 serovar 6b	DSMZ, Deutschland
<i>Pseudomonas putida</i>	KT2440	ATCC, USA
<u>pathogen (S2)</u>		
<i>Listeria monocytogenes</i>	EGD-e	Institute Pasteur, Frankreich
	F2365	BCCM™/LMG, Belgien
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	Institute Pasteur, Frankreich
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 8325	Institute Pasteur, Frankreich
	Mu50 (ATCC 700699)	Institute Pasteur, Frankreich

DSM 18827

DSMZ, Deutschland

DSM 19041

DSMZ, Deutschland

5.3.1.2.2. Kultivierung

Bakterien der Gattungen *Bacillus*, *Escherichia* und *Pseudomonas* wurden als Standard in LB Medium gezüchtet, *Listeria* und *Staphylococcus* hingegen in BHB Medium. Das Wachstum aller Bakterien erfolgte soweit nicht anders vermerkt bei 37°C und ca. 250 rpm Schüttelfrequenz in einem Inkubator. Übernachtskulturen wurden in sterilen 15 mL Falcon™ Tubes oder 14 mL PP-Kulturröhrchen (Greiner bio-one) mit 5 mL Kulturmedium angesetzt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde gefrorenes Bakterienmaterial aus einem Kryostock aufgenommen und dieses in das anzuimpfende Kulturröhrchen überführt. Die Inkubation von Übernachtskulturen erfolgte in der Regel für 12-20 h. Um genetische Veränderung zu vermeiden wurden die Übernachtskulturen vor jedem Versuch aus den entsprechenden Kryostocks angeimpft und keine kontinuierliche Kultivierung vorgenommen. Aus den Übernachtskulturen wurden die jeweiligen Versuchskulturen durch 1:1000 Verdünnung mit frischem Medium angesetzt.

Kulturen von *E. coli* TOP10, BL21 und XL1-Blue wurden entsprechend ihren Plasmiden in LB Medium mit Antibiotika gezüchtet.

5.3.1.2.3. Herstellung kompetenter Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen für die Transformation von Plasmiden wurden Übernachtskulturen ohne Antibiotika der jeweiligen TOP10 und BL21 Zellen hergestellt und aus diesen 250 mL LB Medium 1:100 angeimpft. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,7 wurden die Zellen in 50 mL Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C durch Zentrifugation bei 4.000 rpm für 2 min pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit dem halben Volumen (bezogen auf das ursprüngliche Medium) einer sterilen, eiskalten 50 mM CaCl₂ Lösung versetzt. Nach vorsichtigem Resuspendieren durch Auf- und Abpipettieren der Lösung wurden die Zellen 30 min auf Eis inkubiert und bei 4.000 rpm und 4°C für 2 min pelletiert. Das Pellet wurde erneut in 1/20 – 1/40

Volumen der eiskalten 50 mM CaCl₂ Lösung vorsichtig resuspendiert und wieder für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 10% (v/v) Glycerin versetzt und in 100 bis 200 µL Aliquoten in flüssigen Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung wurden die kompetenten Zellen bei -80°C gelagert.

5.3.1.2.4. Kryostocks

Kryostocks wurden jeweils aus Übernachtskulturen hergestellt. Bei neu erhaltenen Bakterienstämmen wurden die in der Regel lyophilisierten Pellets zunächst resuspendiert und für mindestens zwei Tage mit täglichem Überimpfen in frisches Medium in Kultur genommen. Für Kryostocks wurden je 850 µL Übernachtskultur mit 150 µL sterilem Glycerin versetzt, gemischt und bei -80°C gelagert.

5.3.1.3. Eukaryotische Zellkultur

5.3.1.3.1. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 6 beschriebenen Zelllinien verwendet.

Tabelle 6: Eukaryotische Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Zelltyp	Zelllinie	Bezugsquelle
Epithelzellen, humaner Gebärmutterhalskrebs	HeLa	vorhanden, AK Carell
Maus Makrophagen-ähnliche Zelllinie	J774A.1	DSMZ, Deutschland

5.3.1.3.2. Kultivierung

HeLa Zellen wurden in HeLa Medium (DMEM mit 4,5 g/L Glucose supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum, FBS) in der Regel mit einer Antibiotikum-Antimycotikum Mischung adhärent in 175 cm² (50 mL Medium) oder 75 cm² (25 mL Medium) Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz mit Trypsin/EDTA abgelöst und auf etwa 1,5·10⁴ Zellen/mL für 175 cm² aufgeteilt.

Die Maus Macrophagen-ähnliche Zelllinie J774A.1 wurde in J774 Medium (DMEM mit 1,0 g/L Glucose supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum, FBS) in der Regel mit einer Antibiotikum-Antimycotikum Mischung adhärent in 175 cm² (50 mL Medium) oder 75 cm² (25 mL Medium) Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz mit TEN Puffer abgespalten und zu 1/3 bis 1/4 aufgeteilt. Alle Zellkulturen wurden bei 37°C mit 5% CO₂ in Polystyrol Cellstar® Tissue Culture Flasks (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) Zellkulturflaschen gezüchtet.

5.3.1.4. Molekularbiologische Methoden

5.3.1.4.1. Pufferzusammensetzungen

ClpP Aktivitätspuffer

50 mM	Tris-HCl	7,88 g/L
100 mM	KCl	7,46 g/L
1 mM	DTT	154 mg/L
gelöst in H ₂ O _{deion} , pH 8,0		

6× DNA-Auftragspuffer

Bromphenolblau	250 mg
Xylencyanol	250 mg
Tris 150 mM Lsg.	33 mL
Glycerin	60 mL
H ₂ O _{deion}	7 mL

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

136,9 mM	NaCl	8,00 g/L
10,1 mM	Na ₂ HPO ₄	1,44 g/L
2,7 mM	KCl	0,20 g/L
1,8 mM	KH ₂ PO ₄	0,24 g/L
gelöst in H ₂ O _{deion} , pH 7,4		

Puffer II

50 mM	Tris-HCl	7,88 g/L
200 mM	NaCl	11,69 g/L
5 mM	DTT	772 mg/L

gelöst in H₂O_{deion}, pH 7,5

Puffer B (für ClpP)

50 mM	Tris-HCl	7,88 g/L
2 mM	EDTA	745 mg/L
2 mM	DTT	309 mg/L
10% (v/v)	Glycerin	100 mL/L

gelöst in H₂O_{deion}, pH 7,5

Puffer B, 1 M NaCl (für ClpP)

50 mM	Tris-HCl	7,88 g/L
2 mM	EDTA	745 mg/L
2 mM	DTT	309 mg/L
1 M	NaCl	58,44 g/L
10% (v/v)	Glycerin	100 mL/L

gelöst in H₂O_{deion}, pH 7,5

Puffer E (Elutionspuffer)

100 mM	Tris-HCl	15,76 g/L
150 mM	NaCl	8,77 g/L
1 mM	EDTA	372 mg/L
2,5 mM	Desthiobiotin	536 mg/L

gelöst in H₂O_{deion}, pH 8,0

Puffer W (Waschpuffer)

100 mM	Tris-HCl	15,76 g/L
150 mM	NaCl	8,77 g/L
1 mM	EDTA	372 mg/L

gelöst in H₂O_{deion}, pH 8,0

Sammelgelpuffer

0,5 M	Tris	60,6 g/L
-------	------	----------

gelöst in H₂O_{deion}, pH 6,8

2× SDS-Auftragspuffer

63 mM	Tris-HCl	9,93 g/L
10% (v/v)	Glycerin	100 mL/L
2% (w/v)	SDS	20,0 g/L
0,0025% (w/v)	Bromphenolblau	25 mg/L

5% (v/v) β -Mercaptoethanol 50 mL/L
gelöst in H₂O_{deion}

1× SDS Laufpuffer

24,8 mM Tris 3,0 g/L
191,8 mM Glycin 14,4 g/L
3,5 mM SDS 1,0 g/L
gelöst in H₂O_{deion}, pH 8,3

50× TAE Puffer

2,0 M Tris 242,28 g/L
1,0 M Essigsäure 57,7 mL/L
0,1 M EDTA 37,22 g/L
gelöst in H₂O_{deion}, pH 7,0

TE Puffer

10 mM Tris 1,21 g/L
1 mM EDTA 372 mg/L
gelöst in H₂O_{deion}, pH 8,0

TEN Puffer

40 mM Tris-HCl 6,30 g/L
1 mM EDTA 372 mg/L
150 mM NaCl 8,77 g/L
gelöst in H₂O_{deion}, pH 7,5

Trenngelpuffer

3,0 M Tris 364,4 g/L
gelöst in H₂O_{deion}, pH 8,8

5.3.1.4.2. Lösungen

APS Lösung (10% w/v)

Ammoniumperoxodisulfat 5 g auf 50 mL H₂O

Coomassie Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R250	2,5 g/L	0,25 % (w/v)
Essigsäure (konz.)	92 mL/L	9,2 % (v/v)
Ethanol (abs.)	454 mL/L	45,4 % (v/v)
in H ₂ O _{deion}		

Coomassie Entfärbelösung

Essigsäure (konz.)	100 mL/L	10 % (v/v)
Ethanol (abs.)	200 mL/L	20 % (v/v)
in H ₂ O _{deion}		

SDS-Lösung (10% w/v)

SDS	5 g auf 50 mL H ₂ O
-----	--------------------------------

Trypsinlösung

Trypsin	20 µg in 40 µL 50 mm Essigsäure
---------	------------------------------------

5.3.1.4.3. Stammlösungen

Lösung	c	Lösungsmittel
Carbenicillin	100 g/L	H ₂ O _{deion}
Kanamycin	25 g/L	H ₂ O _{deion}
Anhydrotetracyclin	2 g/L	DMF

Stammlösungen für die Click Chemie

Hauptstock Rhodaminazid (193 mM)

9,9 mg Rhodaminazid
gelöst in 100 µL Methanol

0,65 mM Stock Rhodaminazid

1 µL Hauptstock Rhodaminazid

295 μ L DMSO

10 mM trifunktioneller Linker

1 mg Rhodaminbiotinazid
gelöst in 85,4 μ L DMSO

50 \times Ligand Stock

17,7 mg Ligand
gelöst in 400 μ L DMSO

1 \times Ligand Stock

20 μ L 50 \times Ligand Stock
180 μ L DMSO
800 μ L *tert*-Butanol

50 mM CuSO₄

12,5 mg CuSO₄ \times 5 H₂O
Gelöst in 1 mL H₂O_{deion}

5.3.2. Methoden der Proteomik

5.3.2.1. Präparation von Proteomen

Die Proteome der verschiedenen Bakterienstämme für die *in vitro* Markierung mit ABPP-Sonden wurden aus 1 L Flüssigkulturen hergestellt. Die Kulturen wurden in den entsprechenden Kulturmedien (LB oder BHB) eine Stunde nach Eintritt in die stationäre Phase durch Zentrifugation geerntet. Die Zellpellets wurden mit PBS gewaschen und in 20 mL PBS resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte mittels einer FRENCH[®] Pressure Cell Press (Thermo Fisher Scientific) bei 5mal 500-1.000 psi unter Kühlung. Zellfragmente und nicht-lysierte Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4.000 rpm für 5 min abgetrennt. Die Membranfraktion wurde jeweils durch Zentrifugation für 45 min bei 18.000 rpm pelletiert, die cytosolische Fraktion abgenommen und die Membranfraktion nach Waschen mit PBS resuspendiert.

Als eukaryotische Referenz wurden Proteompräparate von den Organen einer C3H Maus (Helmholtz Zentrum München) verwendet. Diese wurden zerkleinert, in jeweils 2 mL PBS mit einem Dounce Homogenisator homogenisiert und anschließend durch Ultraschall mit einem Bandelin Sonopuls mit 4 x 15 sec bei 70% maximaler Intensität vollständig aufgeschlossen. Die Membranfraktion wurde hierbei durch Ultrazentrifugation bei 45.000 rpm für 30 min abgetrennt.

Die Konzentrationsbestimmung der Proteompräparationen erfolgte durch den Bradford Assay. Die Proteome wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

5.3.2.2. Bradford Assay

Durch den Bradford Assay lassen sich auch geringe Proteinkonzentrationen sehr empfindlich quantifizieren. Bei dieser photometrischen Methode wird der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 verwendet, der in saurer Lösung Komplexe mit kationischen und hydrophoben Proteinseitenketten ausbilden kann. Hierbei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm der ungebundenen kationischen Form des Farbstoffs (rot) zur blauen anionischen Form auf 595 nm mit höherem Extinktionskoeffizienten. Die Absorption kann somit photometrisch ermittelt und mit einer Kalibrationskurve eines Proteinstandards zur Bestimmung der Konzentration einer Probe herangezogen werden.

Zur Kalibration wurde eine BSA Konzentrationsreihe mit einem BSA-Standard (2 mg/mL in H₂O) hergestellt, die in Tabelle 7 gegeben ist.

Tabelle 7: Konzentrationsreihe von BSA für die Kalibration des Bradfordassays.

Konzentration BSA, µg/µL	Volumen H ₂ O	Volumen BSA-Standard
0,00	40 µL	0 µL
0,25	35 µL	5 µL
0,50	30 µL	10 µL
0,75	25 µL	15 µL
1,00	20 µL	20 µL
1,50	10 µL	30 µL

Eine Bradford Stammlösung, Roti[®] - Quant (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde 1:4 mit deionisiertem Wasser verdünnt, filtriert und zu jeder Probe der BSA Kalibration 2 mL hiervon gegeben. Analog wurden 40 µL einer entsprechenden Verdünnung der zu untersuchenden Probe mit 2 mL der Bradfordlösung versetzt und die Absorption bei 595 nm bestimmt.

5.3.2.3. ABPP Markierung von Proteomen

5.3.2.3.1. Analytische *in vitro* Markierung von Proteomen

Die jeweiligen Proteome wurden in den Markierungsexperimenten auf eine einheitliche Konzentration von 1 mg/mL Protein durch entsprechende Verdünnung der Proteompräparationen in PBS eingestellt. Für ein typisches Markierungsexperiment wurde eine Proteommenge eingesetzt, die auf ein Gesamtvolumen von 50 µL Ansatzgröße nach Zugabe aller Reagenzien die Protein Konzentration von 1 mg/mL ergab. Das Proteom wurde zunächst mit PBS auf ein Volumen 43 µL gebracht und bei RT mit 1 µL einer entsprechenden ABPP Sonde versetzt. Für Hitzekontrollen wurde das Proteom vor Sondenzugabe mit PBS auf 41 µL bzw. 39 µL gebracht und mit 2 µL bzw. 4 µL 21,5%iger SDS-Lösung (entsprechend 1% bzw. 2% SDS im Ansatz) für 6 min bei 95°C denaturiert. Erst nach Abkühlen auf RT wurden bei den Hitzekontrollen die Sonden hinzugefügt. Die Inkubationszeit variierte je nach Sonde zwischen 15 min (Showdomycin) und 60 min (β-Lactone). Anschließend wurde 1 µL 0,65 mM Rhodaminazid (Abbildung A37) gefolgt von 1 µL einer frisch angesetzten 52 mM Lösung von Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid (TCEP, 15 g/L) in H₂O_{deion} und 3 µL 1× Ligand (1,667 mM) hinzugefügt. Die Proben wurden gevortext und die Cycloadditionsreaktion durch die Zugabe von 1 µL 50 mM CuSO₄ in H₂O_{deion} gestartet. Nach erneutem Mischen wurde die Click Reaktion für 1 h bei RT inkubiert. Ein 50 µL Standardansatz enthielt somit für die Click Chemie 13 µM Rhodaminazid, 1 mM TCEP, 100 µM Ligand (Abbildung A39) und 1 mM CuSO₄.

Die Reaktion wurde nach 1 h durch die Zugabe von 50 µL 2× SDS Auftragspuffer beendet. Bis zum Auftragen der Proben für die Gelelektrophorese wurden diese bei -80°C aufbewahrt.

5.3.2.3.2. Kompetitive Experimente

In kompetitiven Experimenten wurden *in vitro* Proteome mit einem 100fachen Überschuss an PMSF oder Cerulenin für 15 min vorinkubiert, bevor die entsprechende Lactonsonde (50 μM) zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert wurde.

5.3.2.3.3. Präparative *in vitro* Markierung von Proteomen

Für präparative Markierungsexperimente wurde vor der Gelelektrophorese eine Anreicherung der sondengebundenen Enzyme über die Bindung von Biotin an Avidin durchgeführt. Hierbei wurde ein modifiziertes Rhodaminbiotinazid (trifunktionaler Linker) eingesetzt (Abbildung A38). Da für die massenspektrometrische Identifizierung größere Proteinmengen vorteilhaft sind, wurde die Ansatzgröße auf das 40fache der analytischen Experimente hochskaliert. Für jeden Ansatz wurde zusätzlich eine DMSO Kontrolle ohne Sonde eingesetzt, welche es ermöglichte den unspezifischen Proteomhintergrund, der auch teilweise über die Anreicherungsschritte mitgezogen wurde, in der Auswertung der Massenspektrometrie zu subtrahieren.

Für ein typisches präparatives Markierungsexperiment wurde eine Proteommenge von 1 mg eingesetzt, die auf ein Gesamtvolumen von 1 mL Ansatzgröße nach Zugabe aller Reagenzien die Protein Konzentration von 1 mg/mL ergab. Je Experiment wurden 2 \times 1 mL Ansätze mit Sonde und 2 \times 1 mL Ansätze als DMSO Kontrolle verwendet, die jeweils später vereinigt wurden. Im nachfolgenden ist die Methode für einen Ansatz beschrieben.

Das Proteom (1 mg) wurde mit PBS auf 946 μL Gesamtvolumen gebracht und mit 1 μL Sonde der entsprechenden Konzentration bzw. DMSO für die Kontrollen je nach Sonde für 30 min (Showdomycin, 100 μM im Proteom) bis 60 min (β -Lactone, 50 μM im Proteom) inkubiert. Anschließend wurden sequenziell 3 μL 10 mM trifunktionaler Linker gefolgt von 10 μL 52 mM TCEP in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ und 30 μL 1 \times Ligand (1,667 mM) hinzugegeben. Die Proben wurden gevortext und die Cycloadditionsreaktion durch die Zugabe von 10 μL 50 mM CuSO_4 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gestartet. Nach erneutem Mischen wurde die Reaktion für 1 h bei RT inkubiert.

Anschließend wurde jeder 1 mL Ansatz auf 2 \times 500 μL aufgeteilt und mit je 500 μL eiskaltem Aceton gefällt. Nach Inkubation für ca. 20 min auf Eis wurden die

präzipitierten Proteine durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µL eiskaltem Methanol durch Ultraschall resuspendiert (Bandelin Sonopuls, ca. 5-10 sec bei 50% maximaler Intensität). Die beiden Pellets aus einem Ansatz wurden mit denen aus dem zweiten der 2 × 1 mL Ansätze vereinigt (4 × 200 µL) und bei 13.000 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert. Das resultierende Pellet wurde erneut in 200 µL eiskaltem Methanol durch Ultraschall resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 mL PBS mit 0,4% SDS bei RT mit Ultraschall resuspendiert. 50 µL einer Avidin-Agarosebead Suspension (Avidin-Agarose from egg white, 1,1 mg/mL wässrige Glycerinsuspension, Sigma-Aldrich) wurden vor Gebrauch mit dreimal je 1 mL PBS gewaschen und durch Zentrifugation bei 2.000 rpm gesammelt. Um die Integrität der Beads zu gewährleisten wurden Zentrifugationen bei allen folgenden Waschschritten für 2-5 min bei 2.000 rpm durchgeführt. Das in PBS mit 0,4% SDS resuspendierte Proteom wurde auf die gewaschenen Avidin-Agarosebeads gegeben und 1 h bei RT unter kontinuierlicher Durchmischung durch Drehen der Eppendorf Gefäße an einem KPG-Rührer inkubiert. Anschließend wurden die Beads dreimal mit je 1 mL PBS mit 0,4% SDS, zweimal mit je 1 mL 6 M Harnstoff in H₂O_{deion} und dreimal mit je 1 mL PBS gewaschen. Die Abspaltung der durch den trifunktionalen Linker biotinmarkierten Proteine von Avidin erfolgte durch Inkubation der Beads für 6 min mit 50 µL 2× SDS Auftragspuffer bei 95°C. Die Beads wurden bei 13.000 rpm pelletiert und der Überstand mit den abgespaltenen Proteinen abgenommen und bis zur Auftragung auf ein präparatives SDS-Gel bei -80°C aufbewahrt.

5.3.2.3.4. Analytische *in situ* Markierung von Proteomen

Für analytische *in situ* Experimente wurden Bakterien in den entsprechenden Medien bis eine Stunde nach Eintritt in die stationäre Phase wachsen gelassen und durch Zentrifugation für 10 min bei 6.000 rpm geerntet. Für die Experimente mit β-Lactonen wurde 1 mL OD₆₀₀ = 4 (analog 2 mL OD₆₀₀ = 2), für Showdomycin 0,5 mL OD₆₀₀ = 4 (analog 1 mL OD₆₀₀ = 2) eingesetzt. Die pelletierten Kulturen wurden mit je 1 mL PBS gewaschen und in 100 µL PBS resuspendiert. Anschließend wurde die entsprechende Sonde (in der Regel 50 µM) hinzugegeben und für 30 min (Showdomycin) bis 2 h (β-Lactone) bei RT inkubiert. Dann wurden die Zellen

pelletiert und zweimal mit je 1 mL PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 100 μ L PBS durch Ultraschall an einem Bandelin Sonopuls mit 4 \times 20 sec bei 80% maximaler Intensität aufgeschlossen. Die Membranfraktion wurde bei 13.000 rpm für 10 min pelletiert und das Cytosol vorsichtig abgenommen. Die Membranfraktion wurde mit 100 μ L PBS gewaschen und in 100 μ L PBS durch Ultraschall resuspendiert. Jeweils 44 μ L der markierten Proteomfraktionen wurden für die Click Chemie analog der analytischen *in vitro* Markierung eingesetzt.

5.3.2.3.5. Präparative *in situ* Markierung von Proteomen

Für präparative *in situ* Experimente wurden analog zur analytischen Markierung 5 mL OD₆₀₀ = 4 (analog 10 mL OD₆₀₀ = 2), für Showdomycin 2,5 mL OD₆₀₀ = 4 (analog 5 mL OD₆₀₀ = 2) eingesetzt. Hierbei wurde für ein präparatives Experiment jeweils nur ein Ansatz mit einer DMSO Kontrolle verwendet. Die pelletierten Kulturen wurden in je 5 mL PBS gewaschen und in 500 μ L PBS resuspendiert. Anschließend wurde die entsprechende Sonde (in der Regel 50-100 μ M) hinzugegeben und für 30 min (Showdomycin) bis 2 h (β -Lactone) bei RT inkubiert. Nach Zellaufschluss in 500 μ L PBS und Abtrennen der Membranfraktion wurde die Click Chemie in 500 μ L mit 3 μ L 10 mM trifunktionaler Linker gefolgt von 10 μ L 52 mM TCEP in H₂O_{deion} und 30 μ L 1 \times Ligand (1,7 mM) durchgeführt. Die Proben wurden gevortext und die Cycloadditionsreaktion durch die Zugabe von 10 μ L 50 mM CuSO₄ in H₂O_{deion} gestartet. Nach erneutem Mischen wurde die Reaktion für 1 h bei RT inkubiert. Die Fällung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 500 μ L eiskaltem Aceton. Alle weiteren Schritte der Affinitätsaufreinigung und Abspaltung erfolgten wie für *in vitro* Proben beschrieben.

5.3.2.4. SDS Gelelektrophorese

5.3.2.4.1. Prinzip der SDS Gelelektrophorese

Bei der SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE) wird ein elektrisches Feld an einem Polyacrylamidgel angelegt, um Proteine nach ihrer Größe auftrennen zu können. Die Proteine durchlaufen hierbei ein dreidimensionales Netz aus Polyacrylamid, wobei sie sich in Abhängigkeit von ihrer Größe mit unterschiedlicher

Geschwindigkeit bewegen. Da Proteine sehr unterschiedliche isoelektrische Punkte aufweisen und daher in Puffersystemen eine verschiedene Nettoladung tragen können, die nicht von ihrer Größe abhängt, wird bei dieser Art der Elektrophorese das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) eingesetzt. SDS bindet über hydrophobe Wechselwirkungen an die Proteine und gibt ihnen dabei eine einheitliche negative Ladung, die proportional zur Größe des Proteins ist. Zusätzlich werden die Proteine durch SDS denaturiert und liegen damit entfaltet vor, womit es in der Regel zu keiner Störung der Auftrennung durch die native Struktur der Proteine mehr kommt. Im elektrischen Feld wandern die Proteine daher im Polyacrylamidgel von der Kathode (- Pol) zur Anode (+ Pol), wobei große Proteine länger für den Weg durch das Gel benötigen als kleine Proteine.

Je nach Vernetzungsgrad und Dichte des Polyacrylamidgels lässt sich die Trennleistung für verschiedene Protein-Größenbereiche anpassen. Um eine hohe Auflösung zu erhalten, sollten die Proteine als möglichst eng fokussierte Bande gleichzeitig in das Gel eintreten, was durch die Auftragung der Proben alleine nicht möglich ist.

Daher wird die SDS PAGE als diskontinuierliche Gelelektrophorese betrieben. Hierbei wird vor das eigentliche Trenngel ein Sammelgel geschaltet. Das Sammelgel verfügt über eine wesentlich geringere Dichte (3,75% Acrylamid) und Ionenstärke als das Trenngel (in der Regel 10% Acrylamid) und führt zu keiner Größenauftrennung der Proteine. Sein pH Wert von 6,8 befindet sich in der Nähe des isoelektrischen Punktes von Glycin (pH 6,0), wodurch Glycin weitgehend als Zwitterion vorliegt und den Strom schlecht leitet. Die Chloridionen hingegen laufen als Leitonen zu Beginn der Elektrophorese voraus, wodurch sich zwischen diesen und Glycin als Folgeionen eine hohe elektrische Feldstärke aufbaut. In dieser Zone zwischen den Leitonen und den Folgeionen laufen die Proteine durch die hohe Feldstärke größenunabhängig als Stapel in Richtung des Trenngels. An der Trenngelfront werden die Proteine zusätzlich durch den Übergang in ein dichteres Gel stärker fokussiert.

Im Trenngel mit pH 8,8 liegt Glycin wieder vollständig als Anion vor und überholt die Proteine auf dem Weg zur Anode. Die Proteine laufen somit in einem einheitlichen Puffersystem und werden durch ihre Wechselwirkung mit dem engmaschigen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

5.3.2.4.2. Herstellung von Polyacrylamidgelen

Für die Herstellung von Polyacrylamidgelen für SDS PAGE wurde zunächst das Trenngel hergestellt und anschließend mit dem Sammelgel überschichtet. Trenngele in verschiedenen Acrylamidkonzentrationen sind in Tabelle 8 gegeben, wobei als Standardgele analytisch und präparativ 10% Acrylamidgele eingesetzt wurden. Hierbei wurde Rotiphorese® Gel 30 (Roth, Karlsruhe), eine 30%ige wässrige Lösung einer Mischung aus 37,5:1 Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid verwendet. Die einzelnen Gelkomponenten wurden unter Rühren gemäß Tabelle 8 zusammengegeben und als letzter Schritt die Polymerisation durch die Zugabe der Ammoniumpersulfat (APS) Lösung initiiert.

Für das verwendete Gelelektrophoresesystem (peQLab, Modell 45-2020-i) mit großen Gelplatten wurde die 1,5fache Menge Trenngel und die 1,25fache Menge Sammelgel eingesetzt. Für kleine Gele (peQLab, Modell 45-1010-i) wurde je Gel $\frac{1}{4}$ der Menge des Trenngels und $\frac{3}{8}$ der Menge des Sammelgels nach Tabelle 8 verwendet. Nach beginnender Aushärtung des Trenngel wurde dieses mit Isopropanol überschichtet, um die Oberfläche zu glätten. Das Isopropanol wurde nach vollständigem Aushärten abgegossen und das frisch vorbereitete Sammelgel darüber geschichtet. Anschließend wurden die Kämme (analytisch oder präparativ) eingesteckt und das Gel aushärten gelassen.

Tabelle 8: Herstellung von SDS Gelen mit Berechnungstabelle für die 1fache Menge und verschiedenen Acrylamidkonzentrationen im Trenngel.

Zusammensetzung von SDS Gelen (1fache Menge)						
Acrylamid %	H ₂ O _{deion}	Rotiphorese Gel 30	Puffer	10% SDS Lsg.	APS Lsg.	TEMED
Trenngel			Trenngel puffer			
10%	14,4 mL	12 mL	9 mL	360 µL	150 µL	15 µL
12,5%	11,4 mL	15 mL	9 mL	360 µL	150 µL	15 µL
15%	8,4 mL	18 mL	9 mL	360 µL	150 µL	15 µL
Sammelgel			Sammelgelpuffer			
3,75%	7,35 mL	1,5 mL	3 mL	120 µL	60 µL	12 µL

5.3.2.4.3. Durchführung der SDS PAGE

Analytische und präparative Gele wurden in der entsprechenden Gelapparatur nach Auftragung der Proben mit 1× SDS Laufpuffer bei 55 mA unter dynamischer Anpassung der Spannung für etwa 6-7 h mit einem Consort EV261 Electrophoresis Power Supply betrieben. Die Fluoreszenzaufnahme von SDS Gelen erfolgte mit einem Fujifilm Las-4000 Luminescent Image Analyzer mit einer Fujinon VRF43LMD3 Linse und einem 575DF20 Filter oder mit einer Fujifilm Las-3000 Fluoreszenz Darkbox mit einer Fujinon VRF43LMD Linse, 605DF40 Filter und 520 nm EPI Anregungswellenlänge.

Bei präparativen Gelen wurde zunächst ein Ausdruck der Fluoreszenzaufnahme erstellt und dieser als Schablone verwendet, auf deren Basis die entsprechenden Gelbanden lokalisiert und mit einem Skalpell isoliert. Die Gelbande wurde dabei als maximal 2 mm breiter Streifen herausgetrennt und in Würfel von etwa 1 mm Dicke geschnitten.

5.3.2.5. Identifikation von markierten Proteinen

5.3.2.5.1. Gelbandenaufreinigung und tryptischer Verdau

Die ausgeschnittenen Gelbanden wurden mit 100 µL H₂O_{deion} gewaschen und mit einer Mischung aus 100 µL 50 mM NH₄HCO₃ und 100 µL Acetonitril für 15 min inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten sofern nicht anders beschrieben unter Schütteln bei RT. Nach Abnehmen der Flüssigkeit wurden 100 µL Acetonitril hinzugegeben und für 5 bis 10 min inkubiert, bis die Gelstücke eingeschrumpft waren. Das Acetonitril wurde entfernt und durch 100 µL 50 mM NH₄HCO₃ ersetzt. Nach Rehydrieren für 5 min wurden 100 µL Acetonitril zu den Gelstücken in der NH₄HCO₃ Lösung gegeben und für 15 min inkubiert. Die Flüssigkeit wurde vollständig abgesaugt, verworfen und die Gelstücke mit 100 µL Acetonitril für 5 min bis zum Einschrumpfen inkubiert. Das Acetonitril wurde abgenommen und die Gelstücke in einer SpeedVac getrocknet.

Anschließend wurde zur Reduktion von Disulfidgruppen 100 µL frisch hergestelltes 10 mM Dithiothreitol (DTT) in 50 mM NH₄HCO₃ zugegeben und die Gelstücke bei 56°C für 45 min unter Schütteln inkubiert. Die Proben wurden auf Raumtemperatur

abkühlen gelassen und nach entfernen der DTT Lösung zur Alkylierung der reduzierten Thiole unmittelbar mit 100 µL einer 55 mM Iodacetamid Lösung in 50 mM NH_4HCO_3 versetzt und geschützt vor Licht für 30 min bei RT inkubiert.

Anschließend wurden die Gelstücke mit einer Mischung aus 100 µL 50 mM NH_4HCO_3 und 100 µL Acetonitril für 15 min gewaschen. Die Flüssigkeit wurde vollständig entfernt und durch 100 µL Acetonitril ersetzt. Nach Inkubation für 5 min bis zum Einschrumpfen der Gelstücke wurde das Acetonitril abgenommen und die Gelstücke in einer SpeedVac getrocknet.

Für den tryptischen Verdau wurden die Gelstücke in einer frisch angesetzten Lösung von 1 µL Trypsinlösung in 100 µL 25 mM NH_4HCO_3 rehydriert und übernacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

5.3.2.5.2. Gelbandenextraktion der tryptischen Peptide

Die 100 µL des tryptischen Verdau wurden von den Gelstücken abgenommen und in ein frisches Eppendorf Gefäß gegeben. Durch die nachfolgenden Waschschrte mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität unter Inkubation bei RT im Ultraschallbad wurden die Peptide aus den Gelstücken extrahiert. Es wurden 100 µL 25 mM NH_4HCO_3 zugefügt und nach 15 min Inkubation mit 100 µL Acetonitril versetzt und weitere 15 min inkubiert. Die 200 µL der NH_4HCO_3 -Acetonitril Lösung wurden gesammelt und die Gelstücke mit 100 µL 5% Ameisensäure für 15 min inkubiert und mit 100 µL Acetonitril weitere 15 min inkubiert. Die gesammelten vereinigten Lösungen aller Extraktionsschrte und des tryptischen Verdau (Gesamtvolumen 500 µL) wurden in einer SpeedVac auf 20 µL aufkonzentriert und für die Massenspektrometrie eingesetzt.

5.3.2.5.3. Massenspektrometrie und Bioinformatik

Die tryptischen Peptide wurden auf eine Dionex C18 Nano Trap Säule (100 µm) geladen, anschließend eluiert und über eine Dionex C18 PepMap 100 (3 µm) Säule separiert. Die Analyse erfolgte durch Tandem Massenspektrometrie gefolgt durch hochauflösende MS mit einem gekoppelten Dionex Ultimate 3000 LC-ThermoFinnegan LTQ-FT MS System oder einer LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific).

Die Datensätze der Massenspektrometrie wurden mit dem SEQUEST Algorithmus gegen die entsprechenden Datenbanken der sequenzierten Organismen im Fasta Format mit der Software „Bioworks“ abgesucht. Die Suche wurde auf tryptische Peptide limitiert mit maximal zwei ausgelassenen Schnittstellen, monoisotopischen Vorläuferionen und einer Peptidtoleranz < 10 ppm. Zusätzlich wurden Filter gesetzt, um die Resultate des Suchalgorithmus weiter einzugrenzen. Die Werte des *Xcorr vs. charge state* Filters wurden auf *Xcorr* (cross-correlation) Werte von 1,5, 2,0 und 2,5 entsprechend für die Ladungen +1, +2 und +3 gesetzt. Die Anzahl der verschiedenen Peptide wurde auf ≥ 2 und die Wahrscheinlichkeitsfilter für Peptide (p-Werte) auf < 0,001 gesetzt. Diese Filtereinstellungen wurden ähnlich zu denen gesetzt, die bereits für die SEQUEST Analyse in der Literatur beschrieben sind.^[148] Die minimalen p-Werte und *Xcorr* Werte der einzelnen Läufe sowie die Gesamtanzahl an detektierten Peptidfragmenten sind in Tabelle A1, Tabelle A2, Tabelle A3 und Tabelle A4 gegeben.

5.3.3. Methoden der Genomik

5.3.3.1. Präparation Genomischer DNA

Genomische DNA wurde aus Übernachtskulturen der jeweiligen Bakterienstämme mit einem DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert.

5.3.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

5.3.3.2.1. Allgemeines zur Methodik der PCR

Seit ihrer Erfindung durch Kary Mullis 1985 hat sich die Polymerasekettenreaktion (PCR) zu einer der wichtigsten Methoden der Molekularbiologie entwickelt. Sie bedient sich einem einfachen Prinzip, um mit höchster Effizienz DNA Stränge zu vervielfältigen (amplifizieren). In einem zyklischen Protokoll mit verschiedenen Temperaturstufen werden die Doppelstränge einer DNA Probe aufgetrennt, wodurch sich bei niedrigerer Temperatur kurze komplementäre Sequenzen, die sogenannten

Primer anlagern können, an denen anschließend eine DNA Polymerase ansetzt und die einzelsträngige DNA zum Doppelstrang ergänzt. Das Standardprotokoll der PCR besteht daher aus drei Temperaturstufen (Abbildung M1). Bei 94-96°C erfolgt das Schmelzen (Denaturierung) der doppelsträngigen DNA (dsDNA) wodurch sie sich in ihre Einzelstränge (ssDNA) auftrennt. In Abhängigkeit des GC Gehalts und der Länge der Primer wird das „Annealing“, die Anlagerung der Primer an die ssDNA in der Regel in einem Bereich zwischen 50 und 60°C durchgeführt. Der zu amplifizierende Bereich wird durch einen *vorwärts* und einen *rückwärts* Primer definiert, der jeweils am Start und am Ende der Sequenz an den zueinander komplementären Strängen bindet. Das sorgfältige Design der Primer ist daher einer der wichtigsten Schritte für eine erfolgreiche Amplifikation. Die eigentliche Vervielfältigung der DNA erfolgt bei einer Temperaturstufe von 68°C (*Pfx* Polymerase) und 72°C (*Pfu* HF Polymerase). Hierbei bindet eine temperaturstabile Polymerase an die angelagerten Primer und synthetisiert durch Elongation der Primer in 5' → 3' Richtung den Komplementärstrang durch die Verknüpfung der passenden dNTPs unter Abspaltung von Pyrophosphat (Abbildung M1).

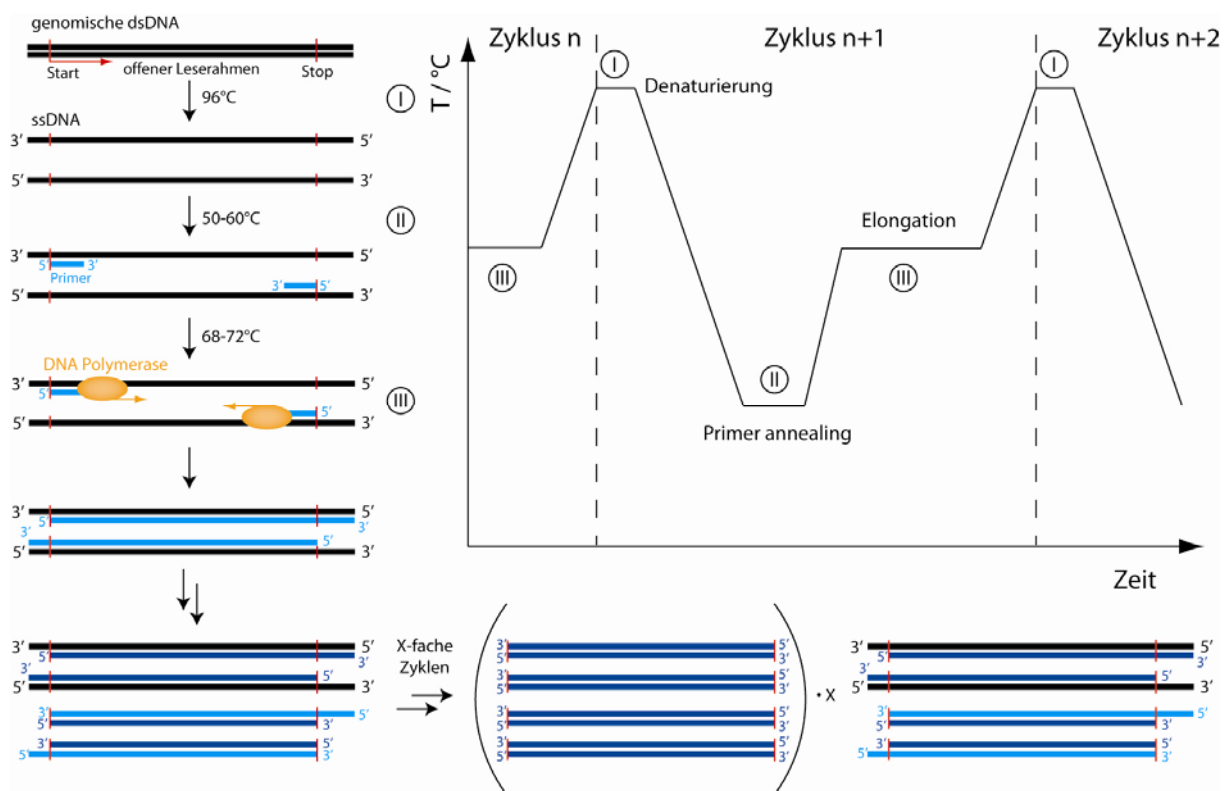


Abbildung M1: Ablauf der Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Temperaturgradienten und schematischer Skizzierung der molekularen Schritte.

5.3.3.2.2. Primerdesign

Das Primerdesign erfolgte entsprechend der Gateway[®] Technologie. Hierbei wurden bereits die für die Klonierungsschritte benötigten *attB* Sequenzen berücksichtigt und den jeweiligen Primern an ihrem 5'-Ende angefügt, womit sich jeweils ein *attB1* *vorwärts* Primer und ein *attB2* *rückwärts* Primer ergab. Als 5'-fusionierte Sequenz wurde für den *vorwärts* Primer 5'-GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TAC-3' mit der *attB1* Sequenz (unterstrichen) und vier Guanosinen am 5'-Ende und zwei weiteren Nukleotiden am 3'-Ende verwendet, um mit dem folgenden Gen im Leserahmen zu bleiben. Je nach Bedarf wurde der Startcodon ATG oder GTG beibehalten oder entfernt, um in der Expression rekombinantes Protein mit anfusioniertem Strep-Tag oder das unmodifizierte Protein zu erhalten. Für den *rückwärts* Primer wurde analog hierzu 5'-GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG-3' mit der *attB2* Sequenz (unterstrichen) eingesetzt. Die Schmelztemperatur der Primer wurde aus der Länge und dem GC-Gehalt der Gensequenzen ohne die flankierenden *attB* Sequenzen gemäß der Tabelle A5 ermittelt und im Primerdesign auf eine maximale Temperaturdifferenz von 0,5°C zwischen beiden Primern eingestellt. Die Primer wurden jeweils als kommerzielle Oligonukleotide in Auftrag gegeben (metabion GmbH, Martinsried, Deutschland) und in gelöster Form zu 100 pmol/µL bezogen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Primer Sequenzen mit *attB* Enden für die Überexpression von identifizierten Proteinen nach der Gateway[®] Technologie.

Abkürzung	Spezies		Primer Sequenz
ADB	<i>E. coli</i> K12	<i>vorwärts</i>	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GAC CAA TAA TCC CCC TTC AGC-3'
		<i>rückwärts</i>	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TCA GAA CAG CCC CAA CGG TTT AT-3'
AhpC	<i>S. aureus</i> NCTC 8325	<i>vorwärts</i>	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GTC ATT AAT TAA CAA AGA AAT-3'
		<i>rückwärts</i>	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA GAT TTT ACC TAC TAA ATC-3'
AlsS	<i>S. aureus</i>	<i>vorwärts</i>	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA

	NCTC 8325		AGC AGG CTA CAT GAC TGA T AA AAA GTA CAC T-3'
		rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA GTT AAA TAC GTC AGG TAA-3'
ClpP	<i>P. putida</i> KT2440	vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GTC CCG CAA TTC TTA TAT TCA GC-3'
		rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TCA GGA GGC CAG TTG CCG-3'
ClpP	<i>S. aureus</i> NCTC 8325	vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GAA TTT AAT TCC TAC AGT TAT T-3'
		rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA TTT TTC GAA CTG CGG GTG GCT CCA TTT TGT TTC AGG TAC CAT C-3'
CTPS	<i>B. subtilis</i> 168	vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GAC GAA ATA TAT TTT TGT AAC-3'
		rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA CTT CTG ATT TGC AGC T-3'
GlmU	<i>S. aureus</i> NCTC 8325	vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GCT AGA TAA AAA TCA ATT AGC-3'
		rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA AAT TAA ACC CAT TCT ACG TA-3'
IMPDH	<i>L. monocyto-</i> <i>genes</i> EGDe	vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GTG GGA AAC AAA ATT TGC A-3'
		rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA AGA AAT ACT ATA ATT TGG CG-3'
KAS II	<i>L. welshimeri</i> SLCC5334	vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GGA TAA AAA AAG AGT AGT TG-3'
		rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA GTC TTC TAT TCT TTT AAA TAC-3'
Lip	<i>L. welshimeri</i> SLCC5334	vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GAA AAA TAC AAT AAA ATG G-3'
		rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA CTT TTC TTC TAA GAA C-3'
MurA1	<i>S. aureus</i> NCTC 8325	vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GGA TAA AAT AGT AAT CAA AGG-3'

			rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA ATC GTT AAT ACG TTC AAT GT-3'
MurA2	<i>S. aureus</i> Mu50		vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GGC TCA AGA GGT AAT AAA AAT-3'
			rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG CTA TAC AGT TTC CGT CCA AA-3'
PBP4*	<i>B. subtilis</i> 168		vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GAA GCA GAA TAA AAG AAA GCA T-3'
			rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG CTA CTT CGT ACG GAC CG-3'
PIP	<i>P. putida</i> KT2440		vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GCA GAC CCT CTA CCC G-3'
			rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TCA TGC TTC TTC CAG AGG CAA-3'
PNBE	<i>B. subtilis</i> 168		vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GAC TCA TCA AAT AGT AAC G-3'
			rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA TTC TCC TTT TGA AGG GAA-3'
POR	<i>L. monocytogenes</i> EGDe		vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CGT GGC AGA ACG TTT AGT A-3'
			rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA AAC AAT TGT TTT TTC ACC G-3'
PtsI	<i>S. aureus</i> Mu50		vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GTC TAA ATT AAT TAA AGG TAT T-3'
			rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA TTT TAC GTA GTT GTT AAC T-3'
RNR	<i>P. aeruginosa</i> PAO1		vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GCA TAC CGA CAC CAC ACG C-3'
			rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TCA CTG GCA GGC TTC GCA GT-3'
SFGH	<i>E. coli</i> K12		vorwärts	5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GGA ACT CAT TGA AAA ACA T-3'
			rückwärts	5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TCA ACG CAT ATT CAG TTT ATT-3'

5.3.3.2.3. PCR Ansatz

Die PCR erfolgte unter Verwendung eines AccuPrime™ *Pfx* DNA Polymerase Kit mit der temperaturstabilen *Pfx* DNA Polymerase des hyperthermophilen Achaeons *Pyrococcus sp.* entweder durch den direkten Einsatz von DNA-Templat intakter Bakterien aus Kryostocks oder zuvor isolierter genomischer DNA.

In einem Standardansatz mit isolierter DNA wurden jeweils drei Konzentrationen der genomischen DNA, 65 ng/μL, 13 ng/μL und 6,5 ng/μL eingesetzt, um die erfolgreiche Amplifikation des Zielgens zu gewährleisten.

Vor Gebrauch wurden die 100 pmol/μL Primerlösungen auf 10 pmol/μL mit deionisiertem Wasser verdünnt. Die Zusammensetzung eines Standardansatzes für die Amplifikation von Gensequenzen mit *attB* Primern zum Einsatz in der Gateway® Klonierungstechnologie ist im Nachfolgenden angegeben.

2,5	μL	10× <i>Pfx</i> Puffer
11,5	μL	deionisiertes Wasser
1	μL	genomische DNA / Kryostock
4	μL	<i>vorwärts</i> Primer Verdünnung 10 pmol/μL
4	μL	<i>rückwärts</i> Primer Verdünnung 10 pmol/μL
2	μL	<i>Pfx</i> DNA Polymerase

Die PCR wurde mit einem PCR Sprint Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) und dem nachstehenden Temperaturprotokoll durchgeführt.

96°C	1:30 min	
94°C	0:10 min	} 4×
$T_m - 2^\circ\text{C}$	0:15 min	
68°C	1:00 min pro 1.000 bp	
94°C	0:10 min	} 6×
$T_m - 2^\circ\text{C} - 0,2^\circ\text{C}/\text{Zyklus}$	0:15 min	
68°C	1:00 min pro 1.000 bp	
96°C	0:10 min	} 30×
$T_m - 0,5^\circ\text{C}$	0:15 min	
68°C	1:00 min pro 1.000 bp	
68°C	7:00 min	
4°C	halten	

Nach erfolgter PCR wurden die Produkte auf 1% Agarosegelen aufgetrennt und mit Ethidiumbromid (EtBr) visualisiert. Hierbei wurden für analytische Ansätze 5 µL der Probe mit 1 µL 6× Auftragspuffer eingesetzt.

5.3.3.3. Agarose Gelelektrophorese

Zur Analyse und Isolation von PCR Produkten und Plasmiden wurden 1% Agarosegele verwendet. Für Standardgele wurden 500 mg Agarose in 50 mL 1× TAE Gelpuffer suspendiert und in einer Mikrowelle für wenige Minuten erwärmt, bis sich die Agarose vollständig löste. Anschließend wurden 10 µL einer 1 g/L Ethidiumbromid (EtBr) Lösung in H₂O_{deion} hinzugesetzt und die noch heiße Lösung in den Gelträger mit eingesetztem Taschenkamm gegossen. Nach Aushärten des Gels und Beladung mit den jeweiligen Proben (6 µL analytisch und 20 µL präparativ), wurde die Auftrennung in einem B1A Gelelektrophoresesystem (Owl Separation Systems Inc., Portsmouth, USA) bei 95 V für etwa 1 h durchgeführt. Die entsprechenden DNA Banden wurden mittels eines IDA Image Documentation & Analysis (raytest GmbH, Deutschland) Systems bei 312 nm visualisiert und gegebenenfalls bei größeren Verunreinigungen mit einem Skalpell ausgeschnitten und extrahiert. Für PCR Produkte mit bereits ausreichender Reinheit wurde der verbliebene PCR Ansatz ohne weitere Aufarbeitung direkt in die Klonierung eingesetzt.

5.3.3.4. Agarose Gelbandenextraktion

Die DNA der isolierten Banden wurde mit einem E.Z.N.A. MicroElute[®] Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, Norcross, USA) extrahiert. Die zuvor isolierten Gelbanden wurden mit einer ihrer Masse entsprechendem Volumen *Binding Buffer* versetzt und für 7 min bei 60°C inkubiert, wobei die Proben alle 3 Minuten durchmischt wurden. Die entstandene Lösung wurde auf MicroElute™ HighBind[®] DNA Säulen gegeben und für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 300 µL XP2 *Binding Buffer* versetzt. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Säulen zweimal mit 700 µL SPW *Wash Buffer* gewaschen. Der Durchfluss wurde nach den Zentrifugationsschritten jeweils verworfen. Anschließend wurden die

Säulen durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 2 min getrocknet. Zur Elution der DNA wurden 20 µL *Elution Buffer* direkt auf die Säulenmatrix appliziert, für 2 min bei RT inkubiert und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Konzentration der Plasmid DNA wurde an einem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer von peQLab durch Absorptionsmessung bei 260 nm ermittelt.

5.3.3.5. Gateway Klonierung

Die relevantesten der mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine wurden als interne Kontrolle der MS Resultate rekombinant und heterolog in *E. coli* überexpressiert. Hierbei wurde die Invitrogen™ Gateway® Technologie eingesetzt. Diese hat den Vorteil, dass auf die herkömmlichen Schritte mit Restriktionsenzymen und Ligase verzichtet und die Klonierung mit höchster Effizienz durchgeführt werden kann.

Hierbei wird das sequenzspezifische Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ verwendet, welches PCR Produkte mit flankierenden *attB* Sequenzen zunächst über das Gateway® BP Clonase™ II Enzym Mix in einen pDONR™201 Vektor einkloniert. Das Enzym Mix enthält die Integrase (Int) des Phagen λ und den Integration Host Factor (IHF) aus *E. coli*. Die *attB* Sequenzen des PCR Produkts werden dabei mit den *attP* Sequenzen des pDONR™201 Vektors rekombiniert, wobei *attL* Sequenzen entstehen. Der pDONR™201 Vektor enthält ein Resistenzgen für Kanamycin und ein *ccdB* Gen, das von den *attP* Sequenzen flankiert wird und dessen Genprodukt in den meisten *E. coli* Stämmen wie TOP10 und BL21 als Gyrasehemmer toxisch wirkt. Durch die Rekombinationsreaktion wird das *ccdB* Gen durch das Zielgen aus dem PCR Produkt ausgetauscht.

Nach Transformation des Vektors in kompetente TOP10 Zellen durch Hitzeschock, können nur die transformierten Zellen überleben, deren Plasmid das korrekt einklonierte Zielgen enthält. Die Aufnahme nicht erfolgreich klonierter Vektoren mit dem *ccdB* Gen führt zum Zelltod. Durch Selektion auf kanamycinhaltigen Agarplatten können darüber hinaus nur jene Zellen wachsen, die erfolgreich mit einem korrekten Vektor mit Resistenzgen transformiert wurden. Im nächsten Schritt wird der pDONR™201 Vektor erfolgreich transformierter Klone extrahiert und das Zielgen in einen Expressionsvektor, pDEST007^[149] umkloniert. Hierbei erfolgt eine Rekombination der *attL* Sequenzen des pDONR™201 Vektors mit den *attR*

Sequenzen des pDEST007 Vektors durch das Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix, wobei erneut die *attB* Sequenzen entstehen. Das Enzym Mix enthält die Integrase (Int) und die Excisionase (Xis) des Phagen λ und den Integration Host Factor (IHF) aus *E. coli*. Der pDEST007 Vektor enthält ebenfalls ein *ccdB* Gen, das in der Rekombinationsreaktion ausgetauscht wird sowie als Selektionsmarker ein Resistenzgen für Ampicillin/Carbenicillin. Auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum können daher nur die Klone mit korrekt rekombinierten Vektoren wachsen. Eine 5'-Upstream Strep-Tag Sequenz im pDEST007 Vektor ermöglicht die Expression eines rekombinanten Proteins mit N-terminalem Strep-Tag zur Affinitätsaufreinigung. Die Expression des Zielgens steht im pDEST007 Vektor unter Kontrolle des *Tet* Operons. Der konstitutiv aktive Repressor TetR bindet hierbei an das *Tet* Operon und verhindert die Expression des Zielgens. Durch Zugabe von Anhydrotetracyclin wird TetR inaktiviert und die Expression induziert.

5.3.3.5.1. BP Klonierung

In die BP Klonierung wurden 100 fmol des jeweiligen *attB* PCR Produkts eingesetzt. Die entsprechende Menge in ng wurde nach der Formel für 100 fmol:

$$m = N \cdot 0,066 \frac{ng}{bp}$$

mit der Länge *N* des Gens in bp berechnet. In einer typischen BP Reaktion wurden zu den 100 fmol *attB* PCR Produkt 1 μ L 150 ng/ μ L pDONR™201 Vektor (50 fmol) gegeben und mit TE Puffer auf 7 μ L Gesamtvolumen ergänzt. Anschließend wurden 2 μ L Gateway® BP Clonase™ II Enzym Mix hinzugegeben und nach Mischen die Reaktion für mindestens 3 h bei RT inkubiert. Unmittelbar vor der Transformation wurde 1 μ L Proteinase K Lösung zur Unterbrechung der BP Klonierung zugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert.

5.3.3.5.2. Transformation des Vektors

Die Transformation des jeweiligen Vektors erfolgte in chemisch kompetente One Shot® TOP10 *E. coli* (Invitrogen) Zellen. Zu etwa 50 bis 100 μ L auf Eis aufgetauten chemisch kompetenten One Shot® TOP10 Zellen in einem 1,5 mL Eppendorf Gefäß wurden 5 μ L der Klonierungsansätze gegeben, vorsichtig durch Drehen gemischt

und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Transformation wurde durch einen Hitzeschock für 45 sec bei 42°C im Wasserbad initiiert. Nach kurzer Inkubation für 5 min auf Eis wurden 400 µL auf 37°C vorgewärmtes LB Medium zu den Zellen gegeben und für 1 h bei 37°C unter Schütteln bei 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB Agarplatten mit 25 µg/mL Kanamycin ausplattiert. Angewachsene Klone wurden gepickt und für Übernachtskulturen in LB Medium mit 25 µg/mL Kanamycin überimpft.

5.3.3.5.3. Plasmidpräparation

Die Extraktion von Plasmiden (pDONR™201, pDEST007) für die Sequenzierung und Umklonierungsschritte während der Herstellung rekombinanter Expressionsklone erfolgte mit einem E.Z.N.A.™ Plasmid Miniprep Kit I (D6943, Omega Bio-tek, Norcross, USA) aus jeweils 5 mL Übernachtskulturen der jeweiligen Klone in LB Medium. Nach Pelletieren der Bakterien durch Zentrifugation bei 9.000 rpm wurden diese in 250 µL *Solution I* (RNase A) resuspendiert und in ein frisches 1,5 mL Eppendorf Gefäß transferiert. Die Suspension wurde mit 250 µL *Solution II* versetzt, vorsichtig durch Drehen gemischt und 3-4 min zur Zellyse bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 350 µL *Solution III* und sofortigem Mischen bildete sich ein weißes Präzipitat genomischer DNA. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurde das Präzipitat bei 13.000 rpm für 10 min bei RT pelletiert. E.Z.N.A.™ HighBind® DNA Minicolumns wurden mit 100 µL *Equilibration Buffer* konditioniert und mit je einem 2 mL *Collection Tube* assembliert bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand der Plasmidpräparation vorsichtig abgenommen ohne das Pellet zu berühren und auf eine konditionierte HighBind® DNA Minicolumn gegeben. Nach Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm wurde der Durchfluss verworfen und 500 µL *Buffer HB* auf die Minicolumn gegeben. Der Durchfluss wurde nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min verworfen und die HighBind® DNA Minicolumn zweimal mit je 700 µL *Wash Buffer* gewaschen. Der Durchfluss wurde jeweils nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min verworfen. Um Pufferreste zu entfernen wurde die HighBind® DNA Minicolumn für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und für die Elution in ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß eingesetzt. 30 µL *Elution Buffer* wurden direkt auf die Säulenmatrix der Minicolumn appliziert und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Konzentration der Plasmid DNA wurde an

einem NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer von peQLab durch Absorptionsmessung bei 260 nm ermittelt:

$$c = A_{260} \cdot 50 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}$$

Die Validität der Klone wurde durch Sequenzierung der Plasmide bestätigt.

5.3.3.5.4. LR Klonierung

Für die LR Klonierung wurden 150 ng des pDONR™201 Vektor mit TE Puffer auf 7 µL gebracht und 1 µL 150 ng/µL pDEST007 hinzugefügt. Die Umklonierung wurde durch Zugabe von 2 µL Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix gestartet und über mindestens 3 h bei RT inkubiert. Unmittelbar vor der Transformation wurde 1 µL Proteinase K Lösung zur Unterbrechung der BP Klonierung zugegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Transformation erfolgte Analog zu der Transformation des pDONR™201 Vektor in chemisch kompetente BL21 *E. coli* Zellen (Novagen). Die Selektion erfolgte auf LB Agarplatten mit 100 µg/mL Carbenicillin. Angewachsene Klone wurden gepickt und für Übernachtskulturen in LB Medium mit 100 µg/mL Carbenicillin überimpft. Aus diesen Übernachtskulturen wurden Kryostocks hergestellt und die Expressionen der jeweiligen Proteine angesetzt.

5.3.3.5.5. Mutagenese

Um das aktive Zentrum von ClpP von *S. aureus* NCTC 8325 als Bindestelle der β-Lactone überprüfen zu können, wurde durch Mutation das Serin des aktiven Zentrums (Ser98) durch Alanin ersetzt (Ser98Ala). Die Mutation wurde gemäß dem QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) mit *S. aureus* NCTC 8325 ClpP im pDONR™201 Vektor und einem mutagenen Primerset für eine Vollplasmid PCR durchgeführt. Die Primer wurden mit dem Stratagene QuikChange® Primer Design Programm (<http://www.stratagene.com>) ermittelt:

<i>vorwärts</i>	5'-ATT TGT ATC GGT ATG GCT GCA <u>G</u> CA ATG GGA TCA TTC TTA TTA G-3'
<i>rückwärts</i>	5'-CTA ATA AGA ATG ATC CCA TTG <u>C</u> TG CAG CCA TAC CGA TAC AAA T-3'

In der Mitte der komplementären Primer wurde ein T-C Mismatch durch die Substitution eines T aus dem Basentriplett von Serin98 (T 292) durch ein G (und damit im komplementären Primer durch ein C) eingeführt. Da die flankierenden Sequenzen identisch mit der Wildtypsequenz auf dem ClpP pDONR™201 Plasmid sind, können sich die Primer dennoch an die Sequenz des Plasmids anlagern und erzeugen bei der Replikation des Plasmids eine Punktmutation. Das Codon für die Aminosäure Serin (TCA) wird somit durch das Codon für Alanin (GCA) ersetzt. Nach der PCR lagen sowohl die Matritze des Wildtyp Plasmids als auch des neu entstandenen mutierten ClpP Plasmids vor. Die PCR Ansätze wurden abweichend zu den Standardansätzen für das Gateway® System behandelt. Die Zusammensetzung ist nachstehend angegeben:

5	µL	10× dNTP Puffer
38	µL	deionisiertes Wasser
2	µL	pDONR™201 ClpP 25 ng/µL
2	µL	<i>vorwärts</i> Primer Verdünnung 10 pmol/µL
2	µL	<i>rückwärts</i> Primer Verdünnung 10 pmol/µL
1	µL	dNTP Mix 10 mM
1	µL	<i>Pfu</i> HF DNA Polymerase

Für die PCR wurde ein verändertes Temperaturprotokoll verwendet:

95°C	2:00 min	
95°C	0:30 min	} 25×
70°C	1:00 min	
72°C	3:10 min	
72°C	10:00 min	
4°C	halten	

Während das aus den TOP10 Zellen (*dam*⁺) isolierte ClpP pDONR™201 Plasmid mit der Wildtypsequenz von ClpP durch seine biologische Herkunft eine Methylierung der Adenine in 5'-GATC-3' Sequenzen durch DAM (DNA Adenin Methylase) aufweist, fehlt diese bei dem mutierten ClpP Ser98Ala Plasmid, das mittels PCR hergestellt wurde. Dies wurde ausgenutzt, um mit der Restriktionsendonuklease Dpn I, welche eine Präferenz für methylierte und hemimethylierte DNA mit der Zielsequenz 5'-

Gm⁶ATC-3' besitzt, das Wildtyp Plasmid selektiv abzubauen. Somit sollte nur noch das Plasmid mit mutierter Ser98Ala ClpP Sequenz vorliegen.

15 µL des PCR Produkts wurden mit 1 µL Dpn I versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden hiervon 5 µL für die Transformation des Plasmids in chemisch kompetente XL1-Blue Zellen eingesetzt (siehe Standardprotokoll für Transformation), die in der Lage sind Plasmide mit Einzelstrangbrüchen zu reparieren. Diese wurden auf LB Agar Platten mit Kanamycin selektiert und einzelne Klone in Übernachtskulturen mit Kanamycin wachsen gelassen. Das Plasmid wurde isoliert und die mutierte Sequenz durch Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurde ClpP Ser98Ala in den Expressionsvektor pDEST007 umkloniert und dieser nach Standardverfahren in chemisch kompetente BL21 Zellen transformiert. Die Expression erfolgte in LB Medium mit Carbenicillin unter Induktion durch Anhydrotetracyclin. Das Protein konnte im Coomassie-gefärbten Gel identifiziert werden und wurde hinsichtlich der Markierung durch β-Lactone mit dem rekombinanten Wildtyp Protein verglichen.

5.3.4. Rekombinante Proteine

5.3.4.1. Überexpression

Zur Expression der jeweiligen Proteine wurden aus Übernachtskulturen die entsprechenden Expressionskulturen 1:100 in LB Medium mit 100 µg/mL Carbenicillin angeimpft. Unter Kontrolle der optischen Dichte wurden die Kulturen bei 37°C auf OD₆₀₀ = 0,6 wachsen gelassen und anschließend die Expression mit 1:10.000 Anhydrotetracyclin (Stock 2 mg/mL in DMF) induziert. Die Expression erfolgte in der Regel für 2 h bei 37°C.

5.3.4.2. Proteinaufreinigung mit Strep-Tag

Zur Aufreinigung von rekombinanten Proteinen wurden in der Regel 1 L Expressionskulturen pelletiert, mit PBS gewaschen und in Puffer W mittels einer FRENCH[®] Pressure Cell Press (Thermo Fisher Scientific) bei 5mal 500-1.000 psi unter Kühlung aufgeschlossen. Die cytosolische Fraktion wurde von der Membran

und nicht lysierten Zellen durch Zentrifugation bei 4°C für 45 min mit 9.000 rpm abgetrennt und in einen 50 mL Superloop (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) geladen. Die Affinitätsaufreinigung erfolgte mit einer StrepTrap™ HP 5 mL Säule (GE Healthcare) an einem ÄKTA™purifier System mit UV Detektor (UPC 900, P900, Box900, Frac950, GE Healthcare). Nach Auftragen der Probe auf die vorkonditionierte Säule wurde diese mit 5 bis 10 Säulenvolumina Puffer W mit 5 mL/min Durchfluss gewaschen, bis die UV Absorption kein Protein mehr im Durchfluss nachweisen ließ. Anschließend erfolgte die Elution des gebundenen Proteins mit 6 Säulenvolumina Puffer E bei 3 mL/min und die fraktionierte Sammlung in 2 bis 3 mL Fraktionen. Die StrepTrap™ HP Säule wurde mit drei Säulenvolumina deionisiertem Wasser gewaschen, mit drei Säulenvolumina 0,5 m NaOH regeneriert und ein weiteres Mal mit drei Säulenvolumina deionisiertem Wasser gewaschen.

5.3.4.3. Expression von ClpP

Die Aufreinigung von rekombinantem ClpP mit C-terminalem Strep-Tag (WSHPQFEK) aus *S. aureus* NCTC 8325 wurde wie in der Literatur beschrieben,^[113] jedoch mit leichter Modifizierung durchgeführt. Ein Zellpellet der Expressionskultur in BL21 Zellen (8 g) wurde in 33 mL Puffer B resuspendiert und durch eine FRENCH® Pressure Cell Press (Thermo Fisher Scientific) bei 7mal 500 psi unter guter Kühlung aufgeschlossen. Durch Zentrifugation für 50 min bei 18.000 rpm wurde die Membranfraktion bei 4°C abgetrennt und die cytosolische Fraktion anschließend mit 300 µL 10% (w/v) wässriger Polyethylenimin (PEI) Lösung pH 8,0 versetzt. Die somit entstandene 0,1%ige PEI Lösung wurde für 5 min auf Eis inkubiert und 50 min bei 18.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Hierbei wurden DNA und stark acidische Proteine ausgefällt.^[150] Der Überstand wurde mit 0,1 m KCl versetzt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung durch eine 5 mL HiTrap™ Q HP Sepharose Anionenaustauscher Säule (GE Healthcare, Uppsala, Schweden). Die 0,1 m KCl haltige Proteinlösung wurde an einem ÄKTA™purifier System auf die HiTrap™ Q HP Säule geladen, mit 6 Säulenvolumina (30 mL) Puffer B mit 0,1 m NaCl gespült und mit einem Gradienten von 0,1 m auf 0,4 m NaCl in 65 min bei einer Flussrate von 2 mL/min mit 1,5 mL Fraktionsgröße eluiert. Die Säule wurde mit 6 Säulenvolumina Puffer B mit 1 m NaCl (30 mL) gespült und mit Puffer B mit 0,1 m NaCl rekonditioniert. ClpP eluierte hierbei

zwischen 0,22 M und 0,28 M NaCl, wie die Analyse der Fraktionen mittels eines Fluoreszenzassays zeigte (siehe 5.3.4.6.2.).

Ein Test zur Anreicherung des ClpP aus den entsprechenden Fraktionen der HiTrapQ im Batch Verfahren mit StrepTactin[®] Superflow[®] (IBA, Göttingen, Deutschland) ergab hochreines ClpP, welches mittels SDS PAGE (10% Acrylamidgel) Gelelektrophorese analysiert und als geeignet für Kristallisationsexperimente beurteilt werden konnte (Abbildung A36).

Unter Verwendung dieser Methode wurden die Fraktionen der HiTrapQ Säule in jeweils 1 mL Proben aufgeteilt und mit 100 µL 50% StrepTactin[®] Superflow[®] (IBA, Göttingen, Deutschland) versetzt. Nach 1 h Inkubation bei RT unter langsamer Rotation wurden die Beads bei 2.000 rpm für 2 min abzentrifugiert und zweimal mit je 1 mL Puffer W gewaschen. Die Beads wurden mit 1 mL Puffer W für 30 min unter langsamer Rotation bei RT inkubiert und mit 1 mL Puffer W gewaschen. Die Elution erfolgte in drei Schritten mit zweimal 200 µL und 150 µL Puffer E. 25 µL der Elutionsfraktionen wurden mit 25 µL 2× SDS Auftragspuffer auf ein 10% Acrylamidgel zur Analyse mit SDS PAGE aufgetragen.

Die reinen ClpP Fraktionen wurden vereinigt, auf Puffer II umgepuffert und für Kristallisationsversuche auf 5,5 mg/mL (ca. 75 µL) aufkonzentriert (Amicon Ultra 4, Ultracel 3k).

5.3.4.4. Edman-Sequenzierung von ClpP

Eine ClpP Gelbande der StrepTactin[®] Superflow[®] Aufreinigung wurde isoliert und mittels Vakuumzentrifugation getrocknet. Anschließend wurde die Gelbande in 50 µL Edman-Puffer für 10 min inkubiert, mit 200 µL H₂O versetzt und ein etwa 5 x 5 mm großes Stück mit MeOH angefeuchtete PVDF Membran hinzugefügt.

Nach Zugabe von 20 µL 100% MeOH wurde der Ansatz für 4 Tage bei RT inkubiert, um das Protein möglichst gut an der Membran zu immobilisieren. Anschließend wurde die Edman-Sequenzierung des Proteins im Genzentrum der LMU durchgeführt.

5.3.4.5. Kristallisation von ClpP

Das aufgereinigte ClpP von *S. aureus* NCTC 8325 wurde bis zu einer Konzentration von 5,5 mg/mL konzentriert und für Kristallisationsversuche verwendet. Hierbei wurden 100 µL Proteinlösung zur „Crystallization Facility“ des Max-Planck Instituts für Biochemie in München gegeben. Eine Analyse ergab, dass ClpP unter verschiedensten Kristallisationsbedingungen Kristalle bildete. In weiteren, selbstdurchgeführten Kristallisationsexperimenten wurden diese Bedingungen verfeinert.

Hierbei wurden in Easy Xtal Tool hanging drop Kristallisationsplatten (Qiagen) jeweils 500 µL einer jeweiligen Pufferlösung in das Reservoir gegeben und auf dem Schraubdeckel jeweils eine Mischung aus 1 µL reiner ClpP Lösung in Puffer II (5-10 mg/mL) und 1 µL des entsprechenden Puffers platziert und für ein bis zwei Wochen bei 18°C inkubiert. Als optimierte Pufferbedingungen wurden 1,65 M bis 1,90 M (NH₄)₂SO₄ (in 0,05 M Schritten variiert) mit 100 mM Natriumacetat pH 4,5 gefunden.

5.3.4.6. Messungen der Enzyminhibition

Für die Bestimmung der IC₅₀ Werte für die Inhibition einer enzymatischen Reaktion durch die Bindung der jeweiligen Sonden wurde für jedes untersuchte Enzym ein entsprechender Substratassay entwickelt, mit dem die Enzymaktivität gemessen werden konnte. Die IC₅₀ Werte wurden aus der Kurvenanpassung der Werte der Enzymaktivität gegen die Inhibitorkonzentration durch Microcal™ Origin 6.0 als Inhibitorkonzentration bei halbmaximaler Aktivität ermittelt. Für jede Inhibitorkonzentration wurden mindestens drei Replikate gemessen.

5.3.4.6.1. Inhibition von SFGH

Die Hydrolaseaktivität der S-Formylglutathion-Hydrolase SFGH aus *E. coli* K12 wurde mit rekombinant exprimiertem, Strep-Tag gereinigtem Protein bestimmt. Hierbei wurde die Hydrolyse von *para*-Nitrophenylacetat als Testreaktion verwendet. Bei der Hydrolyse des chromogenen Substrats *para*-Nitrophenylacetat wird neben Essigsäure auch *para*-Nitrophenol frei, dessen Entstehung durch sein ausgeprägtes

Absorptionsmaximum bei 400 nm leicht spektrometrisch verfolgt werden kann (Abbildung M2). Lacton **G2** wurde in verschiedenen Konzentrationen zu einer Lösung mit 30 nM SFGH in PBS gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 2,4 mM *para*-Nitrophenylacetat gestartet.

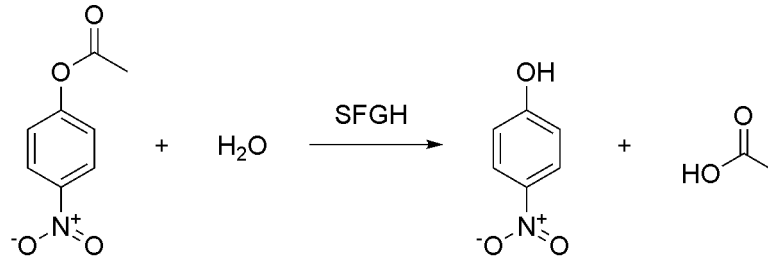


Abbildung M2: Hydrolyse von *para*-Nitrophenylacetat als chromogenes Substrat durch SFGH.

Für eine typische Messung wurden 889 μL PBS in einer 1 mL Küvette vorgelegt, 100 μL 600 nM Stock SFGH in PBS und 1 μL Lacton **G2** (60 mM, 6 mM, 3 mM, 600 μM , 0 μM) hinzugefügt, für 5 min bei RT inkubiert und unmittelbar vor der Messung mit 10 μL 0,24 M *para*-Nitrophenylacetat in DMSO versetzt. Der katalytische Umsatz des Substrats wurde über 6 min bei 400 nm an einem Varian Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometer gemessen. Durch eine simultan durchgeführte Kontrolle ohne Enzym wurde die Hintergrundhydrolyse des Substrats ermittelt, um die Messwerte entsprechend zu bereinigen. Die aus der Auftragung einer kinetischen Messreihe (Absorption gegen Zeit) ermittelte Steigung wurde über drei Replikate gemittelt und gegen die Konzentration des Lactons aufgetragen, um den IC_{50} als Konzentration bei 50% Inhibition der Enzymaktivität zu erhalten.

5.3.4.6.2. Inhibition von ClpP

ClpP besitzt eine relativ hohe Aktivität und Spezifität in der proteolytischen Prozessierung des fluorogenen Peptidase Modellsubstrats *N*-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcumarin (*N*-Succ-Leu-Tyr-AMC). Dieses kann zur gezielten und schnellen Analyse der ClpP Aktivität zwischen den Aufreinigungsschritten sowie der Untersuchung der Inhibitionswirkung der β -Lactone auf ClpP herangezogen werden.^[151] Ein typischer Aktivitätsassay wurde in Greiner CELLSTAR[®] 96-well Flachboden-Microtiterplatten für Fluoreszenzanwendungen in 50 μL Gesamtvolumen durchgeführt. Hierbei wurden 34 μL ClpP (1,7 μg Protein, entsprechend 116 nM

ClpP₁₄ Komplex im Gesamtvolumen von 50 µL) in ClpP Aktivitätspuffer mit 1 µL β-Lacton verschiedener Konzentrationen in DMSO versetzt und 10 min inkubiert. Durch die Zugabe von 15 µL 667 µM N-Succ-Leu-Tyr-AMC Lösung in ClpP Aktivitätspuffer (6 µL 100 mM N-Succ-Leu-Tyr-AMC in DMSO auf 894 µL ClpP Aktivitätspuffer) wurde die Reaktion gestartet und der Anstieg der Fluoreszenz mit einem TECAN GENios Pro™ bei 340 nm Anregung und 450 nm Fluoreszenz in einem Intervall von 120 sec (5 bis 10 Zyklen) bei 25°C aufgenommen.

5.3.4.6.3. Inhibition von MurA1

Die Inhibition von MurA1 durch Showdomycin wurde durch ein bereits in der Literatur beschriebenes Assaysystem untersucht.^[146, 152] Die Aktivität wurde in Form der Freisetzung von P_i aus der durch MurA1 katalysierten Enolpyruvyl Transferreaktion mit Phosphoenolpyruvat (PEP) und UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDPAG) in einem Malachitgrün-Molybdat Assay gemessen. MurA1 aus *S. aureus* NCTC 8325 wurde rekombinant mit einem *N*-terminalem Strep-Tag in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert und durch Affinitätschromatographie an einer StrepTrap™ HP Säule aufgereinigt. Die Elution des reinen Proteins erfolgte mit Puffer E mit 1 mM DTT. Vor Verwendung im Assay wurde MurA1 für mindestens 10 min mit 1 mM UDPAG auf Eis konditioniert. In einem typischen Assay wurden zu 5 µL 500 mM HEPES pH 7,6 sequenziell 36,5 µL H₂O, 2,5 µL 40 mM UDPAG, 5 µL MurA1 (17 µg) und 1 µL Showdomycin Stock verschiedener Konzentrationen oder DMSO als Kontrolle gegeben. Nach Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur wurden 50 µL 400 µM PEP in 50 mM HEPES pH 7,5 zur Initiation der Reaktion hinzugegeben. Nach Inkubation bei RT für eine ausreichende Zeit wurden 20 µL dieser Reaktionslösung abgenommen und in einer Rundboden-96-Well Platte mit 80 µL einer 3:1 Mischung von 0,45% Malachitgrün in Wasser und 4,2% Ammoniumheptamolybdat in 4 M HCl versetzt. Die Absorption wurde mit einem TECAN GENios Pro™ bei 670 nm ausgelesen und der IC₅₀ aus der Kurvenanpassung in Microcal™ Origin 6.0 ermittelt (Abbildung A31).

5.3.5. Virulenzfaktor Tests

Die Inhibition der Virulenzfaktoren von *Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes* wurde teilweise durch Agarplatten-basierende Tests, teilweise auch

durch Tests der entsprechenden steril filtrierten Kulturüberstände untersucht. Hierbei kamen sowohl direkte als auch indirekte Testmethoden zum Einsatz, die entweder einen direkten Nachweis eines Virulenzfaktors durch Antikörpertestsysteme oder einen spezifischen enzymatischen oder physikalischen Effekt, der durch diese Proteine ausgelöst wird zu deren relativen Quantifikation heranziehen. Alle im Folgenden beschriebenen Experimente wurden für verschiedene Konzentrationen jeweils mindestens in Triplikaten durchgeführt.

5.3.5.1. Agarplattenbasierende Tests

Die Hämolyse wurde auf 5% Schafblut Agar Platten (Heipha Diagnostics, Eppelheim, Deutschland) getestet. Für die Proteolyseaktivität der Bakterien wurden 1% Milchagarplatten (Casein) und für die lipolytische Aktivität 1% Tributyrin Agarplatten verwendet. Extrazelluläre DNasen wurden auf DNase Testagar (Difco™) untersucht. Die Aktivität von Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) von *L. monocytogenes* wurde auf ALOA Listeria-agar Platten nach Ottaviani und Agosti (Heipha Diagnostika, Eppelheim, Germany) ermittelt. Sterile Plättchen von Whatman® Cards (No. 1, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) mit 5,5 mm Durchmesser wurden mit einer sterilen Pinzette auf den Agarplatten platziert und mit 2,5 µL der entsprechenden β-Lactone in DMSO mit verschiedenen Konzentrationen versetzt. Als Kontrolle wurden 2,5 µL DMSO appliziert. Anschließend wurden die Plättchen durch Zugabe von 2,5 µL *S. aureus* Übernachtskultur, verdünnt auf OD₆₀₀ = 0,13 in BHB, inokuliert. Die Platten wurden übernacht bei 37°C inkubiert und die Durchmesser der sich ergebenden Zonen um die Bakterienkolonien mit einem Messschieber präzise ausgemessen. Die DNase Testagarplatten (Difco™) wurden zuvor durch Inkubation für wenige Minuten mit 1 m HCl entwickelt. Hierbei wurde die DNA durch die Säure denaturiert und ergab eine Trübung im Agar, während an den Stellen mit abgebauter DNA die Trübung ausblieb. Die Dosen der β-Lactone, die einen halbmaximalen Effekt (ED₅₀) in einem der Virulenztests hervorriefen wurden durch Kurvenanpassung der erhaltenen Werte mittels Microcal™ Origin 6.0 ermittelt. Um den Effekt der reinen Enantiomere von Lacton **U1** im Vergleich mit der racemische Mischung auf die Hämolyse zu untersuchen, wurde eine zuvor hergestellte 1:1 Mischung der beiden Enantiomere von jeder Konzentration sowie die reinen Enantiomere nebeneinander auf 5,5 mm Plättchen ausgebracht.

5.3.5.2. Pyrogene Toxin Superantigene (PTSA)

Aus Übernachtskulturen der PTSA produzierenden Stämme *S. aureus* DSM 19041 und Mu50 wurden jeweils 500 µL durch Zentrifugation bei 6.000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und die Pellets als Waschschrift mit 500 µL BHB Medium resuspendiert, pelletiert und erneut in 500 µL BHB Medium resuspendiert. Drei Replikate mit je 200 µL LB Medium in 1,5 mL Eppendorf Gefäßen wurden mit je 2 µL der gewaschenen Kulturen angeimpft und mit je 2,5 mM Lacton **U1** in zwei Portionen versetzt: 2,0 mM direkt nach dem Animpfen (4 µL 100 mM Lacton **U1** Stock) und weitere 0,5 mM nach 2,5 h Wachstum (1 µL 100 mM Lacton **U1** Stock). Für die TSST-1 Konzentrationsreihe wurden 1,25 mM, 635 µM, 312,5 µM und 156,3 µM Lacton **U1** in die angeimpften Kulturen appliziert. DMSO diente jeweils als Kontrolle. Die Bakterien wurden unter Schütteln bei 200 rpm bei 37°C auf stationäre Phase wachsen gelassen (5 h für DSM 19041 und 6 h für Mu50), dann durch Zentrifugation bei 6.000 rpm pelletiert und die Kulturüberstände durch 0,2 µm GHP Acrodisc® 13 mm Syringe Filter (PALL Life Sciences, Ann Arbor, USA) steril filtriert. Für die Detektion der Staphylococcus Enterotoxine A (SEA), B (SEB), C (SEC) und D (SED) wurde ein RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E (R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland) Sandwich ELISA Immunoassay Kit verwendet. Verdünnungen der steril filtrierten Kulturüberstände wurden eingesetzt und die Toxinverhältnisse durch die Messung der Absorption bei 630 nm mit einem TECAN GENios Pro™ bestimmt. Semi-quantitative Konzentrationen des Staphylococcal toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) wurden durch serielle Verdünnung mit einem reversen passiven Latexagglutinations TST-RPLA Kit (Denka Seiken, Oxoid) bestimmt. Hierbei konnte durch Auftragung der Konzentration der β-Lactone gegen die Aktivität die Konzentration mit halbmaximalem Effekt (EC₅₀) nach Kurvenanpassung der erhaltenen Werte mittels Microcal™ Origin 6.0 ermittelt werden.

5.3.5.3. Listeriolysin O (LLO)

Aus Übernachtskulturen von *L. monocytogenes* EGD-e wurden 500 µL durch Zentrifugation bei 6.000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und die Pellets als Waschschrift mit 500 µL BHB Medium resuspendiert, pelletiert und erneut in 500 µL BHB Medium resuspendiert. In einem 1,5 mL Eppendorf Gefäß wurden 400 µL BHB

Medium vorgelegt und mit 4 μL der resuspendierten gewaschenen *Listeria* Kultur angeimpft. Anschließend wurden 4 μL eines entsprechenden β -Lacton Stock in DMSO hinzugegeben. Die Endkonzentrationen der β -Lactone variierten zwischen 1.000 μM und 75 μM mit DMSO als Kontrolle, wobei der DMSO Anteil im Medium bei 1% gehalten wurde (Zugabe von 4 μL β -Lacton Stock oder DMSO).

Nach kräftigem Mischen wurden die Proben unter Schütteln bei 200 rpm für 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und die Kulturüberstände durch 0,2 μm GHP Acrodisc® 13 mm Syringe Filter (PALL Life Sciences, Ann Arbor, USA) steril filtriert. Die hämolytische Aktivität im extrazellulären Medium durch LLO wurde durch eine in der Literatur beschriebene Methode mit geringen Modifikationen quantifiziert.^[133] In Nunclon™ 96-Well Rundbodenplatten wurden 100 μL serielle Verdünnungen der Kulturüberstände in PBS angesetzt und jeweils mit 100 μL 3% SRBC (sheep red blood cells) resuspendiert in PBS versetzt und für 15 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die 96-Well Platten wurden bei 600 rpm für 5 min zentrifugiert und die minimale Verdünnung bei der intakte Blutzellen begannen Pellets zu bilden ermittelt. Die DMSO Kontrollen wurden hierbei 100% gesetzt. Puffer Kontrollen und reines BHB Medium ergaben keine Hämolyse.

5.3.6. Zytotoxizität von Lacton U1

Die Zytotoxizität wurde in HeLa Zellen mit dem WST-1 Zellproliferationstest bestimmt. Trypsinierte Zellen wurden in Triplikaten in 100 μL Aliquoten mit antibiotikafreiem HeLa Medium in Nunclon™ 96-Well Flachbodenplatten mit $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Well eingesät. Nach Inkubation der HeLa Zellen für 24 h wurde das Medium durch antibiotikafreies Medium mit 1 mM, 100 μM und 10 μM Lacton **U1** ersetzt. DMSO wurde als nicht-toxische Kontrolle und 1% Triton X-100 als 100% lethale Kontrolle eingesetzt. Der DMSO Anteil im Medium wurde bei allen Tests bei 1% gehalten. Die HeLa Zellen mit dem entsprechenden Testmedium wurden für weitere 24 h inkubiert, dann mit 10 μL WST-1 Reagenz versetzt und nach 30 min Inkubation die Absorption bei 450 nm mit 630 nm Referenzwellenlänge mit einem TECAN GENios Pro™ ermittelt.

5.3.7. Infektion von J774 Zellen mit *Listeria monocytogenes*

In Nunclon™ 96-Well Flachbodenplatten wurden $1 \cdot 10^5$ J774 Zellen pro Well in 100 μ L J774 Medium ohne Anitbiotika eingesät. Nach 24 h Inkubation wurde die entstandene Monoschicht einmal mit 100 μ L PBS gewaschen, dieses abgenommen und durch 100 μ L von *Listeria monocytogenes* resuspendiert in J774 Medium ohne Anitbiotika mit 1 mM Lacton **U1** oder DMSO als Kontrolle ersetzt. *L. monocytogenes* EGD-e wurde zuvor in einer Übernachtskultur in BHB Medium mit 1 mM Lacton **U1** oder DMSO wachsen gelassen, auf ungefähr 10^6 Zellen pro mL in J774 Medium ohne Antibiotika resuspendiert und mit Lacton oder DMSO versetzt. Auf die Macrophagen bezogen ergab sich somit eine Multiplizität der Infektion von 0,5. Die Macrophagen wurden nach Adhäsion der Bakterien für 15 min auf Eis für weitere 15 min bei 37°C infiziert.^[101] Anschließend wurde die infizierte Monoschicht zweimal mit je 100 μ L PBS gewaschen und frisches J774 Medium mit 10 μ g/mL Gentamicin und 1 mM Lacton **U1** oder DMSO hinzugegeben. Bei dieser Konzentration des Antibiotikums Gentamicin werden nur freie Listerien abgetötet, während intazelluläre Bakterien überleben. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Nach 0, 3 und 5 h Inkubation bei 37°C nach der Infektion wurde die Monoschicht erneut mit zweimal je 100 μ L PBS gewaschen und die eukaryotischen Zellen durch die Zugabe von zwei Portionen 250 μ L einer 0,05% Triton X-100 Lösung in sterilem deionisiertem Wasser lysiert. Das Gesamtlysats von 500 μ L wurde gesammelt und die Bakterien durch Koloniezählung aus seriellen Verdünnungen des Lysats und Ausplattieren auf Listeria-Agar (Ottaviani & Agosti Agar, Heipha Diagnostika, Eppelheim, Deutschland) quantifiziert.

Um negative Effekte des Lactons auf die Viabilität der eukaryotischen Zellen ausschließen zu können, wurden J774 Zellen wie in den beschriebenen Infektionsexperimenten mit Lacton beziehungsweise DMSO behandelt, jedoch nicht mit Listerien infiziert. Nach 5 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit TEN Puffer abgelöst. Eine Zellfärbung mit Trypanblau ermöglichte in einer Neubauer-Zählkammer die Quantifizierung differenziert nach lebenden, toten oder beschädigten Zellen durch Farbstoffausschluss. Hierbei wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Lacton und DMSO behandelten Zellen beobachtet. Die Anzahl der toten oder beschädigten Zellen lag in den Lactonexperimenten um lediglich 0,2% erhöht vor.

5.3.8. Reaktivität von Showdomycin

Um die Reaktivität von Showdomycin gegenüber Thiolen und primären Aminogruppen zu untersuchen, wurden 17 μL 10 mM DTT und 17 μL 10 mM Isopropylamin jeweils mit 1 μL 10 mM Showdomycin für 1 h inkubiert. Je 80 μL einer 25 mM wässrigen NH_4HCO_3 Lösung wurden hinzugesetzt und die Proben nach Inkubation für 12 h mit ESI-MS analysiert. Für die Behandlung mit DTT wurde Showdomycin mit einem an die Maleimid Doppelbindung addierten DTT Molekül und hydrolysiertem Imidring gefunden ($M = 401,08142$ g/mol):

ESI-MS, positiver Modus (m/z): 142,0297 $[\text{M}+2\text{H}+\text{Na}]^{3+}$ (ber.: 142,0284); negativer Modus (m/z): 422,0536 $[\text{M}+\text{Na}-2\text{H}]^-$ (ber.: 422,0561).

Die Behandlung mit Isopropylamin ergab jedoch keine Addukte weder durch Angriff an die Maleimid Doppelbindung noch an die Carbonylgruppen. Lediglich Showdomycin mit einem hydrolysiertem Ring (durch die lange Exposition gegenüber NH_4HCO_3) konnte im Massenspektrum gefunden werden ($M = 247,06920$ g/mol)

ESI-MS, negativer Modus (m/z): 246,0622 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (ber.: 246,0619).

5.3.9. Bindestelle von AhpC

Um die exakte Position der Bindung von Showdomycin in der Primärstruktur von AhpC aufzudecken, wurde aufgereinigtes Enzym mit Showdomycin markiert und nach chymotryptischem Verdau die Peptidfragmente durch LC-MS analog den präparativen Ansätzen analysiert.

50 μg von AhpC (2 pmol) in 17 μL PBS wurden für 30 min bei RT mit 1 μL 1 mM Showdomycin inkubiert. Durch Umpuffern auf 25 mM NH_4HCO_3 mit einem Endvolumen von 100 μL wurde überschüssige Sonde entfernt. Anschließend wurde 1 mM CaCl_2 hinzugegeben und der Verdau durch Zugabe von 1 μL Chymotrypsinlösung (Sequenzierungsgrad, Roche Diagnostics, Deutschland) für 12 h bei RT durchgeführt. Die Probe wurde auf 0,1% Ameisensäure gebracht und durch LC-MS mit MS-MS und Hochauflösungs-Massenspektren analysiert. Die Spektren der modifizierten Peptide sind in Abbildung A32 gegeben.

6. Anhang

Tabelle A1: Ergebnisse der Massenspektrometrie für die *in vitro* Experimente mit verschiedenen bakteriellen und eukaryotischen Proteomen.

Spezies	Protein	Protein ID	MW	R	min. p Wert	max. Xcorr	NP
<i>Bacillus subtilis</i> Cytosol	Surfactin synthetase subunit 3 (SrfAC)	NP_388233	143727	1	$2,2 \cdot 10^{-15}$	5,31	20
				2	$1,0 \cdot 10^{-30}$	5,83	32
	Putative Esterase YjcH (SFGH)	CAB13043	27899	1	$3,3 \cdot 10^{-15}$	5,14	10
	Hypothetical protein yocD (Pep66)	CAB13809	36387	1	$7,5 \cdot 10^{-13}$	4,19	3
	Beta-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II (KAS II)	NP_389016	43977	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	6,06	13
				2	$1,9 \cdot 10^{-11}$	5,27	9
	CTP Synthase (CTPS)	CAB15743	59681	1	$2,0 \cdot 10^{-15}$	4,43	16
				2	$1,0 \cdot 10^{-30}$	5,16	27
				3	$5,6 \cdot 10^{-14}$	4,04	15
	Paranitrobenzyl esterase (PNBE)	NP_391319	53952	1	$8,6 \cdot 10^{-15}$	5,19	5
				2	$2,3 \cdot 10^{-12}$	4,87	3
	Penicillin-binding protein 4* (PBP4*)	NP_391324	51437	1	$1,1 \cdot 10^{-14}$	6,16	12
				2	$7,9 \cdot 10^{-9}$	2,89	3
	<i>Bacillus licheniformis</i> Cytosol	Beta-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III (KAS III)	YP_078421	33855	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	5,52
2					$3,3 \cdot 10^{-16}$	5,36	19
Beta-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II (KAS II)		YP_078422	43729	1	$6,7 \cdot 10^{-16}$	5,57	5
				2	$1,3 \cdot 10^{-15}$	5,36	15

	CTP Synthase (CTPS)	YP_093470	59771	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	5,14	11
				2	$2,8 \cdot 10^{-15}$	4,94	21
	Putative formate C-acetyltransferase (FCA)	YP_079294	83378	1	$2,3 \cdot 10^{-05}$	3,05	2
				2	$1,7 \cdot 10^{-13}$	6,63	12
	Putative esterase YitV (PutE)	YP_078404	29760	1	$4,0 \cdot 10^{-14}$	4,95	6
<i>Escherichia coli</i> Cytosol	Aldehyde dehydrogenase B (ADB)	AAC76612	56271	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	5,99	18
				2	$3,3 \cdot 10^{-16}$	5,44	16
	Beta-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II (KAS II)	NP_415613	43046	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	6,67	14
	Beta-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase I (KAS I)	NP_416826	42586	1	$1,1 \cdot 10^{-15}$	6,70	15
	Predicted esterase (SFGH)	AAC73458	31404	1	$3,3 \cdot 10^{-13}$	4,63	5
				2	$6,7 \cdot 10^{-14}$	4,85	2
	CTP Synthase (CTPS)	AAC75822	60374	1	$1,5 \cdot 10^{-10}$	4,72	4
				2	$5,6 \cdot 10^{-15}$	5,19	10
<i>Listeria welshimeri</i> Cytosol	CTP Synthase, PyrG (CTPS)	YP_850706	59562	1	$4,6 \cdot 10^{-10}$	4,62	4
				2	$3,8 \cdot 10^{-5}$	2,65	2
	Beta-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II (KAS II)	YP_850415	44189	1	$5,7 \cdot 10^{-13}$	6,34	8
				2	$6,8 \cdot 10^{-6}$	3,37	2
				3	$4,3 \cdot 10^{-8}$	4,05	6
	Lipase (Lip)	YP_850307	38500	1	$5,0 \cdot 10^{-10}$	4,42	3

	Thymidylate synthase, ThyA (ThyS)	YP_850091	36104	1	$6,0 \cdot 10^{-7}$	2,24	2
				2	$1,6 \cdot 10^{-9}$	3,48	2
	Tributyryn esterase, EstA (SFGH)	YP_850577	28894	1	$2,8 \cdot 10^{-6}$	2,48	2
<i>Listeria welshimeri</i> Membran	Beta-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II (KAS II)	YP_850415	44189	1	$8,7 \cdot 10^{-10}$	3,63	2
	Lipase (Lip)	YP_850307	38500	1	$5,3 \cdot 10^{-15}$	5,12	12
				2	$4,4 \cdot 10^{-16}$	4,92	3
	Lipase/acylhydrolase putative (LipAc)	YP_850078	29611	1	$1,5 \cdot 10^{-11}$	4,37	10
				2	$1,2 \cdot 10^{-9}$	3,63	3
	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (ClpP)	YP_850614	21591	1	$1,3 \cdot 10^{-8}$	3,91	4
				2	$2,3 \cdot 10^{-6}$	3,08	2
<i>Mus musculus</i> Cytosol	Abhydrolase domain containing protein 14B (ABH)	NP_083907	22437	1	$1,4 \cdot 10^{-10}$	4,77	2
				2	$1,1 \cdot 10^{-16}$	5,03	6
				3	$1,1 \cdot 10^{-15}$	5,01	5
	Carboxylesterase 6 (CEI)	NP_598721	61900	1	$2,7 \cdot 10^{-13}$	5,02	7
				2	$6,1 \cdot 10^{-13}$	4,16	3

	Carboxylesterase 5 (CEI)	NP_766347	62277	1	$2,2 \cdot 10^{-10}$	5,37	10
				2	$5,2 \cdot 10^{-08}$	4,04	2
	Carboxylesterase 31 isoforms (CEI)	-	-	1	$6,8 \cdot 10^{-11}$	5,04	8
				2	$5,8 \cdot 10^{-10}$	3,44	3
	Lysophospholipase-like protein 1 (LPL)	AAH52848	24671	1	$5,8 \cdot 10^{-7}$	3,23	2
				2	$6,9 \cdot 10^{-8}$	3,53	2
				3	$5,1 \cdot 10^{-5}$	3,05	2
	Esterase D/formylglutathion hydrolase (SFGH)	NP_058599	31299	1	$1,3 \cdot 10^{-12}$	4,86	5
				2	$4,6 \cdot 10^{-11}$	5,76	5
				3	$8,0 \cdot 10^{-13}$	5,07	4
<i>Pseudomonas putida</i> Cytosol	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (ClpP)	NP_744449	23500	1	$5,6 \cdot 10^{-15}$	5,57	8
				2	$2,8 \cdot 10^{-13}$	5,39	5
				3	$1,1 \cdot 10^{-11}$	4,15	1
	Proline iminopeptidase (PIP)	NP_747129	36567	1	$7,4 \cdot 10^{-14}$	5,68	11
				2	$7,9 \cdot 10^{-10}$	3,75	3
	Acetyl-CoA hydrolase (ACoAH)	NP_742324	53924	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	4,80	7
				2	$6,5 \cdot 10^{-13}$	3,96	4
				3	$9,3 \cdot 10^{-12}$	3,99	6

ATP-dependent protease, put. (PADP)	NP_742841	89622	1	$2,9 \cdot 10^{-14}$	5,00	24
Beta-ketothiolase (BKT)	NP_745884	40962	1	$5,3 \cdot 10^{-07}$	2,80	2
			2	$4,8 \cdot 10^{-10}$	3,43	7
Beta-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase I (KAS I)	NP_746292	43237	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	6,03	10
			2	$1,7 \cdot 10^{-14}$	5,33	6
			3	$3,3 \cdot 10^{-15}$	5,94	5
Dienelactone hydrolase (DLH)	NP_746295	26252	1	$6,2 \cdot 10^{-12}$	2,71	2
			2	$3,3 \cdot 10^{-10}$	4,30	6
			3	$2,6 \cdot 10^{-9}$	4,07	2

Diese Liste von Proteinen enthält jeweils die Protein ID, das Molekulargewicht (MW) in Da, die Anzahl an Replikaten (R), in denen die Proteine identifiziert wurden, die Minima der p-Werte eines Laufs, die Maxima der Xcorr und die Anzahl der Peptide (NP), die in jedem Replikat gefunden wurde.

Tabelle A2: Ergebnisse der Massenspektrometrie für die *in situ* Experimente mit *Staphylococcus aureus*.

Spezies	Protein	Protein ID	MW	R	min. p Wert	max. Xcorr	NP
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (ClpP)	YP_499347	21514	1	$5,8 \cdot 10^{-12}$	4,15	7
				2	$1,6 \cdot 10^{-10}$	4,15	7
				3	$1,6 \cdot 10^{-10}$	4,15	4
				4	$3,0 \cdot 10^{-10}$	4,05	6
	Beta-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase II, put. (KAS II)	ABD30046	43739	1	$1,8 \cdot 10^{-12}$	4,80	6
				2	$5,0 \cdot 10^{-13}$	4,81	9
				3	$1,6 \cdot 10^{-13}$	5,72	7
				4	$1,8 \cdot 10^{-13}$	6,45	10
	Beta-ketoacyl-(acyl-carrier-protein) synthase III, put. (KAS III)	YP_499473	33879	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	6,58	5
				2	$1,0 \cdot 10^{-30}$	6,17	4

Diese Liste von Proteinen enthält jeweils die Protein ID, das Molekulargewicht (MW) in Da, die Anzahl an Replikaten (R), in denen die Proteine identifiziert wurden, die Minima der p-Werte eines Laufs, die Maxima der Xcorr und die Anzahl der Peptide (NP), die in jedem Replikat gefunden wurde.

Tabelle A3: Ergebnisse der Massenspektrometrie für die *in situ* Experimente mit *Listeria monocytogenes*.

Spezies	Protein	Protein ID	MW	R	min. p Wert	max. Xcorr	NP
<i>Listeria monocytogenes</i> F2365	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (ClpP)	Q71WV9	21619	1	$4,5 \cdot 10^{-12}$	3,84	9
				2	$2,8 \cdot 10^{-8}$	3,87	8
				3	$1,0 \cdot 10^{-30}$	6,71	11
				4	$2,3 \cdot 10^{-11}$	4,23	7
	Tributylin esterase (TBE)	Q71WZ5	28764	1	$1,0 \cdot 10^{-15}$	6,04	12
				2	$5,1 \cdot 10^{-13}$	4,91	9
	Hydrolase, alpha/beta fold family, Lysophospholipase (LPL)	Q720G4	34449	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	6,94	8
	Lipase (Lip)	Q71XS5	38471	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	5,44	14
				2	$1,0 \cdot 10^{-30}$	5,43	16
	Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II (KAS II)	Q71XG4	44280	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	6,28	14
				2	$1,0 \cdot 10^{-30}$	6,13	11
	Hydrolase CocE/NonD family (Hyd)	Q71W08	62771	1	$1,3 \cdot 10^{-14}$	5,32	16
				2	$1,0 \cdot 10^{-30}$	5,41	14

Diese Liste von Proteinen enthält jeweils die Protein ID, das Molekulargewicht (MW) in Da, die Anzahl an Replikaten (R), in denen die Proteine identifiziert wurden, die Minima der p-Werte eines Laufs, die Maxima der Xcorr und die Anzahl der Peptide (NP), die in jedem Replikat gefunden wurde.

Tabelle A4: Ergebnisse der Massenspektrometrie für die *in situ* Markierungen verschiedener Bakterienspezies mit der Showdomycin Sonde.

Spezies	Protein	Protein ID	MW	R	min. p Wert	max. Xcorr	NP
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	Formate acetyltransferase (FAT)	YP_498784	84861	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	5,93	34
				2	$1,0 \cdot 10^{-30}$	7,73	48
				3	$1,0 \cdot 10^{-30}$	8,22	59
				4	$1,0 \cdot 10^{-30}$	6,48	49
	Acetolactate synthase (AlsS)	YP_500936	61173	1	$2,0 \cdot 10^{-8}$	3,61	3
				2	$1,0 \cdot 10^{-14}$	5,52	11
				3	$3,3 \cdot 10^{-16}$	5,16	7
				4	$4,4 \cdot 10^{-15}$	5,68	16
				5	$1,7 \cdot 10^{-14}$	6,03	15
	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F (AhpF)	ABD29530	54720	1	$1,4 \cdot 10^{-11}$	5,48	2
				2	$6,3 \cdot 10^{-11}$	5,89	4
				3	$1,6 \cdot 10^{-14}$	5,66	11
				4	$5,4 \cdot 10^{-11}$	5,82	13
				5	$2,2 \cdot 10^{-13}$	6,12	12

Inosine-5'- monophosphate dehydrogenase (IMPDH)	YP_498963	52850	1	$1,7 \cdot 10^{-12}$	4,69	3
			2	$1,1 \cdot 10^{-16}$	5,86	16
			3	$2,9 \cdot 10^{-14}$	5,09	16
			4	$1,0 \cdot 10^{-13}$	5,62	11
			5	$5,6 \cdot 10^{-16}$	5,10	16
UDP-N-acetylglu- cosamine 1- carboxy- vinyltransferase 1 (MurA1)	YP_500816	44941	1	$9,1 \cdot 10^{-10}$	3,38	2
			2	$8,9 \cdot 10^{-8}$	3,15	2
			3	$1,9 \cdot 10^{-10}$	4,39	9
			4	$2,3 \cdot 10^{-9}$	4,17	6
			5	$1,1 \cdot 10^{-9}$	3,79	8
UDP-N-acetyl- glucosamine pyro- phosphorylase, putative (GlmU)	YP_500894	44894	1	$1,0 \cdot 10^{-9}$	4,67	9
			2	$1,7 \cdot 10^{-11}$	4,69	11
			3	$3,2 \cdot 10^{-13}$	5,27	22
			4	$1,7 \cdot 10^{-12}$	4,43	21
			5	$2,6 \cdot 10^{-11}$	4,58	14

	Thioredoxine reductase (TrxB)	YP_499342	33616	1	$1,1 \cdot 10^{-15}$	5,99	3
				2	$1,0 \cdot 10^{-15}$	6,06	9
				3	$5,6 \cdot 10^{-15}$	6,42	16
				4	$6,7 \cdot 10^{-15}$	6,15	10
				5	$3,3 \cdot 10^{-16}$	5,69	11
	Phosphomethylpyrimidine kinase (ThiD)	YP_499134	29857	1	$3,3 \cdot 10^{-14}$	6,22	12
				2	$4,4 \cdot 10^{-15}$	6,49	15
				3	$2,2 \cdot 10^{-16}$	6,69	14
	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC)	YP_498954	20976	1	$7,9 \cdot 10^{-11}$	5,81	6
				2	$6,4 \cdot 10^{-11}$	4,90	3
				3	$6,4 \cdot 10^{-14}$	6,10	7
<i>Staphylococcus aureus</i> Mu50	Formate acetyltransferase (FAT)	NP_370750	84862	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	6,65	59
	Alkyl hydroperoxide reductase subunit F (AhpF)	NP_370904	54707	1	$3,4 \cdot 10^{-11}$	4,17	7
				2	$3,9 \cdot 10^{-11}$	5,82	14
	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH)	NP_370914	52850	1	$1,1 \cdot 10^{-14}$	5,61	19
				2	$3,5 \cdot 10^{-14}$	5,18	16
	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1 (MurA1)	NP_372623	44996	1	$1,4 \cdot 10^{-11}$	3,87	9
				2	$1,8 \cdot 10^{-10}$	4,25	5

				3	$2,6 \cdot 10^{-9}$	4,19	6
	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxy-vinyltransferase 2 (MurA2)	NP_372648	45075	1	$6,5 \cdot 10^{-14}$	5,22	19
				2	$1,5 \cdot 10^{-13}$	6,11	14
				3	$7,5 \cdot 10^{-14}$	6,39	10
				4	$1,8 \cdot 10^{-15}$	5,34	7
	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (PtsI)	BAB57246	63206	1	$3,4 \cdot 10^{-12}$	4,49	15
				2	$1,4 \cdot 10^{-13}$	4,46	15
				3	$5,1 \cdot 10^{-14}$	4,84	18
				4	$1,7 \cdot 10^{-12}$	5,13	18
	Thioredoxine reductase (TrxB)	NP_371288	33616	1	$4,4 \cdot 10^{-15}$	5,41	11
				2	$1,4 \cdot 10^{-14}$	5,75	9
				3	$8,3 \cdot 10^{-15}$	5,76	12
	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC)	NP_370905	20977	1	$1,9 \cdot 10^{-11}$	6,08	7
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	Ribonucleotide-diphosphate reductase subunit alpha (RNR)	NP_465679	87395	1	$1,7 \cdot 10^{-14}$	6,07	46
				2	$7,7 \cdot 10^{-14}$	5,45	32
				3	$2,2 \cdot 10^{-16}$	5,76	41
	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase (PtsI)	NP_464528	63212	1	$2,1 \cdot 10^{-10}$	4,63	12
				2	$4,4 \cdot 10^{-7}$	3,84	5
	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH)	NP_466280	52556	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	5,25	18
				2	$3,3 \cdot 10^{-15}$	4,86	15
				3	$1,7 \cdot 10^{-12}$	5,36	16

	Peroxiredoxin, putative (POR)	NP_465129	20140	1	$1,2 \cdot 10^{-11}$	4,85	7
				2	$3,1 \cdot 10^{-8}$	4,00	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Ribonucleotide- diphosphate reductase subunit alpha (RNR)	NP_249847	107106	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	6,72	38
				2	$2,0 \cdot 10^{-14}$	5,83	20
	Cysteine desulfurase (CDS)	NP_252503	44667	1	$7,5 \cdot 10^{-10}$	4,92	8
				2	$1,3 \cdot 10^{-11}$	5,11	8
				3	$3,0 \cdot 10^{-08}$	4,06	2
	Probable Oxidoreductase (POR)	NP_251181	36832	1	$3,3 \cdot 10^{-8}$	4,22	3
				2	$5,8 \cdot 10^{-8}$	4,28	3
				3	$5,1 \cdot 10^{-9}$	4,23	5
	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC)	NP_248829	20541	1	$1,2 \cdot 10^{-7}$	3,51	6
				2	$3,8 \cdot 10^{-8}$	3,18	2
				3	$8,6 \cdot 10^{-6}$	3,38	3
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC)	NP_743245	21730	1	$1,0 \cdot 10^{-30}$	6,43	10
				2	$1,4 \cdot 10^{-11}$	4,90	5
				3	$7,1 \cdot 10^{-11}$	3,44	2

Diese Liste von Proteinen enthält jeweils die Protein ID, das Molekulargewicht (MW) in Da, die Anzahl an Replikaten (R), in denen die Proteine identifiziert wurden, die Minima der p-Werte eines Laufs, die Maxima der Xcorr und die Anzahl der Peptide (NP), die in jedem Replikat gefunden wurde.

Tabelle A5: Empirische Voraussage der Annealingtemperaturen von Primern in °C in Abhängigkeit der Primerlänge und des GC Gehalts.^[149]

GC	Primerlänge in Basenpaaren																	
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	28,7	31,2	33,5	35,5	37,2	38,9	40,3	41,6	42,8	43,9	44,9	45,9	46,7	47,6	48,3	49,0	49,7	50,3
2	31,4	33,8	35,9	37,7	39,4	40,9	42,3	43,5	44,6	45,6	46,6	47,5	48,3	49,0	49,7	50,4	51,0	51,6
3	34,2	36,4	38,3	40,0	41,6	43,0	44,2	45,3	46,4	47,3	48,2	49,0	49,8	50,5	51,1	51,7	52,3	52,8
4	36,9	38,9	40,7	42,3	43,7	45,0	46,2	47,2	48,2	49,1	49,9	50,6	51,3	51,9	52,5	53,1	53,6	54,1
5	39,6	41,5	43,1	44,6	45,9	47,1	48,1	49,1	50,0	50,8	51,5	52,2	52,8	53,4	54,0	54,5	54,9	55,4
6	42,4	44,1	45,5	46,9	48,0	49,1	50,1	50,9	51,7	52,5	53,1	53,8	54,3	54,9	55,4	55,8	56,3	56,7
7	45,1	46,6	47,9	49,1	50,2	51,2	52,0	52,8	53,5	54,2	54,8	55,3	55,9	56,3	56,8	57,2	57,6	58,0
8	47,8	49,2	50,4	51,4	52,4	53,2	54,0	54,7	55,3	55,9	56,4	56,9	57,4	57,8	58,2	58,6	58,9	59,2
9	50,6	51,7	52,8	53,7	54,5	55,3	55,9	56,5	57,1	57,6	58,1	58,5	58,9	59,3	59,6	59,9	60,2	60,5
10	53,3	54,3	55,2	56,0	56,7	57,3	57,9	58,4	58,9	59,3	59,7	60,1	60,4	60,7	61,0	61,3	61,6	61,8
11	56,0	56,9	57,6	58,2	58,8	59,4	59,8	60,3	60,6	61,0	61,3	61,6	61,9	62,2	62,4	62,7	62,9	63,1
12	58,8	59,4	60,0	60,5	61,0	61,4	61,8	62,1	62,4	62,7	63,0	63,2	63,4	63,7	63,9	64,0	64,2	64,4
13	61,5	62,0	62,4	62,8	63,1	63,5	63,7	64,0	64,2	64,4	64,6	64,8	65,0	65,1	65,3	65,4	65,5	65,6
14	64,2	64,6	64,8	65,1	65,3	65,5	65,7	65,8	66,0	66,1	66,3	66,4	66,5	66,6	66,7	66,8	66,8	66,9
15	67,0	67,1	67,2	67,4	67,5	67,6	67,6	67,7	67,8	67,8	67,9	68,0	68,0	68,1	68,1	68,1	68,2	68,2
16	69,7	69,7	69,7	69,6	69,6	69,6	69,6	69,6	69,6	69,6	69,5	69,5	69,5	69,5	69,5	69,5	69,5	69,5
17	72,4	72,2	72,1	71,9	71,8	71,7	71,5	71,4	71,3	71,3	71,2	71,1	71,0	71,0	70,9	70,9	70,8	70,8
18	75,2	74,8	74,5	74,2	73,9	73,7	73,5	73,3	73,1	73,0	72,8	72,7	72,6	72,4	72,3	72,2	72,1	72,1

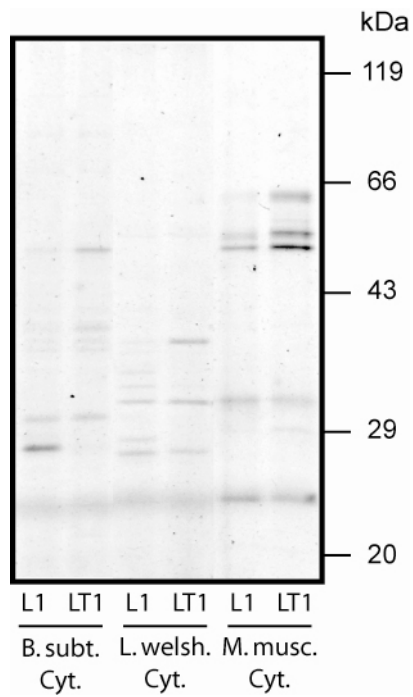
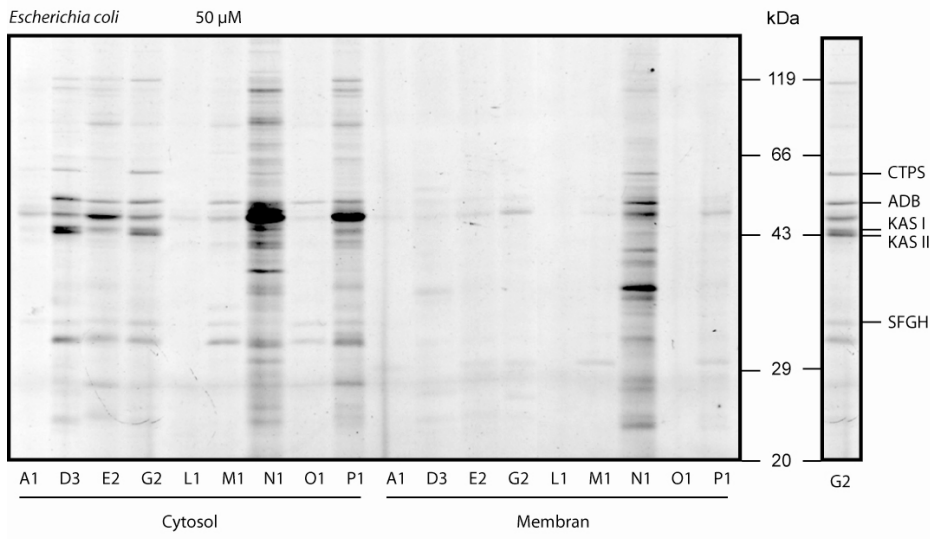
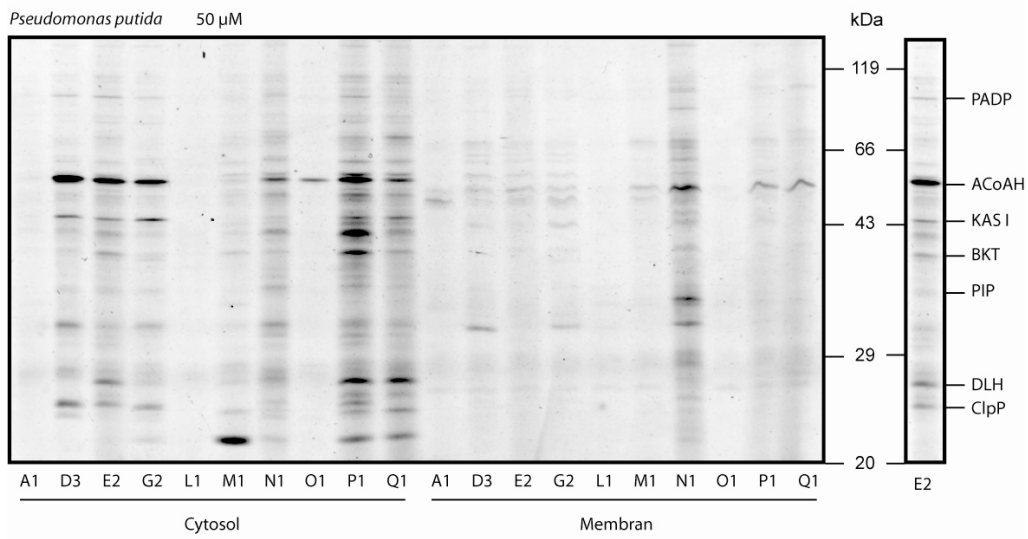


Abbildung A1: Der Vergleich der *cis* und *trans*- β -Lactone **L1** und **LT1** ergab ähnliche Markierungsprofile für die *in vitro* Cytosol Proteome von *B. subtilis*, *L. welshimeri* und *M. musculus*.

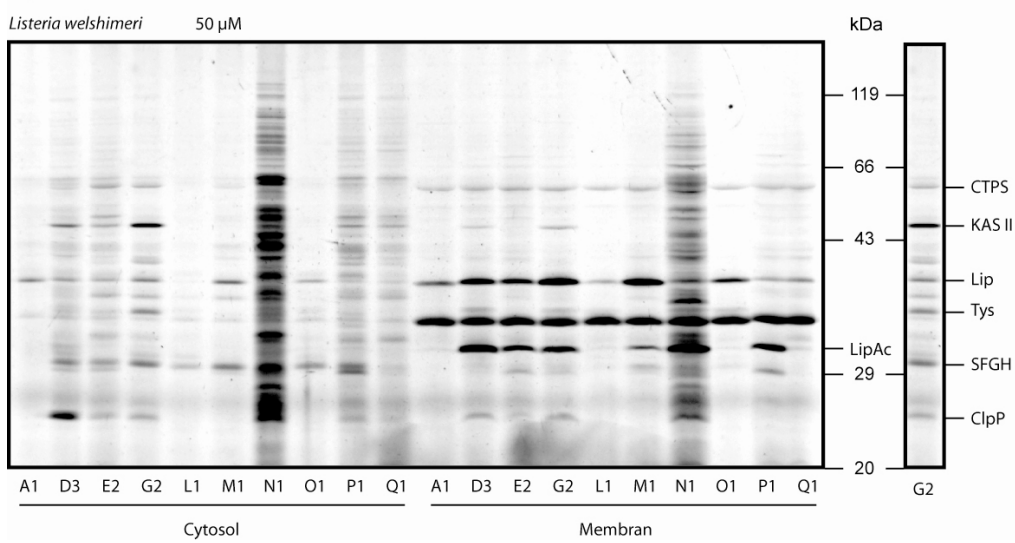
A



B



C



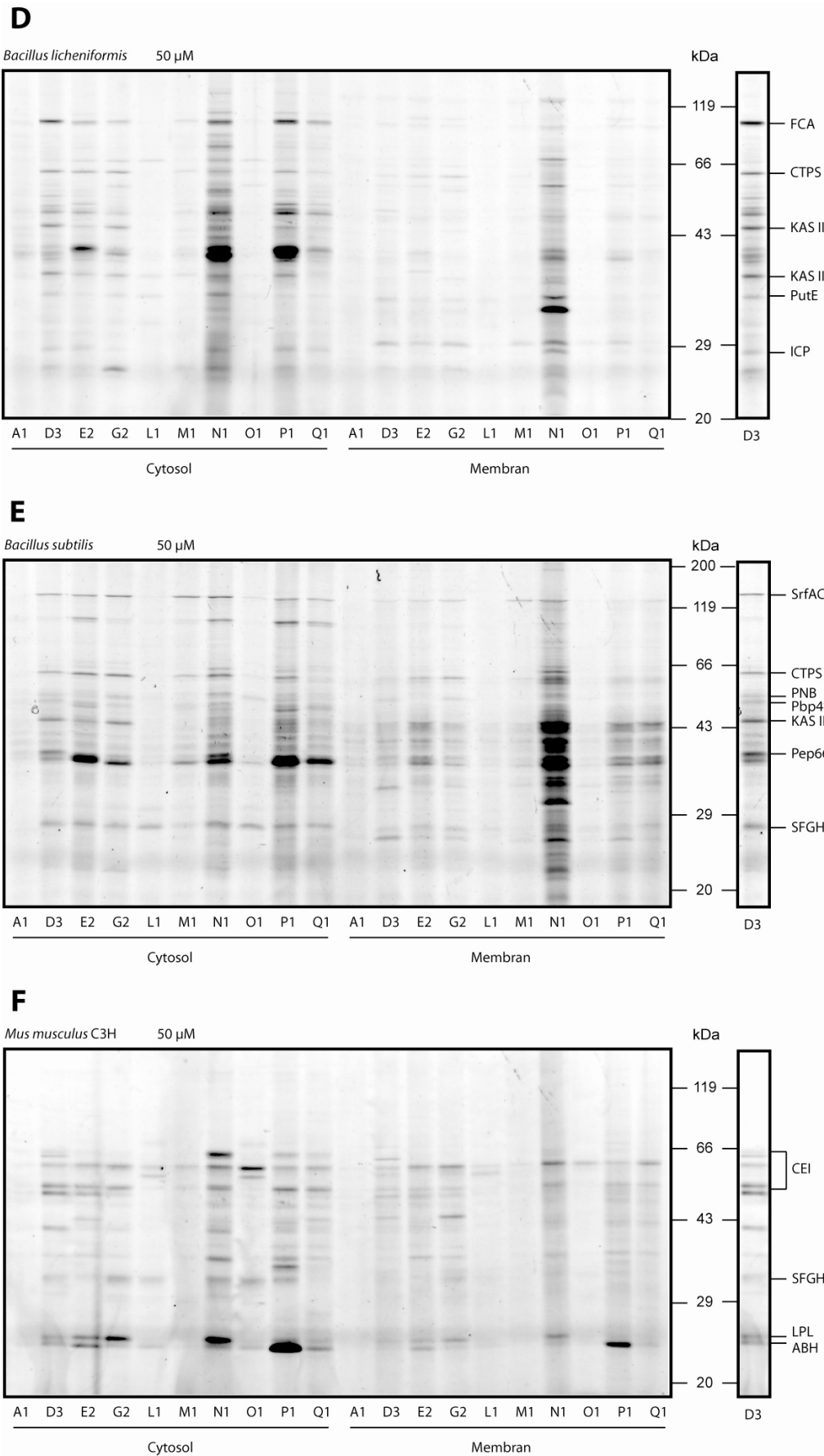


Abbildung A2: *In vitro* Markierungsprofile der Proteome in Cytosol und Membran mit der β -Lacton Sonden Bibliothek.

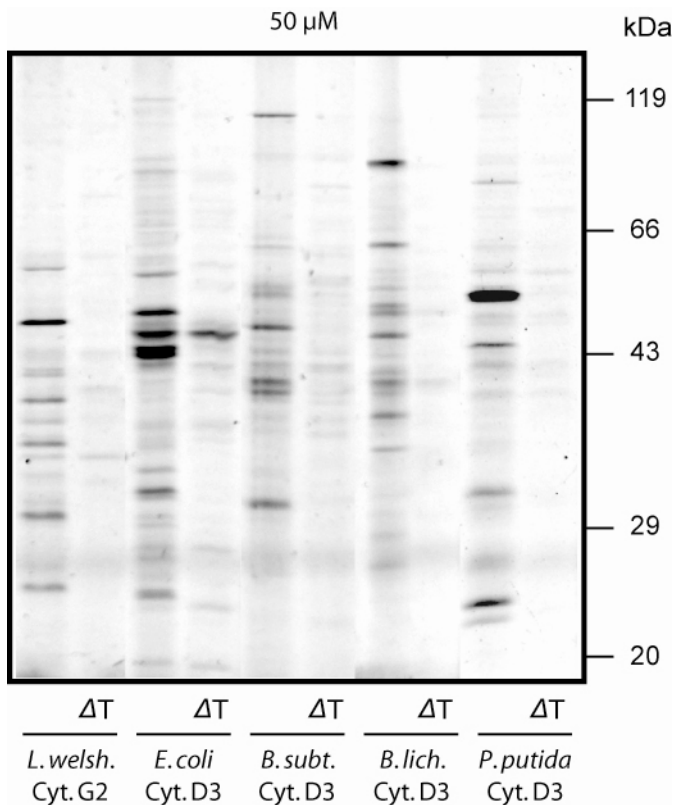


Abbildung A3: Repräsentative Beispiele nativer Proteome mit ihren entsprechenden Hitzecontrollen. Die Mehrheit aller Markierungen erwies sich als hitzesensitiv und kann daher als Resultat einer spezifischen Affinitätsbindung betrachtet werden.

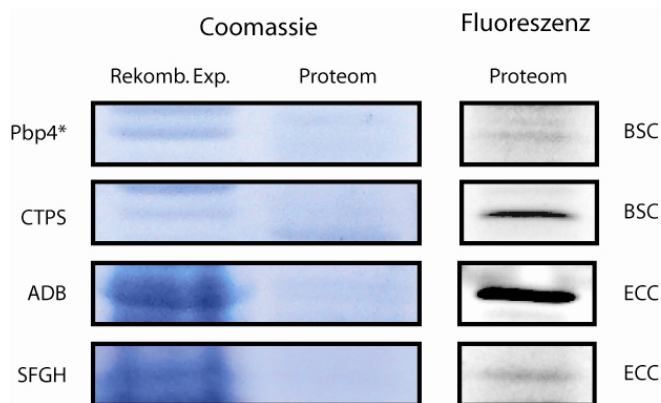


Abbildung A4: Vergleich zwischen relativen Proteinintensitäten nach Coomassie Färbung (linke Seite) und Fluoreszenzanalyse (rechte Seite). Die meisten markierten Enzyme zeigen nur eine geringe Häufigkeit in der Coomassie Färbung. Rekombinant exprimierte Enzyme wurden daher neben diesen aufgetragen, um den korrekten Bereich der Bande im Gel zu lokalisieren.

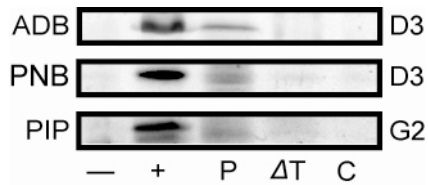


Abbildung A5: Rekombinant exprimierte Proteine als Zusatz zu Abbildung 11 (– vor Induktion, + nach Induktion, P natives Proteom, ΔT nach Induktion/Hitzekontrolle, C nach Induktion/ohne Sonde).

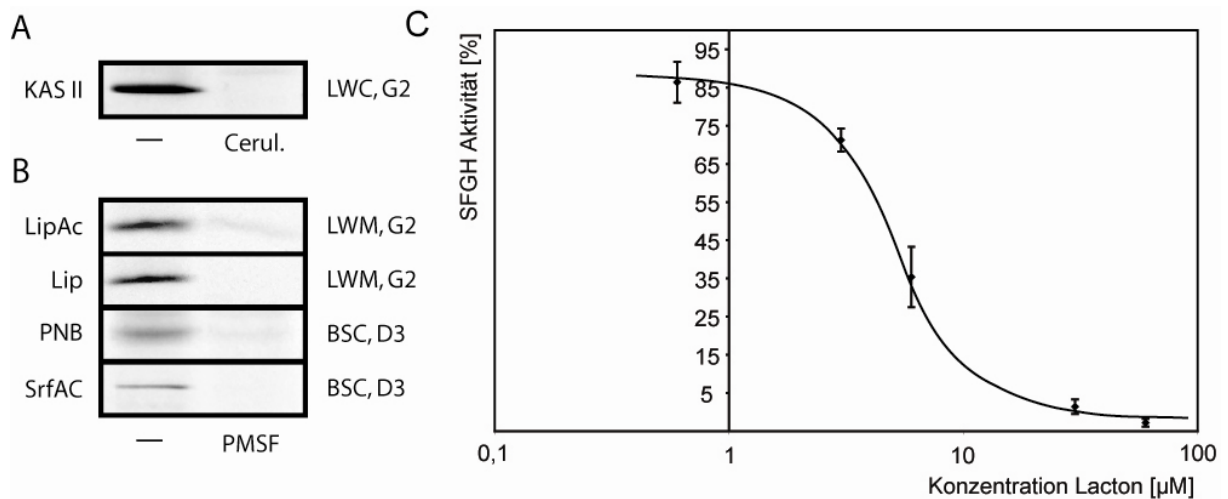


Abbildung A6: Konkurrenzexperimente und IC_{50} Bestimmung. A) Konkurrenz von Cerulenin (100facher Überschuss) mit der Lacton Sonde **G2** um das aktive Zentrum von KAS II. B) Kompetitives Experiment mit einigen Serinproteasen mit und ohne 100fachem Überschuss des Inhibitors PMSF und den entsprechenden Sonden. (LWC: *L. welshimeri* Cytosol, LWM: *L. welshimeri* Membran, BSC: *B. subtilis* Cytosol). C) IC_{50} von 5 μM für die Inhibition von SFGH durch die Sonde **G2**.

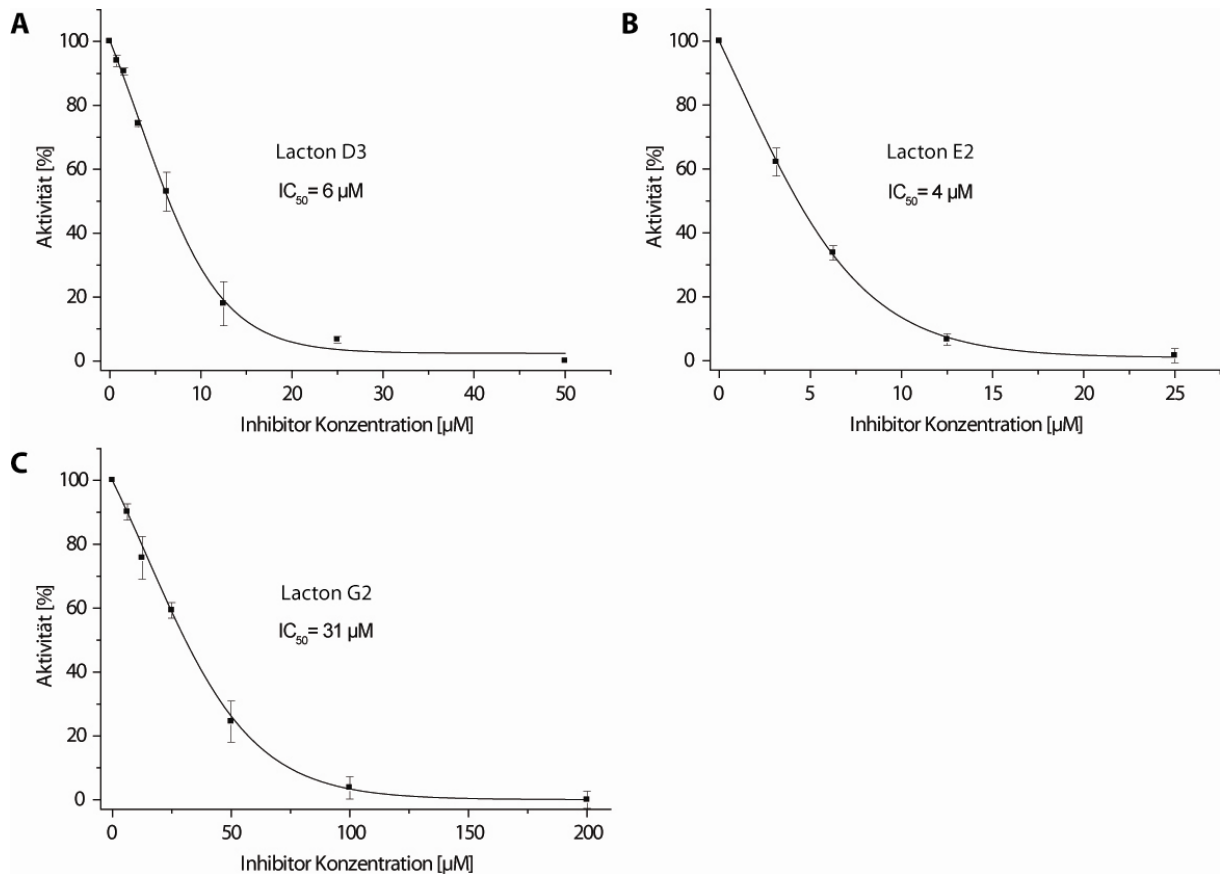


Abbildung A7: Inhibition der Aktivität von ClpP durch A) Sonde **D3** (IC₅₀ = 6 μM), B) Sonde **E2** (IC₅₀ = 4 μM) und C) Sonde **G2** (IC₅₀ = 31 μM).

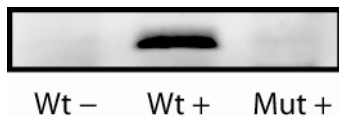


Abbildung A8: Markierung des heterolog exprimierten Wildtyp (Wt) ClpP und der Ser98Ala Mutation (Mut) durch die Sonde **D3**. Die ausbleibende Markierung bei der Ser98Ala Mutante zeigt, dass Ser98 im aktiven Zentrum der Protease für die Bindung der Sonde verantwortlich ist (+ Expression induziert, – nicht induziert).

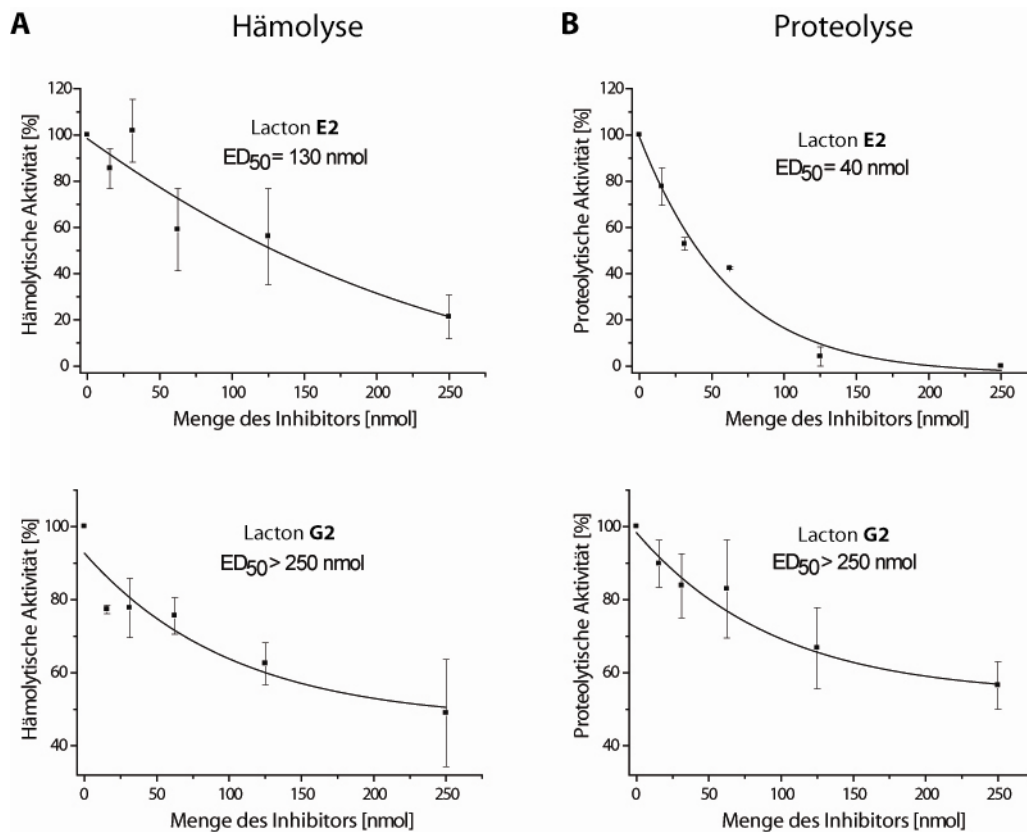


Abbildung A9: A) Inhibition der Hämolyse und B) der Proteolyse durch die Sonden **G2** und **E2** mit Agarplatten-basierenden Tests mit *S. aureus* NCTC 8325.

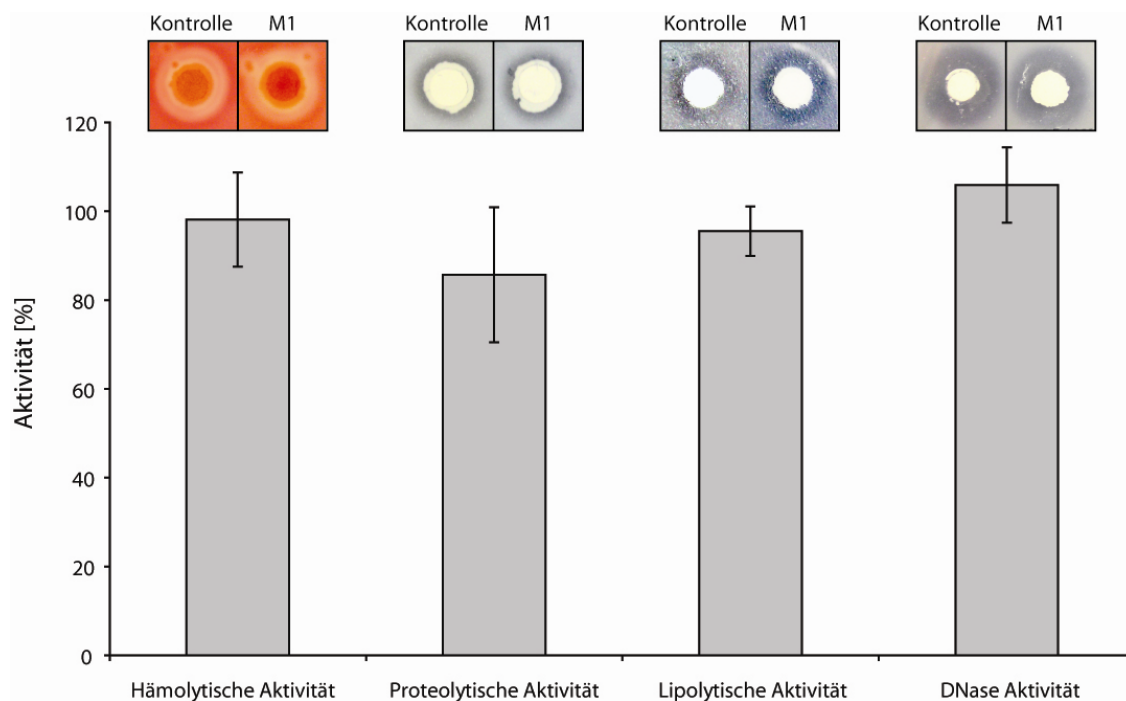


Abbildung A10: Agarplatten-basierende Experimente mit Lacton **M1** und *S. aureus* NCTC 8325. Lacton **M1** ergab keine signifikanten Effekte in allen Assays, was auf die fehlende Markierung und Inhibition von ClpP zurückzuführen sein dürfte.

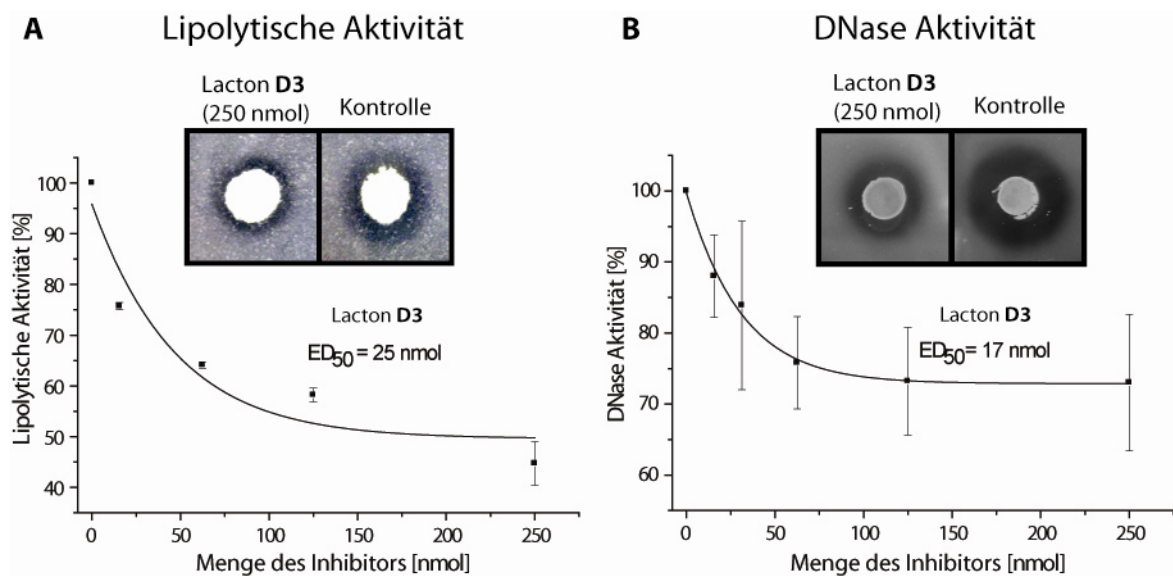


Abbildung A11: A) Partielle Inhibition der lipolytischen und B) der DNase Aktivitäten von *S. aureus* NCTC 8325 durch Sonde **D3**.

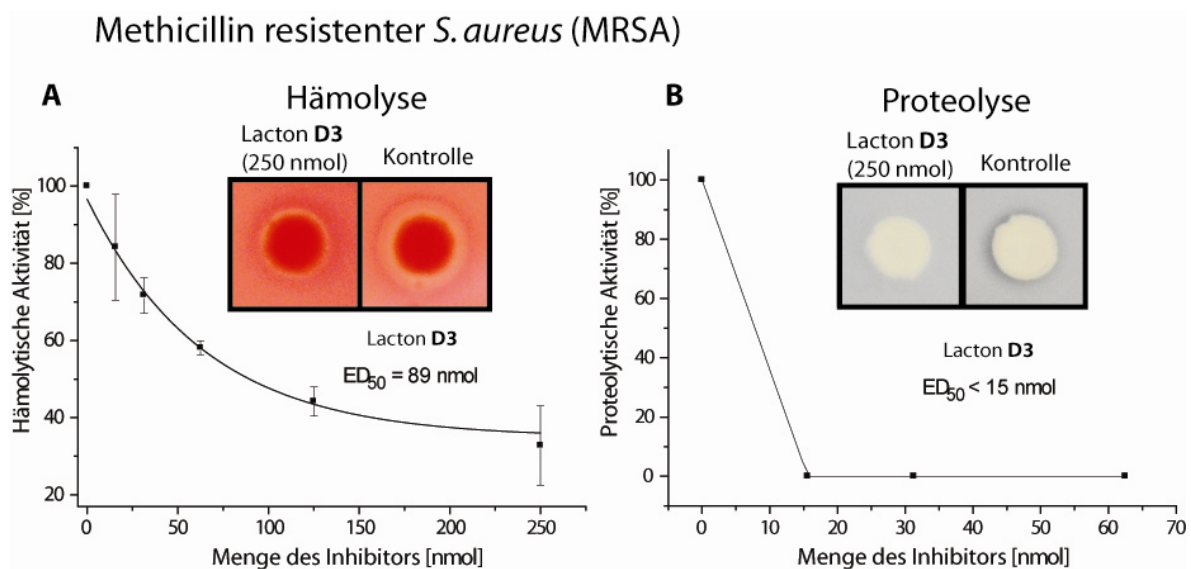


Abbildung A12: Inhibition von A) der Hämolyse im MRSA Stamm DSM 18827 und B) der Proteolyse im MRSA Stamm Mu50.

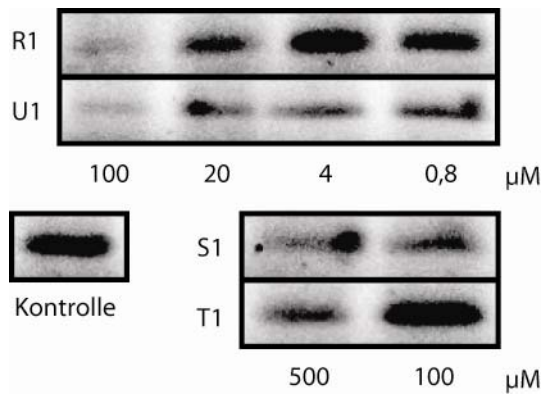


Abbildung A13: *In situ* Bindung der Inhibitoren **R1**, **U1**, **S1** und **T1** an ClpP bei verschiedenen Konzentrationen in lebenden *S. aureus* NCTC 8325 Zellen visualisiert durch kompetitives ABPP mit Markierung durch die Sonde **D3** nach Lyse der Zellen. In diesem Experiment verhindert die *in situ* Bindung der neuen Inhibitoren in das aktive Zentrum von ClpP die folgende Markierung durch die Sonde **D3**. Die Fluoreszenzgelanalyse zeigt, dass ClpP das *in situ* Ziel der Inhibitoren ist, wobei **U1** die stärkste Bindung aufweist, während **T1** und **S1** die schwächste Bindung ergeben.

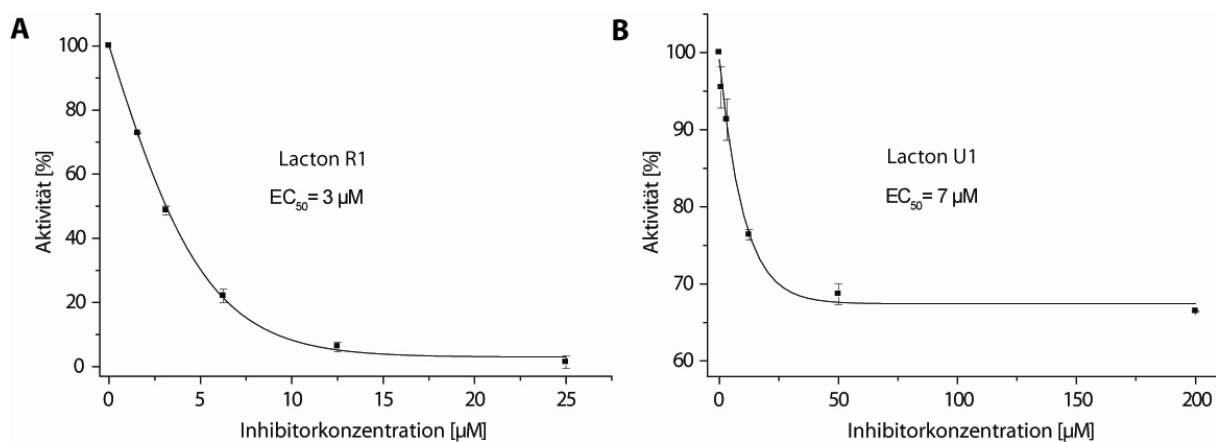


Abbildung A14: Inhibition der Peptidaseaktivität von aufgereinigtem ClpP durch A) Inhibitor **R1** ($EC_{50} = 3 \mu\text{M}$) und B) Inhibitor **U1** ($EC_{50} = 7 \mu\text{M}$).

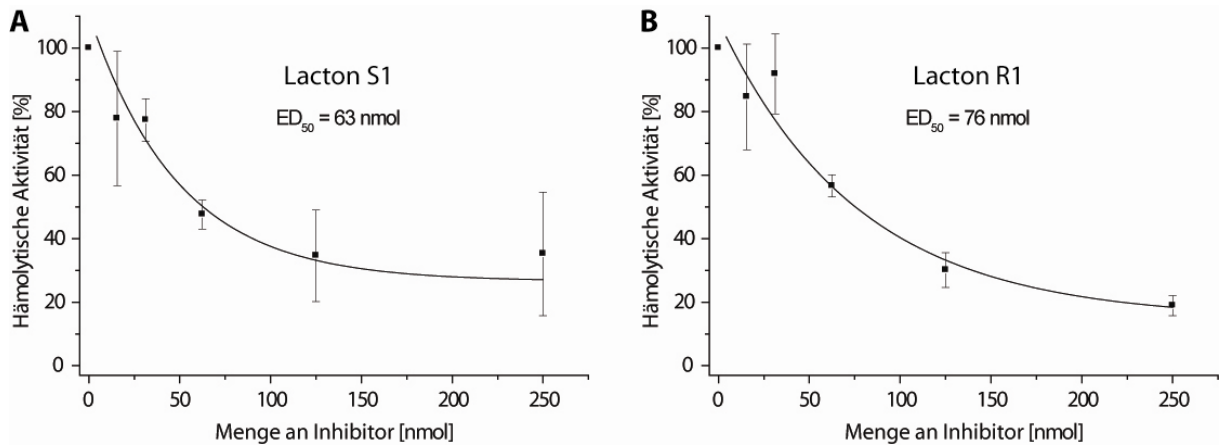


Abbildung A15: Hämolyseassay für die Inhibitoren **S1** und **R1** der neuen Generation mit *S. aureus* NCTC 8325. A) Lacton **S1** mit einem ED₅₀ von 63 nmol und B) **R1** mit einem ED₅₀ von 76 nmol. Die Inhibitoren **S1** und **R1** ergaben somit eine wesentlich geringere Effizienz als **U1**.

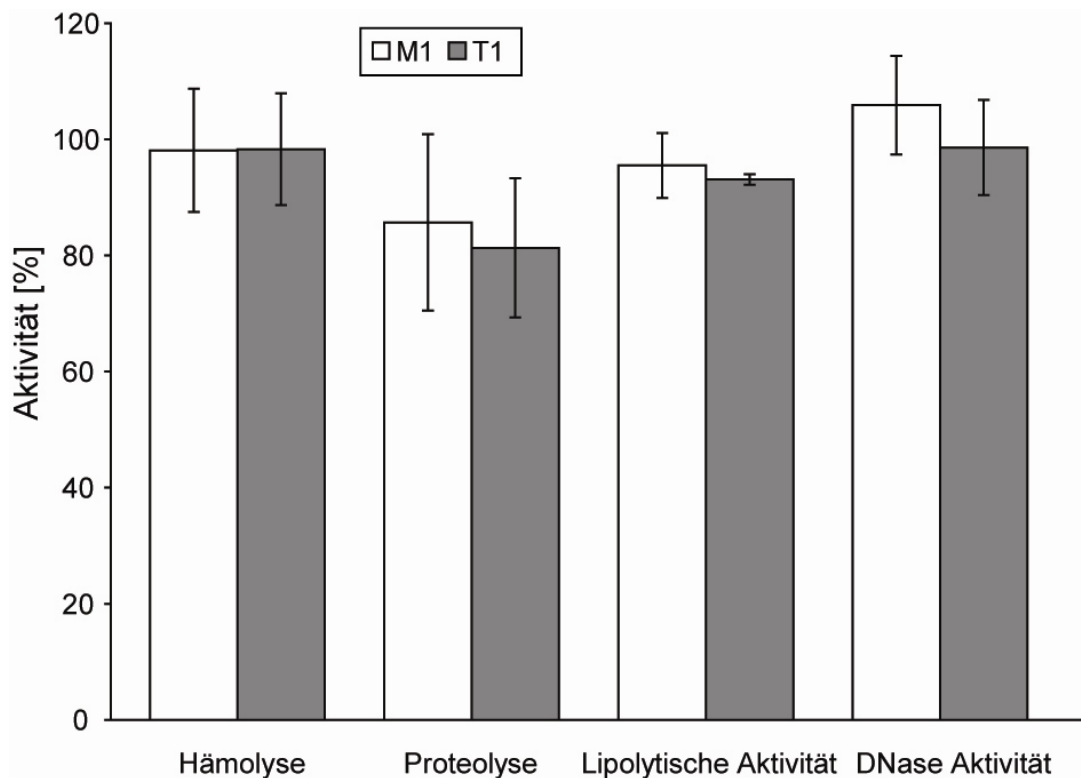


Abbildung A16: Agarplatten-basierende Experimente mit den Lactonen **M1** und **T1** mit *S. aureus* NCTC 8325. Die Lactone **M1** und **T1** ergaben keine signifikanten Effekte in allen Virulenzfaktortests.

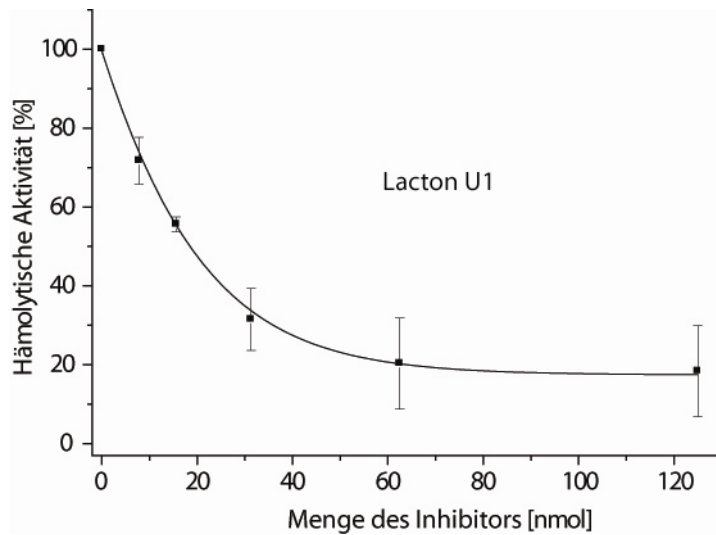


Abbildung A17: Inhibition der hämolytischen Aktivität des MRSA Stammes DSM 18827 durch das Lacton **U1**. Die hämolytische Aktivität wurde bei der höchsten Menge des Inhibitors **U1** signifikant reduziert und führte sogar bei diesem Stamm zu einer Verringerung der Aktivität um 80% bei 125 nmol.

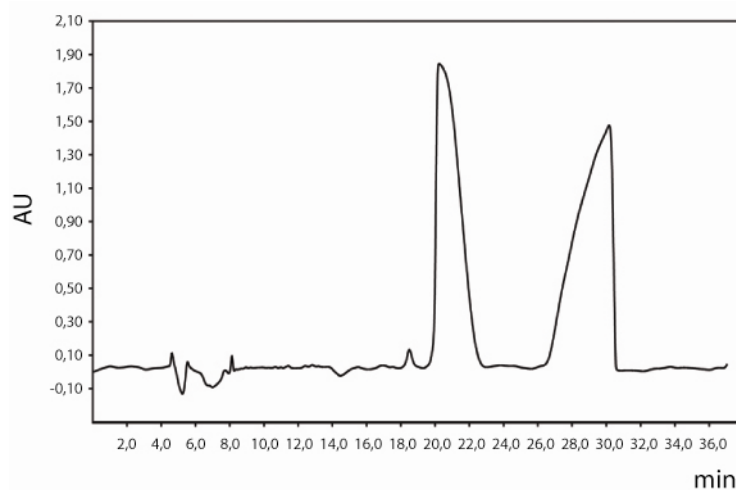


Abbildung A18: HPLC Spektrum der Trennung der Enantiomeren von Lacton **U1** mittels chiraler HPLC.

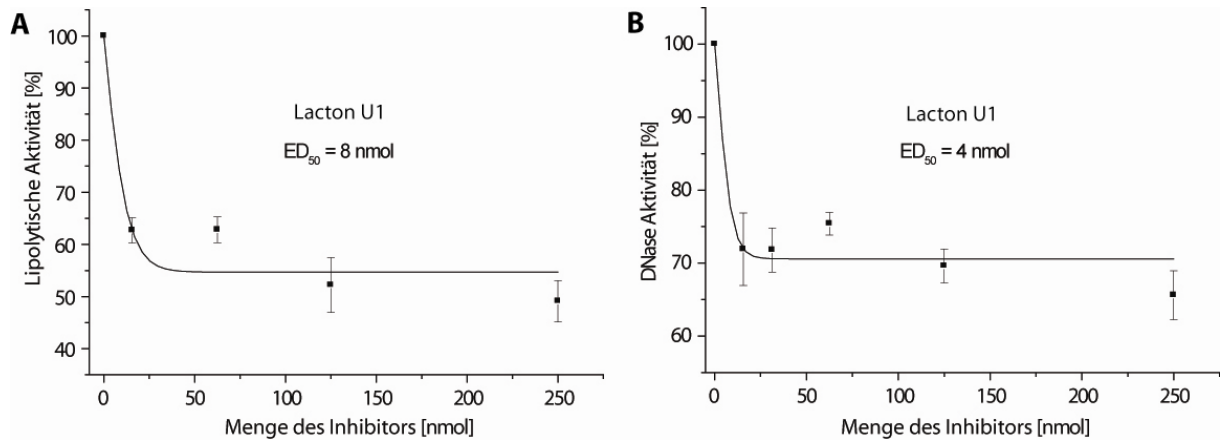


Abbildung A19: Zusätzliche Agarplatten-basierende Assays für Lacton **U1** mit *S. aureus* NCTC 8325. A) Partielle Inhibition der lipolytischen Aktivität durch **U1** ($ED_{50} = 8$ nmol). B) Signifikante Reduktion der DNase Aktivität mit **U1** ($ED_{50} = 4$ nmol).

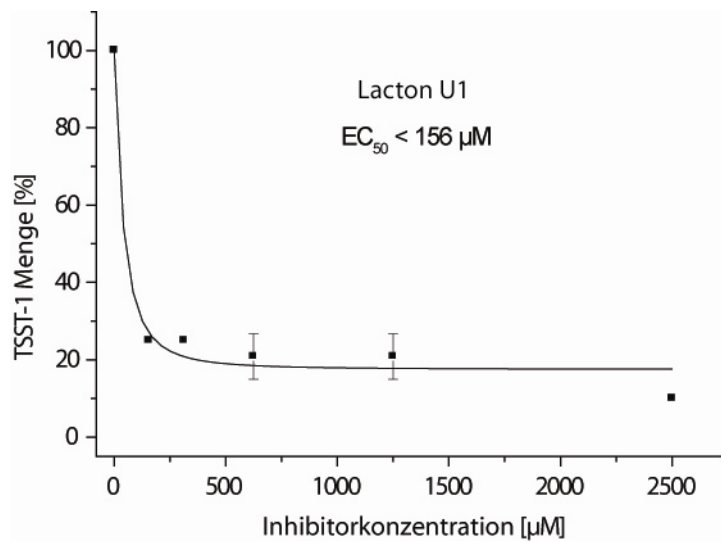


Abbildung A20: TSST-1 Immunoassay mit dem MRSA Stamm Mu50 und einer Konzentrationsreihe von Lacton **U1**.

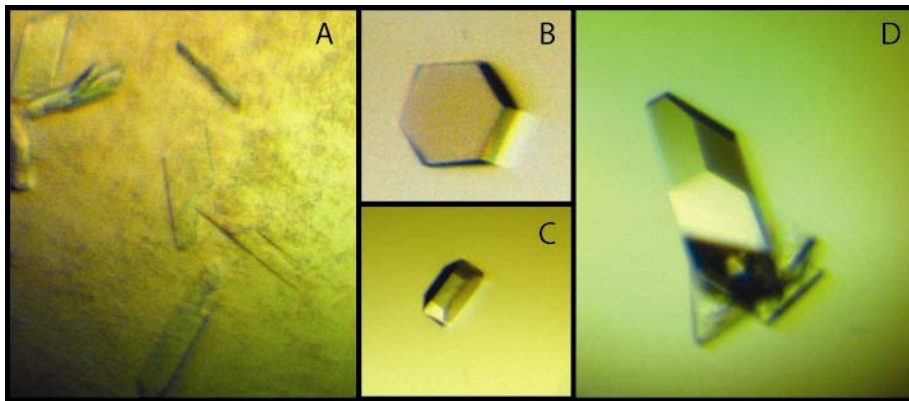


Abbildung A21: Kristalle von ClpP unter verschiedenen Pufferbedingungen im hanging drop Verfahren. A) Kleine Nadeln und dünne Platten bei 1 m Li_2SO_4 , 50% PEG 3350. Schöne sphärisch hexagonale Kristalle, die für die Strukturbestimmung geeignet waren, wurden bei B) 1,85 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit 100 mM Natriumacetat pH 4,5, C) 1,75 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit 100 mM Natriumacetat pH 4,5 und D) 1,70 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mit 100 mM Natriumacetat pH 4,5 erhalten.

<i>S. aureus</i>	1	M	N	L	I	P	T	V	I	E	T	T	N	R	G	E	R	A	Y	D	I	Y	S	R	L	L	K	D	R	I	I
<i>E. coli</i>	14	M	A	L	V	P	M	V	I	E	Q	T	S	R	G	E	R	S	F	D	I	Y	S	R	L	L	K	E	R	V	I
<i>M. tuberculosis</i>	1	M	S	Q	V	T	D	M	R	S	N	S	Q	G	L	S	L	T	D	S	V	Y	E	R	L	L	S	E	R	I	I
<i>S. pneumoniae</i>	1	-	-	M	I	P	V	V	I	E	Q	T	S	R	G	E	R	S	Y	D	I	Y	S	R	L	L	K	D	R	I	I
<i>P. falciparum</i>	168	K	V	Q	Q	Q	I	I	T	N	N	D	D	I	K	D	M	K	K	D	V	K	L	F	F	F	K	K	R	I	I
<i>S. aureus</i>	31	M	L	G	S	Q	I	D	D	N	V	A	N	S	I	V	S	Q	L	L	F	L	Q	A	Q	D	S	E	K	D	I
<i>E. coli</i>	44	F	L	T	G	Q	V	E	D	H	M	A	N	L	I	V	A	Q	M	L	F	L	E	A	E	N	P	E	K	D	I
<i>M. tuberculosis</i>	31	F	L	G	S	E	V	N	D	E	I	A	N	R	L	C	A	Q	I	L	L	L	A	A	E	D	A	S	K	D	I
<i>S. pneumoniae</i>	29	M	L	T	G	P	V	E	D	N	M	A	N	S	V	I	A	Q	L	L	F	L	D	A	Q	D	S	T	K	D	I
<i>P. falciparum</i>	198	Y	L	T	D	E	I	N	K	K	T	A	D	E	L	I	S	Q	L	L	Y	L	D	N	I	N	-	H	N	D	I
<i>S. aureus</i>	61	Y	L	Y	I	N	S	P	G	G	S	V	T	A	G	F	A	I	Y	D	T	I	Q	H	I	K	P	D	V	Q	T
<i>E. coli</i>	74	Y	L	Y	I	N	S	P	G	G	V	I	T	A	G	M	S	U	Y	D	T	M	Q	F	I	K	P	D	V	S	T
<i>M. tuberculosis</i>	61	S	L	Y	I	N	S	P	G	G	S	I	S	A	G	M	A	I	Y	D	T	M	V	L	A	P	C	D	I	A	T
<i>S. pneumoniae</i>	59	Y	L	Y	V	N	T	P	G	G	S	V	S	A	G	L	A	I	V	D	T	M	N	F	I	K	A	D	V	Q	T
<i>P. falciparum</i>	227	K	I	Y	I	N	S	P	G	G	S	I	N	E	G	L	A	I	L	D	I	F	N	Y	I	K	S	D	I	Q	T
<i>S. aureus</i>	91	I	C	I	G	M	A	A	S	M	G	S	F	L	L	A	A	G	A	K	G	K	R	F	A	L	P	N	A	E	V
<i>E. coli</i>	104	I	C	M	G	Q	A	A	S	M	G	A	F	L	L	T	A	G	A	K	G	K	R	F	C	L	P	N	S	R	V
<i>M. tuberculosis</i>	91	Y	A	M	G	M	A	A	S	M	G	E	F	L	L	A	A	G	T	K	G	K	R	Y	A	L	P	H	A	R	I
<i>S. pneumoniae</i>	89	I	V	M	G	M	A	A	S	M	G	T	V	I	A	S	S	G	A	K	G	K	R	F	M	L	P	N	A	E	Y
<i>P. falciparum</i>	257	I	S	F	G	L	V	A	S	M	A	S	V	I	L	A	S	G	K	K	G	K	R	K	S	L	P	N	C	R	I
<i>S. aureus</i>	121	M	I	H	Q	P	L	G	G	A	Q	G	-	-	Q	A	T	E	I	E	I	A	A	N	H	I	L	K	T	R	E
<i>E. coli</i>	134	M	I	H	Q	P	L	G	G	Y	Q	G	-	-	Q	A	T	D	I	E	I	H	A	R	E	I	L	K	V	K	G
<i>M. tuberculosis</i>	121	L	M	H	Q	P	L	G	G	V	T	G	-	-	S	A	A	D	I	A	I	Q	A	E	Q	F	A	V	I	K	K
<i>S. pneumoniae</i>	119	M	I	H	Q	P	M	G	G	T	G	G	G	T	Q	Q	T	D	M	A	I	A	A	E	H	L	L	K	T	R	N
<i>P. falciparum</i>	287	M	I	H	Q	P	L	G	N	A	F	G	-	-	H	P	Q	D	I	E	I	Q	T	K	E	I	L	Y	L	K	K
<i>S. aureus</i>	149	K	L	N	R	I	L	S	E	R	T	G	Q	S	I	E	K	I	Q	K	D	T	D	R	D	N	F	L	T	A	E
<i>E. coli</i>	162	R	M	N	E	L	M	A	L	H	T	G	Q	S	L	E	Q	I	E	R	D	T	E	R	D	R	F	L	S	A	P
<i>M. tuberculosis</i>	149	E	M	F	R	L	N	A	E	F	T	G	Q	P	I	E	R	I	E	A	D	S	D	R	D	R	W	F	T	A	A
<i>S. pneumoniae</i>	149	T	L	E	K	I	L	A	E	N	S	G	Q	S	M	E	K	V	H	A	D	A	E	R	D	N	W	M	S	A	Q
<i>P. falciparum</i>	315	L	L	Y	H	Y	L	S	S	F	T	N	Q	T	V	E	T	I	E	K	D	S	D	R	D	Y	Y	M	N	A	L
<i>S. aureus</i>	179	E	A	K	E	Y	G	L	I	D	E	V	M	V	P	E	T	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	192	E	A	V	E	Y	G	L	V	D	S	I	L	T	H	R	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. tuberculosis</i>	179	E	A	L	E	Y	G	F	V	D	H	I	I	T	R	A	H	V	N	G	E	A	Q	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i>	179	E	T	L	E	Y	G	F	I	D	E	I	M	A	N	N	S	L	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. falciparum</i>	345	E	A	K	Q	Y	G	I	I	D	E	V	I	E	T	K	L	P	H	P	Y	F	N	K	V	E	K	-	-	-	-

Abbildung A22: Sequenzabgleich zwischen *S. aureus*, *E. coli*, *M. tuberculosis*, *S. pneumoniae* und *P. falciparum*. Mit der Sequenz von *S. aureus* NCTC 8325 identische Aminosäuren sind grün markiert.

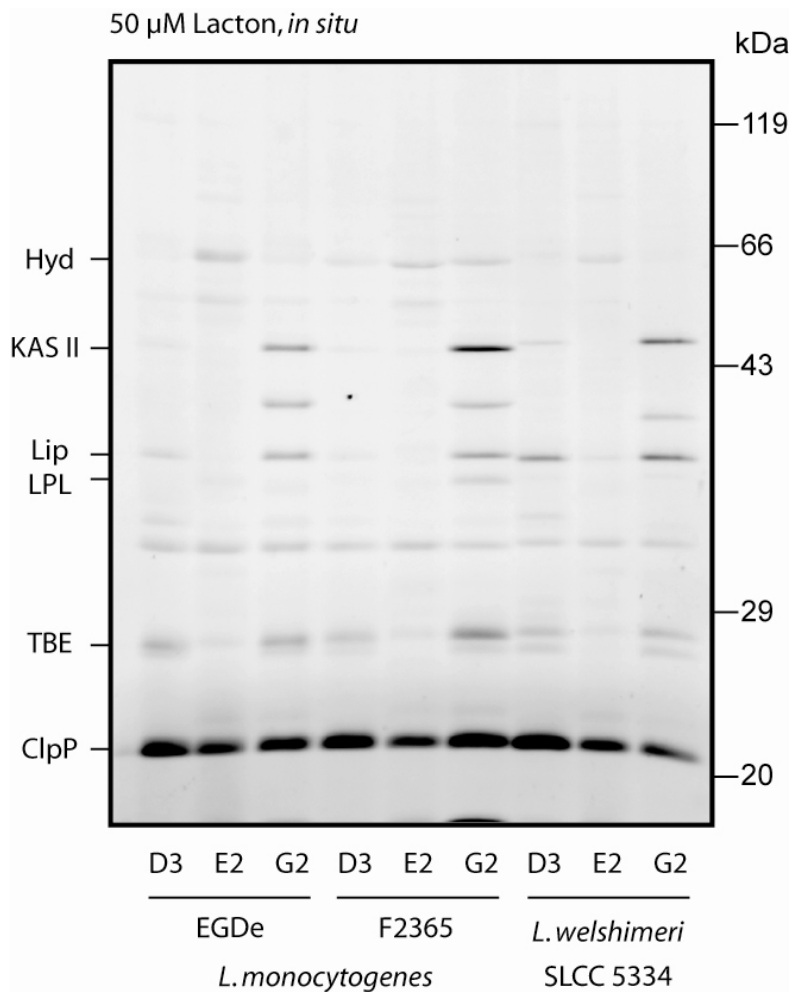


Abbildung A23: Vergleich der ABPP Markierungsprofile der *L. monocytogenes* Stämme EGD-e und F2365 mit *L. welshimeri* in lebenden Zellen mit 50 μ M β -Lacton Sonden und 2 h Inkubationszeit. ClpP erwies sich als Hauptziel dieser Lactone. Jedoch konnten auch ein paar weitere Ziele identifiziert werden: Hydrolase CocE/NonD (Hyd), β -Ketoacyl-Acyl-Carrier-Protein-Synthase II (KAS II), Lipase (Lip), Lysophospholipase (LPL) und Tributyrin-Esterase (TBE).

<i>S. aureus</i>	1	M N L I P T V I E T T N R G E R A Y D I Y S R L L K D R I I
<i>L. monocytogenes</i>	1	M N L I P T V I E Q T S R G E R A Y D I Y S R L L K D R I I
<i>S. aureus</i>	31	M L G S Q I D D N V A N S I V S Q L L F L Q A Q D S E K D I
<i>L. monocytogenes</i>	31	M L G S A I D D N V A N S I V S Q L L F L D A Q D P E K D I
<i>S. aureus</i>	61	Y L Y I N S P G G S V T A G F A I Y D T I Q H I K P D V Q T
<i>L. monocytogenes</i>	61	F L Y I N S P G G S I S A G M A I Y D T M N F V K A D V Q T
<i>S. aureus</i>	91	I C I G M A A S M G S F L L A A G A K G K R F A L P N A E V
<i>L. monocytogenes</i>	91	I G M G M A A S M G S F L L T A G A N G K R F A L P N A E I
<i>S. aureus</i>	121	M I H Q P L G G A Q G Q A T E I E I A A N H I L K T R E K L
<i>L. monocytogenes</i>	121	M I H Q P L G G A Q G Q A T E I E I A A R H I L K I K E R M
<i>S. aureus</i>	151	N R I L S E R T G Q S I E K I Q K D T D R D N F L T A E E A
<i>L. monocytogenes</i>	151	N T I M A E K T G Q P Y E V I A R D T D R D N F M T A Q E A
<i>S. aureus</i>	181	K E Y G L I D E V M V P E T K - - -
<i>L. monocytogenes</i>	181	K D Y G L I D D I I I N K S G L K G

- * Aminosäuren der katalytischen Triade (aktives Zentrum)
- Identische Aminosäuren
- Ähnliche Aminosäuren

Abbildung A24: Sequenzabgleich von *Listeria monocytogenes* EGD-e und *Staphylococcus aureus* NCTC 8325.

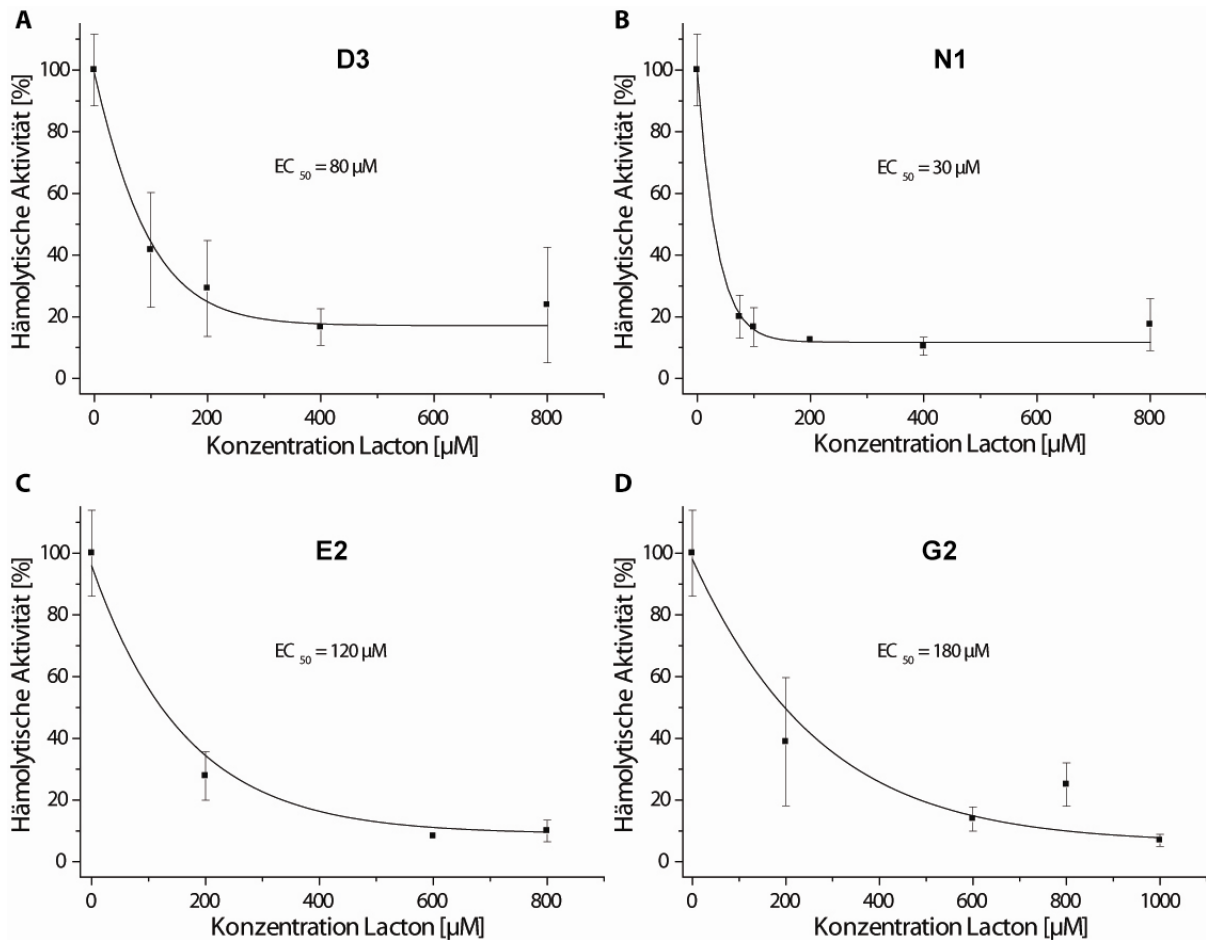


Abbildung A25: LLO Aktivitätsassay mittels der Hämolyse von Schaf-Erythrozyten in Kulturüberständen von *L. monocytogenes* EGD-e, die bei verschiedenen Lactonkonzentrationen gewachsen waren. A) Mit Lacton **D3**, B) mit Lacton **N1**, das somit für die LLO Inhibition im etwa gleichen Bereich liegt wie **U1**, C) mit Lacton **E2** und D) mit **G2**, die jeweils in Übereinstimmung mit dem Markierungsprofil eine geringere biologische Aktivität zeigen.

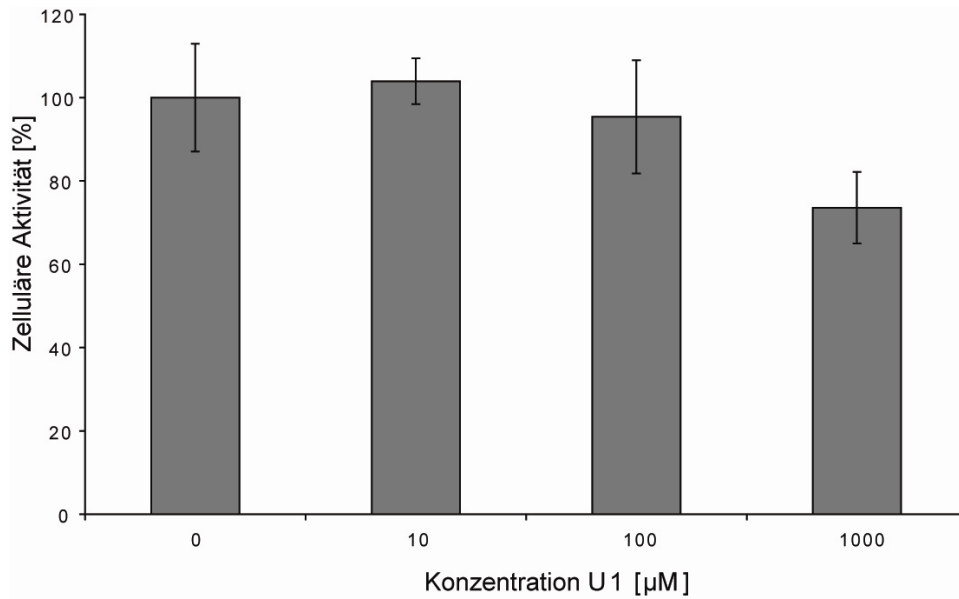


Abbildung A26: WST-1 Zellproliferationsassay mit verschiedenen Konzentrationen von Lacton **U1**.

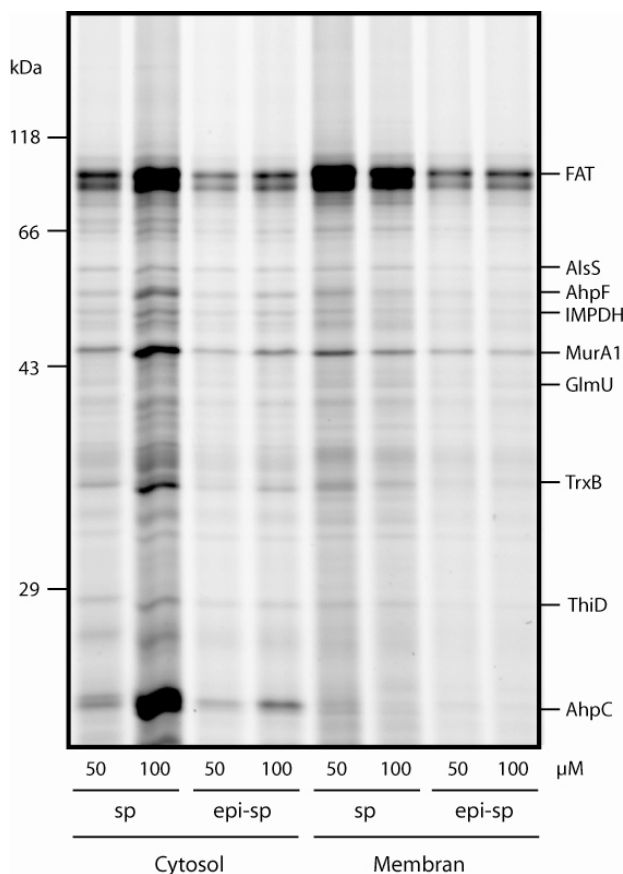


Abbildung A27: *In situ* Markierungsprofil von *S. aureus* NCTC 8325 mit beiden Isomeren der Sonde: O'-Hex-5'-inoylshowdomycin Sonde (sp) und O'-Hex-5'-inoyl-1'-epi-showdomycin Sonde (epi-sp).

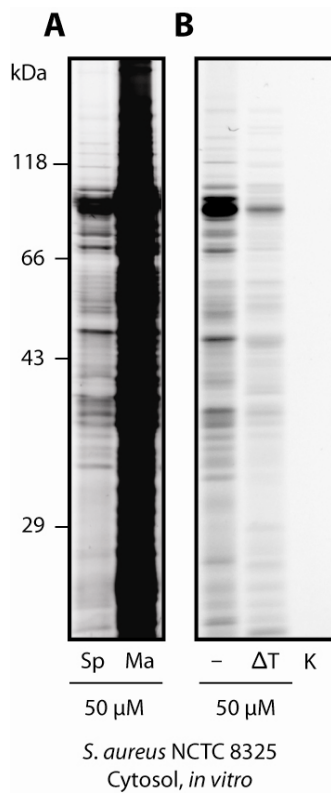


Abbildung A28: A) Der Vergleich des Markierungsprofils von fluoreszentem Maleimid (Ma) und der Showdomycin Sonde (Sp) zeigt eine wesentlich höhere Selektivität und abgestimmte Reaktivität der Sonde. B) Markierung von *S. aureus* NCTC 8325 *in vitro* Proteom (-), Hitzekontrolle (ΔT) und Kontrolle ohne Sonde (K).

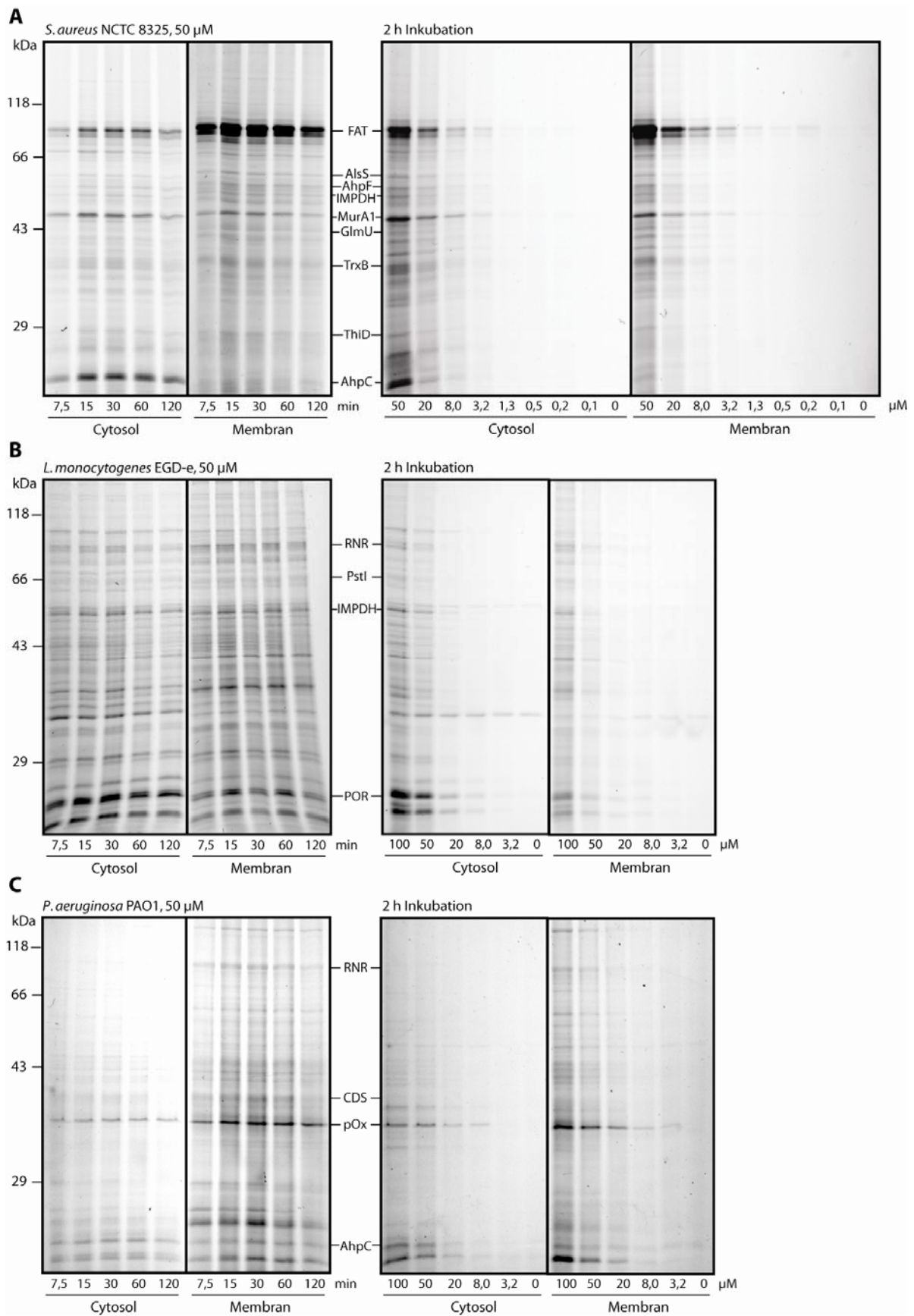


Abbildung A29: *In situ* Zeitabhängigkeit und Konzentrationsexperimente mit der Showdomycin Sonde für A) *S. aureus* NCTC 8325, B) *L. monocytogenes* EGD-e and C) *P. aeruginosa* PAO1.

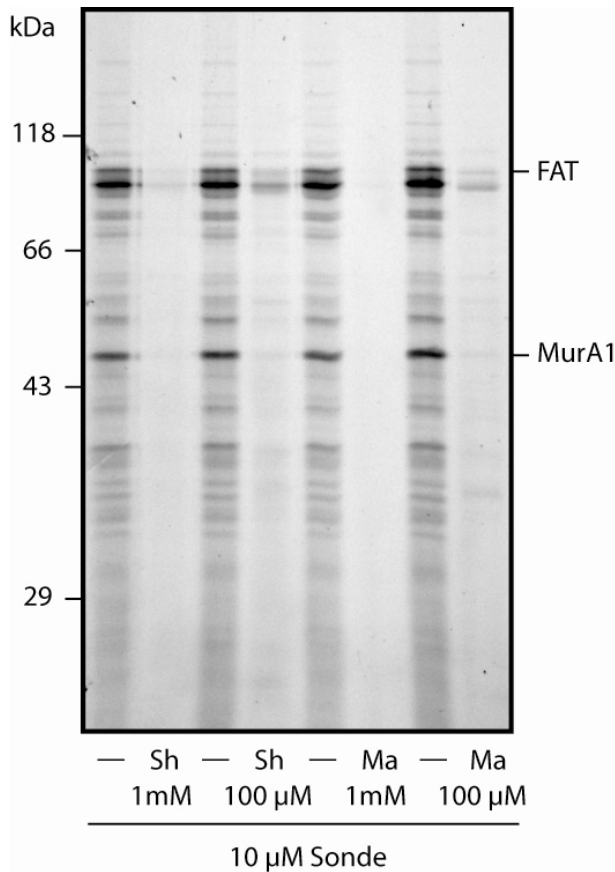


Abbildung A30: Kompetitive Experimente mit Vorinkubation mit Showdomycin (Sh) und Maleimid (Ma) sowie DMSO Kontrollen (–) von *S. aureus* NCTC 8325 *in vitro* Cytosol Proteom und anschließende Markierung mit 10 μM Showdomycin Sonde.

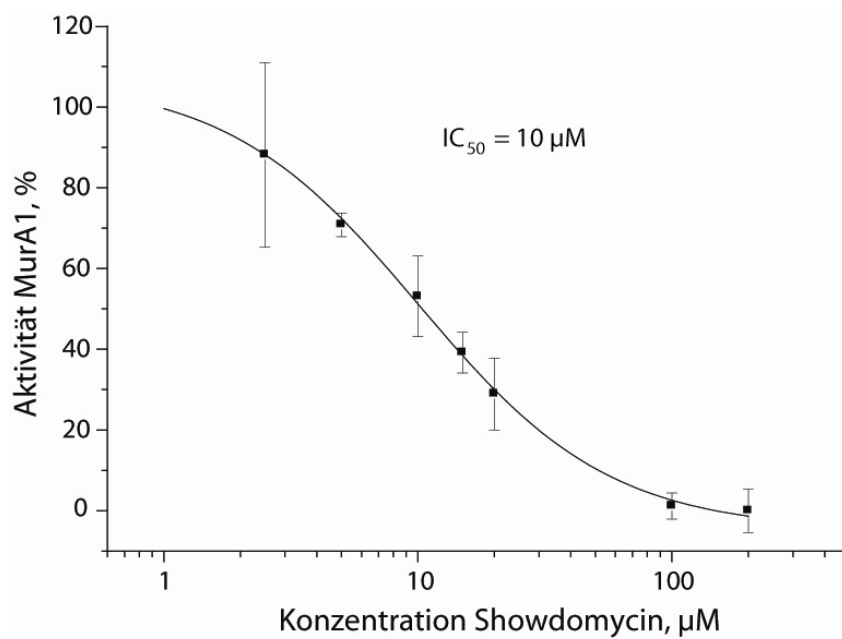


Abbildung A31: Inhibition der Aktivität von MurA1 aus *S. aureus* NCTC 8325 durch Showdomycin mit einem IC_{50} von 10 μM.

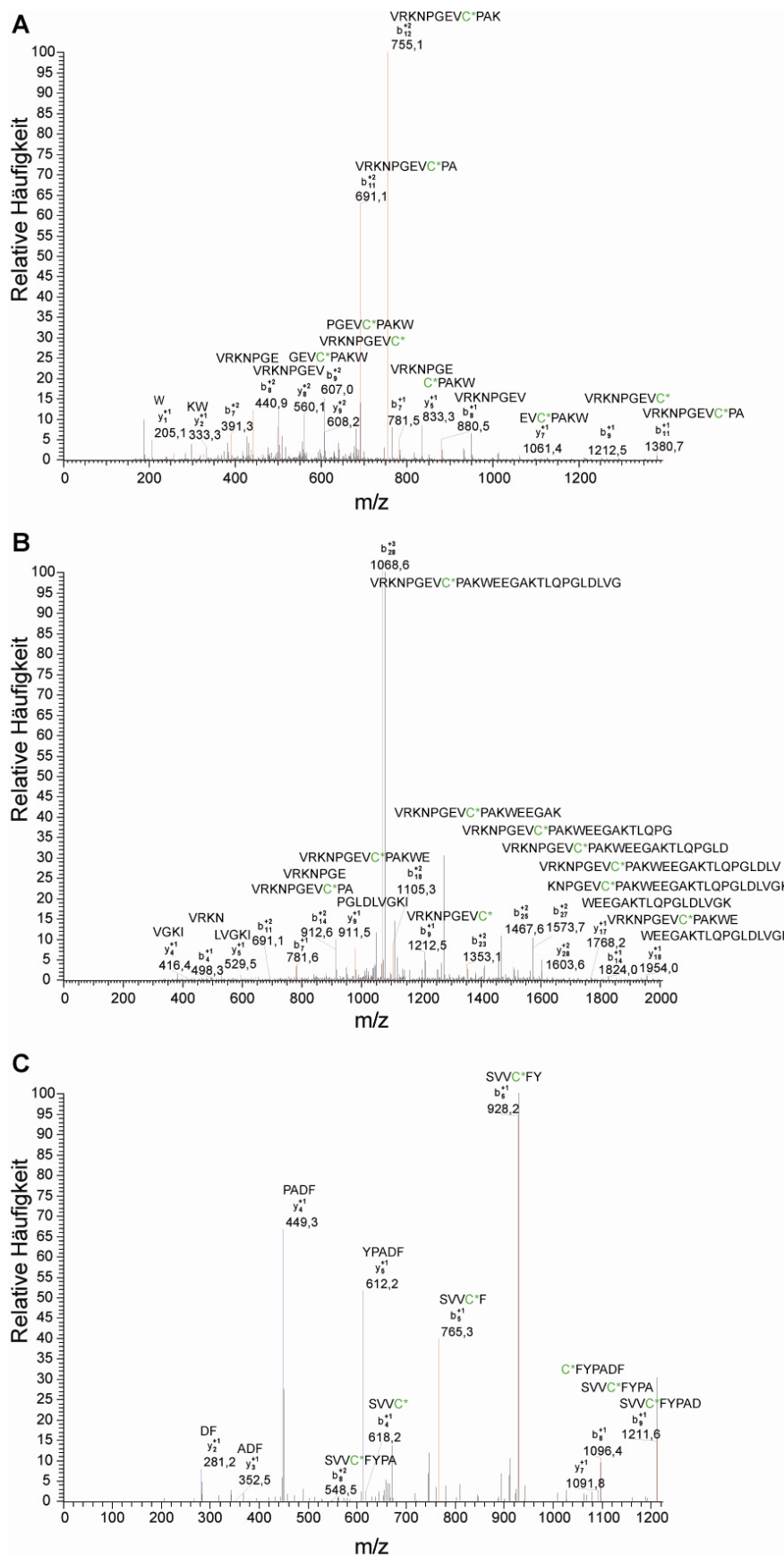


Abbildung A32: MS Fragmentationsspektren der Showdomycin modifizierten chymotryptischen Peptide von AhpC. A) und B) Peptide mit Cys168, C) Peptid mit Cys39 (C*: Showdomycin modifiziertes Cystein).

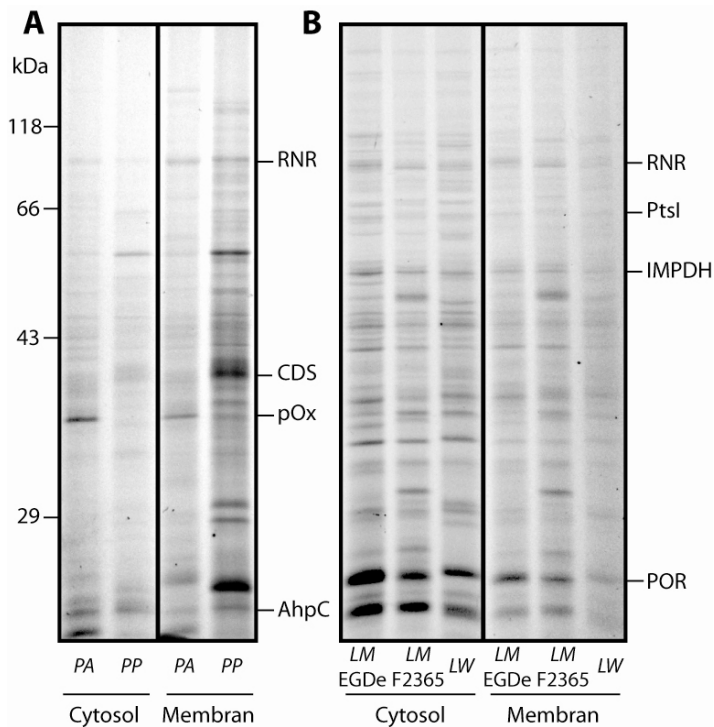


Abbildung A33: Vergleich der *in situ* Markierungsprofile von A) *P. aeruginosa* (PA) und seinem nicht pathogenen Verwandten *P. putida* (PP) und B) zwei Stämmen von *L. monocytogenes* (LM) und nicht pathogener *L. welshimeri* (LW) bei 50 µM Sondenkonzentration der Showdomycin Sonde. Die Abkürzungen der zugeordneten Enzymidentitäten sind in Tabelle 4 gegeben.

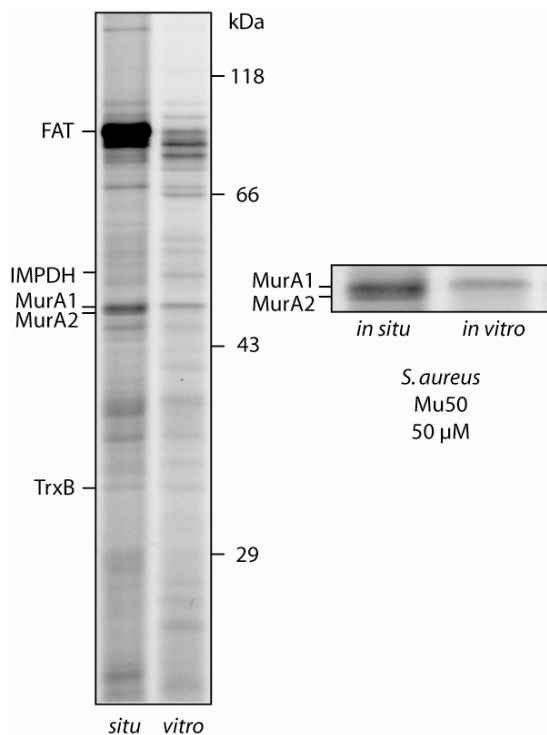


Abbildung A34: *S. aureus* Mu50 *in situ* und *in vitro* Markierung. MurA2 wird hierbei nur im *in situ* Experimenten markiert.

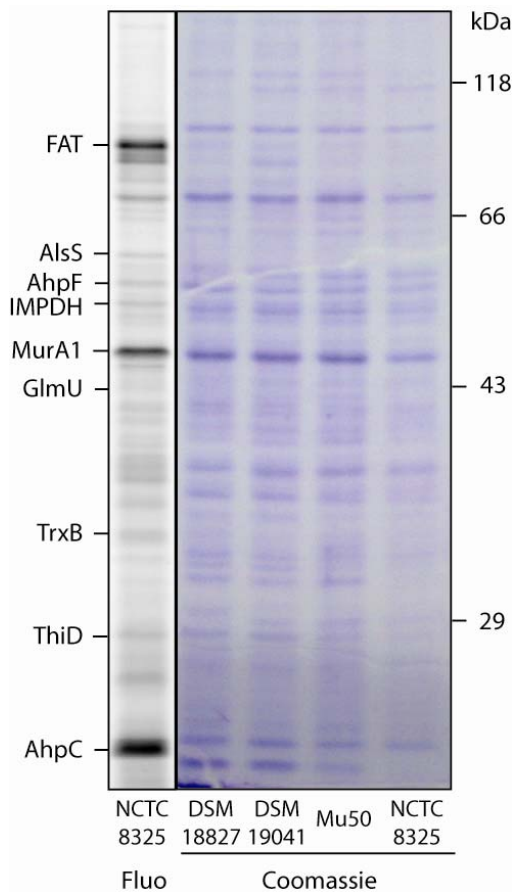


Abbildung A35: Ein Vergleich des Coomassie gefärbten Cytosols von *in situ* Markierungen verschiedener *S. aureus* Stämme ergibt keine signifikanten Unterschiede in den Proteinbanden. Als Standard ist eine Fluoreszenzaufnahme (Fluo) gegeben.

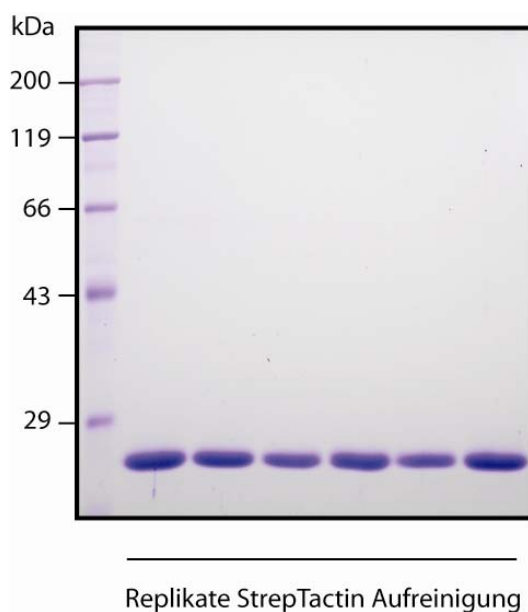


Abbildung A36: Kristallisationsgeeignetes ClpP nach letztem Aufreinigungsschritt mit StrepTactin.

Rhodaminazid:

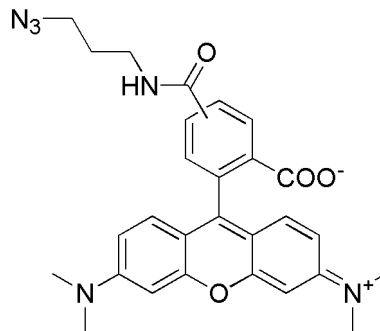


Abbildung A37: Struktur von Rhodaminazid, das als Gemisch zweier Isomeren vorliegt; systematischer Name: 5(6)-(3-Azidopropylcarbamoyl)tetramethylrhodamin (M = 512,56 g/mol).

Trifunktionaler Linker:

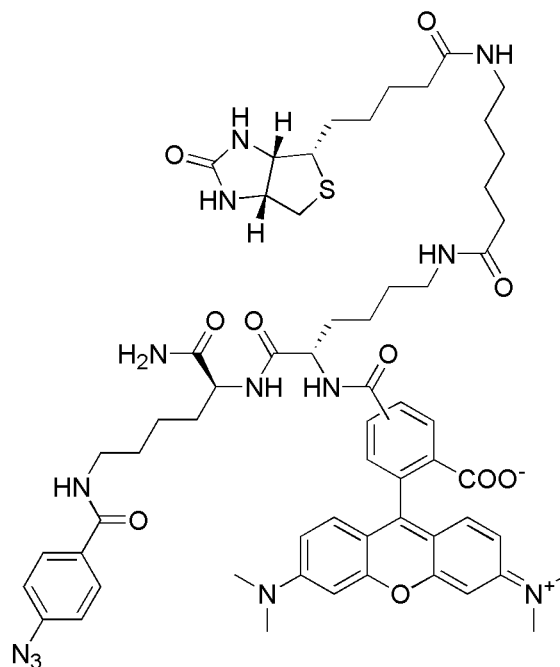


Abbildung A38: Struktur des trifunktionalen Linkers, der als Gemisch zweier Isomeren vorliegt; systematischer Name: 5(6)-(1-[5-(4-Azido-benzoylamino)-1-carbamoyl-pentylcarbamoyl]-5-(6-biotinoylamino-hexanoylamino)-pentylcarbamoyl)-tetramethylrhodamin (M = 1170,38 g/mol).

Ligand:

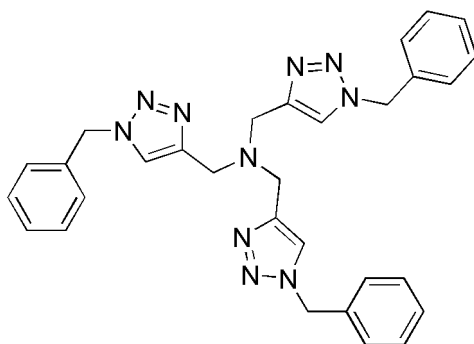


Abbildung A39: Struktur des Liganden für die Click Chemie; systematischer Name: Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin ($M = 530,63 \text{ g/mol}$).

Abkürzungsverzeichnis

A	Nukleobase A denin
ABPP	a ktivitäts b asierendes P rotein P rofilng
abs.	Absolut
AIP	A utoinducing P eptide
ALOA	A gar L isteria O ttaviani & A gosti
app.	appearing as
APS	A mmonium p ersulfat
BHB	B rain h eart b roth
bp	b ase p airs (B asen p aare)
BSA	B ovines S erum a lbumin
C	Nukleobase C ytosin
CFU	C olony f orming u nits (Koloniebildende Einheiten)
d	Dublett
Da	D alton (g/mol)
DAM	D N A A denin M ethylase
DC	D ünnschicht c hromatographie
DCC	<i>N,N</i> - D icyclohexyl c arbodiimid
DEI	D esorption E lektronenstoß I onisation
DIC	<i>N,N</i> - D iisopropyl c arbodiimid
DIPEA	D iisopropylethylamin
DMAP	4- D imethylaminopyridin
DMEM	D ulbecco's M odified E agle's M edium
DMSO	D imethylsulfoxid
DNA	D eoxyribonucleic a cid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	D eoxynucleoside t riphosphate
dsDNA	d ouble- s tranded DNA (doppelsträngige DNA)
DTT	D ithiothreitol
EC	E nzyme c lass
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ED ₅₀	mittlere effektive Dosis
EI	E lektronenstoß I onisation

ELISA	E nzyme-linked I mmunosorbent A ssay
ESI	E lektrospray Ionisation
EtBr	E thidium b romid
G	Nukleobase G uanin
GC	G aschromatographie / G aschromatograph
HEPES	2-(4-(2- H ydroxy e thyl)-1- p iperazinyl)- e thansulfonsäure
HMG-CoA	3- H ydroxy-3- m ethyl g lutaryl- C oenzym A
HOBT	<i>N</i> - H ydroxy b enzotriazol
HPLC	H igh P ressure L iquid C hromatography
Hz	Hertz
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IGFS	i n- g el fluorescence s canning
konz.	konzentriert
LB	L ysogeny b roth
LC	L iquid C hromatography / Flüssigchromatographie
LDA	L ithium d iisopropylamid
LLO	L isteriolysin O
Lsg.	Lösung
M	Molare Masse
m	Molar (mol/L)
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
MHz	Megahertz
MIC	M inimum I nhibitory C oncentration (Minimale Hemmkonzentration)
min	Minuten
MRSA	M ethicillin resistente <i>Staphylococcus aureus</i> Stämme
MS	M assenspektrometrie / M assenspektrometer
OD ₆₀₀	O ptische D ichte gemessen als Absorption bei 600 nm
PBS	P hosphate B uffered S aline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	P olymerase C hain R eaction (Polymerasekettenreaktion)
PEI	P olyethylenimin
PenG	P enicillin G
PEP	P hosphenolpyruvat
P _i	inorganic Phosphate (anorganisches Phosphat)
PI-PLC	P hosphatidylinositol-spezifische P hospholipase C

PLC	Phospholipasen C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	parts per million
PTSA	Pyrogene Toxin-Superantigene
put.	Putativ
PVDF	Polyvinylidenfluorid
q	Quartett
quint.	Quintett
R _f	Retentionsfaktor
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
Rot	Repressor of toxins
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEA	Staphylococcus Enterotoxin A
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SEC	Staphylococcus Enterotoxin C
sec	Sekunden
SED	Staphylococcus Enterotoxin D
sept.	Septett
sp.	Species
SRBC	Sheep red blood cells
ssDNA	single-stranded DNA (einzelsträngige DNA)
t	Triplett
T	Nukleobase Thymin
T _m	Schmelztemperatur
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin Hydrochlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
THF	Tetrahydrofuran
THL	Tetrahydrolipstatin
TSST-1	Toxic shock syndrome toxin 1

UDPAG	UDP-<i>N</i>-Acetylglucosamin
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

Lebenslauf

Thomas Böttcher

Geburtsdatum/-ort: 28.12.1982, München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung und Zivildienst

1989-1993 Grundschule Maisach
1993-2002 Gymnasium Olching
06/02 Abitur, Gymnasium Olching
09/02-06/03 Zivildienst, GSF – Forschungszentrum für Umwelt und
Gesundheit, Neuherberg – Institut für Bodenökologie

Hochschulstudium

10/03-09/06 Studium der Chemie und Biochemie an der LMU in München
06/06-08/06 Bachelorarbeit bei Professor Dr. von Kiedrowski, RUB Bochum

Promotion

10/06 Zulassung zum *fast-track* PhD Programm der LMU München
06/08 Promotionseignungsprüfung mit 1,0 abgeschlossen
10/06-12/09 Promotion in der Gruppe von Dr. S. A. Sieber, LMU München

Stipendien und Preise

2002 diverse Preise bei Jugend forscht
06/02 Carl Friedrich von Martius Umweltpreis
2003 diverse Preise bei Jugend forscht
10/03 DLR Stipendium für Kongressteilnahme
02/04-09/07 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
08/07 DLR Stipendium für ESA Summer School in Alpbach

08/05- 12/09 Stipendiat von e-fellows, online Stipendienprogramm
09/07-12/09 Promotionsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
12/07 Römer Preis der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU
06/08 Vollstipendium des UIMP in Spanien für NASA Summer School
08/08 Reisestipendium des Mediterranean Institute for Life Sciences
10/08 Innovationspreis der BioRegionen in Deutschland
04/09 Young Scientists Travel Award for Europeans (YSTA) der
European Geosciences Union (EGU)
12/09 Römer Preis der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU

Literaturverzeichnis

- [1] AHRQ, *Agency for Healthcare Research and Quality, Nationwide Inpatient Sample 1993-2005*.
- [2] M. J. Cloutier, *Am J Pharm Educ* **1995**, 59, 167.
- [3] J. L. Martinez, *Science* **2008**, 321, 365.
- [4] N. B. Shoemaker, H. Vlamakis, K. Hayes, A. A. Salyers, *Appl Environ Microbiol* **2001**, 67, 561.
- [5] S. Trindade, A. Sousa, K. B. Xavier, F. Dionisio, M. G. Ferreira, I. Gordo, *PLoS Genet* **2009**, 5, e1000578.
- [6] H. C. Neu, *Science* **1992**, 257, 1064.
- [7] M. L. Cohen, *Science* **1992**, 257, 1050.
- [8] E. Larson, *Annu Rev Public Health* **2007**, 28, 435.
- [9] V. Bethal, *Folia Microbiol (Praha)* **2006**, 51, 359.
- [10] C. Walsh, *Nat Rev Microbiol* **2003**, 1, 65.
- [11] P. Heisig, *Pharm Unserer Zeit* **2006**, 35, 400.
- [12] A. Zapun, C. Contreras-Martel, T. Vernet, *FEMS Microbiol Rev* **2008**, 32, 361.
- [13] C. Fuda, M. Suvorov, S. B. Vakulenko, S. Mobashery, *J Biol Chem* **2004**, 279, 40802.
- [14] X.-Z. Li, H. Nikaido, *Drugs* **2004**, 64, 159.
- [15] F. Van Bambeke, Y. Glupczynski, P. Plesiat, J. C. Pechere, P. M. Tulkens, *J Antimicrob Chemother* **2003**, 51, 1055.
- [16] F. R. DeLeo, H. F. Cambers, *J Clin Invest* **2009**, 119, 2464.
- [17] M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Science* **2009**, 325, 1089.
- [18] G. Taubes, *Science* **2008**, 321, 356.
- [19] M. L. Fournier, J. M. Gilmore, S. A. Martin-Brown, M. P. Washburn, *Chem Rev* **2007**, 107, 3654.
- [20] R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **2003**, 422, 198.
- [21] A. Pandey, M. Mann, *Nature* **2000**, 405, 837.
- [22] A. Saghatelian, B. F. Cravatt, *Nat Chem Biol* **2005**, 1, 130.
- [23] S. Arastu-Kapur, E. L. Ponder, U. P. Fonovic, S. Yeoh, F. Yuan, M. Fonovic, M. Grainger, C. I. Phillips, J. C. Powers, M. Bogyo, *Nat Chem Biol* **2008**, 4, 203.
- [24] E. S. Witze, W. M. Old, K. A. Resing, N. G. Ahn, *Nat Methods* **2007**, 4, 798.
- [25] Z. Chang, *Sci China C Life Sci* **2009**, 52, 515.
- [26] J. Reinders, A. Sickmann, *Biomol Egin* **2007**, 24, 169.
- [27] B. M. Cullen, I. M. Halliday, G. Kay, J. Nelson, B. Walker, *Biochem. J.* **1992**, 283, 461.
- [28] B. Walker, B. M. Cullen, G. Kay, I. M. Halliday, A. McGinty, J. Nelson, *Biochem J* **1992**, 283 (Pt 2), 449.
- [29] A. S. Abuelyaman, D. Hudig, S. L. Woodard, J. C. Powers, *Bioconjug Chem* **1994**, 5, 400.
- [30] C. M. Kam, A. S. Abuelyaman, Z. Li, D. Hudig, J. C. Powers, *Bioconjug Chem* **1993**, 4, 560.
- [31] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Amer. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4686.
- [32] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem Rev* **2006**, 106, 3279.
- [33] S. H. Verhelst, M. Bogyo, *Biotechniques* **2005**, 38, 175.

- [34] M. P. Patricelli, D. K. Giang, L. M. Stamp, J. J. Burbaum, *Proteomics* **2001**, *1*, 1067.
- [35] Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 14694.
- [36] D. Kidd, Y. Liu, B. F. Cravatt, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4005.
- [37] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat Biotechnol* **2002**, *20*, 805.
- [38] G. C. Adam, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Chem. Biol.* **2001**, *8*, 81.
- [39] C. Drahl, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 5788.
- [40] J. C. Powers, J. L. Asgian, O. D. Ekici, K. E. James, *Chem Rev* **2002**, *102*, 4639.
- [41] K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Chem Biol* **2004**, *11*, 1523.
- [42] K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 7408.
- [43] E. Weerapana, G. M. Simon, B. F. Cravatt, *Nat Chem Biol* **2008**, *4*, 405.
- [44] E. J. Moran, Sarshar, S., Cargill, J. F., Shahbaz, M. M., Lio, a., Mjalli, A. M. M., Armstrong, R. W., **1995**.
- [45] M. Pitscheider, S. A. Sieber, *Chem Commun (Camb)* **2009**, 3741.
- [46] A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, M. A. Brown, H. Kirschke, C. G. Knight, M. Tamai, K. Hanada, *Biochem J* **1982**, *201*, 189.
- [47] A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, K. Hanada, *Acta Biol Med Ger* **1981**, *40*, 1513.
- [48] J. T. Palmer, D. Rasnick, J. L. Klaus, D. Bromme, *J Med Chem* **1995**, *38*, 3193.
- [49] E. Shaw, *Methods Enzymol* **1994**, *244*, 649.
- [50] E. Shaw, H. Angliker, P. Rauber, B. Walker, P. Wikstrom, *Biomed Biochim Acta* **1986**, *45*, 1397.
- [51] D. H. Pliura, B. J. Bonaventura, R. A. Smith, P. J. Coles, A. Krantz, *Biochem J* **1992**, *288 (Pt 3)*, 759.
- [52] M. Fonovic, S. H. Verhelst, M. T. Sorum, M. Bogoyo, *Mol Cell Proteomics* **2007**, *6*, 1761.
- [53] S. Liu, B. Zhou, H. Yang, Y. He, Z. X. Jiang, S. Kumar, L. Wu, Z. Y. Zhang, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 8251.
- [54] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 10000.
- [55] S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat Chem Biol* **2006**, *2*, 274.
- [56] M. Uttamchandani, J. Wang, J. Li, M. Hu, H. Sun, K. Y. Chen, K. Liu, S. Q. Yao, *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 7848.
- [57] A. Baruch, D. A. Jeffery, M. Bogoyo, *Trends Cell Biol* **2004**, *14*, 29.
- [58] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J Org Chem* **2002**, *67*, 3057.
- [59] V. V. Rostovtsev, J. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 2596.
- [60] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007.
- [61] C. P. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, *47*, 10030.
- [62] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535.
- [63] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 16793.
- [64] G. C. Adam, J. Burbaum, J. W. Kozarich, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 1363.
- [65] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 10018.

- [66] N. Jessani, S. Niessen, B. M. Mueller, B. F. Cravatt, *Cell Cycle* **2005**, *4*, 253.
- [67] S. A. Sieber, T. S. Mondala, S. R. Head, B. F. Cravatt, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 15640.
- [68] N. Jessani, S. Niessen, B. Q. Wei, M. Nicolau, M. Humphrey, Y. Ji, W. Han, D. Y. Noh, J. R. Yates, 3rd, S. S. Jeffrey, B. F. Cravatt, *Nat Methods* **2005**, *2*, 691.
- [69] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, *J Chem Phys* **1968**, *49*, 2240.
- [70] K. Y. Li, H. Tu, A. K. Ray, *Langmuir* **2005**, *21*, 3786.
- [71] J. K. Eng, B. Fischer, J. Grossmann, M. J. Maccoss, *J Proteome Res* **2008**, *7*, 4598.
- [72] G. M. Cragg, D. J. Newman, K. M. Snader, *J Nat Prod* **1997**, *60*, 52.
- [73] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *Nat Prod Rep* **2000**, *17*, 215.
- [74] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J Nat Prod* **2003**, *66*, 1022.
- [75] D. H. Kim, J. I. Park, S. J. Chung, J. D. Park, N. K. Park, J. H. Han, *Bioorg Med Chem* **2002**, *10*, 2553.
- [76] J. S. Wells, W. H. Trejo, P. A. Principe, R. B. Sykes, *J Antibiot (Tokyo)* **1984**, *37*, 802.
- [77] H. Kumagai, H. Tomoda, S. Omura, *J Antibiot (Tokyo)* **1992**, *45*, 563.
- [78] W. L. Parker, M. L. Rathnum, W. C. Liu, *J Antibiot (Tokyo)* **1982**, *35*, 900.
- [79] H. Tomoda, H. Kumagai, H. Tanaka, S. Omura, *Biochim Biophys Acta* **1987**, *922*, 351.
- [80] H. Tomoda, H. Kumagai, H. Tanaka, S. Omura, *J Antibiot (Tokyo)* **1993**, *46*, 872.
- [81] F. Pojer, J. L. Ferrer, S. B. Richard, D. A. Nagegowda, M. L. Chye, T. J. Bach, J. P. Noel, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 11491.
- [82] T. Imanaka, Y. Moriyama, G. G. Ecsedi, T. Aoyagi, K. Amanuma-Muto, S. Ohkuma, T. Takano, *J Biochem* **1983**, *94*, 1017.
- [83] M. Kitahara, M. Asano, H. Naganawa, K. Maeda, M. Hamada, T. Aoyagi, H. Umezawa, Y. Iitaka, H. Nakamura, *J Antibiot (Tokyo)* **1987**, *40*, 1647.
- [84] K. Uotani, H. Naganawa, S. Kondo, T. Aoyagi, H. Umezawa, *J Antibiot (Tokyo)* **1982**, *35*, 1495.
- [85] W. Köller, F. Trail, D. M. Parker, *J Antibiot (Tokyo)* **1990**, *43*, 734.
- [86] E. K. Weibel, P. Hadvary, E. Hochuli, E. Kupfer, H. Lengsfeld, *J Antibiot (Tokyo)* **1987**, *40*, 1081.
- [87] P. Hadvary, H. Lengsfeld, H. Wolfer, *Biochem J* **1988**, *256*, 357.
- [88] K. Yoshinari, M. Aoki, T. Ohtsuka, N. Nakayama, Y. Itezono, M. Mutoh, J. Watanabe, K. Yokose, *J Antibiot (Tokyo)* **1994**, *47*, 1376.
- [89] M. Mutoh, N. Nakada, S. Matsukuma, S. Ohshima, K. Yoshinari, J. Watanabe, M. Arisawa, *J Antibiot (Tokyo)* **1994**, *47*, 1369.
- [90] H. Tomoda, N. Ohbayashi, Y. Morikawa, H. Kumagai, S. Omura, *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1636*, 22.
- [91] S. G. Nelson, Z. H. Wan, T. J. Peelen, K. L. Spencer, *Tetrahedron Lett* **1999**, *40*, 6535.
- [92] R. L. Danheiser, Nowick, J. S., *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1176.
- [93] F. G. Bordwell, G. E. Drucker, N. H. Andersen, A. D. Denniston, *J Am Chem Soc* **1986**, *108*, 7310.
- [94] F. G. Bordwell, H. E. Fried, *J Org Chem* **1991**, *56*, 4218.
- [95] A. C. Price, K. H. Choi, R. J. Heath, Z. Li, S. W. White, C. O. Rock, *J Biol Chem* **2001**, *276*, 6551.

- [96] J. Wang, S. Kodali, S. H. Lee, A. Galgoci, R. Painter, K. Dorso, F. Racine, M. Motyl, L. Hernandez, E. Tinney, S. L. Colletti, K. Herath, R. Cummings, O. Salazar, I. Gonzalez, A. Basilio, F. Vicente, O. Genilloud, F. Pelaez, H. Jayasuriya, K. Young, D. F. Cully, S. B. Singh, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 7612.
- [97] J. Wang, S. M. Soisson, K. Young, W. Shoop, S. Kodali, A. Galgoci, R. Painter, G. Parthasarathy, Y. S. Tang, R. Cummings, S. Ha, K. Dorso, M. Motyl, H. Jayasuriya, J. Ondeyka, K. Herath, C. Zhang, L. Hernandez, J. Allocco, A. Basilio, J. R. Tormo, O. Genilloud, F. Vicente, F. Pelaez, L. Colwell, S. H. Lee, B. Michael, T. Felcetto, C. Gill, L. L. Silver, J. D. Hermes, K. Bartizal, J. Barrett, D. Schmatz, J. W. Becker, D. Cully, S. B. Singh, *Nature* **2006**, *441*, 358.
- [98] D. L. Popham, K. D. Young, *Curr Opin Microbiol* **2003**, *6*, 594.
- [99] A. Michel, F. Agerer, C. R. Hauck, M. Herrmann, J. Ullrich, J. Hacker, K. Ohlsen, *J Bacteriol* **2006**, *188*, 5783.
- [100] Y. M. Ibrahim, A. R. Kerr, N. A. Silva, T. J. Mitchell, *Infect Immun* **2005**, *73*, 730.
- [101] O. Gaillot, E. Pellegrini, S. Bregenholt, S. Nair, P. Berche, *Mol Microbiol* **2000**, *35*, 1286.
- [102] A. Y. Yu, W. A. Houry, *FEBS Lett* **2007**, *581*, 3749.
- [103] D. Y. Kim, K. K. Kim, *J Mol Biol* **2008**, *379*, 760.
- [104] G. T. Robertson, W. L. Ng, J. Foley, R. Gilmour, M. E. Winkler, *J Bacteriol* **2002**, *184*, 3508.
- [105] M. T. Cohn, H. Ingmer, F. Mulholland, K. Jorgensen, J. M. Wells, L. Brondsted, *Appl Environ Microbiol* **2007**, *73*, 7803.
- [106] C. Webb, M. Moreno, M. Wilmes-Riesenberg, R. Curtiss, 3rd, J. W. Foster, *Mol Microbiol* **1999**, *34*, 112.
- [107] D. Frees, S. N. Qazi, P. J. Hill, H. Ingmer, *Mol Microbiol* **2003**, *48*, 1565.
- [108] A. Abdelnour, S. Arvidson, T. Bremell, C. Ryden, A. Tarkowski, *Infect Immun* **1993**, *61*, 3879.
- [109] K. Tegmark, E. Morfeldt, S. Arvidson, *J Bacteriol* **1998**, *180*, 3181.
- [110] D. Frees, K. Sorensen, H. Ingmer, *Infect Immun* **2005**, *73*, 8100.
- [111] B. Said-Salim, P. M. Dunman, F. M. McAleese, D. Macapagal, E. Murphy, P. J. McNamara, S. Arvidson, T. J. Foster, S. J. Projan, B. N. Kreiswirth, *J Bacteriol* **2003**, *185*, 610.
- [112] H. Brotz-Oesterhelt, D. Beyer, H. P. Kroll, R. Endermann, C. Ladel, W. Schroeder, B. Hinzen, S. Raddatz, H. Paulsen, K. Henninger, J. E. Bandow, H. G. Sahl, H. Labischinski, *Nat Med* **2005**, *11*, 1082.
- [113] M. R. Maurizi, M. W. Thompson, S. K. Singh, S. H. Kim, *Methods Enzymol* **1994**, *244*, 314.
- [114] G. M. Wiseman, *Bacteriol Rev* **1975**, *39*, 317.
- [115] I. Walev, U. Weller, S. Strauch, T. Foster, S. Bhakdi, *Infect Immun* **1996**, *64*, 2974.
- [116] R. J. O'Callaghan, M. C. Callegan, J. M. Moreau, L. C. Green, T. J. Foster, O. M. Hartford, L. S. Engel, J. M. Hill, *Infect Immun* **1997**, *65*, 1571.
- [117] F. D. Lowy, *N Engl J Med* **1998**, *339*, 520.
- [118] J. Rollof, J. H. Braconier, C. Soderstrom, P. Nilsson-Ehle, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1988**, *7*, 505.
- [119] M. M. Dinges, P. M. Orwin, P. M. Schlievert, *Clin Microbiol Rev* **2000**, *13*, 16.
- [120] C. W. Tseng, G. C. Stewart, *J Bacteriol* **2005**, *187*, 5301.
- [121] A. E. Clatworthy, E. Pierson, D. T. Hung, *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 541.

- [122] L. Cegelski, G. R. Marshall, G. R. Eldridge, S. J. Hultgren, *Nat Rev Microbiol* **2008**, *6*, 17.
- [123] A. Gribun, M. S. Kimber, R. Ching, R. Sprangers, K. M. Fiebig, W. A. Houry, *J Biol Chem* **2005**, *280*, 16185.
- [124] K. Y. Leung, B. B. Finlay, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991**, *88*, 11470.
- [125] M. A. Horwitz, *J Exp Med* **1983**, *158*, 2108.
- [126] C. Pujol, J. P. Grabenstein, R. D. Perry, J. B. Bliska, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 12909.
- [127] P. Cossart, J. Mengaud, *Mol Biol Med* **1989**, *6*, 463.
- [128] M. Hamon, H. Bierne, P. Cossart, *Nat Rev Microbiol* **2006**, *4*, 423.
- [129] J. A. Vazquez-Boland, M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, J. Kreft, *Clin Microbiol Rev* **2001**, *14*, 584.
- [130] M. M. Gedde, D. E. Higgins, L. G. Tilney, D. A. Portnoy, *Infect Immun* **2000**, *68*, 999.
- [131] G. A. Smith, H. Marquis, S. Jones, N. C. Johnston, D. A. Portnoy, H. Goldfine, *Infect Immun* **1995**, *63*, 4231.
- [132] S. Kayal, A. Charbit, *FEMS Microbiol Rev* **2006**, *30*, 514.
- [133] B. Sampathkumar, E. Tsougriani, L. S. L. Yu, G. G. Khachatourians, *Journal of food safety* **1998**, *18*, 197.
- [134] R. Aurora, A. Prakash, S. Prakash, D. B. Rawool, S. B. Barbuddhe, *Food control* **2008**, *19*, 641.
- [135] W. R. Schwan, A. Demuth, M. Kuhn, W. Goebel, *Infect Immun* **1994**, *62*, 4795.
- [136] J. Moser, B. Gerstel, J. E. Meyer, T. Chakraborty, J. Wehland, D. W. Heinz, *J Mol Biol* **1997**, *273*, 269.
- [137] M. Leimeister-Wachter, E. Domann, T. Chakraborty, *Mol Microbiol* **1991**, *5*, 361.
- [138] C. Michelet, J. L. Avril, F. Cartier, P. Berche, *Antimicrob Agents Chemother* **1994**, *38*, 438.
- [139] H. Nishimura, M. Mayama, Y. Komatsu, H. Kato, N. Shimaoka, Y. Tanaka, *J Antibiot (Tokyo)* **1964**, *17*, 148.
- [140] S. Roy-Burman, P. Roy-Burman, D. W. Visser, *Cancer Res* **1968**, *28*, 1605.
- [141] A. G. M. Barrett, H. B. Broughton, *J Org Chem* **1986**, *51*, 495.
- [142] E. Hedaya, S. Theodoropoulos, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2241.
- [143] K. Cosgrove, G. Coutts, I. M. Jonsson, A. Tarkowski, J. F. Kokai-Kun, J. J. Mond, S. J. Foster, *J Bacteriol* **2007**, *189*, 1025.
- [144] Q. Shu, V. Nair, *Med Res Rev* **2008**, *28*, 219.
- [145] J. Cassat, P. M. Dunman, E. Murphy, S. J. Projan, K. E. Beenken, K. J. Palm, S. J. Yang, K. C. Rice, K. W. Bayles, M. S. Smeltzer, *Microbiology* **2006**, *152*, 3075.
- [146] W. Du, J. R. Brown, D. R. Sylvester, J. Huang, A. F. Chalker, C. Y. So, D. J. Holmes, D. J. Payne, N. G. Wallis, *J Bacteriol* **2000**, *182*, 4146.
- [147] M. Kok, G. Bron, B. Erni, S. Mukhija, *Microbiology* **2003**, *149*, 2645.
- [148] S. P. Mirza, B. D. Halligan, A. S. Greene, M. Olivier, *Physiol Genomics* **2007**, *30*, 89.
- [149] C. Pieck, *Dissertation, Dept. Chemie und Pharmazie, LMU München* **2007**.
- [150] R. R. Burgess, *Methods Enzymol* **1991**, *208*, 3.
- [151] M. W. Thompson, M. R. Maurizi, *J Biol Chem* **1994**, *269*, 18201.
- [152] C. J. Dunsmore, K. Miller, K. L. Blake, S. G. Patching, P. J. Henderson, J. A. Garnett, W. J. Stubbings, S. E. Phillips, D. J. Palestrant, L. Angeles Jde, J. A. Leeds, I. Chopra, C. W. Fishwick, *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 1730.