

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

β -Lactame und ihre enzymatischen Angriffsziele in multiresistenten Bakterien

Isabell Helga Staub
aus
Lohr am Main

2011

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 (in der Fassung der sechsten Änderungssatzung vom 16. August 2010) von Herrn Prof. Dr. Stephan A. Sieber betreut und von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 31.05.2011

Isabell Staub

Dissertation eingereicht am 31.05.2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Stephan A. Sieber

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

Mündliche Prüfung am 28.06.2011

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Beiträge in rezensierten Fachjournalen

Staub, I., Sieber, S. A., "β-Lactams as selective chemical probes for the in vivo labeling of bacterial enzymes involved in cell wall biosynthesis, antibiotic resistance and virulence", *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13400 – 13407.

Staub, I., Sieber, S. A., "β-Lactam probes as selective chemical-proteomic tools for the identification and functional characterization of resistance associated enzymes in MRSA", *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6271 – 6276.

Kunzmann, M.H., Staub, I., Böttcher, T., Sieber, S.A., "Protein Reactivity of Natural Product-Derived γ-Butyrolactones" *Biochem.* **2011**, *50* (5), 910 – 916.

Beiträge als Buchkapitel

S. A. Sieber, T. Böttcher, I. Staub, R. Orth, Small Molecules as Versatile Tools for Activity-Based Protein Profiling Experiments. *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*, Ed. L. Mander, H.-W. Lui, Elsevier: Oxford, Volume 9, **2010**, 629 – 674.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Stephan A. Sieber gilt mein Dank für die hochinteressante Themenstellung und die immer sehr zielgerichtete Betreuung und Anleitung bei der Ausgestaltung dieser Arbeit. Die Möglichkeit neue wissenschaftliche Verfahren in interdisziplinären Projekten erlernen und anwenden zu können, waren ein Ansporn während der Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Carell danke ich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und seine stetige Unterstützung bei allen administrativen Erledigungen. Zudem war sein Interesse in besonderem Maße eine Motivation für mich.

Für die freundliche Zusammenarbeit und das sehr gute Arbeitsklima möchte ich mich bei den Arbeitskreismitgliedern „der ersten Stunde“ Herrn Dr. Thomas Böttcher, Herrn Dr. Ronald Frohnafel und Herrn Dipl.-Chem. Max Pitscheider bedanken. Die stete Hilfsbereitschaft, viele fachliche Diskussionen und das Zusammenwirken der verschiedenen Begabungen hatten einen großen Anteil an der erfolgreichen Durchführung der Projekte.

Herrn Prof. Pfändler danke ich für die wertvollen Tipps bezüglich der Chemie von β -Lactamantibiotika. Mein Dank auch an Herrn Prof. Heuschmann und Herrn Dr. Stephenson, die sich für Diskussionen über die Auswertung kniffliger NMR-Spektren stets Zeit genommen haben um auch noch die kleinste Wechselwirkung aufzuklären.

Herrn Dr. Werner Spahl möchte ich für die Anfertigung von Massenspektren und seine Hilfsbereitschaft bei analytischen Fragestellungen danken. Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Departments Chemie und Pharmazie der LMU München, Herrn Dr. David Stephenson und Frau Claudia Dubler für die Aufnahme der Kernresonanzspektren.

Ich bedanke mich auch bei Frau Prof. Dr. Helma Wennemers und meinem Betreuer Roman Kovasy für die Möglichkeit, ein Fortgeschrittenenpraktikum in ihrem Arbeitskreis an der Universität Basel zu absolvieren.

Ein herzliches Dankeschön auch an Herrn Marcus Tegel für die technische Hilfeleistung, das Korrekturlesen, sowie besonders für Unterstützung und Zuspruch in anstrengenderen Zeiten.

Meiner Familie möchte ich für die Geduld und Begleitung während der Promotionszeit herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	12
1.1	Gefahr durch pathogene Bakterien	12
1.2	Proteomik	15
1.3	Activity-Based Protein Profiling (ABPP)	17
1.4	β -Lactamantibiotika – Wirkung und Resistenz	28
1.5	Privilegierte Strukturen in Naturstoffen	42
1.6	Aufgabenstellung	44
2	RESULTATE	46
2.1	β -Lactame als ABPP-Sonden	46
2.1.1	Synthese antibiotisch aktiver β -Lactamsonden	46
2.1.2	Synthese von monocyclischen β -Lactamsonden	52
2.1.3	Etablierung von antibiotisch aktiven Lactamsonden	55
2.1.4	Etablierung von monocyclischen β -Lactamsonden	62
2.1.5	Zusammenfassung	67
2.2	Anwendung der Sondenbibliothek	69
2.2.1	Multiresistenter und Antibiotika-sensitiver <i>S. aureus</i>	69
2.2.2	Zusammenfassung	84
2.3	γ -Lactonderivate als ABPP-Sonden	86
2.3.1	Synthesestrategie	87
2.3.2	Erweiterung der Sondenbibliothek	93
2.3.3	Markierungsexperimente mit Sonde UExL (34)	96
2.3.4	Markierungsexperimente mit PBL (36)	100
2.3.5	Zusammenfassung	101
3	AUSBLICK	103
4	MATERIALIEN UND METHODEN	107
4.1	Allgemeine Methoden	107
4.2	Synthesevorschriften für β -Lactamsonden	109
4.3	Synthesevorschriften für γ -Lactonsonden	127
4.4	Chemisch-biologische Methoden	145
4.5	Methoden der Proteomik	152
4.6	Methoden der Genomik	164
5	ANHANG	175
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	189
7	LITERATURVERZEICHNIS	192

Summary

β -Lactams represent one of the most important groups of antibiotics prescribed today. They stop bacterial growth by inhibiting penicillin-binding proteins (PBPs), which are indispensable for the cross-linking process during cell wall biosynthesis. Although the general mechanism of β -lactam antibiotics is well known, some functions and regulations of the target enzymes (PBP) have not been clarified in detail. β -Lactams with radioactive or fluorescent tags have been used to explore the different activity of diverse β -lactam antibiotics on PBPs. However, these methods are either limited by time-consuming procedures and harsh reaction conditions or by the attachment of large fluorescent dyes to the core scaffold. Hence, the target affinity or cell permeability is reduced, which is important for *in vivo* studies. To explore the role of PBPs and other yet unknown targets of β -lactams, a novel chemical proteomic strategy referred to as “activity-based protein profiling” (ABPP) was utilized. ABPP uses small reactive molecules as probes that specifically bind to the active sites of a variety of enzymes and these molecules can be modified by appending a fluorescent tag for the visualization of the corresponding enzyme activities in complex proteomes.

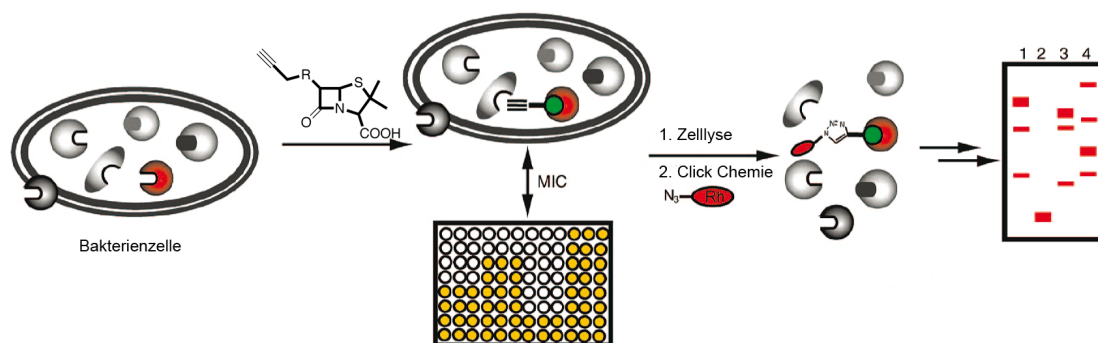


Figure S1: Concept of ABPP used in experiments

In this work a two-tiered strategy was used. Firstly, a selection of probes consisting of conventional β -lactam antibiotics for labeling various penicillin-binding proteins (PBPs) was prepared. Secondly, a new synthetic generation of monocyclic β -lactam probes with no similarity to established natural products was introduced. The binding partners of several naturally occurring β -lactam antibiotics, as well as new synthetic analogs thereof, were identified in diverse bacterial proteomes *in vitro* and *in vivo*. Interestingly, in addition to PBPs, several other PBP-unrelated targets could be

detected *in vivo*, which play key roles in both resistance and virulence. Selected synthetic β -lactam probes for example inhibited the virulence-associated enzyme ClpP and a resistance-associated β -lactamase in non-pathogenic bacteria.

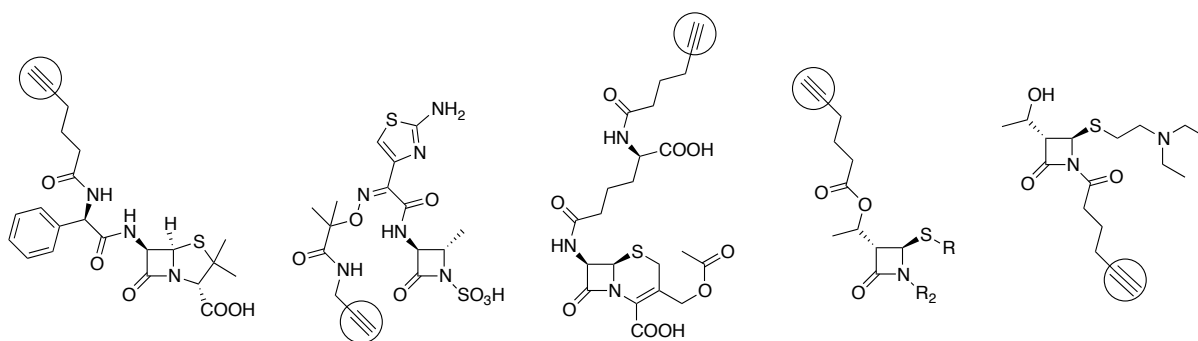


Figure S2: β -Lactam probe library

These experiments indicate that the specificity of β -lactams can be adjusted to versatile enzyme families with important and crucial cellular functions. Nowadays, the search for such biological targets for effective therapeutic interventions is imperative. Bacterial infections become more and more immune to traditional antibiotic treatments because multi-resistant microorganisms spread worldwide. In an increasing number of cases, infectious diseases caused by methicillin-resistant *S. aureus* strains (MRSA) have even become completely untreatable with current antibiotics. The resistance mechanisms, which are responsible for this development, are partly based on the unique proteomic composition of the pathogen. In the second part of this work, it could be shown that the set of antibiotic and artificial β -lactam probes were effective in the comparative *in situ* profiling of bacterial proteomes derived from antibiotic-sensitive and methicillin-resistant *S. aureus* strains (MRSA). One prominent resistance mechanism of MRSA can be basically attributed to the concerted action of a pair of enzymes, MecR1 and PBP2'. The set of conventional and artificial β -lactam probes was efficient for monitoring the activity of these two important enzymes, which are the major cause of MRSA resistance. While MecR1 was labeled solely by probes that resemble dedicated classical antibiotics, PBP2' was exclusively tagged by an artificial β -lactam probe. This emphasizes the utility of using diverse sets of compounds, conventional and artificial β -lactams. Contrary to classical β -lactam antibiotics, an amide-activated β -lactam probe is of suitable reactivity to acylate the active site of PBP2' overcoming the limited reactivity of this enzyme towards β -lactam antibiotics. These experiments suggest that the lactam

probe strategy is suitable to detect and monitor the activity and function of known resistance-associated proteins in multiresistant pathogenic bacteria. Furthermore, several enzymes of yet unknown function could be detected that were only active in the MRSA strain. In this work, these labeled enzymes could be associated with the resistance of MRSA for the first time. In-depth functional analyses revealed that two of these enzymes were effective in the hydrolysis of β -lactam antibiotics of the penicillin family. Interestingly, one of these enzymes is a metalloenzyme that most likely belongs to the metallo- β -lactamase family. This is a new, advancing resistance-associated enzyme class that is insensitive to current β -lactamase inhibitors and that poses a major problem in conventional antibiotic therapies. The ABPP platform may therefore represent a valuable analytical tool to explore the mechanism and substrate preferences of known but also yet uncharacterized resistance-associated enzymes in pathogenic bacteria.

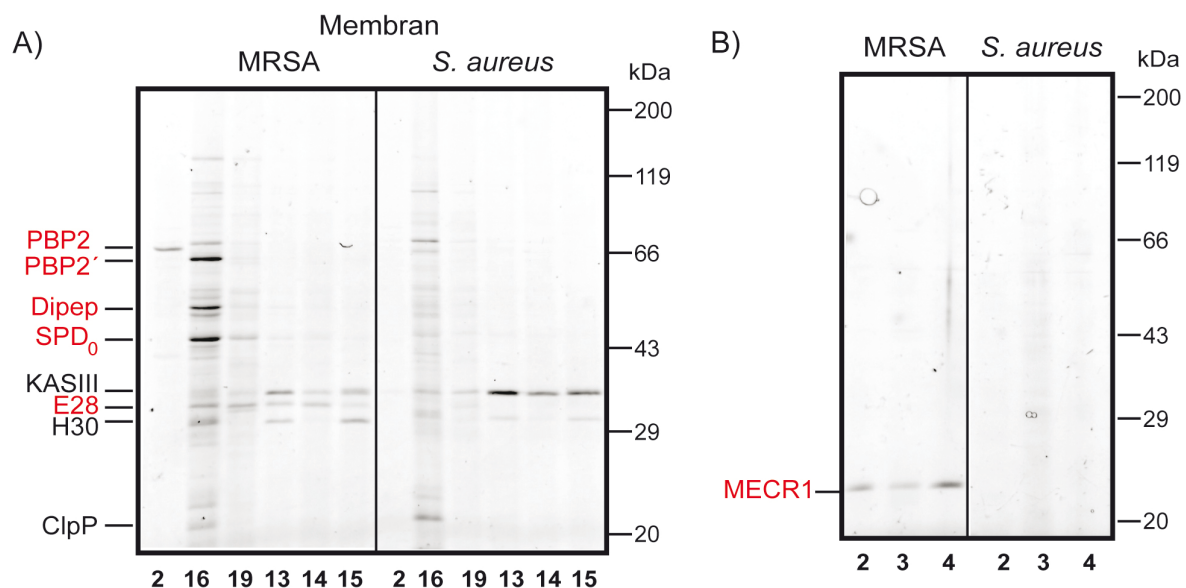


Figure S3: Comparison between multiresistant (MRSA) and antibiotic-sensitive *S. aureus* with β -Lactam probes

To keep up with the development of bacterial resistance, there are increasing requirements for new lead structures and corresponding biological targets. For this reason, the “activity-based protein profiling” (ABPP) target identification technique was extended to a new probe scaffold, the γ -butyrolactones. This structural motif is

found in up to 10% of all known compounds of natural origin and could exert biological activity on a proteomic level. To explore the full reactivity profile of different lactone derivatives, a diverse set of γ -butyrolactones and γ -thiolactones as well as their Michael acceptor-activated derivatives (α -methylene- γ -butyrolactones and α -methylene- γ -butenolides) were synthesized. In the third part of this work, it could be shown that this approach with several five-membered lactones reveals important insights into the reactivity and binding preferences of these probes, which were inspired by natural products. While there is no covalent reaction of regular γ -butyrolactones and γ -thiolactones with proteomic samples, the Michael acceptor-based α -methylene- γ -butyrolactones exhibit a strong tendency to label a series of important bacterial enzymes *in situ*.

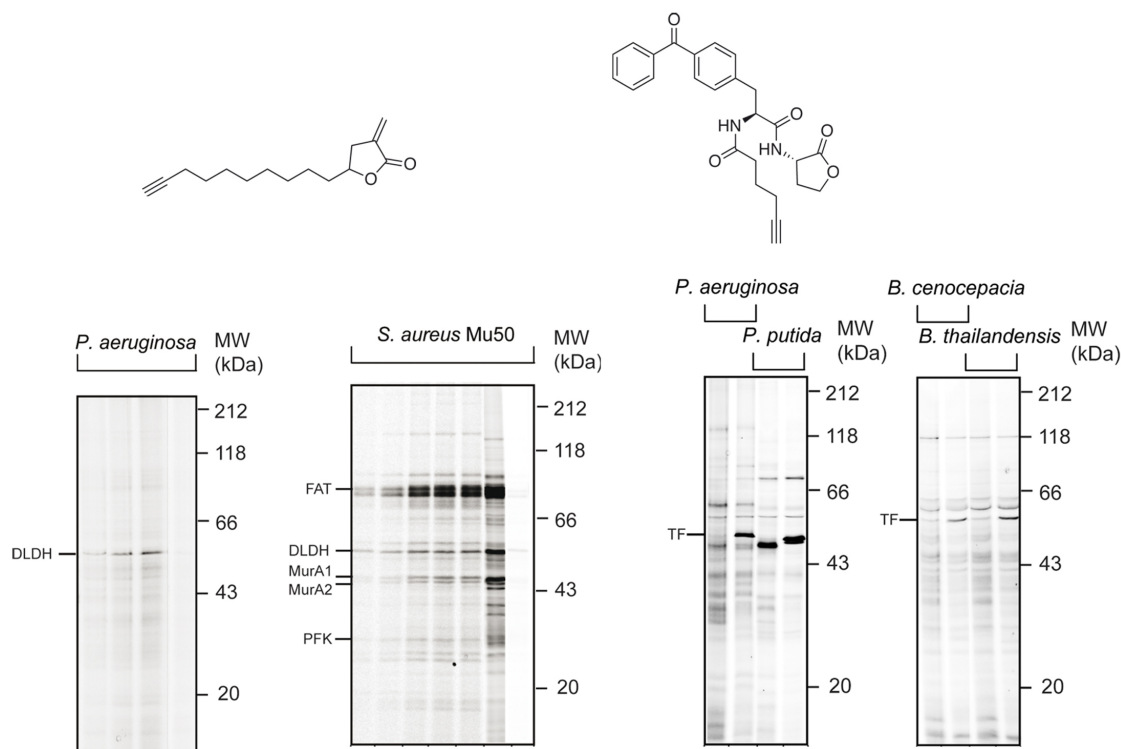


Figure S4: Labeling profiles of γ -lactone probes

Several proteins that play important roles in the primary metabolism of bacteria could be identified. Moreover, MurA1 and MurA2, two essential enzymes for the cell wall biosynthesis in *S. aureus*, were inhibited in multiresistant *S. aureus* cells (MRSA). The specific labeling of different enzymes demonstrates the applicability of

α -methylene- γ -butyrolactones as a molecular tool for the profiling of enzyme activities and functions in bacterial proteomes. In order to detect non-covalent interactions between enzymes and γ -butyrolactones that are not activated by an electrophilic Michael acceptor system, a photo-cross-linker-functionalized lactone probe with a benzophenone moiety was designed and synthesized, too. This probe exhibits a remarkable selectivity to bind to the enzyme 'trigger factor' in various gram-negative bacterial species. Trigger factor plays an important role in the bacterial protein folding mechanism and it could hence represent a new target for antibiotic therapy. It is therefore currently investigated in more detail. In this work, γ -butyrolactones were used to characterize this enzyme. These results emphasize the capability of γ -butyrolactone probe libraries to explore the biological reactivity of natural products with the same structural motif in the bacterial proteome.

Zusammenfassung

β -Lactame gehören heute noch immer zu den wichtigsten verwendeten Antibiotikaklassen. Die antibiotische Aktivität dieser Verbindungen beruht dabei auf der Wechselwirkung mit sogenannten Penicillin-bindenden-Proteinen (PBP), welche für den ordnungsgemäßen Aufbau der bakteriellen Zellwand verantwortlich sind. Eine Bindung des Antibiotikums an PBP hindert die Bakterien an der Ausbildung ihrer Zellwand und tötet sie dadurch ab. Dieses Wirkprinzip der β -Lactamantibiotika ist zwar mittlerweile gut verstanden, jedoch sind einige Funktionen unklar und vor allem die Regulation der Zielenzyme (PBP) ist noch in vielen Fällen ungeklärt. Durch Untersuchungen mittels radioaktiv markierten β -Lactamverbindungen oder durch β -Lactamderivate mit fluoreszierenden Farbstoffen ist bekannt, dass verschiedene β -Lactamantibiotika unterschiedliche Aktivitäten gegenüber den PBP aufweisen. Solche Methoden sind jedoch nicht nur zeitaufwendig oder erfordern harsche Reaktionsbedingungen, sondern bleiben auch oft nur auf Experimente mit Proteomlysaten beschränkt. Da sterisch anspruchsvolle Farbstoffe die Zellgängigkeit und Empfindlichkeit gegenüber den Zielenzymen beeinflussen, lassen sich so nur begrenzt Aussagen über die Situation in der lebenden Zelle gewinnen. Um diese Nachteile zu überwinden wurde in dieser Arbeit für die Untersuchung von PBP und anderen noch unbekannten bakteriellen Targetenzymen von β -Lactamverbindungen eine neuartige chemisch-proteomische Strategie, die aktivitätsbasierte funktionelle Proteomik (ABPP) eingesetzt. In ABPP werden kleine reaktive Moleküle als Sonden genutzt, um spezifisch in die aktiven Zentren von Enzymen zu binden. Eine Modifikation mit einem Fluoreszenzmarker ermöglicht die Visualisierung der Enzymaktivitäten in komplexen Proteomen (Abbildung Z1).

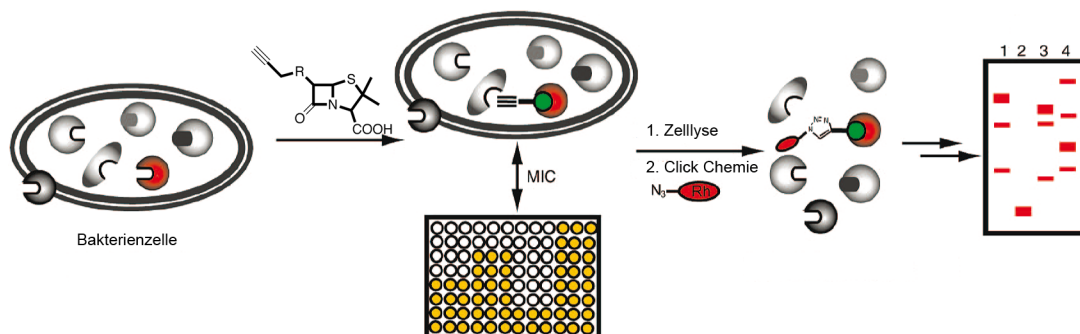


Abbildung Z1: Schematische Darstellung eines ABPP-Experiments

Die Synthesestrategie bestand in zwei unterschiedlichen Ansätzen. Zum einen wurden wirksame β -Lactamantibiotika in ABPP-Sonden zur Markierung von PBP umgewandelt. Zusätzlich wurde eine kleine Sondenbibliothek aus rein synthetischen, monocyclischen Lactamsonden ohne strukturelle Ähnlichkeit mit bekannten β -Lactamantibiotika aufgebaut (Abbildung Z2). Es gelang die Identifikation der enzymatischen Angriffsziele der antibiotisch aktiven, sowie der rein synthetischen β -Lactamsonden in verschiedenen bakteriellen Proteomen *in vitro* und *in vivo*. Interessanterweise wurden dabei neben PBP auch Vertreter anderer Enzymklassen *in situ* markiert, die wichtige Aufgaben in der bakteriellen Resistenz oder Virulenz übernehmen. Ausgewählte synthetische β -Lactamsonden inhibierten zum Beispiel das virulenzassoziierte Enzym ClpP, sowie eine β -Lactamase in nichtpathogenen Bakterienstämmen. Diese Ergebnisse belegen, dass die Selektivität von β -Lactamverbindungen gezielt auf die Inhibition bestimmter Enzymklassen mit wichtigen Zellfunktionen abgestimmt werden kann.

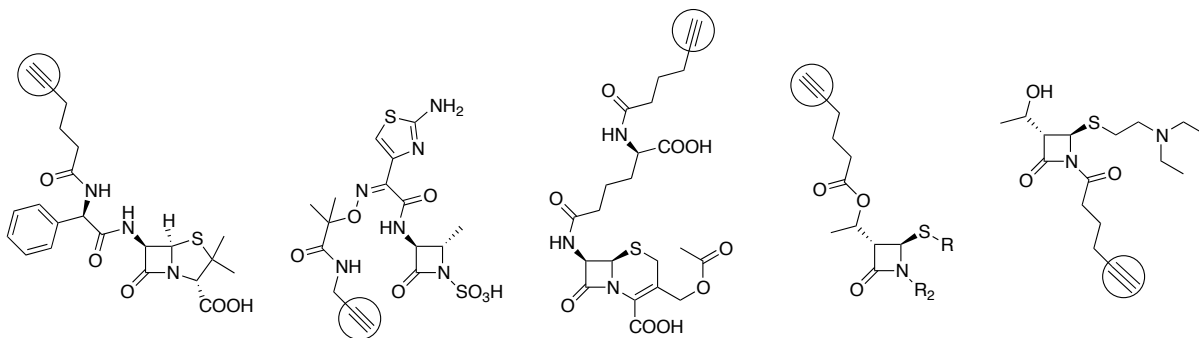


Abbildung Z2: Struktur antibiotisch aktiver und synthetischer β -Lactamsonden

Die Suche nach solchen biologischen Zielen ist heutzutage für eine effektive Antibiotikabehandlung dringend erforderlich. Immer mehr bakterielle Infektionen sprechen nicht mehr auf eine Standardbehandlung an, da sich wirkstoffresistente Erreger weltweit ausbreiten. Erkrankungen durch das methicillin-resistente *S. aureus* Bakterium (MRSA) sind mit den zur Verfügung stehenden Antibiotika zunehmend schwerer zu therapieren. Die Ursachen der verschiedenen Resistenzmechanismen gegenüber den β -Lactamantibiotika liegen dabei zum Teil in der speziellen proteomischen Struktur des Erregers. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde deswegen die in Nichtpathogenen etablierte β -Lactamsondenbibliothek für einen Vergleich der Proteome von antibiotika-sensitiven und antibiotika-resistenten *S. aureus* Stämmen

herangezogen. Ein bekannter Resistenzmechanismus von MRSA ist im Wesentlichen auf die Aktivität zweier Enzyme, MecR1 und PBP 2' zurückzuführen. MecR1 sowie PBP 2' konnten durch einzelne Sonden der Bibliothek markiert werden. Während MecR1 im extrazellulären Medium durch antibiotisch aktive Sonden markiert wird, konnte PBP 2' nur durch eine synthetische β -Lactamverbindung erreicht werden. Dies verdeutlicht den Nutzen einer Sondenbibliothek aus verschiedenen Lactamgrundstrukturen (antibiotisch aktive, sowie rein synthetische Verbindungen). Durch die Ergebnisse der ABPP-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Sondenbibliothek als wertvolles molekulares Werkzeug für die Erforschung der Aktivität und Funktion bekannter resistenzassoziierter Enzyme dienen kann. Weiterhin konnten aber auch einige bisher nichtcharakterisierte Enzyme detektiert werden, welche nur im MRSA-Stamm aktiv sind (Abbildung Z3). Die markierten Enzyme können durch den Einsatz der Sondenbibliothek in dieser Arbeit zum ersten Mal mit der Resistenz von MRSA assoziiert werden. Eine Untersuchung ergab, dass zwei markierte Enzyme in der Lage sind, β -Lactamantibiotika mit Penicillinstruktur zu hydrolysieren. Eines dieser Enzyme gehört dabei der Klasse der Metalloenzyme an. Metallo- β -lactamasen stellen eine explizite Bedrohung dar, da sie nicht von konventionellen β -Lactamaseinhibitoren gehemmt werden. Die Untersuchungsmethode eines bakteriellen Proteoms durch ABPP bietet hier eine wertvolle analytische Strategie zur Erforschung der Funktionsweise und Substratpräferenzen bekannter wie auch noch nicht charakterisierter resistenzassoziierter Enzyme in Pathogenen.

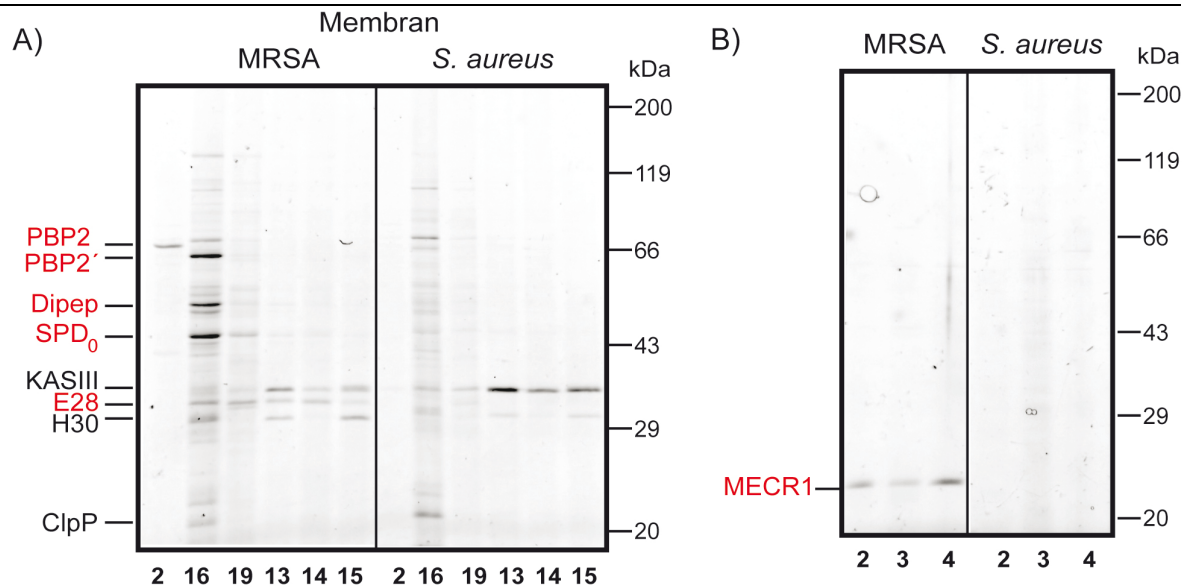


Abbildung Z3: Vergleich von multiresistentem (MRSA) und Antibiotika-sensitivem *S. aureus* mit β -Lactamsonden

Um mit der Resistenzentwicklung von Bakterien Schritt halten zu können, besteht jedoch auch ein wachsender Bedarf an neuen Leitstrukturen und biologischen Targets. Aus diesem Grund wurde im dritten Teil dieser Arbeit eine neue Sondenbasisstruktur der ABPP-Technologie zugeführt. In ungefähr 10 % aller Naturstoffe findet sich ein γ -Butyrolactonmotiv, welches eine biologische Wirkung auf proteomischer Ebene ausüben kann. Um einen Überblick über das Reaktivitätsprofil verschiedener γ -Lactonderivate zu erhalten, wurde eine Sondenbibliothek aus γ -Butyrolactonen und γ -thiolactonen, sowie ihrer Michaelakzeptorderivate α -Methylen- γ -butyrolactone und γ -butenolide synthetisiert. Diese Sonden lieferten dabei wichtige Informationen über die Reaktivität und Bindungspräferenzen dieser naturstoffinspirierten Struktur motive. Während einfache γ -Butyrolactone und γ -thiolactone im Proteom keine kovalenten Bindungen mit bakteriellen Enzymen eingehen, vermochte die α -Methylen- γ -butyrolactonsonde unter *in situ* Bedingungen mehrere wichtige Enzyme zu markieren. Einige der markierten Enzyme spielen im Primärmetabolismus von pathogenen Bakterien eine wichtige Rolle. In MRSA wurden die Enzyme MurA1 und MurA2 inhibiert, die im Zellwandbiosyntheseprozess von essentieller Bedeutung sind (Abbildung Z4).

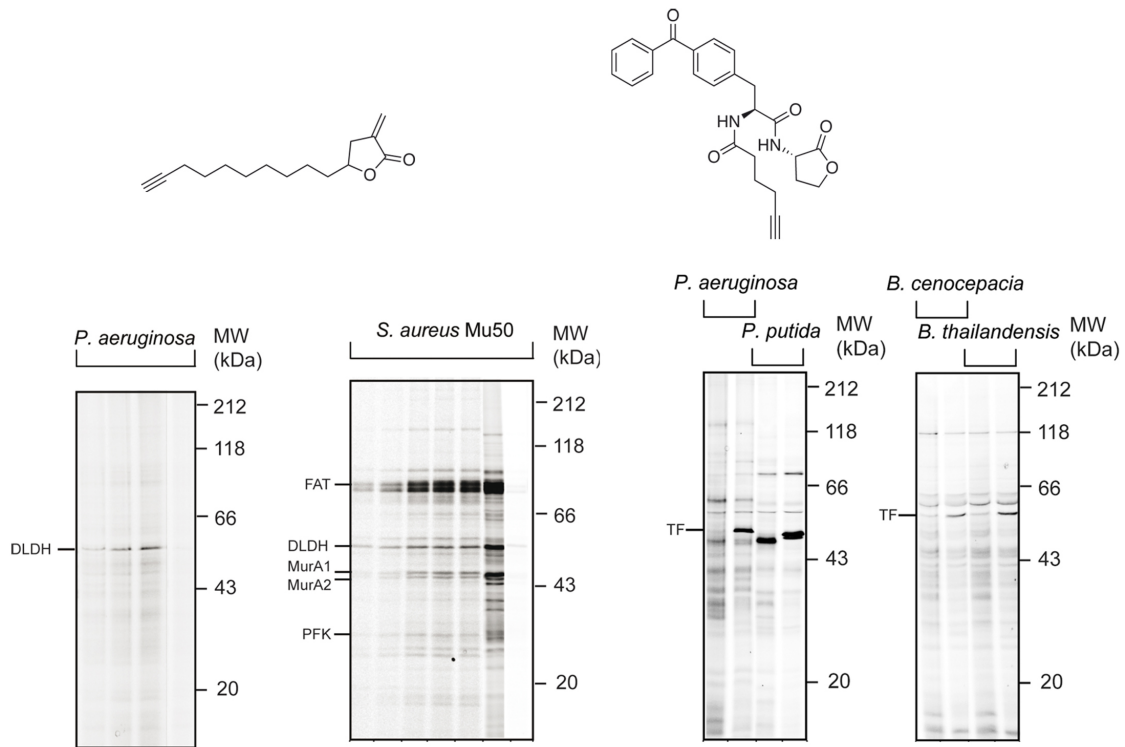


Abbildung Z4: Markierungsprofile von γ -Lactonsonden

Die spezifische Markierung der unterschiedlichen Enzyme belegt die Anwendbarkeit von α -Methylen- γ -butyrolactonen als molekulare Werkzeuge zur Erforschung von Enzymaktivitäten und Funktionen in bakteriellen Proteomen. Um auch affinitive Wechselwirkungen zwischen Enzymen und γ -Lactonderivaten ohne aktivierendes Michaelakzeptorsystem detektieren zu können wurde auch eine Lactonsonde mit einem Benzophenonrest als Photocrosslinker entwickelt und synthetisiert. Diese Sonde bindet mit hoher Selektivität das bakterielle Enzym Trigger Factor in verschiedenen gram-negativen Bakterienspezies. Der bakterielle Proteinfaltungsmechanismus, in dem auch der Trigger Factor eine wichtige Rolle spielt wird derzeit als mögliches therapeutisches Ziel für eine antibiotische Behandlung erforscht. In dieser Arbeit konnten γ -Butyrolactone als neues analytisches Werkzeug hierfür vorgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen darüber hinaus die Möglichkeit auf, durch die Synthese von γ -Butyrolactonbibliotheken mittels ABPP die biologische Reaktivität von Naturstoffen mit diesem Strukturmotiv im bakteriellen Proteom zu erforschen.

1 Einleitung

1.1 Gefahr durch pathogene Bakterien

Seit der Einführung von Penicillin, des ersten antibakteriellen Wirkstoffs in den 1940er Jahren des letzten Jahrhunderts kam es zu einer deutlichen Abnahme der Sterblichkeitsrate infolge bakterieller Infektionen.^[1] Antibiotika gelten seitdem als die wichtigste Waffe der Menschen gegen Bakterien^[2] und viele antibiotisch aktive Substanzen wurden in der Folgezeit entdeckt und klinisch zugelassen. Obwohl schon bald nach den ersten Therapieerfolgen medikamentenresistente Mikroorganismen beobachtet wurden, war man sich noch in den 1970er Jahren sicher, mit den bis damals zur Verfügung stehenden Antibiotika gegen das gesamte Spektrum bakterieller Erreger gewappnet zu sein.^[3] Doch die bekannten altbewährten Antibiotika blieben nicht dauerhaft verlässlich wirksam. Anfang der 1980er Jahre musste die Menschheit auch ihre letzten Illusionen aufgeben. Die Bakterien wurden zunächst resistent gegen Penicillin, bevor sie nach und nach Resistenzen gegen alle Antibiotika ausbildeten, die der Mensch seither entdeckt hat.^[4] Zwischen der Markteinführung eines Wirkstoffs und dem Auftreten von Resistenz kann die Zeitspanne im Extremfall nur ein Jahr betragen (Abbildung 1).^[5]

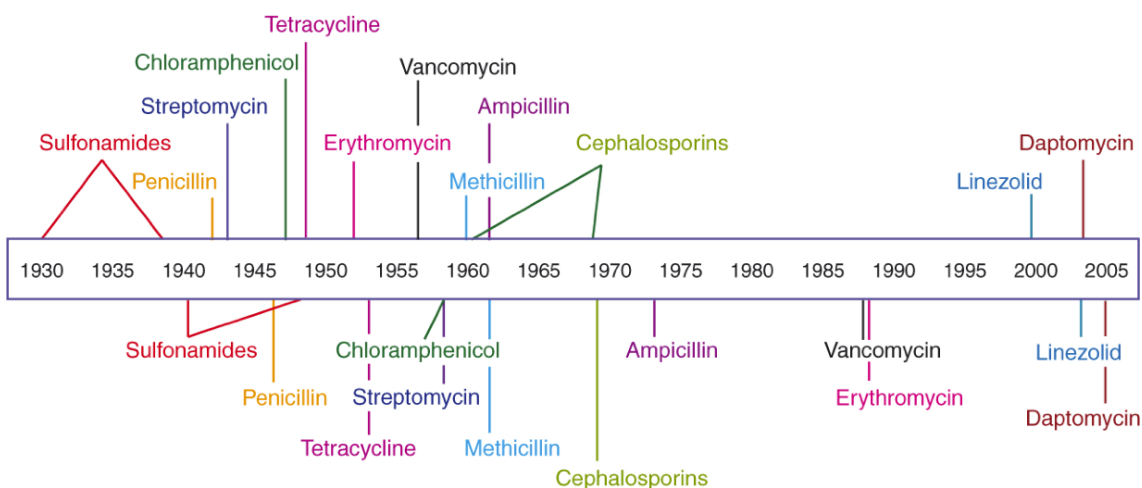


Abbildung 1: Die Markteinführung verschiedener Antibiotika (oben) und das Auftreten von Resistenz gegen den jeweiligen Wirkstoff (unten)^[6]

Das schnelle Lernvermögen der Bakterien beruht auf einer erstaunlichen Fähigkeit, über die Mikroorganismen seit je her verfügen. Bakterien sind in der Lage, durch

einfachen Kontakt DNA-Fragmente auszutauschen. Beherrscht ein Bakterium also eine Methode um den Angriff eines bestimmten Antibiotikums abzuwehren, kann es den genetischen Code an ein anderes Bakterium weitergeben. Diese natürlichen Mechanismen des Genaustauschs sind ständig im Gange, sogar zwischen sehr verschiedenen Bakterienarten (horizontaler Gentransfer).^[4, 7] Der allzu sorglose Umgang mit Antibiotika führte aber zu einer rasanten weltweiten Verbreitung von Bakterienstämmen, welche gegen mehrere Wirkstoffe gleichzeitig resistent sind, sogenannte multiresistente Erreger.^[5] Die durch sie ausgelösten bakteriellen Infekte sprechen nicht mehr auf die Standardbehandlung an und sind daher schwierig und manchmal auch gar nicht mehr zu therapieren.^[8] Am bekanntesten sind Infektionen durch *Staphylococcus aureus* (SA), welcher in ungünstigen Fällen auch lebensgefährliche Erkrankungen auslösen kann. MRSA (methicillin-resistenter SA) gilt als Sammelbezeichnung für alle antibiotika-resistenten SA-Stämme, also multiresistente und damit sehr gefährliche Pathogene, die über Resistenzen gegen mehrere Antibiotikaklassen verfügen. Allerdings sind die Ursachen für solch eine rapide Ausbreitung von Mikroorganismen vor allem mit den problematischen Mehrfachresistenzen nicht in der natürlichen Entwicklung zu suchen.^[9] So wissen einer EU-Umfrage zufolge nur 40 % der Europäer, dass Antibiotika gegen Viren zum Beispiel bei Atemwegsinfektionen ungeeignet sind.^[10] Ein Drittel der Verschreibungen außerhalb des klinischen Bereichs sind unnötig.^[5, 11] Dazu kommt der bis vor einigen Jahren übermäßige Einsatz von Antibiotika in der Veterinärmedizin als Infektionsschutzmittel,^[11] zur Wachstumsförderung von Masttieren^[7b] sowie in der Landwirtschaft zum Beispiel als Pflanzenschutzmittel. Jährlich werden über 30000 Tonnen Antibiotika produziert und über unseren Planeten verteilt.^[4] Bakterien sind damit oft über längere Zeit subletalen Antibiotikakonzentrationen ausgesetzt.^[5] Es gibt natürliche Grenzen, welche die Häufigkeit von Mutationen einer Bakterienpopulation begrenzen. Tritt jedoch ein Antibiotikum in Erscheinung, kommt es plötzlich zu einem starken Anstieg der Mutationsrate.^[4] Das beschleunigt den Prozess der Resistenzbildung um ein Vielfaches,^[5, 7a] denn aufgrund ihrer enorm raschen Vermehrung und der kurzen Generationszeit sind Bakterien schnell in der Lage, sich auf genetischer Ebene auf diese Situation einzustellen.^[5] Die Antibiotika die uns heilen sollten, haben paradoxerweise zu Infektionen mit multiresistenten Bakterien geführt.^[4] Die einzige Rettung für den Infizierten ist dann meist nur ein Reserveantibiotikum, welches

deswegen noch wirksam ist, weil es einen anderen Wirkmechanismus aufweist, gegen den sich noch keine Resistenz ausgebreitet hat. Die Wirkungsweisen der verschiedenen Antibiotika richten sich bis jetzt nur gegen wenige zelluläre Vorgänge: die Synthese der Zellwand, die Proteinbiosynthese, die Transkription, die DNA Replikation, den Folatstoffwechsel und die Membranintegrität (Abbildung 2).^[12]

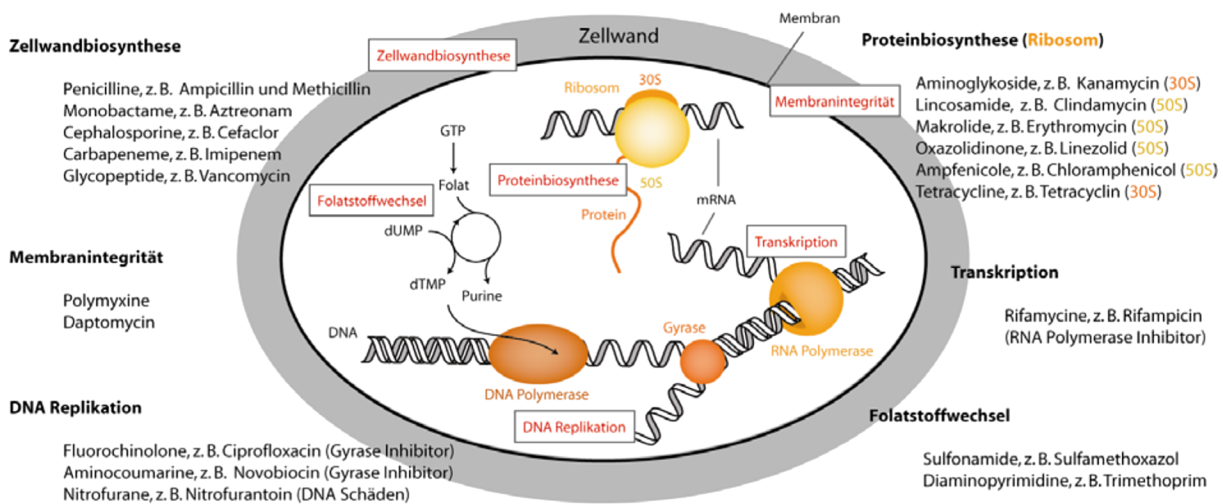


Abbildung 2: Zelluläre Angriffsziele der bis jetzt eingesetzten Antibiotika gegen pathogene Erreger

Den ersten beiden Mechanismen kommt dabei die größte Bedeutung zu, da fast alle zugelassenen Antibiotika diese beiden Angriffsziele ausnutzen. Dass viele der eingesetzten Antibiotika einen ähnlichen oder sogar den gleichen Wirkungsmechanismus aufweisen, ist von großem Nachteil. Hat ein Bakterium einmal eine Resistenz erworben, ist nicht nur ein Antibiotikum wirkungslos, sondern es verhält sich häufig unempfindlich gegenüber der ganzen Antibiotikaklasse.^[12a, 13] Daraus ergeben sich Therapieprobleme vor allem für multiresistente Bakterienstämme, da bis heute nur wenige bakterielle Targets von auf dem Markt erhältlichen Antibiotikapräparaten ausgenutzt werden. Doch ein kontinuierlicher Nachschub an klinischen Entwicklungskandidaten, die weitere Funktionen in einer Bakterienzelle hemmen, blieb aus. In den letzten 40 Jahren erreichten nur zwei Substanzen mit neuen Wirkmechanismen, das Oxazolidinon Linezolid^[14] und das Lipopeptid Daptomycin,^[15] für die Therapie am Menschen die Marktzulassung. Obwohl das Resistenzphänomen heute ständig neue Antibiotika erfordert, haben die Pharmaunternehmen, die früher regelmäßig neue Produkte entwickelten, ihre

Forschungsarbeit auf diesem Gebiet eingestellt und sich anderen Bereichen zugewandt, die gewinnversprechender sind.^[8] Angesichts der weltweiten Zunahme von MRSA-Keimen und weiterer gefährlicher Pathogene ist die so entstandene Innovationslücke im Bereich Antibiotikaforschung äußerst besorgniserregend. Denn während noch vor einigen Jahren die multiresistenten Erreger vor allem in Krankenhäusern für ältere und immungeschwächte Patienten (hospital-acquired MRSA) gefährlich wurden, ist heute eine höchst bedrohliche Ausbreitung auch in der Allgemeinbevölkerung zu beobachten. Selbst junge, gesunde Menschen ohne jeden Kontakt zu einer Gesundheitseinrichtung erkranken zunehmend schwer aufgrund kaum behandelbarer Problemkeime (community-acquired MRSA).^[16] Diese ernste Situation verlangt dringend nach der Entwicklung neuer Leitstrukturen für zukünftige wirksame Therapien.^[8] Die Anpassungsfähigkeit von Bakterien zwingt dabei zur Konzentration auf die Identifikation neuer pharmazeutischer Targets. Die große Herausforderung für Forscher in diesem Bereich besteht in der Komplexität der zellulären biochemischen Vorgänge, welche zu Infektion, Krankheitsentstehung oder Resistenz führen. Auf dem Weg zum Verständnis der molekularen Grundlagen dieser Vorgänge sind in den letzten Jahren eine Reihe neuer Techniken in den Bereichen Genomik und Proteomik entstanden und mittlerweile gut etabliert. Aus dem Bewusstsein für die Komplexität und dem Zusammenspiel von zellulären Regulationsnetzwerken zeigen sich jedoch Grenzen in der Leistungsfähigkeit dieser Methoden.

1.2 Proteomik

Gene sind eine Art Bauanleitung für die Proteine, die als ausführende Organe unzählige Aufgaben in einer Zelle übernehmen.^[17] Die Genomik, die systematisch die zugrundeliegende genetische Information untersucht, ergänzt sich mit der Proteomik, die sich mit Auftreten, Form, Funktion und Interaktion der Proteine eines Organismus beschäftigt. Trotz gleicher genetischer Ausstattung können die Genprodukte, die Proteine, stark abweichen. Alterung, Umwelteinflüsse und Krankheiten beeinflussen die Proteinausstattung eines Organismus. Zellen besitzen eine Vielzahl von Möglichkeiten, die Funktion von Proteinen und Enzymen zu kontrollieren. Enzyme, also Proteine mit einer katalytischen Aktivität, übernehmen fundamentale

Schlüsselprozesse in einem Organismus. Posttranslationale Modifikationen sind dabei Veränderungen an einem Protein oder Enzym, die nach seiner Biosynthese entstehen.^[18] Gebildete Proteine können durch diese Art „Nachbearbeitung“ in ihrer Funktion reguliert und moduliert werden.^[19] Man kennt mehr als 100 Typen der posttranslationalen Modifikation,^[17] darunter die Phosphorylierung, proteolytische Prozessierung, Glycosylierung, Acylierung oder die Wechselwirkung mit nichtproteinischen Komponenten, welche die Aktivität in der Wahrnehmung einer physiologischen Aufgabe beeinflussen.^[20] Inhibitoren, welche die katalytische Tasche eines Enzyms blockieren, oder Aktivatoren führen zu der jeweils inaktiven oder aktiven Form eines Enzyms, wodurch sich die vielfältigen Aufgaben der Enzyme von der Bakterienzelle steuern lassen. Enzyme gelten als potentielle Angriffspunkte für neue Arzneistoffe, da sie für nahezu alle Zellfunktionen von entscheidender Bedeutung sind.^[21] Ein Meilenstein in der Erforschung von Proteinen war die Entwicklung der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE). Das Verfahren trennt ein Gemisch aus tausenden verschiedenen Proteinen nach Kriterien wie Größe, Masse, oder Form und elektrischer Ladung, wovon ihre Wanderung im gel-elektrischen Feld bestimmt wird.^[22] Da sich die Zusammensetzung des Proteoms in biologischen Systemen umwelt- und zustandsabhängig verändert, können die so erhaltenen Proteinexpressionsmuster Aufschluss über Krankheitsursachen oder den Wirkmechanismus von Medikamenten auf molekularer Ebene geben. Zusätzlich kombiniert wird die Gelelektrophorese mit weiteren Verfahren zur Identifizierung der Proteine, darunter auch die Massenspektrometrie und Färbemethoden.^[22] Die Proteomanalytik erfolgt als subtraktiver Ansatz, indem zwei oder mehr wohldefinierte Zustände miteinander verglichen werden. Unterschiede in den Proteinmustern verschiedener Zustände (z.B. vor und nach Wirkstoffgabe, gesunde und pathologische Zustände) werden beobachtet und quantitativ ausgewertet. Der Fokus dieser klassischen Methoden liegt dabei auf der Proteomzusammensetzung. Trotz ständiger Verbesserungen und Weiterentwicklungen der 2D-Gelelektrophorese, stößt diese im Hinblick auf etliche wichtige Proteinklassen noch immer an ihre Grenzen. Obwohl das Expressionsprofil ein wichtiger Aspekt bei der Aufklärung biologischer Prozesse und dem Auffinden neuer Angriffsziele für Pharmazeutika ist, ist dessen Aussagekraft aber eingeschränkt. Proteine erweisen sich wie erläutert als extrem variabel und es ist nicht das Auftreten oder die Häufigkeit, sondern die Aktivität, welche zur Beurteilung

einer biologischen Auswirkung herangezogen werden muss. Die Enzymaktivität korreliert jedoch nicht mit den im jeweiligen Zellstadium vorhandenen Enzymen (Abbildung 3).

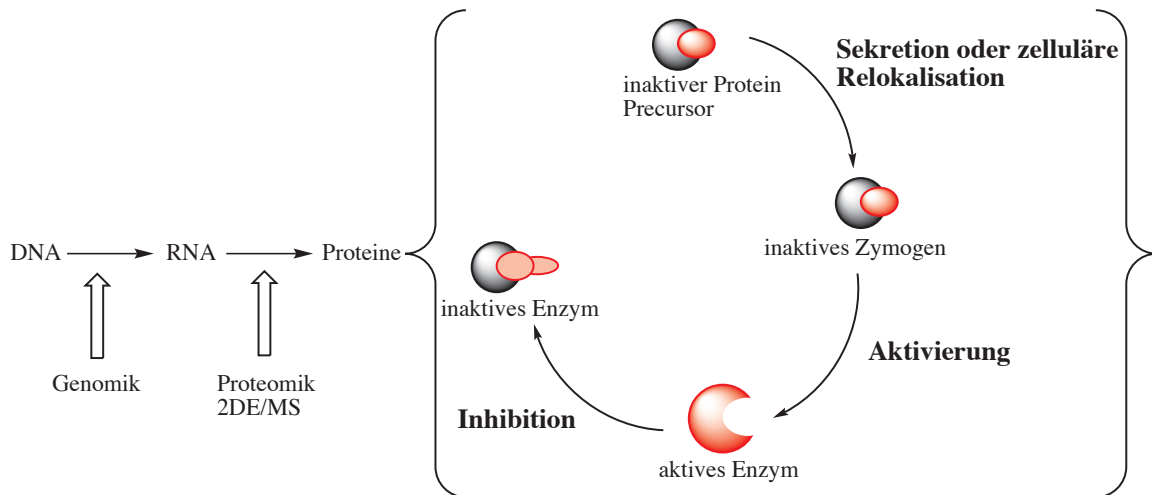


Abbildung 3: Schematische Darstellung posttranslationaler Modifikationen im Proteom

Klassische Methoden tragen der komplexen Regulation, der das Proteom unterworfen ist nicht Rechnung, da sie die Funktion und Aktivität der Proteine nicht direkt erfassen, sondern nur Veränderungen der Proteinmengen analysieren.^[23] Um dieses grundsätzliche Problem zu lösen, wurde vor ungefähr 10 Jahren ein neues chemisch-proteomisches Verfahren unter dem Namen „aktivitätsbasiertes Protein Profiling“ (ABPP) entwickelt. Maßgeblich *Cravatt*^[24] und *Bogyo*^[25] etablierten diese Technik um die Aktivität, Funktion und Regulation von Enzymen zu untersuchen. Wegbereitend für die heutige ABPP-Technik war die Forschung der Gruppen um *Walker*^[26] und *Powers*.^[24b, 27]

1.3 Activity-Based Protein Profiling (ABPP)

Funktionelle bzw. aktivitätsbasierte Proteomik (activity-based protein profiling, ABPP) ist eine Untersuchungsmethodik mit dem Ziel, Inhibitoren für bestimmte aktive Enzyme und Enzymklassen zu finden und deren Reaktion im komplexen Proteom zu visualisieren. Sogenannte Sonden (dies sind vergleichsweise kleine Moleküle), welche an das aktive Zentrum von Enzymen binden können, werden genutzt, um mit einem bestimmten Teil des Proteoms zu reagieren. Diese Sonden können dann mit

einem Marker zur Visualisierung dieser Reaktionen verknüpft werden. Im Gegensatz zu klassischen proteomischen Ansätzen kann ein Teilbereich des Proteoms durch diese chemische Modifizierung isoliert betrachtet werden. Nachdem die Proteine eines Proteoms per Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt wurden, kann man eine Fluoreszenzaufnahme vornehmen (Abbildung 4). Die Komplexität des Gelelektrophoresebildes wird wesentlich dadurch reduziert, dass der an der Sonde gebundene Farbstoff nur Enzyme anzeigt, welche vorher durch Reaktion mit der Sonde gleichzeitig auch den Marker an sich gebunden haben. Der große Vorteil ist, dass diese Methodik es erlaubt, zwischen aktiven Enzymen und inaktiven Formen oder inhibitor gebundenen Enzymen zu unterscheiden, da nur aktive Enzyme eine Affinität zu einem Substrat aufzeigen und Reaktionen mit der Sonde eingehen können. Welche Enzyme mit einer Sonde reagieren, wird durch die Affinität zwischen Enzym und Sonde bestimmt. Da die Sonde vor allem dann gebunden wird, wenn sie einem potentiellen Substrat in Struktur und Reaktivität ähnelt, kann man Rückschlüsse auf die Funktion des markierten Enzyms ziehen. Die Identifizierung der so markierten Enzyme gelingt durch Massenspektrometrie der enthaltenen Peptidfragmente nach dem Verdau des Enzyms.

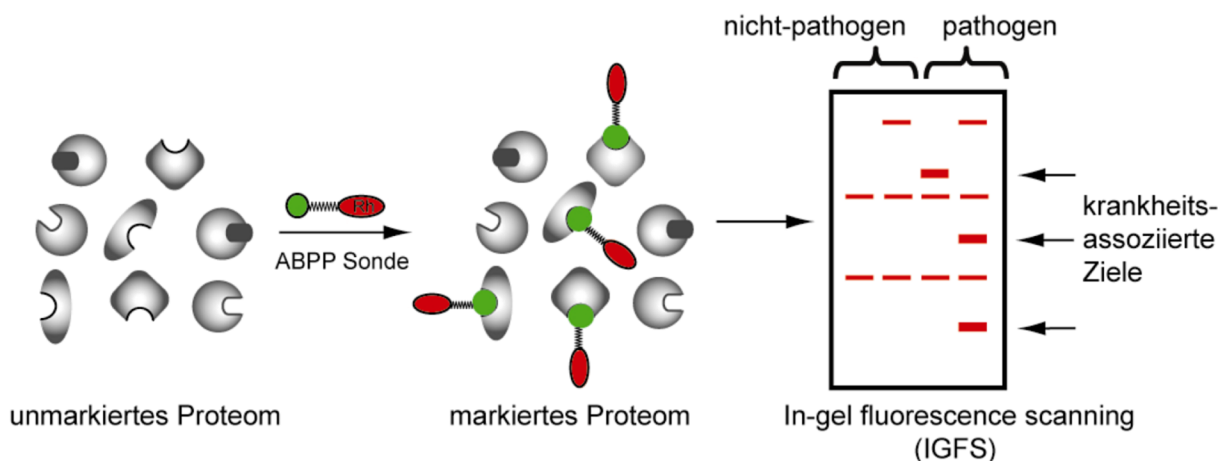


Abbildung 4: Die Markierung aktiver Enzyme im Proteom mit fluoreszierenden ABPP-Sonden und Analyse durch Gelelektrophorese

Sondendesign:

Die Werkzeuge der funktionellen Proteomik, die aktivitätsbasierten Sonden (activity-based probes, ABP) bestehen aus mindestens drei Elementen (Abbildung 5):

- eine reaktive Gruppe (reactive group, RG) – um in das aktive Zentrum eines Enzyms zu binden.
- einer Reportergruppe (reporter tag, RT), um die markierten Enzyme sensitiv detektieren zu können.
- einem Linker (spacer), der die reaktive Gruppe und die Reportergruppe miteinander verbindet

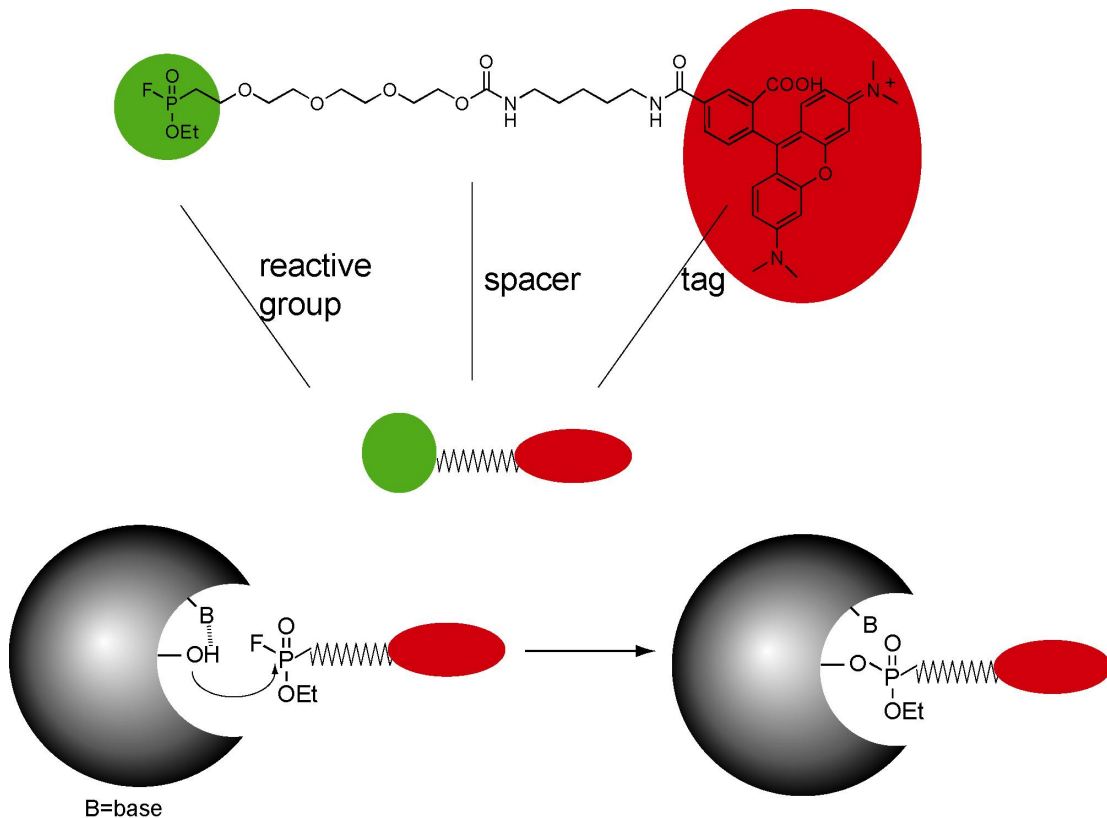


Abbildung 5: Aufbau einer Fluorophosphonat-Sonde und der Mechanismus der kovalenten Bindung an ein Enzym durch einen Serinrest

Ein wichtiger Unterschied zu den klassischen Methoden besteht darin, dass die reaktive Gruppe nur an diejenigen Enzyme des Proteoms bindet, die eine passende Reaktivität und Struktur besitzen – und außerdem zur Bindung eines potentiellen Substrats in der Lage sind, weil sie in einem aktiven Zustand vorliegen. Deswegen

bedarf die Auswahl der reaktiven Gruppe besonderer Aufmerksamkeit. Zu große chemische Reaktivität kann zur Bindung an zu viele Enzyme eines Proteoms führen. Hinzu kommt, dass auch unspezifische Reaktionen mit den Aminosäuren in den Seitenketten wahrscheinlicher werden. Dadurch wird die Auswertung des Reaktionsmusters durch zu viele Markierungsereignisse kompliziert und die Aussagefähigkeit des Experiments vor allem hinsichtlich der Eignung der Sonde als selektiver Inhibitor vermindert. Ist aber die chemische Reaktivität der reaktiven Gruppe zu gering, wird die Sonde nur sehr wenige oder gar keine Enzyme binden und man kann unter Umständen wichtige biologische Angriffsziele nicht detektieren. Neben der chemischen Reaktivität gilt es zu beachten, dass der Einfluss einer Verbindung auf Enzyme auf verschiedene Weisen erfolgen kann. Zum einen durch eine Reaktion, in der das Enzym kovalent mit dem Substrat verknüpft wird und zum anderen ist auch eine Anbindung durch nichtkovalente Wechselwirkungen über Affinität möglich. Dabei wird keine kovalente Verbindung zwischen Enzym und Substrat hergestellt. Dies ist allerdings für eine ABP-Sonde notwendig, da die weiteren Versuchsbedingungen eines ABPP-Experiments nichtkovalente Wechselwirkungen zerstören und somit nicht angezeigt würden. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten, die dem Design der Sonden zugrunde liegen. Um auch die nichtkovalenten Wechselwirkungen einer Sonde im Proteom visualisieren zu können, muss man die Möglichkeit schaffen, gleichzeitig zu dieser Affinitätswechselwirkung auch eine kovalente Bindung zwischen Sonde und Enzym zu schaffen. Dies gelingt durch einen in der Sonde enthaltenen Photocrosslinker. Es kommen dafür Benzophenon- und Diazirin-Gruppen zum Einsatz (Abbildung 6). Wenn diese UV-Licht ausgesetzt werden bilden sie hochenergetische Triplet- diradikalische Zustände, welche dann mit räumlich benachbarten enzymatischen Aminosäuren reagieren und eine kovalente Verknüpfung zwischen Sonde und Enzym herstellen (Abbildung 7).^[28] Die Reaktion ist nur im Falle einer zuvor erfolgten affinitiven Bindung möglich. Eine „zufällige“ Verbindung durch diffuses Zusammentreffen ist unwahrscheinlich, da die Lebensdauer des reaktiven Tripletzustands zu gering ist.

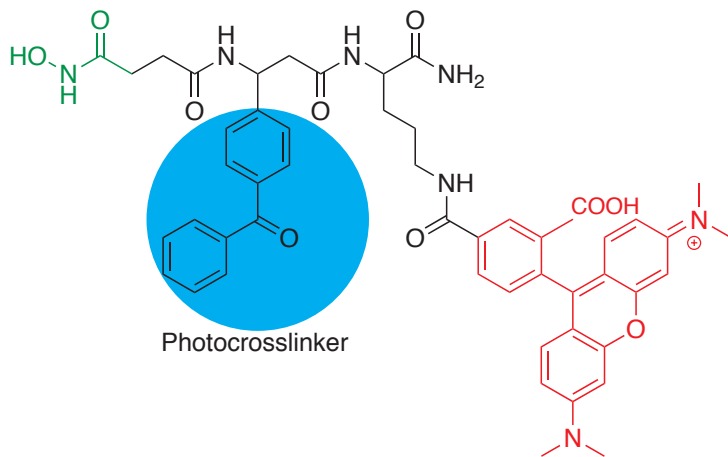


Abbildung 6: Hydroxamatsonde mit Benzophenonrest als Photocrosslinker zur Herstellung einer kovalenten Bindung an ein Enzym

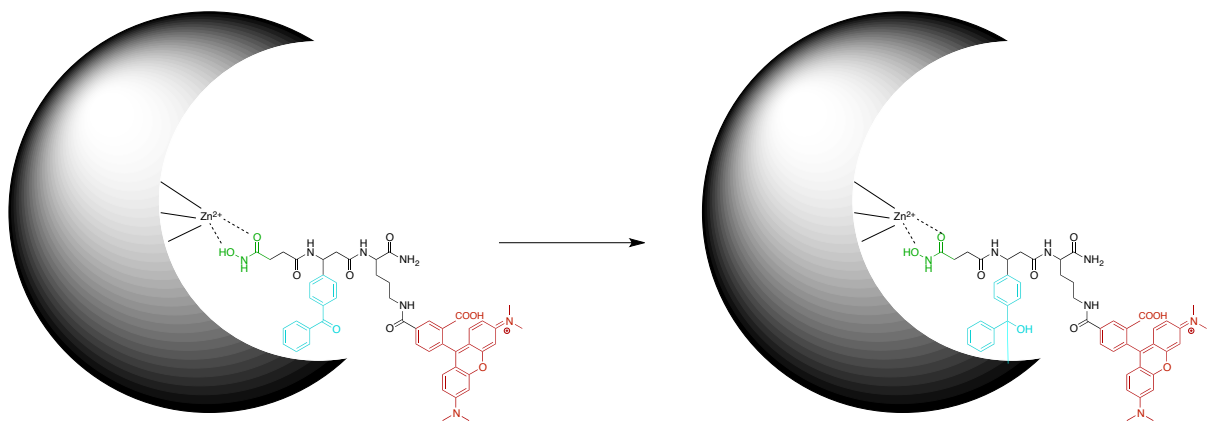


Abbildung 7: Darstellung der affinitiven Wechselwirkung einer ABPP-Sonde mit Photocrosslinker und anschließende kovalente Markierung durch UV-Bestrahlung

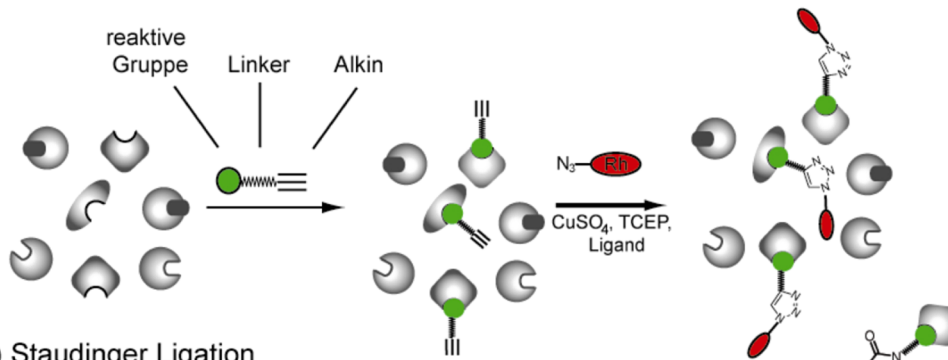
Ein Linker verbindet die Reportergruppe (Farbstoff) und die reaktive Gruppe miteinander. Die einfachsten Linker (Spacer) enthalten Alkyl- oder Polyethylenglykolketten. Sie können in der Länge variiert werden, so dass sie genügend Platz zwischen dem reaktiven Zentrum und dem Farbstoff bieten. Zu beachten ist, dass die Struktur des Linkers aufgrund elektronischer und sterischer Aspekte die Selektivität der Sonde mitbestimmen kann. Zudem besteht die Möglichkeit, neben der reaktiven Gruppe weitere bioaktive Struktureinheiten oder Photocrosslinker zu integrieren und so die Sonde auf unterschiedliche Präferenzen der Substratbindetaschen der Zielenzyme zu optimieren.

Als Reportergruppe (Tag oder Marker) kommen zum Beispiel Biotin- oder Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz (Abbildung A9 und A10). Fluoreszenzmarker wie Tetramethylrhodamin (TAMRA) ermöglichen die extrem empfindliche Visualisierung auch von kleinsten Mengen des Zielproteins. Biotin-Tags dienen in ABPP-Experimenten zur Anreicherung der gebundenen Zielproteine für die massenspektrometrische Identifikation. Dabei wird die Biotin-Avidin-Bindung genutzt, welche als eine der stärksten nichtkovalenten Wechselwirkungen gilt.^[29]

Tag-freie ABPP

Der hohe sterische Anspruch und das hohe Molekulargewicht der verwendeten Reportergruppen kann die Zellgängigkeit der Sonden und deren Bindungsaffinität an Enzyme beeinflussen. Die Anwendung der ABPP-Methodik war daher anfangs meist auf Zelllysate beschränkt. In der Tag-freien ABPP wird die Reportergruppe dagegen erst **nach** Reaktion der Sonde durch eine Cu(I)-katalysierte Huisgen [3+2] Azid-Alkin Cycloaddition (Click-Chemie, CC) oder Staudinger-Ligation mit dem Enzym verknüpft (Abbildung 8). Die Sonde selbst beinhaltet anstatt des Farbstoffs dafür nur eine kleine, sterisch inerte Azid- oder Alkingruppe. Das Produkt der bioorthogonalen Click-Reaktion ist ein 1,4-disubstituierter Triazolring, der dann das markierte Enzym und die Reportergruppe verbindet. Die Reaktionen erfüllen die Voraussetzung hoher Chemoselektivität und die allgemeine Biokompatibilität der Click-Chemie wurde durch *Finn et al.* aufgezeigt.^[30] Diese besonders wichtige Weiterentwicklung der ABPP-Methodik ermöglicht die Visualisierung der untersuchten Reaktionen zwischen Sonde und Enzym *in vivo*, das heißt in der natürlichen Umgebung des lebenden Organismus.

A) Click Chemie



B) Staudinger Ligation

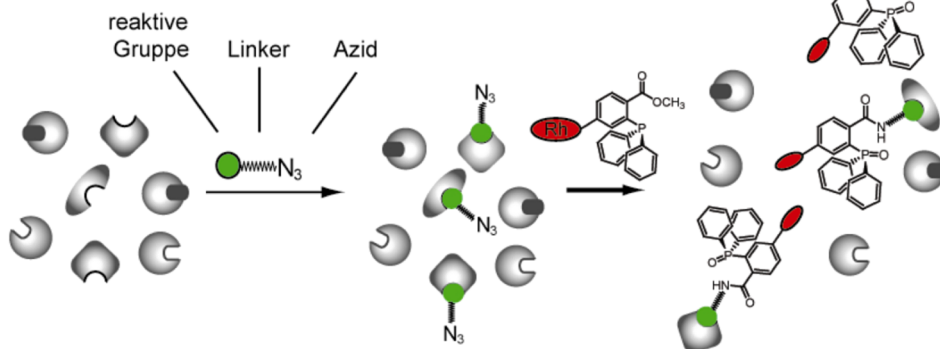


Abbildung 8: Strategien zur Anbindung eines fluoreszierenden Farbstoffs nach Reaktion der ABPP-Sonde (Rh = Rhodamin) mit Enzymen

A) Kupfer(I)-katalysierte Huisgen 1,3-dipolare Cycloaddition (Click-Chemie)

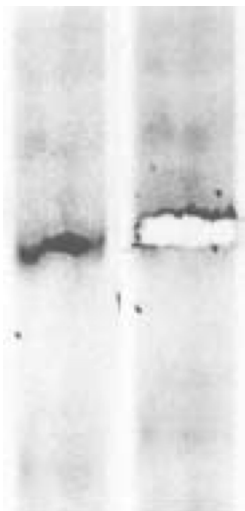
B) Staudinger-Ligation

Analytische Methodik:

Ein typisches Markierungsexperiment beginnt mit der Inkubation des Proteoms oder der lebenden Zellen für einen gewissen Zeitraum mit der Sonde. Durch Vorversuche wird die optimale Konzentration der Sonde und die Inkubationszeit ermittelt. Die Sonden binden entsprechend ihrer Reaktivität und Struktur an aktive Enzyme, wobei für eine *in vivo* Markierung die Sonden zellgängig sein müssen. Die Zellen durchlaufen nach Inkubation einige Waschschrte und werden anschließend durch Ultraschall aufgeschlossen. Das Cytosol und die Membranfraktion werden getrennt, was später Aufschluss darüber geben kann, wo das markierte Enzym lokalisiert ist. Die Click-Chemie ermöglicht im nächsten Schritt das Anbringen des Fluoreszenzfarbstoffs nur an die Enzyme, welche zuvor auch eine Sonde gebunden haben. Nachdem man durch Gelelektrophorese die Enzyme der Größe nach aufgetrennt hat, kann man durch Fluoreszenzaufnahmen nachweisen, ob Enzyme die Sonde gebunden haben. Vergleicht man verschiedene Zustände, kann man bereits hier Interessantes beobachten: Treten im Vergleich von pathogenen und

nichtpathogenen oder zwischen Antibiotika-sensitiven und -resistenten Bakterien Unterschiede in der Fluoreszenzaufnahme auf, so können diese enzymatischen Targets potentiell zu den ausgeprägten unerwünschten Eigenschaften des Bakteriums beitragen (zum Beispiel der Resistenz oder Pathogenese). Man wird diese dann weiter erforschen, da sie bei Inhibition evtl. die Resistenzausprägung oder die Pathogenese regulieren. Um die Identität eines gebundenen Enzyms festzustellen, wird vor der Gelelektrophorese noch ein Anreicherungsschritt durchgeführt. Dabei enthält der Farbstoff auch einen Biotin-Rest, welcher eine starke Wechselwirkung mit Avidin aufweist.^[29] Avidinbeads, welche zum Reaktionsgefäß gegeben werden, binden alle Vertreter mit Biotinbestandteil. Man kann dann durch mehrmaliges Waschen die Enzyme, welche nicht mit der Sonde reagiert haben, entfernen, da diese keine Sonde und damit auch keinen Farbstoff mit Biotin gebunden haben (Abbildung 10). Nach einer Fluoreszenzaufnahme des Gels isoliert man die auftretenden Banden, wobei der Einfallswinkel des UV-Lichts in der Gelkammer mit berücksichtigt werden muss (Abbildung 9).

A)



B)



Abbildung 9:

A) Isolierung einer Gelbande

B) LC-MS-Analyse durch ein Orbitrap System

Daraufhin werden die in den Gelstücken enthaltenen Enzyme nach mehrmaligen Waschschritten durch Trypsin verdaut. Die Serinprotease Trypsin schneidet die

Proteine an definierten Stellen in kleinere Peptide, und nach Extraktion werden die Peptidfragmente durch ein gekoppeltes Chromatographie-Massenspektrometrie-system analysiert. Eine Reverse Phase Nano HPLC trennt die Peptidfragmente zunächst auf, bevor sie via Nanospray-ESI (Elektrospray Ionisation) ionisiert und verdampft werden. Die Peptide werden bei dieser Methode auf den entgegengesetzt geladenen Pol beschleunigt und ein Massenanalysator kann die Fragmente detektieren (Abbildung 10). Die ermittelten Peptidfragmentmassen werden dann mit Enzym-Datenbanken abgeglichen, welche alle aus dem Genom ableitbaren theoretischen Genprodukte und die Massen ihrer Peptidfragmente beinhalten.

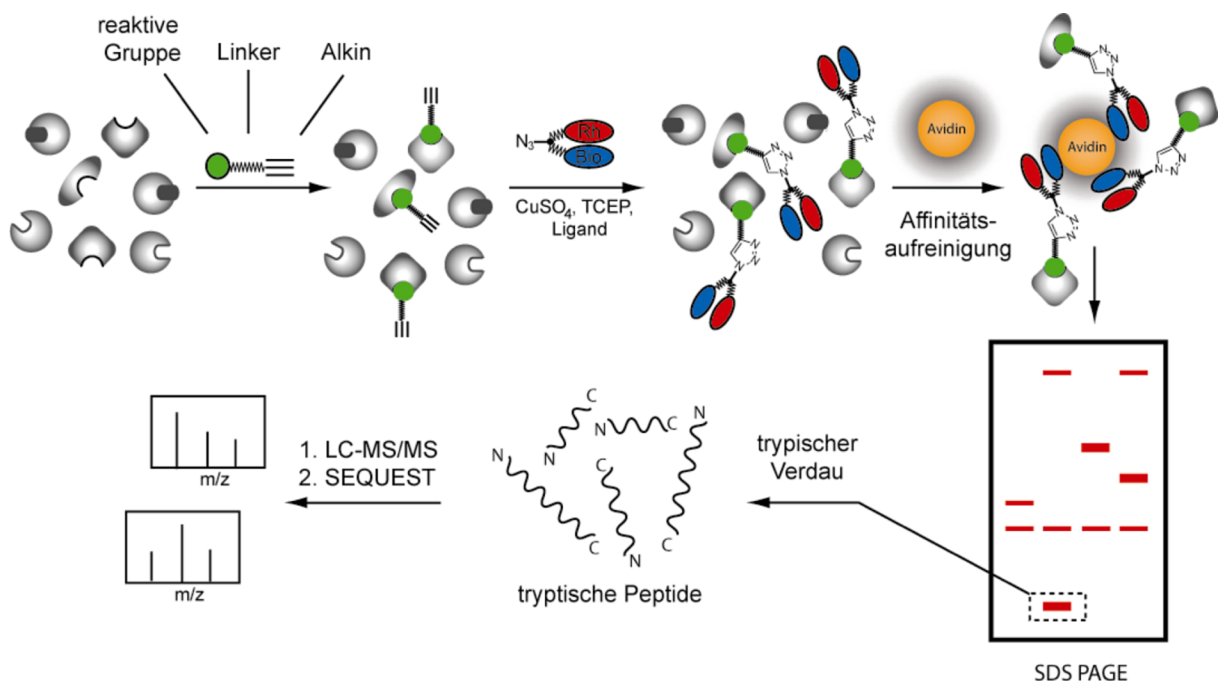


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Identifikation markierter Proteine

Eine Analyse liefert allerdings in den wenigsten Fällen nur ein Protein. Je nach Größe der ausgeschnittenen Bande und der Proteine, sowie der in der Analyse-Software gewählten Fehlertoleranzen, beinhalten die Ergebnisse mehrere mögliche Enzyme. Neben dem Abgleich der gefundenen Proteinmassen mit der Laufhöhe im Gel erleichtert eine Kontrollprobe, welche ohne Sonde durchgeführt wird, bisweilen die Auswahl. Die korrekte Zuordnung der Bande zum markierten Enzym erfordert allerdings nicht selten zusätzliche Literaturrecherchen bezüglich Aufbau des aktiven Zentrums, des Reaktionsmechanismus oder bekannten Inhibitoren.

Strategische Ansätze: Gerichtete und ungerichtete ABPP

Eine Vielzahl reaktiver Gruppen wurden als Leitmotive für die Entwicklung von ABPP-Sonden eingesetzt. Darunter finden sich unter anderem Fluorophosphonate,^[31] Sulfonsäureester,^[32] α -Chloracetamide,^[33] Michael-Akzeptoren^[34] sowie Epoxide, Vinylsulfonsäureester, Diazomethylketone, α -Halogenketone und Acyloxymethylketone (Abbildung 11).^[35]

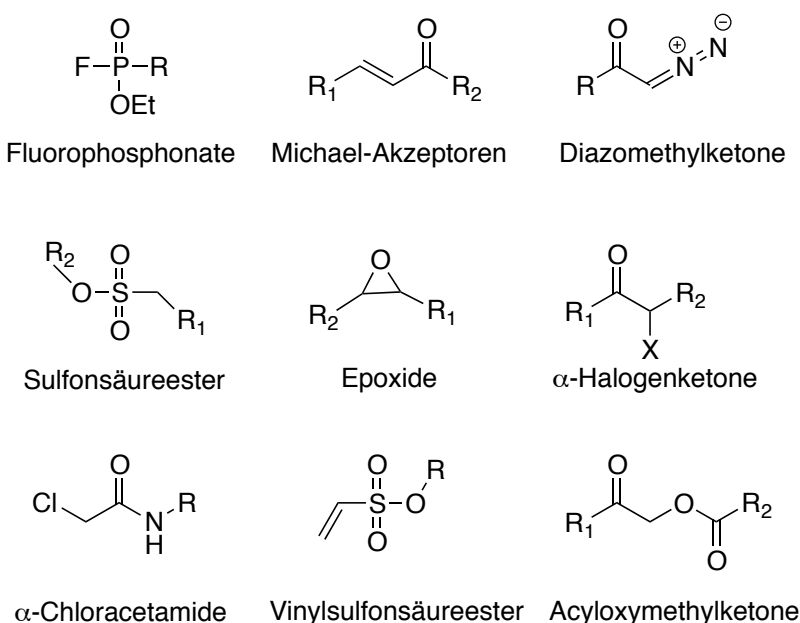


Abbildung 11: Reaktive Gruppen von ABPP-Sonden zur Markierung und Identifizierung von Enzymklassen

ABPP kann entweder mit dem Ziel erfolgen, als gerichteter Ansatz die aktiven Vertreter einer bestimmten Enzymklasse zu detektieren, oder ungerichtet alle biologischen Ziele mit passender Reaktivität und Struktur enzymklassenübergreifend aus dem gesamten Proteom herauszufiltern. Je nach Zielsetzung variiert auch die Auswahl der reaktiven Gruppe. Gerichtete ABPP-Sonden einer Bibliothek sollen an möglichst viele – im Idealfall an alle in der Fragestellung eingeschlossenen – Vertreter einer Proteinklasse in einer der Proteinfamilie entsprechenden, charakteristischen Weise binden. Dadurch erhält man Informationen über den funktionellen Status der Mitglieder und man kann damit auch neue, noch unbekannte Mitglieder dieser Klasse mit bestimmten Eigenschaften finden. Des Weiteren ist es möglich, die Mitglieder einer Enzymklasse nach ihren Präferenzen für Substrate in

Verbindung mit den dafür notwendigen Aminosäuresequenzen um das aktive Zentrum weiterhin zu differenzieren. Als herausragendes Beispiel für den Erfolg dieses Ansatzes sei die Entwicklung einer Sondenbibliothek mit Hydroxamat-Motiv genannt. Diese Sonden sind sozusagen Chelatbildner für die zweiwertigen Zinkionen im aktiven Zentrum von Metalloproteasen. Mit diesen Sonden konnte beispielsweise die Familie der Metalloproteasen untersucht werden, die an Krebserkrankungen beteiligt sind.^[28, 36] Weiterhin reagieren z.B. Fluorophosphonate hoch spezifisch mit Enzymen der Serinhydrolasefamilie, Epoxide, Vinylsulfone, Diazomethylketone, α -Halogenketone und Acyloxymethylketone zeigen eine deutliche Präferenz für Cysteinproteasen. Sulfonate, α -Chloracetamide und Michael-Akzeptoren reagieren dagegen weitgehend ungerichtet und können je nach struktureller Dekoration der Sonde mit einer Vielzahl verschiedener Enzymklassen reagieren.^[37] Häufig entwickeln sich Erkenntnisse über spezifische Inhibitoren für bestimmte Enzyme aus der Weiterentwicklung einer Sondenstruktur, die zuvor in einem ungerichteten Ansatz entdeckt wurde. Der ungerichtete ABPP-Ansatz geht von der Annahme aus, dass ein mäßig reaktives Kohlenstoffelektrophil bevorzugt im aktiven Zentrum von Enzymen reagieren sollte, wenn dieses eine erhöhte Dichte an ausreichend nukleophilen Stellen aufweist.^[38] Durch Variieren der chemischen Reaktivität einer Sonde kann das komplexe Proteom im Hinblick auf die chemischen Reaktionsmerkmale des Enzyms differenziert werden. Mit diesem Ansatz wird gearbeitet, um Enzyme zu markieren, deren Eigenschaften noch nicht oder nicht gut genug bekannt sind und dementsprechend auch keine Inhibitoren für das Sondendesign zum Vorbild genommen werden können. Das strukturelle Design kann in einem zweiten Schritt, auf Basis der so erhaltenen Resultate, für die Bindung an nur eine gewünschte Enzymklasse optimiert werden. So konnte zum Beispiel die Reaktivität von Michael-Akzeptoren wie Zimtaldehyde oder Arylvinylnsulfonate und Arylsulfone erfolgreich für die Markierung von Phosphatasen eingeschränkt werden.^[34b, 34c, 39] Die so ermittelten, biologisch wirksamen chemischen Gruppen können dann zielgerichtet in Leitstrukturen zur Entwicklung neuer Medikamente eingehen. Es wurden bereits Sondenbibliotheken mit diesem Ansatz erstellt, wodurch eine Vielzahl unbekannter aktiver Zentren von Enzymen mehrerer verschiedener Enzymklassen charakterisiert werden konnten.^[34a] Bemerkenswert ist dabei, dass einige der so identifizierten Proteine zuvor von gerichteten ABPP-Sondenbibliotheken, in denen gezielt nach Mitgliedern mit bestimmten Eigenschaften gesucht wurde, nicht markiert wurden.^[32]

Dies unterstreicht den Nutzen chemisch und strukturell vielfältiger Sondenbibliotheken zur Identifizierung neuer Proteinziele.

1.4 β -Lactamantibiotika – Wirkung und Resistenz

Im Kampf um Nährstoffe und zur Erhöhung der Konkurrenzfähigkeit besitzen Pilze aber auch Bakterien die Fähigkeit, Substanzen zu produzieren, mit denen sie das Wachstum konkurrierender Mikroorganismen einschränken oder sie zerstören können.^[5] Der schottische Forscher Alexander Fleming beobachtete 1928, dass in der Umgebung von Kulturen des Schimmelpilzes *Penicillium notatum* Bakterien an ihrer Vermehrung gehindert wurden. Der Grund für diese Wachstumshemmung ist das von den Pilzen gebildete Penicillin G. Penicillin gehört zu einem der bekanntesten Arzneimittel der heutigen Zeit^[5] und seine Entdeckung begründete die Stoffgruppe der β -Lactamantibiotika. Die β -Lactamantibiotika wurden als erste Naturstoffklasse zur Therapie bakterieller Infektionen verwendet.^[8] Das Gerüst der Penicilline wird aus den Aminosäuren L-Cystein und D-Valin aufgebaut, wie es die gestrichelten Linien in Abbildung 12 andeuten.^[40]

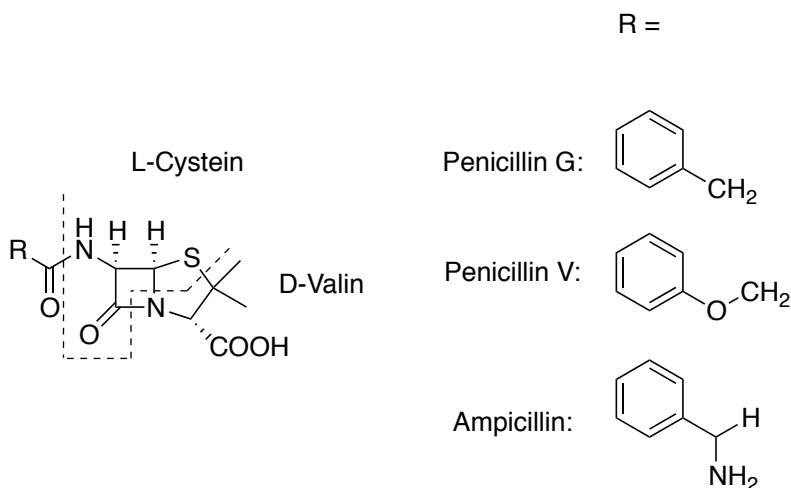


Abbildung 12: Aufbau des Penicillingerüsts aus den Aminosäuren

Natürliches Penicillin musste noch bezüglich etlicher kritischer Parameter verbessert werden: z.B. im Hinblick auf das schmale antibakterielle Spektrum, die Instabilität in saurer (Magen) und basischer Umgebung (Darm), die geringe Löslichkeit, die

ausgeprägte Hydrolyseempfindlichkeit und die schnelle Ausscheidung aus dem Körper. Strukturvariationen dieses β -Lactamgerüsts führten zu wirksameren Derivaten mit verbesserten physikochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften.^[8] Aufgrund dessen und der Ausarbeitung und Optimierung von fermentativen Verfahren für die Gewinnung dieser Naturstoffe oder ihrer Vorläufer in größeren Mengen dauerte es so noch gut 20 Jahre, bis Penicillin für die Patienten verfügbar war.^[41] Neben der Notwendigkeit, stabile und potente Derivate dieser empfindlichen Naturstoffe zu entwerfen, musste noch ein weiteres Problem gelöst werden. Denn bald nach den ersten Therapieerfolgen erkannte man, dass sich die Bakterien mit der Entwicklung spezieller Enzyme, die den für die Wirkung essentiellen Bestandteil, den β -Lactamring hydrolytisch spalten (β -Lactamasen, Penicillinasen: Spaltung des Penicillingerüsts), gegen die Behandlung zu wehren wussten. Sie wurden gegen Penicillin resistent. Der Wirkung der Penicillinasen versuchte man zu begegnen, indem der Angriff dieser Enzyme durch sterisch anspruchsvolle Seitenketten blockiert werden sollte. In der Folge ging es darum, die Stabilität gegen den enzymatischen Abbau zu verbessern. Die Fähigkeit von Bakterien und Pilzen, antibiotische Substanzen zu produzieren, wurde dazu rasch von der Medizin aufgegriffen.^[5] Nachdem die antibakteriellen Eigenschaften von Penicillinverbindungen erkannt worden waren, setzte eine intensive Suche nach antibiotikaproduzierenden Mikroorganismen ein. 1953 fand man ebenfalls in Pilzkulturen den Naturstoff Cephalosporin C (Abbildung 13). 1955 wusste man, dass Cephalosporine gegen ein breites Spektrum von Bakterien wirksam sind und nicht von Penicillinasen zerstört werden.

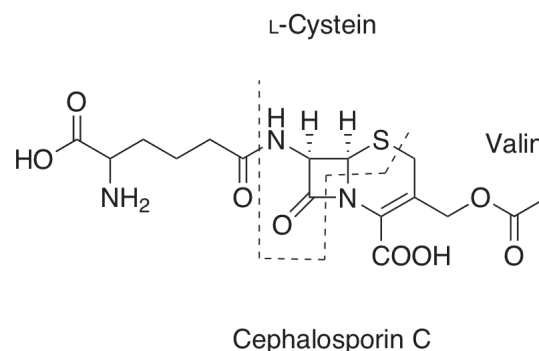


Abbildung 13: Cephalosporin C und dessen Aufbau aus Aminosäuren

Jahr für Jahr wurden dann zahlreiche neue, halbsynthetische Derivate von Cephalosporinen und Penicillinen hergestellt.^[42] Während anfangs im Wesentlichen die Seitenketten an den Penamen (Penicillin-Struktur) und Cephemen (Cephalosporin-Struktur) strukturell variiert wurden, um die Pharmakokinetik und das Wirkspektrum zu verbessern, war die treibende Kraft für die Entwicklung weiterer Strukturvariationen später die zunehmende Resistenz der Erreger auch gegen die Cephalosporine.^[41, 43] Dennoch blieben die Penicilline und Cephalosporine über fast 30 Jahre die einzigen β -Lactamantibiotikagruppen. Ab 1970 wurden dann verwandte Untergruppen entdeckt: Monobactame wie Aztreonam, Oxapeneme wie Clavulansäure, Carbapeneme wie Imipenem, Oxapeneme, Oxacepheme und Peneme (Abbildung 14).^[8]

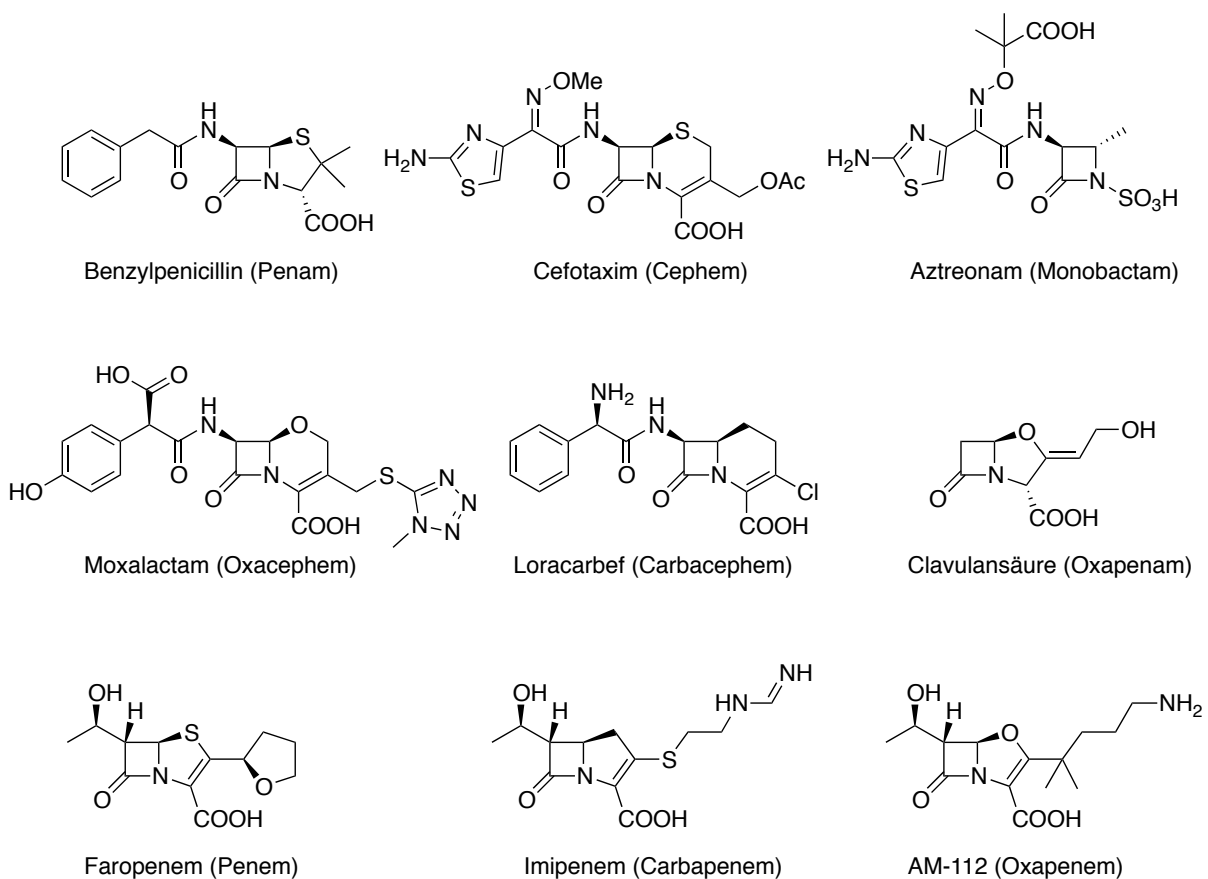


Abbildung 14: Beispiele verschiedener Wirkstoffe aus den β -Lactamgrundstrukturen

Ein Blick auf die Strukturformeln der β -Lactamantibiotika zeigt das charakteristische Merkmal aller β -Lactamantibiotika: den viergliedrigen Azetidinon- oder β -Lactamring. In den meisten Antibiotika ist der gespannte und chemisch reaktive viergliedrige

β -Lactam- oder Azetidinonring mit einem weiteren fünf- oder sechsgliedrigen Ring anelliert,^[8] woraus sich verschiedene Klassen von β -Lactamantibiotika ergeben.

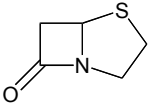
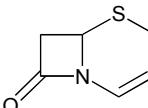
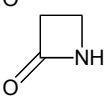
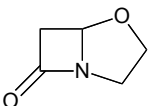
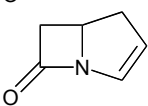
Struktur	Klasse	Beispiel	Precursor
	Penicilline	Penicillin G	Cystein, Valin, α -Amino-adipinsäure
	Cephalosporine / Cephamycine	Cephalosporin C	Cystein, Valin, α -Amino-adipinsäure
	Monobactame	Nocardicin A	Serin, Methionin, <i>p</i> -Hydroxy-phenylglycin
	Oxapeneme (Clavame)	Clavulansäure	Arginin, Glyceraldehyd-3-phosphat
	Carbapeneme	Car	Acetat, Glutamat

Tabelle 1: Wichtige Grundstrukturen von β -Lactamantibiotika und ihren Precursoren

β -Lactame sind intramolekulare Amide und besitzen zwangsläufig die energiereichere *E*-Konfiguration (Abbildung 15). Während man offenkettige (*Z*-konfigurierte) Amide zur alkalischen Hydrolyse mit KOH 24 Stunden in siedendem Glykol (198 °C) erhitzen muss, reagieren die β -Lactame mit einem Nukleophil bei wesentlich milderen Bedingungen unter Ringöffnung. Bei dem bicyclischen Gerüst der Penicilline tritt die Amidspaltung schon mit dem wenig nukleophilen Wasser und bei Raumtemperatur langsam ein. Dies liegt nicht nur an der *E*-Konfiguration und der zusätzlichen Vierring-Spannung, sondern auch am angegliederten Fünfring: Aus Spannungsgründen kann das Stickstoffatom nicht mehr planar (sp^2 -hybridisiert) sein, wodurch die Amid-Mesomerie geschwächt wird.^[44] Die Amid-Reaktivität von Cephalosporinen wird durch die Konkurrenz der Enamin-Mesomerie mit der Amid-Mesomerie hervorgerufen.^[40, 45] Die Lactamfunktion der β -Lactamantibiotika stellt somit ein Acylierungsmittel dar, welches mit geeigneten Nukleopilen unter Ringöffnung reagieren kann.^[46]

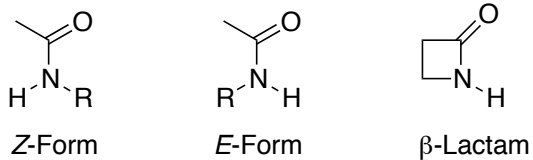


Abbildung 15: Konfigurationen der Peptidbindung im Vergleich zur Lactambindung

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von penicillingschädigten Zellen lieferten frühzeitig Hinweise darauf, dass die bakterielle Zellwand der primäre Wirkort der β -Lactamantibiotika ist.^[47] Die Wirkung der β -Lactamantibiotika wurde erstmals direkt dadurch nachgewiesen, dass die zellwandsynthetisierenden Enzyme radioaktiv markiertes Penicillin durch nukleophile Reste in ihrer Substratbindetasche kovalent unter Ringöffnung zu binden vermochten.^[47] Die Bindung hindert die Bakterien an der ordnungsgemäßen Ausbildung ihrer Zellwand und tötet sie dadurch ab. Aus diesem Wirkmechanismus erklärt sich auch die gute Verträglichkeit der β -Lactamantibiotika. Da im tierischen und menschlichen Organismus Zellwände, wie sie Bakterien bilden, nicht vorkommen, sind Nebenwirkungen durch Wechselwirkung mit Enzymen des Patienten selten.

Wirkmechanismus

Die Zellwand von Bakterien wird als Mureinsacculus bezeichnet und besteht überwiegend aus dreidimensional vernetzten Peptidoglykansträngen. Die Funktion dieser Zellwand ist der Schutz der Zelle vor Cytolyse, die in einer normalerweise niedrig osmolaren Umgebung aufgrund des sehr hohen intrazellulären osmotischen Drucks eintreten würde.^[48] Da die Bakterienzellen bei ausreichender Ernährung rasch unter Zellvergrößerung wachsen, muss die Zellwand kontinuierlich angepasst werden, wofür ein stetiger Umbau erforderlich ist. Die hieran beteiligten Enzyme zeigen mehrere Aktivitäten: Transglycosidasen katalysieren den Aufbau der Zellwand, indem neue Disaccharid-Pentapeptidbausteine über glycosidische Bindungen an freie Glycanstränge angehängt werden. Durch Transpeptidasen werden die Peptidseitenketten über Isopeptidbindungen quervernetzt und Carboxypeptidasen spalten das C-terminale D-Alanin aus der D-Alanyl-D-Alanin-Bindung zur Knüpfung einer neuen Isopeptidbrücke ab. Endopeptidasen sind durch

Spaltung von Isopeptidbrücken am Abbau nicht mehr benötigter Stränge beteiligt (Abbildung 16).^[47]

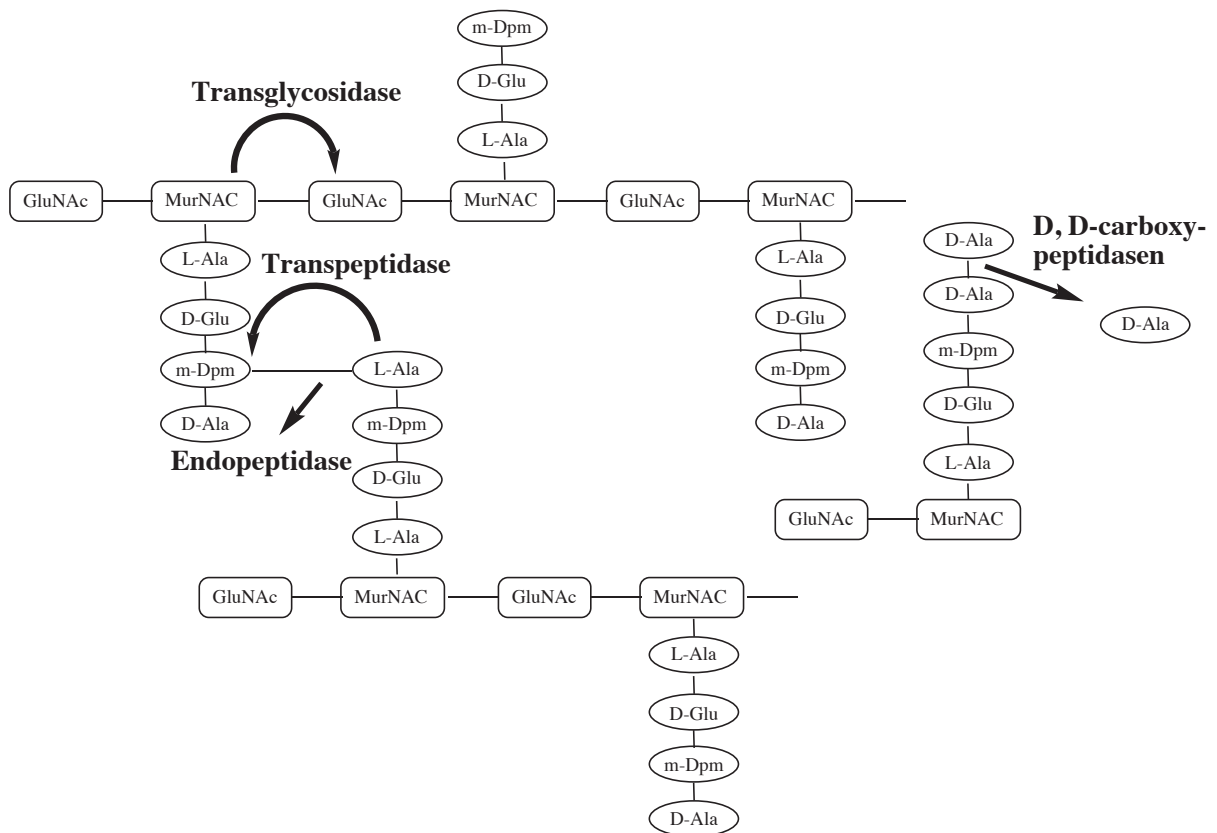
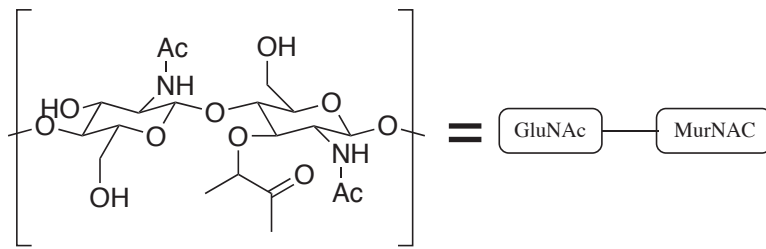


Abbildung 16: Biosyntheseprozesse der bakteriellen Zellwand und die beteiligten Enzyme

Dabei werden zellwandaufbauende Enzyme Penicillin-bindende Proteine (PBP) genannt. β -Lactamantibiotika inhibieren diese klassischen PBP und hemmen dadurch das Bakterienwachstum.^[49] Der Begriff Penicillin-Bindeprotein ist historisch geprägt und der Definition gemäß werden alle Enzyme **unabhängig von ihrer Funktion** PBP genannt, die β -Lactame erkennen und / oder metabolisieren. Demnach umfasst der Begriff PBP aber nicht nur die gerade erwähnten Enzyme, sondern auch Enzyme, die nicht an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind, wie zum Beispiel β -Lactamasen – wichtige resistenzvermittelnde Enzyme, auf die im letzten

Teil dieses Kapitels noch näher eingegangen wird. Fast allen PBP ist ein konservierter Serinrest im aktiven Zentrum gemeinsam. PBP sind biochemisch gesehen also Serinproteasen. Lediglich ein Beispiel für ein PBP aus der Gruppe der von Zink abhängigen Proteasen ist bekannt. In allen bislang untersuchten Bakterien mit Zellwand finden sich zwischen vier und acht PBP.^[47] Die Enzyme verwechseln dabei β -Lactamantibiotika mit den C-terminalen L-Lys-D-Ala-D-Ala-Enden der Murein-Peptidketten, die sie vernetzen sollen.^[8, 50]

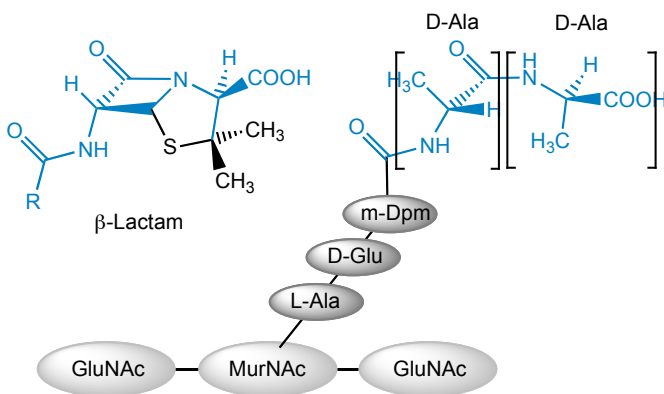


Abbildung 17: Strukturvergleich zwischen einem β -Lactamantibiotikum und einer Murein-Peptidkette

Der Serinrest im aktiven Zentrum von PBP öffnet in einem nukleophilen Angriff den elektrophilen β -Lactamring unter Bildung eines inerten Acyl-Enzym-Intermediats.^[8] Der resultierende Serinester ist ein strukturelles Analogon des eigentlichen Substrats, bei dem es sich um einen Übergangszustand der enzymatischen Umsetzung des C-terminalen D-Ala-D-Ala-Rests der Disaccharid-Pentapeptidbausteine handelt. Im Unterschied zum natürlichen Substrat wird jedoch die zunächst geknüpfte Serinesterbindung zum β -Lactamantibiotikum nur sehr langsam hydrolysiert, wodurch das PBP-Enzym irreversibel blockiert wird (Abbildung 18).^[43, 47, 51] Die antibiotische Aktivität von β -Lactamen resultiert damit aus ihrer Fähigkeit, ein PBP unter Öffnung des β -Lactamrings leicht zu acylieren, während die Deacylierung sehr viel langsamer abläuft. Durch diese Beeinträchtigung des korrekten Ablaufs der Zellwandbiosynthese werden Autolysine freigesetzt, welche die Zellwand verdauen.^[43, 52] Die daraus folgenden Vernetzungsschäden im Peptidoglycan sind für empfindliche Mikroben tödlich, da die Zellwand an Struktur und Festigkeit verliert und die Zellmembran dem osmotischen Druckunterschied zwischen Umwelt und Zellinneren nicht mehr standhalten kann.

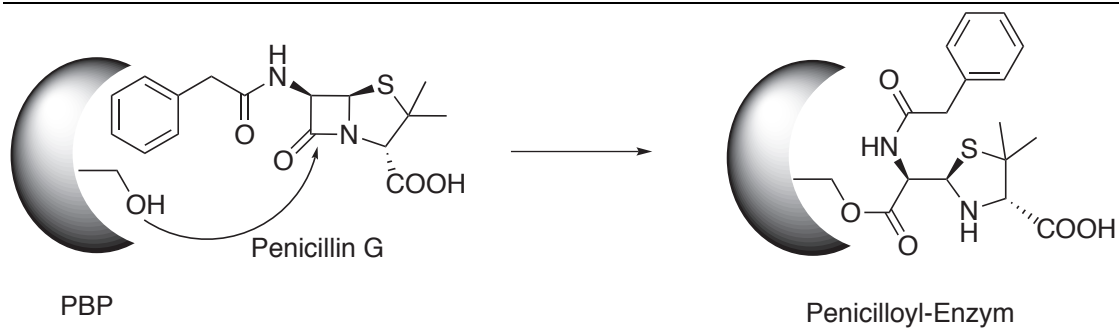


Abbildung 18: Irreversible Inhibition eines PBP durch Penicillin G

Resistenzmechanismen

Bereits kurze Zeit nach dem ersten Einsatz von Antibiotika konnten die ersten Resistenzentwicklungen bei Bakterien beobachtet werden. 1960 waren bereits 60 % aller klinischen Isolate von *Staphylococcus aureus* gegenüber Penicillin resistent.^[5] 2006 berichtete das „Center for Disease Control and Prevention“ für methicillin-resistenten *S. aureus* über 19000 Tote und 105000 MRSA-infizierte Patienten.^[5, 53] Die Entwicklung bakterieller Resistenz gegenüber β -Lactamantibiotika stellt damit ein großes therapeutisches Problem dar. Das Auftreten in großer Zahl, die hohe Vermehrungsrate und die Mutationshäufigkeit sind Gründe für das rasche Auftreten von Resistenz.^[5] Mechanistisch lassen sich drei Wege der Resistenzentwicklung gegen β -Lactamantibiotika unterscheiden, die teilweise allein, teilweise aber auch in Kombination zur Entwicklung von klinisch relevanter Resistenz geführt haben.^[47]

- die Produktion inaktivierender Enzyme
- die Bildung modifizierter Zielstrukturen
- die Reduktion der Antibiotikakonzentration an der Zielstruktur durch Veränderungen der Membraneigenschaften (was in Kombination mit den zuvor aufgeführten Mechanismen zur Erhöhung einer Resistenz führt)

Die Bildung von β -Lactamasen ist der häufigste Resistenzmechanismus bei β -Lactamantibiotika.^[43] Diese Enzyme inaktivieren das β -Lactamantibiotikum, indem sie den β -Lactamring hydrolytisch spalten, bevor es das bakterielle Ziel (ein PBP) erreichen kann.^[54] Im Gegensatz zu PBP sind diese Enzyme so aufgebaut, dass sie

β -Lactame nicht nur effizient acylieren, sondern auch die Deacylierung schnell zulassen. Es kommt also nicht zu einer irreversiblen Inhibierung der katalytischen Aktivität (Abbildung 19). Die β -Lactamase wird regeneriert und kann weitere β -Lactammoleküle spalten, bevor diese an ein PBP binden können.^[43] Die PBP können ihre Aufgabe in der Zellwandsynthese dadurch weiterhin wahrnehmen und das Bakterium überlebt die Antibiotikabehandlung.

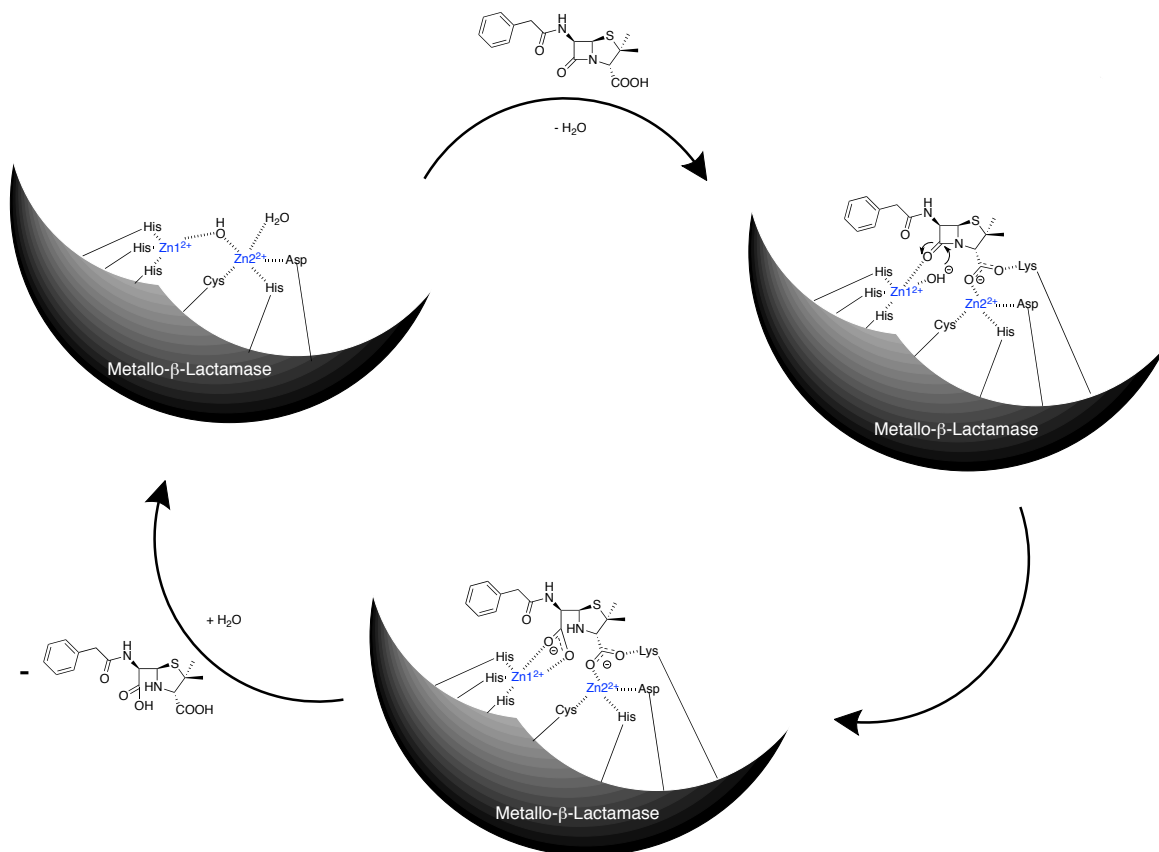


Abbildung 19: Hydrolyse der β -Lactamverbindung durch eine Metallo- β -Lactamase^[55]

Zwei chemisch unterschiedliche Reaktionswege ermöglichen einer β -Lactamase die Hydrolyse der Lactamverbindung. β -Lactamasen vom Typ der Serinproteasen hydrolysieren den β -Lactamring nach Abbildung 20. Durch eine Base wird das Acyl-Enzym-Intermediat gebildet, welches sofort von Wasser zum hydrolysierten β -Lactam und dem regenerierten aktiven Enzym gespalten (deacyliert) wird.^[56]

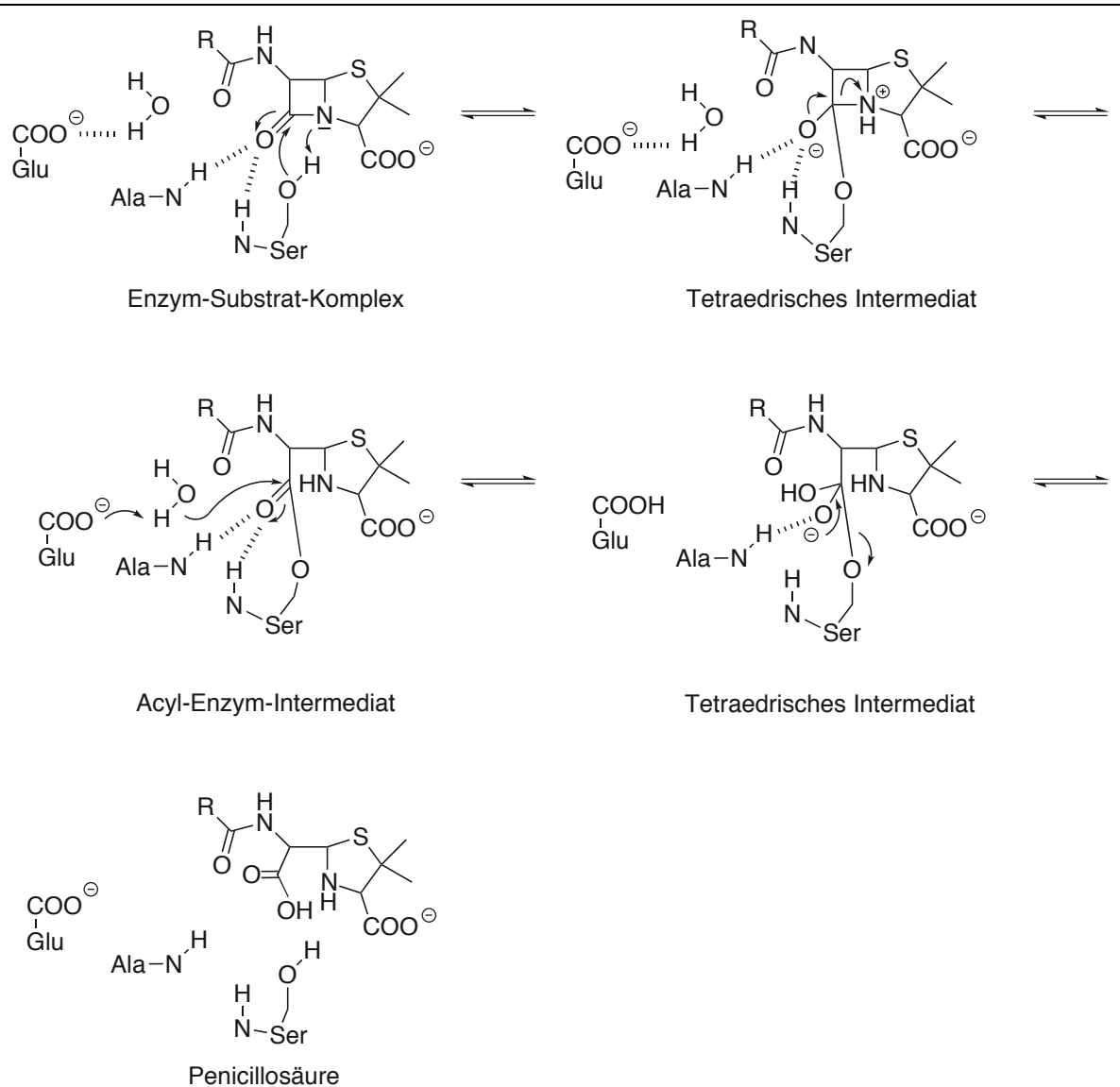


Abbildung 20: Hydrolyse eines β -Lactamantibiotikums durch β -Lactamasen vom Typ der Serinproteasen

β -Lactamasen vom Typ der Metalloenzyme hydrolysieren den Lactamring mit Hilfe eines Metallions, welches sich komplexiert durch Histidinreste in der aktiven Tasche der Metallo- β -Lactamase befindet (Abbildung 21). Das Zinkion im aktiven Zentrum einer Metallo- β -Lactamase aktiviert die Lactambindung, so dass ein Hydroxidligand in einem nukleophilen Angriff die Spaltung des β -Lactamrings initiieren kann.^[56]

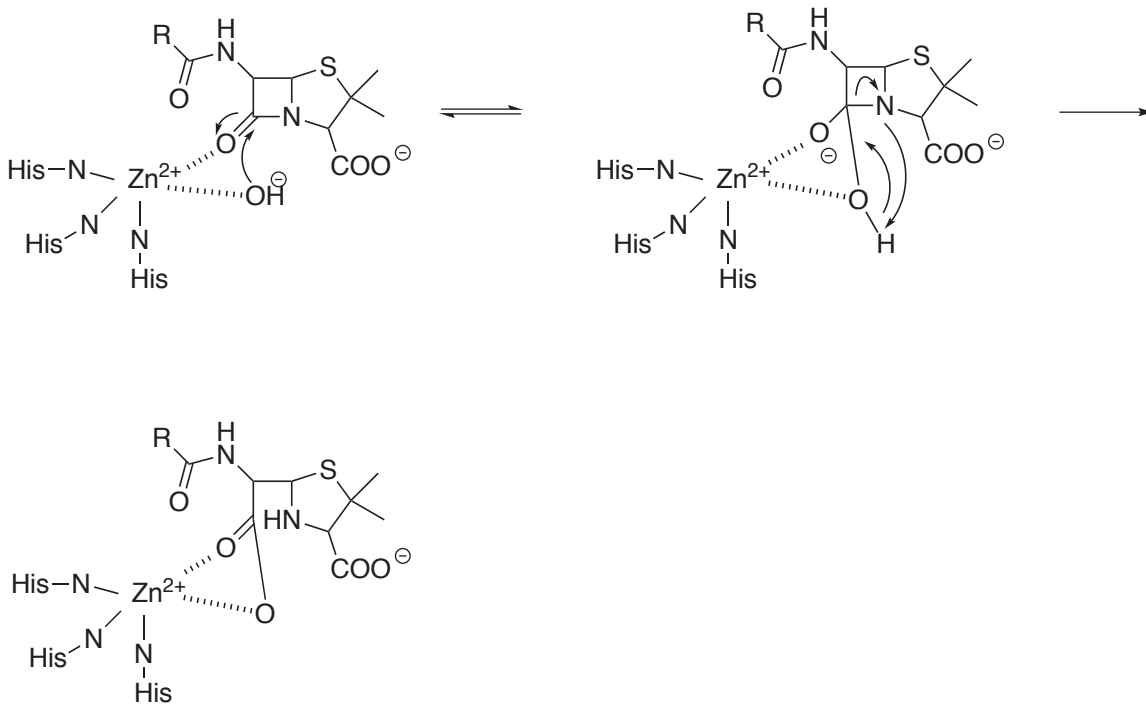


Abbildung 21: Hydrolyse eines β -Lactamantibiotikums durch Metallo- β -Lactamasen

Zwei verschiedene Strategien werden genutzt, um die Wirksamkeit von neuen β -Lactamantibiotika zu erhalten. Zum einen verändert man die chemische Struktur von herkömmlichen β -Lactamverbindungen, um eine erhöhte Hydrolysestabilität gegenüber β -Lactamasen zu erreichen. Durch Variationen meist in den Seitenketten erkennt die β -Lactamase die veränderte Struktur dann nicht mehr als Substrat an. Die zweite Strategie basiert auf einer kombinierten Gabe des β -Lactamantibiotikums mit einem β -Lactamase-Hemmer (Abbildung 22). Die Mechanismus-basierten Inhibitoren besitzen selbst keine antibiotische Aktivität, werden aber von der β -Lactamase gebunden.^[43] Dadurch wird die antimikrobielle β -Lactamsubstanz geschützt, so dass sie ihre Aufgabe erfüllen kann.^[57]

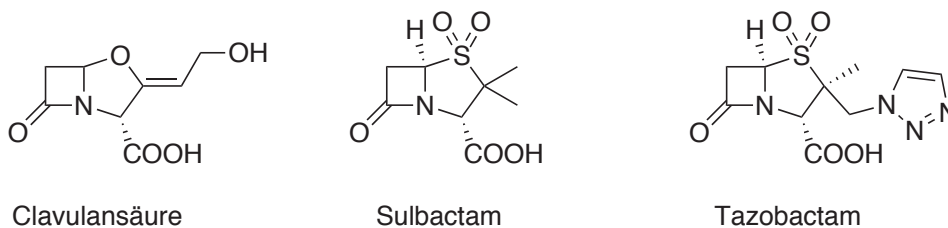


Abbildung 22: Struktur von in Kombinationspräparaten eingesetzten β -Lactamase-Inhibitoren

Clavulansäure inhibiert eine β -Lactamase irreversibel nach Abbildung 23. Die serinbasierte β -Lactamase wird durch Clavulansäure acyliert. Nach einem 1,5-H-Shift entsteht zunächst ein Imin-Intermediat, welches mit den mesomeriestabilisierten Enamin-Formen im Gleichgewicht steht und daher nur noch sehr langsam deacyliert werden kann.^[56]

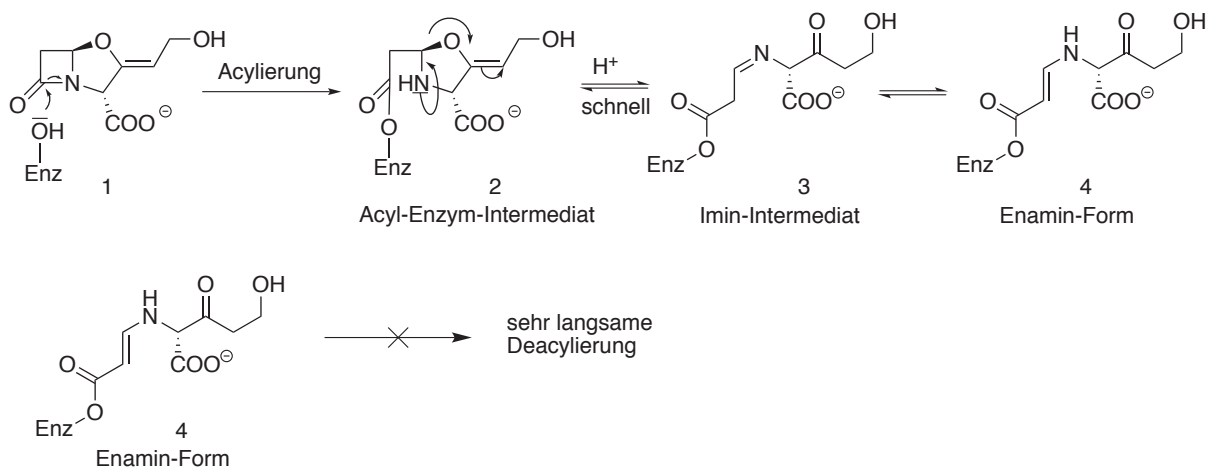


Abbildung 23: Inhibition einer Serin- β -Lactamase durch Clavulansäure

β -Lactamasen werden von nahezu allen Bakterien gebildet, wobei die klinische Relevanz unter den gram-negativen Bakterien weit größer ist.^[47] Seit der Entdeckung und Weiterentwicklung von β -Lactamantibiotika haben sich β -Lactamasen ebenfalls in Abhängigkeit vom gewachsenen Selektionsdruck mitentwickelt.^[58] Derzeit sind ca. 500 β -Lactamasen bekannt,^[59] wobei diese Zahl kontinuierlich steigt. Aufgrund der großen Zahl an β -Lactamantibiotikastrukturen und dem breiten Einsatz von Cephalosporinen der 2. bis 4. Generation ergibt sich eine erstaunliche Diversität dieser Enzyme.^[58] Die klinische Bedeutung der β -Lactamasen liegt vor allem in dieser Vielfalt und Anpassungsfähigkeit an das β -Lactamantibiotikum. β -Lactamasen können nach ihrer Funktionalität (*Bush-Jacoby-Medeiros*, 1995) oder nach ihrer Molekülstruktur (*Ambler*, 1980) klassifiziert werden,^[58-59, 60] wobei diese Einteilungen immer wieder erweitert werden müssen. Wichtige therapierelevante Charakteristika von β -Lactamasen umfassen u.a. die Fähigkeit, eine β -Lactamstrukturklasse zu hydrolysieren und die Möglichkeit der Inhibition durch β -Lactamase-Inhibitoren wie Clavulansäure,^[61] Sulbactam^[62] und Tazobactam.^[63]

Des Weiteren ist auch die Lage und Eigenschaft der zugehörigen genetischen Information ein wichtiges Kriterium.

Nach einer Arbeit von *Ambler et. al* werden die oben genannten Enzyme in vier molekulare Klassen A, B, C und D eingeteilt.^[64] Die Klassen A, C und D sind Serinproteasen, in denen Serin die Spaltung des β -Lactamrings katalysiert.

Ambler Klasse A β -Lactamasen sind vor allem Penicillinasen, das heißt sie hydrolysieren β -Lactamantibiotika, deren Grundstruktur auf dem Penicillingerüst basiert. Sie sind die am längsten bekannte Klasse und ihr Vorkommen im klinisch relevanten Pathogen *S. aureus* hat schon früh die Entwicklung von neueren 2. und 3. Generationen von β -Lactamantibiotikastrukturen gefördert, darunter Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame.

Klasse C β -Lactamasen besitzen im Vergleich zu Klasse A größere Substratbindetaschen, wodurch sie die Möglichkeit erhalten, die sterisch anspruchsvolleren extended-spectrum Cephalosporine umzusetzen. Sie hydrolysieren Cephalosporine der ersten Generation mit Umsatzraten von bis zu 5000 sec^{-1} . Sie können von Klasse A durch diese phänotypische Resistenz gegen Cephalosporine und der Immunität gegen β -Lactam- β -Lactamase-Inhibitor Kombinationstherapie unterschieden werden. Resistenzen aufgrund von Enzymen der Klassen A und C sind heute von besonderer klinischer Bedeutung, doch die anderen Klassen holen auf.

Klasse B repräsentieren Metallo- β -Lactamasen, bei denen sich im aktiven Zentrum ein zweikerniger Zinkkomplex anstelle von Serin befindet. Dank dieser besonderen Struktur können diese Enzyme sehr unterschiedlich substituierte β -Lactame hydrolysieren. Metallo- β -Lactamasen besitzen ein breites Aktivitätsspektrum, sie hydrolysieren nicht nur Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme, sondern auch die Serin- β -Lactamase-Inhibitoren wie Clavulansäure.^[65] Das Metallzentrum dient nicht nur zur Katalyse, sondern auch zur Substraterkennung, da sich produktive Wechselwirkungen zwischen einem Metallzentrum und funktionellen Gruppen ausbilden können. Metallo- β -Lactamasen können durch Chelatbildner inhibiert werden. Jedoch enthalten viele andere hydrolytische Enzymsysteme ebenfalls zweikernige Metallzentren, was das Design von selektiven Inhibitoren schwierig macht.^[55] Durch Plasmid-Transfer verbreiten sich zudem die Resistenzgene schnell auf andere Bakterienspezies. Metallo- β -Lactamasen stellen durch diese Eigenschaften eine explizite Bedrohung dar, da sie in hochpathogenen Keimen

vorkommen, welche oft gegen die meisten Antibiotika bereits resistent sind. Die in Verwendung stehenden β -Lactamantibiotika sind in unterschiedlichem Ausmaß gegenüber β -Lactamasen widerstandsfähig. Aber die Anzahl der Pathogene, welche β -Lactamasen mit verbreiteter Wirksamkeit gegen fast alle gängigen β -Lactamantibiotika entwickeln, steigt ständig. Nicht nur neue β -Lactamasen, sondern vor allem eine Effizienzsteigerung der schon lange bekannten Enzyme stellen die Medizin vor große Herausforderungen. Sogenannte extended-spectrum β -Lactamasen (ESBL) können durch Punktmutation im genetischen Code klassischer β -Lactamasen entstehen. Ein Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum kann ihr Wirkungsspektrum auf gängige Breitband-Antibiotika und Reserveantibiotika erweitern, so dass Therapieoptionen eingeschränkt werden.^[58, 66]

Veränderungen der Zielstruktur ist ein weiterer Mechanismus der Resistenz gegenüber β -Lactamantibiotika, die klinisch relevant vor allem bei gram-positiven Bakterien beobachtet werden.^[47] Hier tritt die Resistenz dadurch in Erscheinung, dass ein PBP in seiner Struktur abgeändert vorliegt, so dass es nur geringe Affinität gegenüber einer β -Lactamantibiotikastruktur aufweist.^[43] Bei Hemmung der übrigen PBP durch das Antibiotikum kann dieses dann die essentiellen Zellwandsynthesereaktionen übernehmen. Das β -Lactamantibiotikum kann seine Aufgabe nicht mehr erfüllen, da es nicht mehr als Substrat anerkannt wird und das Bakterium überlebt die Behandlung. Die Wahl des richtigen Wirkstoffs ist nicht nur für den Therapieerfolg maßgebend, sondern auch für die Eindämmung der Selektion resistenter Organismen während der Therapie. Es ist daher unerlässlich, ein tiefes Verständnis über Resistenzmechanismen zu entwickeln, da zudem die der Resistenz zugrundeliegenden biochemischen Reaktionen komplexen regulatorischen Mechanismen unterliegen und sehr individuelle Charakteristika aufweisen können. In Deutschland findet man bei ca. 70 % der klinischen Isolate von *S. aureus* eine Penicillinresistenz, welche sich auf die Bildung einer Penicillase zurückführen lässt. Jedoch weisen etwa 20 % Resistenzen gegenüber allen β -Lactamantibiotika auf. Die Ursache hierfür ist das *mecA*-Gen, welches für ein zusätzliches PBP (PBP 2') kodiert.^[47] Dieses ist in seiner Struktur so verändert, dass es eine deutlich verringerte Affinität gegenüber β -Lactamverbindungen aufweist und nicht mehr von β -Lactamantibiotika inhibiert wird.^[67] Der Resistenzmechanismus insgesamt besteht aus einer komplexeren Signal-Transduktionskaskade, mit der das Bakterium auf die

Bedrohung durch ein β -Lactamantibiotikum reagieren kann. Sie besteht aus einem Signalprotein MecR1, dessen C-terminales Ende an der Zellaußenwand lokalisiert ist. Die intrazelluläre N-terminale Domäne (transmembranes Enzym) besitzt eine Metalloproteaseaktivität. Unter normalen Wachstumsbedingungen ist die Transkription des *mecA*-Gens repressiert und die Metalloprotease liegt als Zymogen (inaktives Enzym) vor. Befindet sich ein β -Lactamantibiotikum im extrazellulären Raum, wird dieses von MecR1 über ein Serin im aktiven Zentrum gebunden. Die Acylierung am C-terminalen Ende führt zu einer konformationellen Änderung des gesamten Enzyms, wodurch die Metalloproteaseaktivität aktiviert wird. Der Repressor des *mecA*-Gens wird spezifisch von der Metalloprotease gespalten und das *mecA*-Gen für PBP 2' kann abgelesen werden.^[68] Die Penicillinresistenz von *S. pneumoniae*-Isolaten beruht ebenfalls auf der Bildung β -lactamunempfindlicher PBP (PBP2x). Die Resistenzentstehung ist auf die Aufnahme von Genfragmenten aus anderen Streptokokken-Spezies zurückzuführen, welche z.B. während einer Atemwegsinfektion am selben Standort vorliegen. Aufgrund dieses Entstehungsmechanismus ist es verständlich, dass es sich nicht um definierte Resistenzgene handelt, sondern um individuelle Variationen, wodurch verschiedene Ausprägungen der Resistenz gegenüber β -Lactamstrukturen auftreten können. Enterokokken wie *E. faecalis* besitzen ein PBP (PBP5), welches sie resistent gegenüber Cephalosporinen werden lässt. Wird das Gen für PBP 5 aufgrund einer Mutation in der Kontrollregion überexprimiert und / oder der Erreger erwirbt eine Punktmutation im Strukturgen, so weitet sich die Resistenz auch auf β -Lactame mit Penicillinstruktur aus.^[47]

1.5 Privilegierte Strukturen in Naturstoffen

Die medizinische Chemie hat die Aufgabe, immer neuartige antibakterielle Substanzen bereitzustellen, um mit der Resistenzentwicklung Schritt zu halten. Da die Gesamtheit der denkbaren chemischen Verbindungen unendlich groß ist, stellt sich die Frage nach Startpunkten für das Wirkstoffdesign. Die ursprüngliche Hoffnung, durch Hochdurchsatz-Screeningverfahren von großen Substanzbibliotheken, welche Millionen von synthetischen Verbindungen enthalten, vermehrt erste Vertreter neuer Wirkstoffklassen zu generieren, erfüllte sich jedoch bislang

nicht.^[8, 69] Der außergewöhnliche Erfolg in der Erforschung und Entwicklung antibakterieller Arzneimittel im vergangenen Jahrhundert basiert auf der Optimierung von chemischen Strukturvorlagen aus der Natur. Naturstoffe sind definiert als alle niedermolekularen Verbindungen, die von biologischen Organismen gebildet werden. Mikroorganismen produzieren solche Verbindungen mit dem Ziel, die zellulären biochemischen Abläufe zu beeinflussen. Ob zur Kontrolle von Stoffwechselprozessen oder zur Verteidigung gegen bakterielle Konkurrenten, im Kampf um Raum oder Ressourcen sind Naturstoffstrukturen evolutorisch darauf optimiert, mit ihren natürlichen Zielen (z.B. Proteine oder Nukleinsäuren) effizient zu interagieren. Verschiedene Wirkmechanismen und Bindungsmodi sind dabei möglich. Neben der Blockierung des aktiven Zentrums von Enzymen durch Naturstoffmoleküle als Inhibitoren kann die Aktivierung oder Inaktivierung von Enzymen auch durch eine allosterische Wechselwirkung erreicht werden. Die Bindung an bestimmte Enzymdomänen hat hier die Umwandlung der Enzymkonformation zur Folge und bewirkt dadurch eine Regulation der Enzymaktivität. Die Bindungswechselwirkung von Naturstoffen an Proteine kann kovalent oder nichtkovalent erfolgen, indem der Naturstoff dann als Ligand an die passende Zielstruktur bindet. Naturstoffe haben sich evolutorisch über Jahrtausende entwickelt, um hochselektiv und spezifisch zu binden. Aus Sicht der Evolutionstheorie erscheint es daher logisch, eher unter Naturstoffen als unter rein synthetischen Verbindungen ohne natürliches Vorbild, therapeutisch wirksame Moleküle ausfindig machen zu können.^[8, 70] Denn im biochemischen Umfeld innerhalb der Zelle mit vielen möglichen Reaktionspartnern müssen Naturstoffe eine hohe Bindungsaffinität an das Zielenzym aufweisen. Komplexe chemische Funktionalisierungsmuster, wie sie in Naturstoffen zu beobachten sind, werden daher oft flankiert von sterisch charakteristischen Erkennungsregionen für die selektive Enzymbindung und Modulation der Reaktivität. Die für die eigentliche chemische Bindung verantwortlichen Aktionszentren eines Naturstoffs stellen privilegierte Strukturen dar, welche von besonderer biologischer Relevanz sind. Nach *Evans et al.* gehören den privilegierten Strukturen Verbindungsklassen an, deren Mitglieder aufgrund ihres molekularen Grundgerüsts, in der Lage sind, als Ligand für verschiedene Proteinrezeptorbindungsstellen zu dienen.^[69, 71] Mit diesen pharmakologischen Eigenschaften kann die zugrundeliegende Struktur einem Optimierungsprozess unterworfen werden, um Bindungsaffinität und -selektivität zu

verbessern. Damit sind diese Strukturen ein vielversprechender Ausgangspunkt, um neue pharmazeutisch wirksame Verbindungen zu entwickeln. Aus dem Konzept der privilegierten Struktur ergeben sich neben der Eignung dieser Molekülstrukturen als Basis für die Entwicklung von Medikamenten weitere Einsatzmöglichkeiten. Denn es ist oftmals nicht notwendig, die komplette Architektur eines Naturstoffs nachzuahmen, um eine funktionstüchtige bioaktive Substanz zu erhalten.^[69] Vielmehr vermitteln die natürlichen chemisch reaktiven Zentralelemente eine potentielle Bindungsaffinität für enzymatische Targets. Derivate dieser Zentralstrukturen lassen sich als molekulare Werkzeuge nutzen, um Einblicke in die Wirkmechanismen der Verbindungen und ein vollständiges Verständnis der zellulären Prozesse auf molekularer Ebene zu gewinnen. Durch Variationen der Leitstruktur kann die Selektivität für bestimmte Enzyme gesteuert oder es können auch neue Targets erschlossen werden. Im vorherigen Kapitel wurde aufgezeigt, wie β -Lactamnaturstoffe selektiv mit ihren Zielen, den PBP reagieren. Die Medizin profitiert von dieser Selektivität, was auch an den geringen Nebenwirkungen der β -Lactamantibiotika deutlich wird. Weniger bekannt aber ist, dass das pharmazeutische Potential der β -Lactamleitstruktur auch in anderen, scheinbar unzusammenhängenden Anwendungsgebieten eingesetzt werden kann: als Signalpeptidase-Inhibitoren,^[72] als Elastase-Inhibitoren^[73] oder zur PSA-Erkennung.^[74]

1.6 Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung des ersten Teils dieser Promotionsarbeit bestand in der Synthese verschiedener gerichteter ABPs, welche auf β -Lactamnaturstoffen beruhen. Dafür wurden bekannte, pharmazeutisch wirksame β -Lactamantibiotikaverbindungen chemisch modifiziert. Es wurden bislang noch keine ABPs mit diesem Naturstoffgerüst eingesetzt, weshalb es vollkommen unbekannt ist, wie sich die einzelnen chemischen und biochemischen Faktoren auf die Fähigkeit dieser Sonden zur Proteommarkierung von Mikroorganismen auswirken. Bei der Projektplanung wurden deshalb verschiedene Strategien verfolgt, um eine Diversifizierung der Struktur und Reaktivität zu erreichen. Eine Herausforderung bestand insbesondere in den Synthesen selbst, da β -Lactame empfindliche Verbindungen sind und häufig

besonders milde Synthesemethoden erfordern.^[8, 75] Es sollte untersucht werden, ob diese ABPs zunächst im Proteom der nichtpathogenen Bakterienstämme *Pseudomonas putida* (gram-negativ), *Bacillus licheniformis* (gram-positiv) und *Listeria welshimeri* (gram-positiv) ihre Angriffsziele, die PBP markieren. Die Ergebnisse sollten dann hinsichtlich des eingesetzten Naturstoffgerüsts mit dem Ziel interpretiert werden, die Einsatzfähigkeit der ABPP-Methodik für die Analyse der Reaktionsweise von bekannten β -Lactamantibiotika in einem Proteom darzustellen. Die Mikroorganismen wurden aufgrund ihrer Verwandtschaft zu pathogenen Stämmen ausgewählt. Die Anwendbarkeit dieser Sonden zur Untersuchung der enzymatischen Targets von β -Lactamantibiotika in Bakterien sollte auch damit aufgezeigt werden, dass sowohl gram-positive als auch gram-negative Erreger miteinbezogen wurden. Die Strategie wurde anschließend dahingehend erweitert, auch strukturell weniger anspruchsvolle Molekülsonden, welche aber den β -Lactamring als reaktive Gruppe enthalten, der ABPP-Methodik zuzuführen. Es existierten zuvor keine ABPP-Sonden mit β -Lactamstruktur und es sollte daher untersucht werden, ob solche Verbindungen die Fähigkeit besitzen, im Proteom mit Enzymen zu reagieren, bei denen bislang keine Wechselwirkung mit β -Lactamverbindungen bekannt war. Um neue Sonden dem ABPP zugänglich zu machen und die Aussagekraft der Ergebnisse zu bewerten, sind umfangreiche Untersuchungen notwendig. Die Möglichkeit, die erhaltenen Ergebnisse anhand bereits bekannter Fakten auf Plausibilität zu überprüfen, ist Voraussetzung für den universellen Einsatz der ABPP-Methodik als analytisches Verfahren auf proteomischer Ebene.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten Studien für den Einsatz von γ -Lactonderivaten in der ABPP-Methodik für bakterielle Proteome erstellt werden. Auch die γ -Lactonstruktur, welche man in vielen bioaktiven Naturstoffen vorfindet, wurde zuvor noch nicht für die ungerichtete ABPP eingesetzt. Daher sollte in diesem Projekt speziell die allgemeine Reaktivität verschiedener Derivate untersucht werden, um dann Aussagen über die Einsatzfähigkeit von Strukturbibliotheken im ABPP treffen zu können.

2 Resultate

2.1 β -Lactame als ABPP-Sonden

2.1.1 Synthese antibiotisch aktiver β -Lactamsonden

Mit Ausnahme von Aztreonam ist in den meisten Antibiotika der zentrale β -Lactamring mit einem weiteren fünf- oder sechsgliedrigen Ring anelliert. Es sollte festgestellt werden, ob die nachfolgend beschriebenen Sonden die bekannten Ziele (PBP) markieren und wie sich eine Variation des Naturstoffgerüsts auf das Markierungsprofil auswirkt. Deswegen wurden die unten abgebildeten β -Lactamantibiotika als Vertreter wichtiger Strukturklassen von β -Lactamantibiotika (Cephem, Monobactam, Penam) durch die im Weiteren beschriebenen chemischen Umsetzungen in Sonden umgewandelt. Um β -Lactamantibiotika als Sonden in der ABPP-Methodik einsetzen zu können, müssen sie so modifiziert werden, dass sie eine terminale Alkingruppe besitzen (Kapitel 1.3).

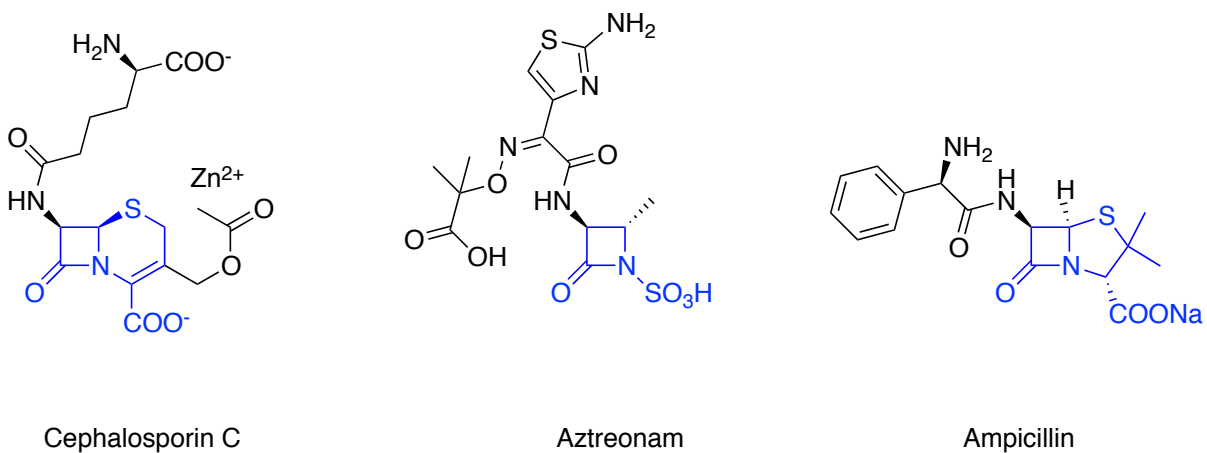


Abbildung 24: Ausgangssubstanzen für „antibiotische“ ABPP-Sonden

In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die freie Carboxylgruppe für die Bindung an PBP und die antibiotische Aktivität eine strukturelle Voraussetzung ist.^[76] Um dieses Erkenntnis in ABPP-Experimenten darzustellen und die Resultate auf Plausibilität zu überprüfen, wurde in einem Lactamantibiotikum (Ampicillin) der Alkinrest an zwei verschiedenen Positionen der Ausgangsverbindung angebracht, wobei in einem Fall die Carboxylgruppe verestert wurde.

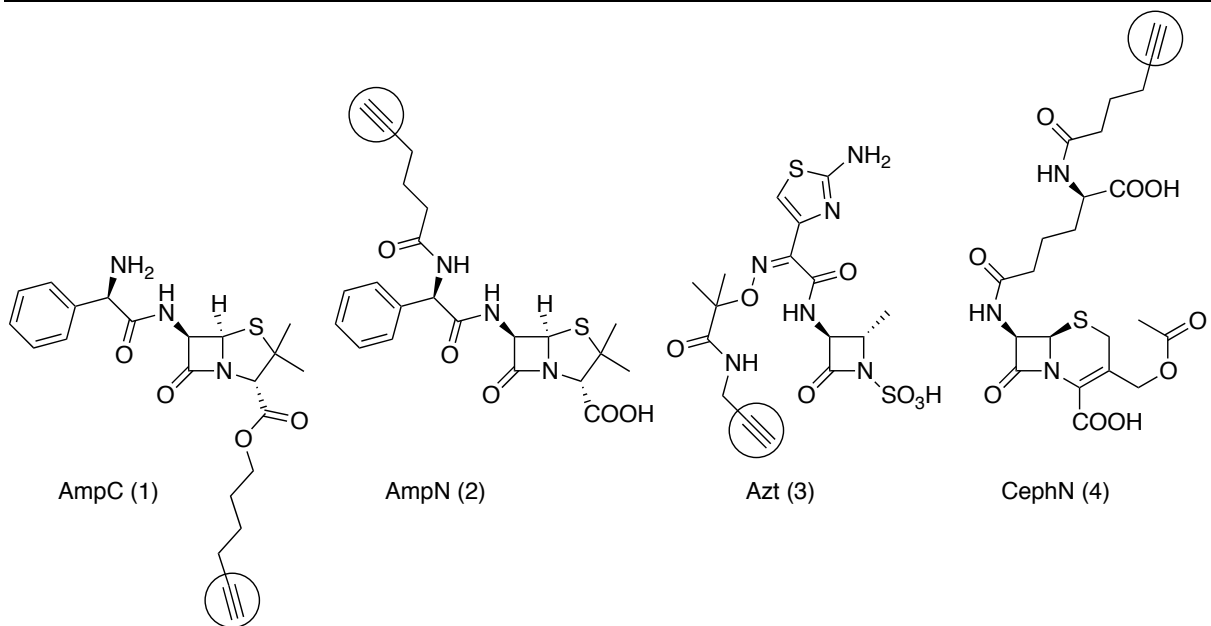
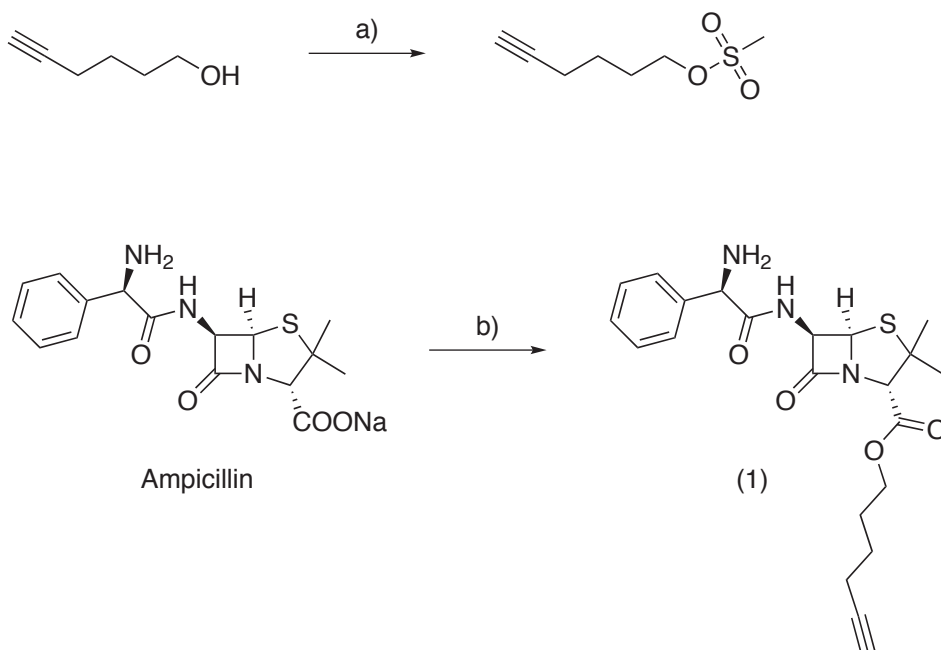


Abbildung 25: „Antibiotische ABPP-Sonden“

Synthese der Ampicillinsonde AmpC (1)

Die Synthese erfolgte nach folgendem Reaktionsschema:



a) MeSO_2Cl , DMF, 12 Std, RT.

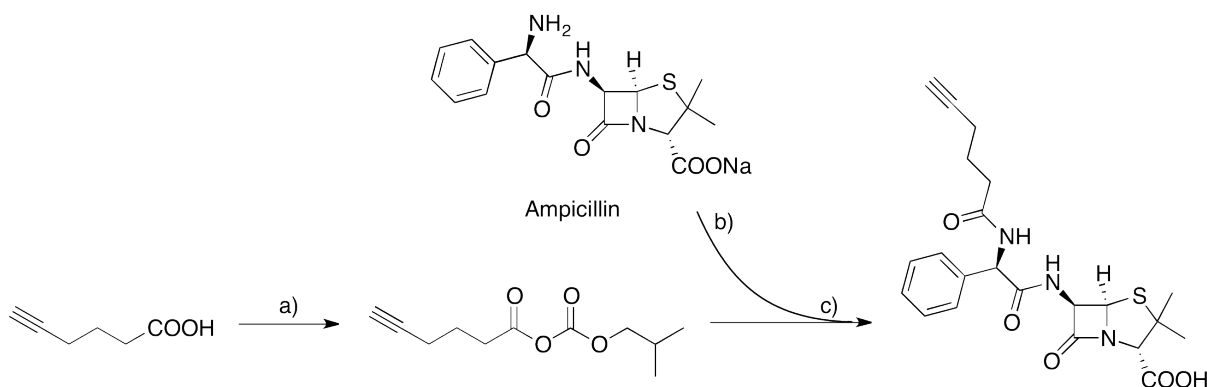
b) Methansulfonsäure-hex-5-ynylester, EtOAc.

Abbildung 26: Syntheschema der chemischen Sonde AmpC (1)

Hydroxylgruppen von Alkoholen lassen sich durch nukleophile Substitutionen normalerweise nicht direkt ersetzen.^[77] In einem ersten Schritt wurde deswegen der chemisch wenig reaktive Alkohol Hex-5-inol in einen Methansulfonsäureester (Mesylat) umgewandelt. Diese Reaktion erfolgt mit einem Standardreagenz zur Sulfonsäureesterherstellung, dem Methansulfonylchlorid. Das entstandene Mesylat ist eine gute Abgangsgruppe und kann dadurch in der Regel durch ein Nukleophil substituiert werden. Obwohl der Carboxylatrest des Ampicillins ein schlechtes Nukleophil ist, gelang eine Veresterung durch einen Überschuss an Methansulfonsäureester in ausreichender Ausbeute. Die Triebkraft wird in dieser Reaktion erhöht durch Zugabe von EtOAc, wodurch NaSO_3CH_3 ausfällt und abfiltriert werden kann.

Synthese der Ampicillinsonde AmpN (2)

Die Synthese erfolgte nach folgendem Reaktionsschema:



a) Isobutylchloroformat, NMM, $-13\text{ }^\circ\text{C}$, 45 min, THF.

b) Ampicillin-Na-Salz, THF/ H_2O (20/1).

c) 45 min, $-10\text{ }^\circ\text{C}$ nach RT.

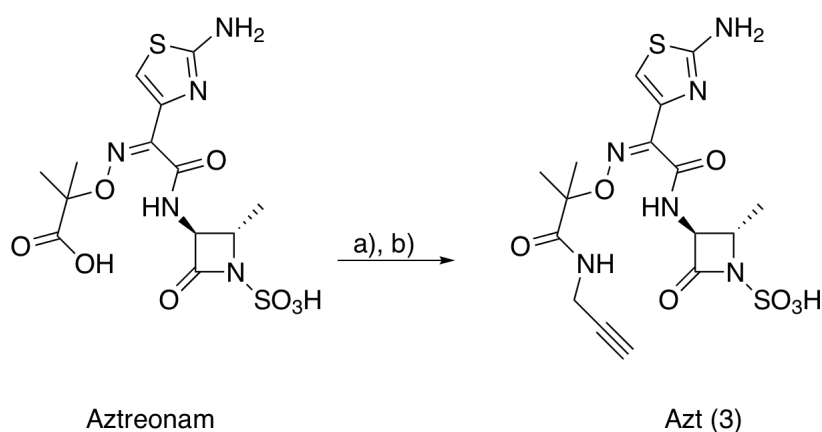
Abbildung 27: Syntheschema der chemischen Sonde AmpN (2)

Für die Knüpfung einer Peptidbindung gibt es zahlreiche Methoden, die nach ihren Kupplungsreagenzien benannt werden. Die hier verwendete Methode nutzt die Bildung des gemischten Anhydrids zur Aktivierung der Carbonsäure. Aus organischen Carbonsäuren bilden sich Carbonsäureanhydride formal durch die Abspaltung von Wasser mit Hilfe von Isobutylchloroformat und einer tertiären Base.

Als Kohlendäurederivate setzen diese bei der Peptidkupplung mit der Aminkomponente Kohlendioxid und Alkohol frei. Der Angriff des freien Elektronenpaares der Aminogruppe erfolgt am C-Atom des Anhydrids, das die geringste Elektronendichte besitzt und sterisch am wenigsten gehindert ist. Die Aufreinigung des Produkts kann per präparativer HPLC erfolgen, wobei allerdings teilweise Hydrolyse des Lactamrings beobachtet wurde. Die Massen- sowie die NMR-Spektren bestätigen aber den intakten Lactamring der chemischen Sonde AmpN (2) in der Hauptfraktion.

Synthese der Aztreonamsonde Azt (3)

Die Synthese erfolgte nach folgendem Reaktionsschema:



a) HOBt, DIC, DIPEA, 0 °C, 30 min, DMF.

b) Propargylamin, 0 °C nach RT, 30 min.

Abbildung 28: Syntheschema der chemischen Sonde Azt (3)

Die Synthese der chemischen Sonde Azt (3) erfolgte ebenfalls durch eine Peptidkupplung. Als Aktivierungsreagenz diente DIC. Der Mechanismus ist in Abbildung 29 und 30 dargestellt.

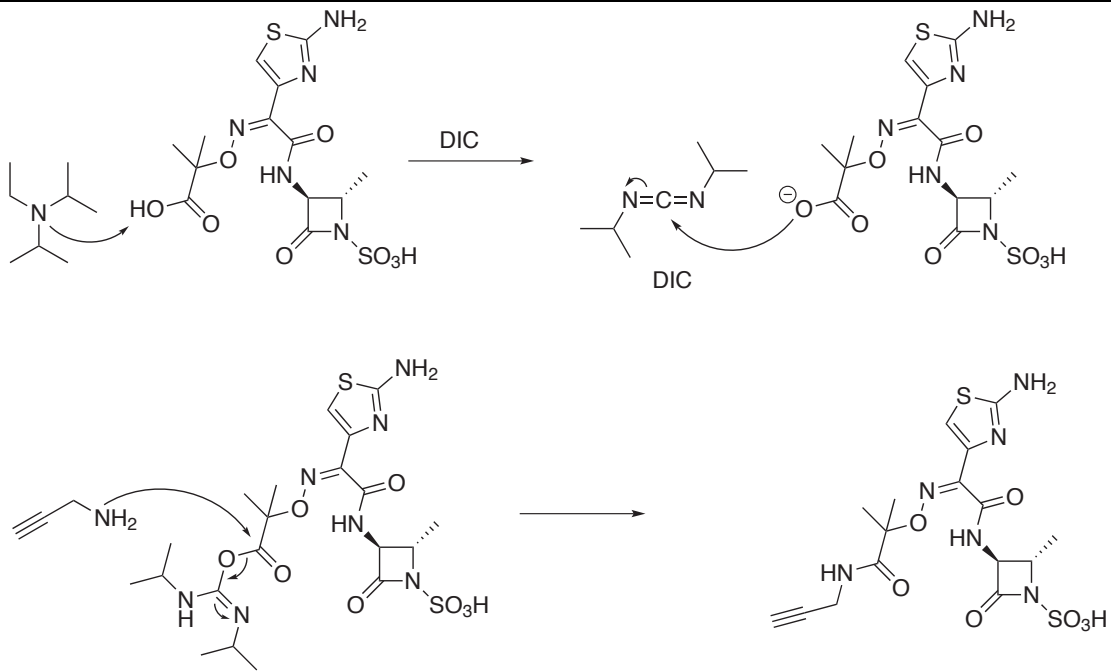


Abbildung 29: Mechanismus der Peptidkupplung mittels DIC

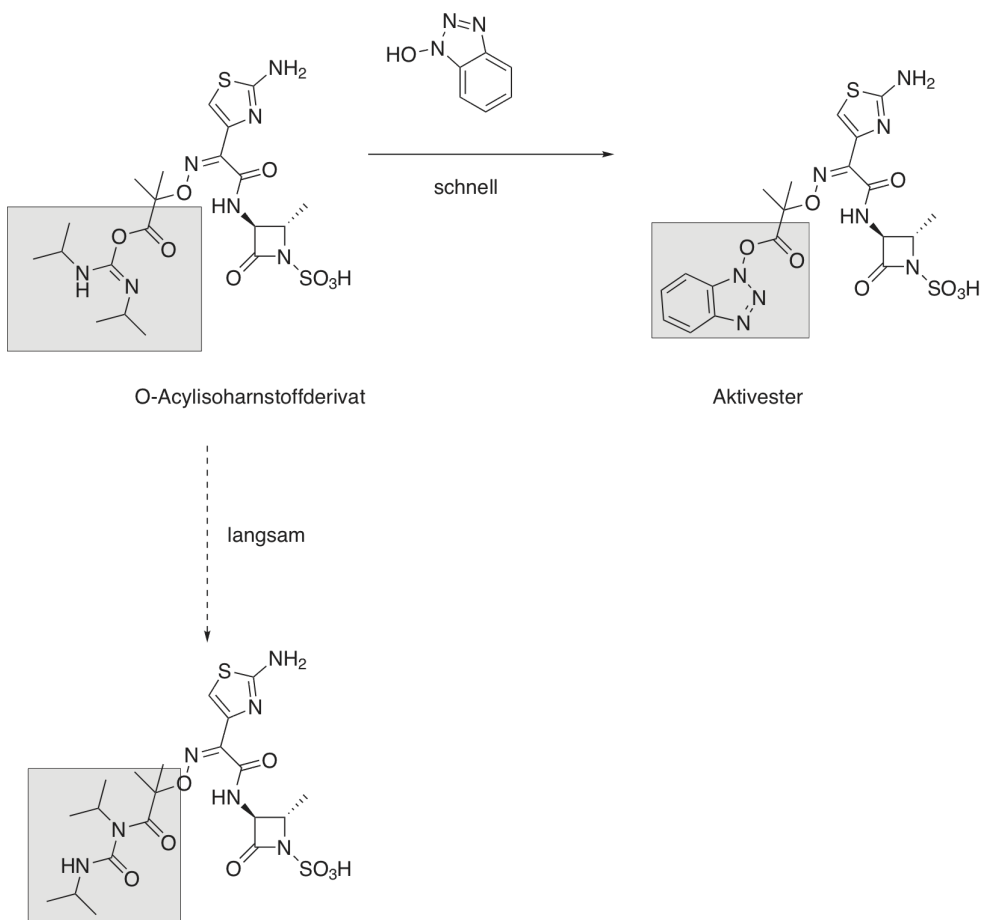
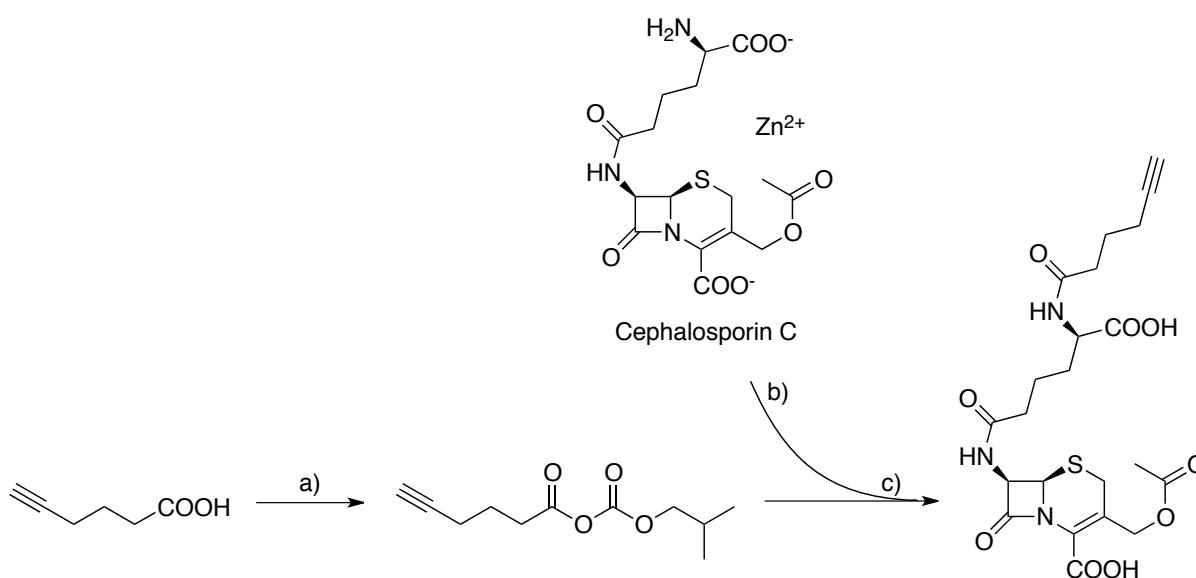


Abbildung 30: Einsatz von HOBt zur Aktivierung der Carbonsäurekomponente

Um zu verhindern, dass sich O-Acylisoharnstoffderivate in unreaktive N-Acylisoharnstoffe umlagern, wird HOBt als Hilfsnukleophil zugesetzt. Das erhaltene Substitutionsprodukt ist nach wie vor ein Acylierungsmittel, wobei dieser Aktivester sich nicht in unreaktive Derivate zersetzt und auch von Aminokomponenten mit geringerer Nukleophilie angegriffen werden kann.^[78]

Synthese der Cephalosporin C – Sonde CephN (4)

Die Synthese erfolgte nach folgendem Reaktionsschema:



a) Isobutylchloroformat, NMM, – 13 °C, 60 min, THF.

b) Cephalosporin-C-Zink-Salz, NEt₃, THF/H₂O (6/1).

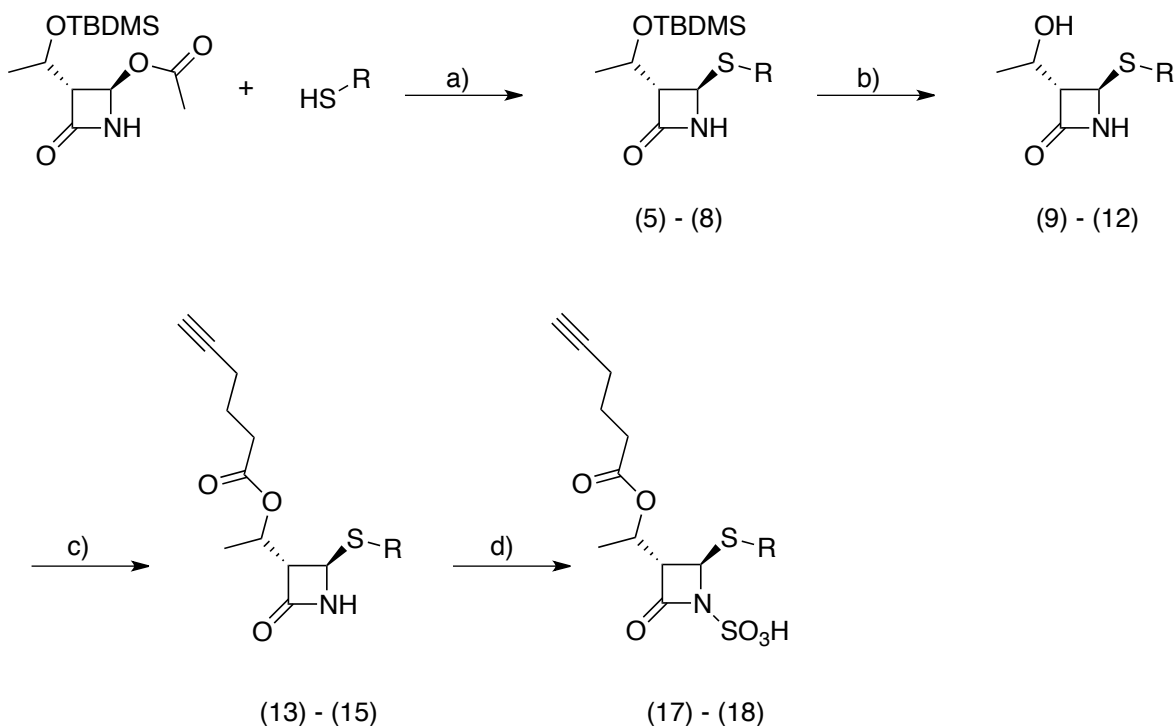
c) 45 min, – 10 °C nach RT.

Abbildung 31: Syntheschema der chemischen Sonde CephN (4)

Die gemischte Anhydridmethode wurde auch zur Knüpfung der Peptidbindung bei Cephalosporin C angewendet.^[79] Das Grundgerüst dieses Ausgangsstoffs ist hydrolysestabiler als im Falle der Ampicillinstruktur. Die Aufreinigung per präparativer HPLC konnte deswegen problemlos erfolgen.

2.1.2 Synthese von monocyclischen β -Lactamsonden

Es konnten in ABPP-Experimenten mit ungerichteten Sonden interessante Wechselwirkungen zwischen reaktiven Gruppen und Enzymen beobachtet werden, welche wiederum das Wissen über die Eigenschaften einiger Enzymklassen erweiterten. Um die enzymatischen Angriffsziele des elektrophilen β -Lactamrings in bakteriellen Proteomen zu untersuchen, wurde zusätzlich eine kleine Bibliothek von monocyclischen β -Lactamsonden hergestellt. Diese Sonden besitzen keine Ähnlichkeit zu antibiotisch wirksamen β -Lactamnaturstoffen. Es wurde als Ausgangsmaterial das kommerziell erhältliche [3*R*(1'*R*,4*R*)]-(+)-4-Acetoxy-3-[1-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)-ethyl]-2-azetidinon gewählt. Dieses bietet an der C-1'-Position die Möglichkeit, über eine Veresterung der Alkoholgruppe einen Alkinlinker anzufügen. Da strukturelle Unterschiede die Fähigkeit der Sonde zur Bindung an verschiedene Enzyme beeinflussen, sollten in der C-4-Ringposition verschiedene Reste eingeführt werden. Nach Vorbild des Aztreonamgerüsts wurden diese Sonden anschließend nochmals in ihrer Reaktivität durch Anbringen einer Sulfonsäuregruppe am Lactam-Stickstoff abgewandelt. Die Synthese der synthetischen Lactamsonden (13 – 18) erfolgte nach folgendem Reaktionsschema:



-
- a) NaOH, Aceton.
b) TBAF / THF, 0 °C nach RT, 12 Std.
c) Hex-5-inoylchlorid (28), NEt₃, DCM.
d) Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex, Pyridin, 90 °C, 1 Std.

Abbildung 32: Syntheschema für synthetische Lactamsonden

Durch eine nukleophile Substitution lässt sich die Acetoxygruppe des Edukts an Ringposition C-4 leicht durch deprotonierte Thiolreagenzien austauschen.^[80] Nach Entschützung der TBDMS-Gruppe mit TBAF steht der Alkohol dann zur Veresterung mit Säurechloriden zur Verfügung. Die Einführung der Sulfonsäurekomponente erfolgte in Pyridin mit Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex. Durch Phasentransferkatalyse mit Bu₄NHSO₄ konnten die Sonden (17) und (18) in die organische Phase extrahiert werden.^[81]

Die Synthese von Sonde NCO (16) erfolgte nach folgendem Reaktionsschema:

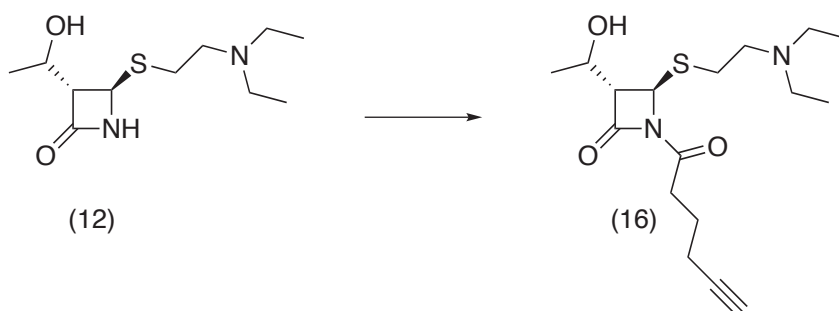


Abbildung 33: Synthese der chemischen Sonde NCO (16)

Beim Versuch die Alkoholgruppe an C-1' der Verbindung (12) mit Hex-5-inoylchlorid zu verestern wurde die Verbindung (16) isoliert. Das Säurechlorid reagierte demnach bevorzugt mit dem Lactamstickstoff unter Ausbildung einer Peptidbindung. Offenbar ist die tertiäre Aminofunktion der Seitenkette durch ihre basischen Eigenschaften in einer geeigneten Position in der Lage, die N-H Bindung soweit abzuschwächen, dass auch eine Reaktion am Lactamstickstoff stattfinden kann. Ohne diesen Effekt sind ähnliche Umsetzungen am Lactamstickstoff meistens nur durch den Einsatz sehr starker Basen zu erreichen.^[82]

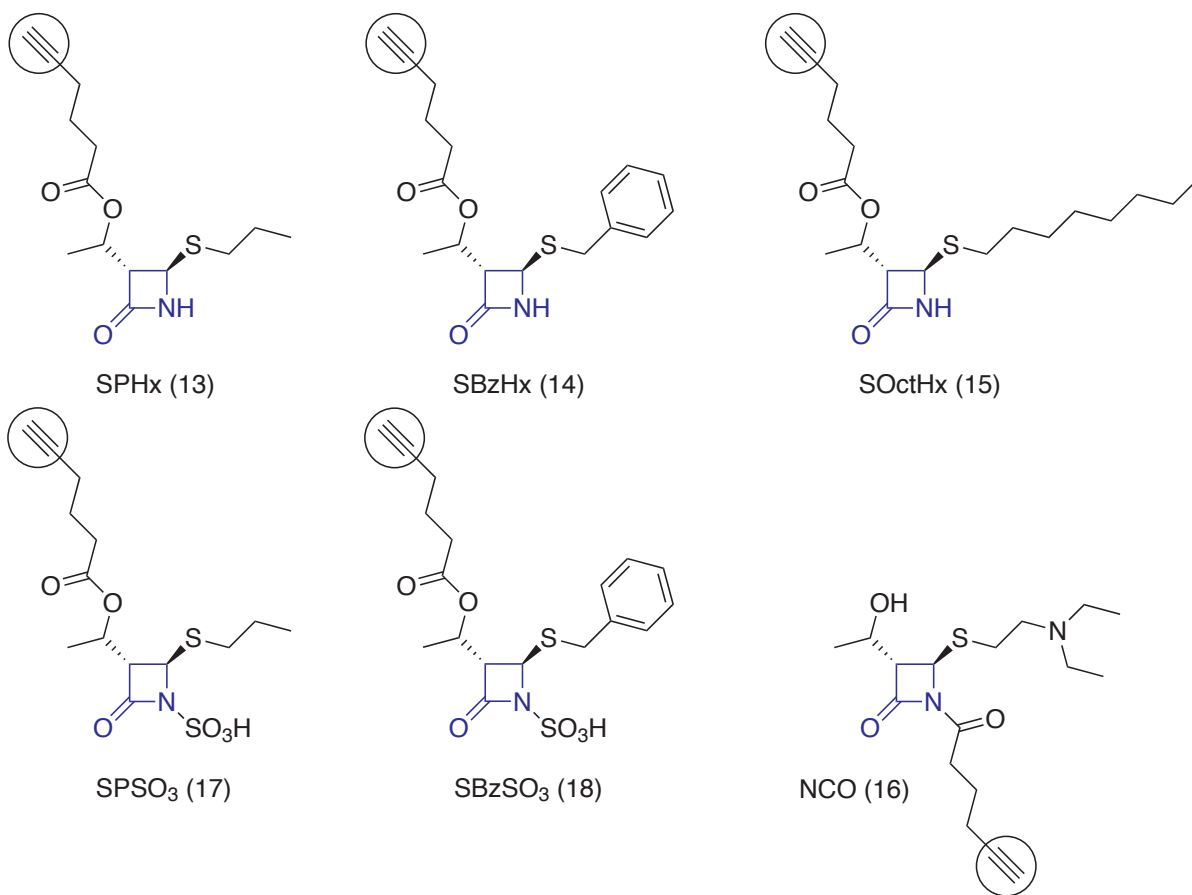
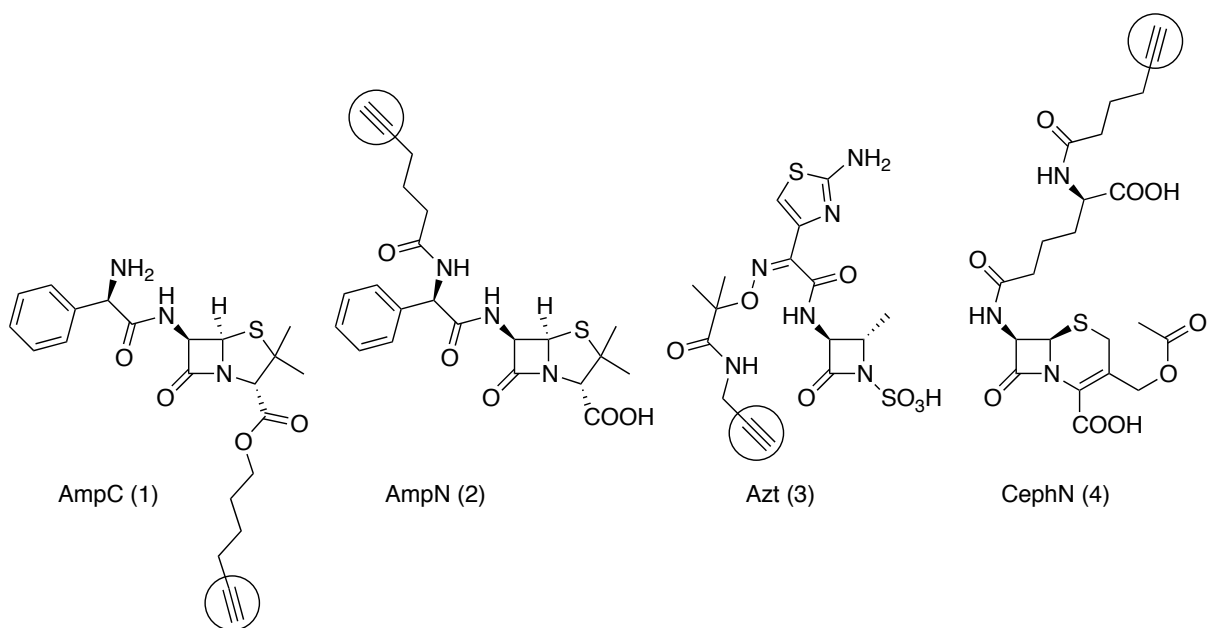


Abbildung 34: Synthetische Lactamsonden im Überblick

2.1.3 Etablierung von antibiotisch aktiven Lactamsonden

Um die Bindungsfähigkeit der Sonden, welche auf den antibiotisch aktiven Ausgangsstoffen beruhen (antibiotische Sonden) zu untersuchen, wurden sie zunächst mit dem Lysat aus *P. putida* für eine Stunde inkubiert. *P. putida* wurde als gram-negativer Mikroorganismus ausgewählt, da er phylogenetisch nahe Verwandtschaft zu *Pseudomonas Aeruginosa* aufweist, einem äußerst hartnäckigen Pathogen, welches vor allem im klinischen Umfeld zu schweren Folgeinfektionen nach einer Operation führen kann.

A



B

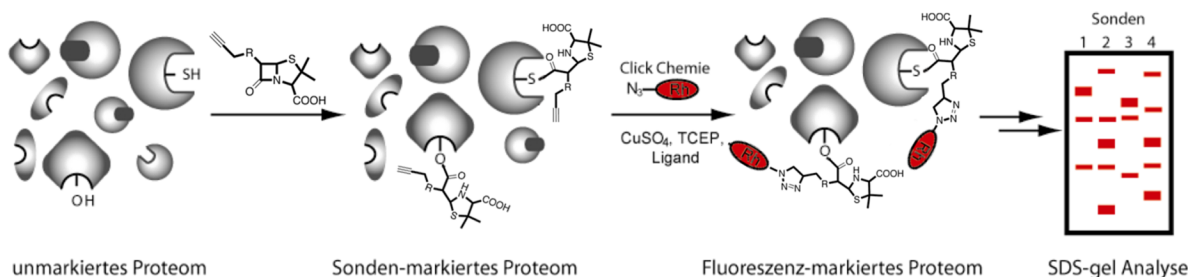


Abbildung 35:

A) Antibiotische Lactamsonden

B) Markierungsexperiment in bakteriellen Lysaten

Nach Click-Chemie zur Anbringung des Farbstoffs und Gelelektrophorese wurde das in Abbildung 36 gezeigte Fluoreszenzbild der Membranfraktion von *P. putida* erhalten.

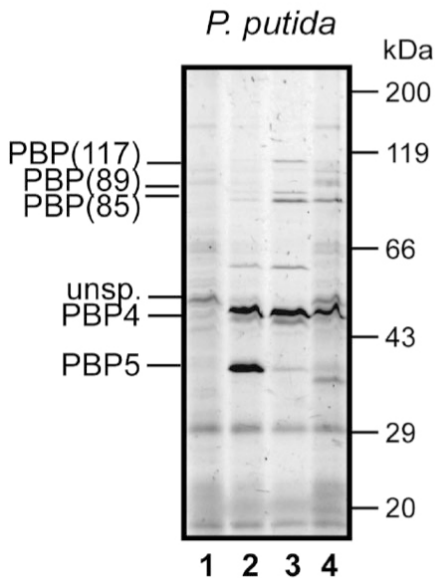


Abbildung 36: Fluoreszenzaufnahme des Markierungsprofils der antibiotischen Lactamsonden (1 – 4) in der Membran von *P. putida*

Die unterschiedlichen β -Lactamverbindungen zeigten distinkte Banden und interessanterweise unterschiedliche Reaktivitätsprofile. Die Untersuchungen wurden dann auch für die Lysate von *B. licheniformis* und *L. welshimeri* durchgeführt. Für die Markierungsexperimente der Lysate erwies sich eine Sondenkonzentration von 5 μ M für die bicyclischen Lactamsonden AmpC (1), AmpN (2) und CephN (4) und 50 μ M für das monocyclische Azt (3) zur vollständigen Markierung der enzymatischen Targets als ausreichend (Anhang Abbildung A1). Die Identifizierung der markierten Zielenzyme mittels massenspektrometrischer Analyse ergab, dass es sich um hoch- und niedermolekulare PBP handelt, die bekannten biologischen Targets von β -Lactamantibiotika. Die an der Säuregruppe des Lactamgerüsts veresterte Sonde AmpC (1) vermochte hingegen keine Enzyme kovalent zu binden.

Ob eine Markierung in aktivitätsbasierter Weise stattfindet, kann durch eine Hitzekontrolle geklärt werden. Dabei wird das Proteom in Gegenwart von SDS kurzzeitig auf 96 °C erhitzt. Dieses Vorgehen zerstört die dreidimensionale Struktur des Enzyms, die Substraterkennung durch die räumliche Anordnung geht verloren. Proteine, die eine spezifische Bindung über ihr aktives Zentrum eingehen, können somit nicht mehr markiert werden. Bei einigen Enzymen ist die Entfaltung durch

Wärmezufuhr jedoch reversibel, so dass SDS hinzugefügt wird, um die Zurückfaltung zu verhindern. Findet eine Markierung dennoch statt, so kann man davon ausgehen, dass nicht die natürliche katalytische Aktivität eines Enzyms für die Bande verantwortlich ist. Beispiele für Hitze-SDS-denaturierte Proteom-Kontrollen sind im Anhang (Abbildung A2) gegeben. Bis auf eine unspezifische Markierung waren alle Bindungsereignisse im Lysat von *P. putida* hitzesensitiv, was die Präferenz von Sonden auf Basis natürlicher β -Lactamantibiotika für native Proteine verdeutlicht. Die meisten markierten Proteine waren von geringer Häufigkeit im Proteom. Ein direkter Vergleich der relativen Intensitäten von Coomassie-Färbung mit Fluoreszenzaufnahmen belegte, wie durch ABPP-Experimente eine äußerst sensitive Analyse erfolgen kann (Abbildung 37).

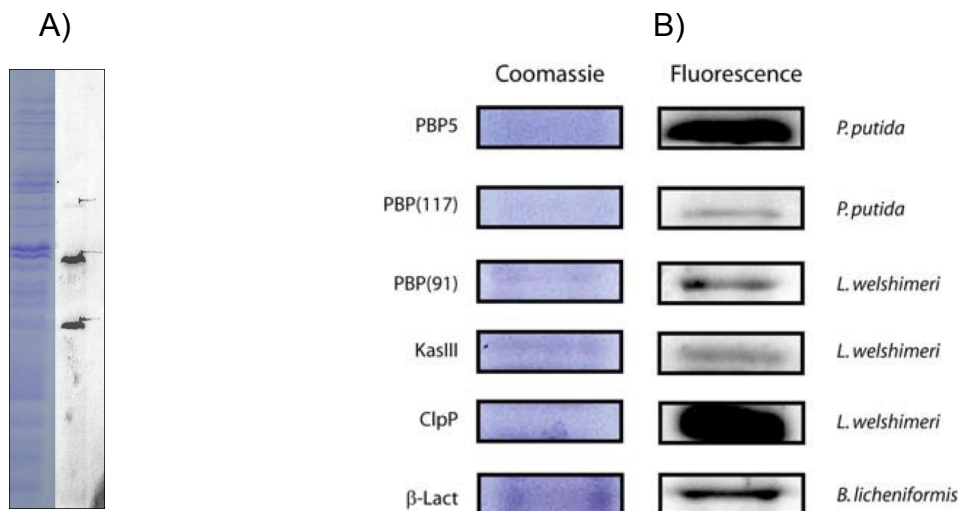


Abbildung 37:

A) Vergleich eines mit Coomassie gefärbten Gels mit dem Fluoreszenzbild durch Anpassung von Schnittkanten

B) Vergleich der Fluoreszenzanalyse mit der Coomassiefärbung ausgewählter Enzyme

Die Reaktivität der Sonden im Proteom im Vergleich zu den antibiotischen Ausgangssubstanzen wird dabei nicht durch den Alkinlinker verändert. Um dies zu verdeutlichen, wurde das Proteom mit einem 100fachen Überschuss des zugrundeliegenden Antibiotikums vorinkubiert. Eine anschließende Markierung mit der Sonde ergab daraufhin keine Fluoreszenzbanden mehr, was darauf zurückzuführen ist, dass das Antibiotikum und die Sonde um dieselben Bindestellen in Enzymen konkurrieren. Enzyme, welche durch das Antibiotikum bereits inhibiert sind, können die Sonde nicht mehr in ihr aktives Zentrum binden, eine Markierung bleibt deshalb aus (Abbildung 38).

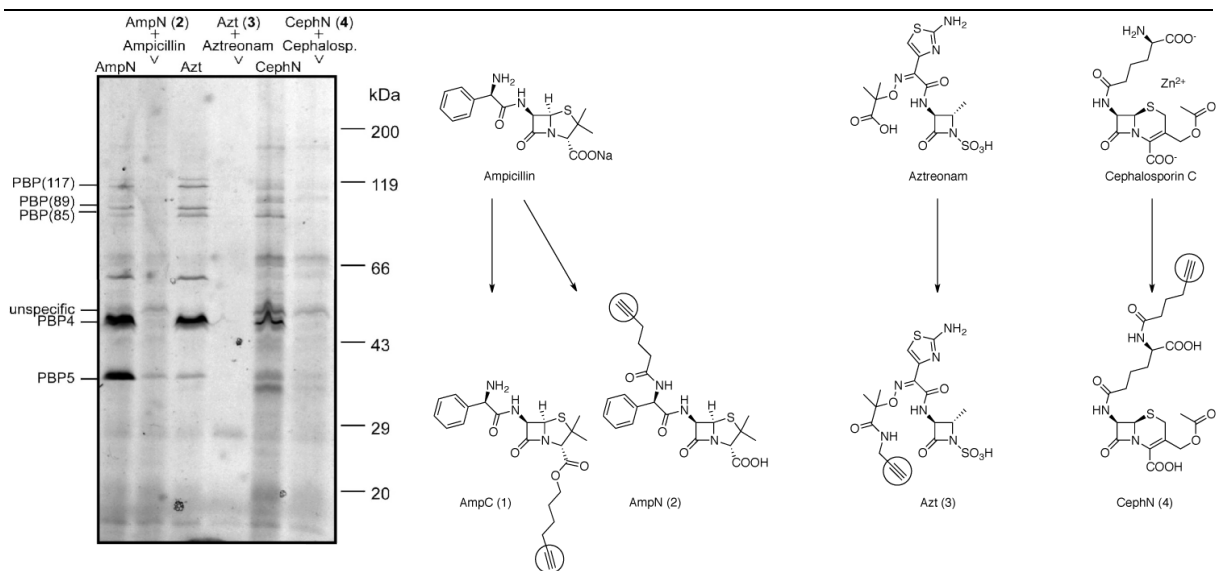


Abbildung 38: Konkurrenzexperiment mit den Sonden zugrundeliegenden Antibiotika

Unterschiedliche Präferenzen für PBP ergaben sich auch in den Lysaten der Bakterienstämme *B. licheniformis* und *L. welshimeri*. Sie besitzen wie *P. putida* in ihrer Bakteriengattung ebenfalls phylogenetisch verwandte pathogene Bakterienarten (z. B. *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*) und wurden deswegen als gram-positive Erreger mit in die Versuchsreihen einbezogen. In der Tabelle sind die Zielenzyme der Sonden in den verschiedenen Bakterienstämmen aufgelistet.

Bakterienstamm	Protein (kDa)	Sondenpräferenz
<i>P. putida</i>	PBP(117)	Azt (3)
	PBP(89)	Azt (3), AmpN (2)
	PBP(85)	Azt (3), AmpN (2), CephN (4)
	PBP 4 (50)	Azt (3), AmpN (2), CephN (4)
	PBP 5 (42)	Azt (3), AmpN (2), CephN (4)
<i>L. welshimeri</i>	PBP(91)	Azt (3), AmpN (2)
	PBP 2 (82)	Azt (3), AmpN (2)
	PBP(78)	Azt (3), AmpN (2)
<i>B. licheniformis</i>	PBP 1A/1B (97)	Azt (3), AmpN (2), CephN (4)
	PBP 3 (73)	Azt (3), AmpN (2), CephN (4)
	PBP 5 (48)	AmpN (2)

Tabelle 2: Auflistung der durch Massenspektrometrie identifizierten Enzyme und der markierenden Sonden

Um die Frage zu beantworten, ob die Sonden auch für eine *in situ* Markierung geeignet sind, wurden sie mit lebenden Zellen von *P. putida*, *B. licheniformis* und *L. welshimeri* für zwei Stunden inkubiert. Außerhalb der Zelle befindliche Sondenmoleküle wurden danach durch wiederholte Waschschriffe entfernt. Nach Lyse der Zellen per Ultraschall und Click-Chemie konnten in allen Bakterienarten Markierungsereignisse auch *in vivo* stattfinden, wie die Abbildung 39 zeigt.

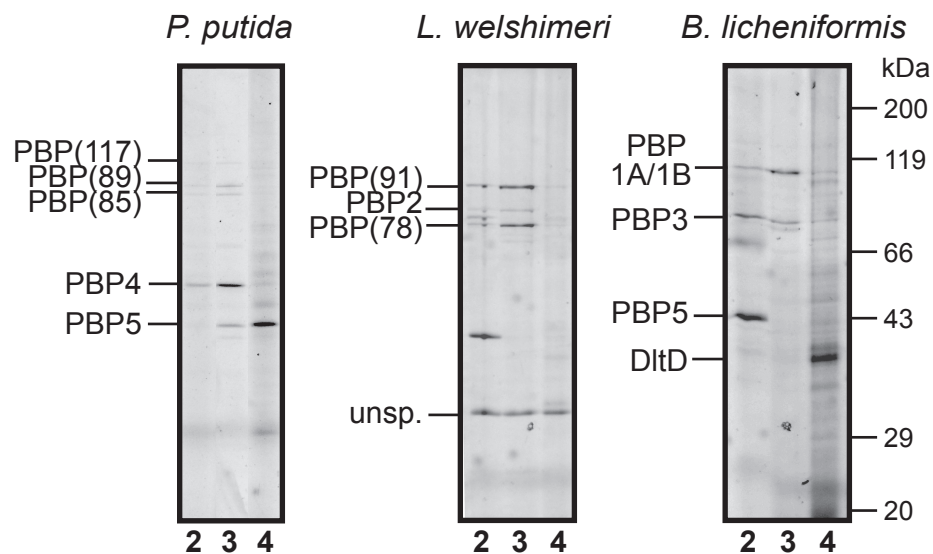
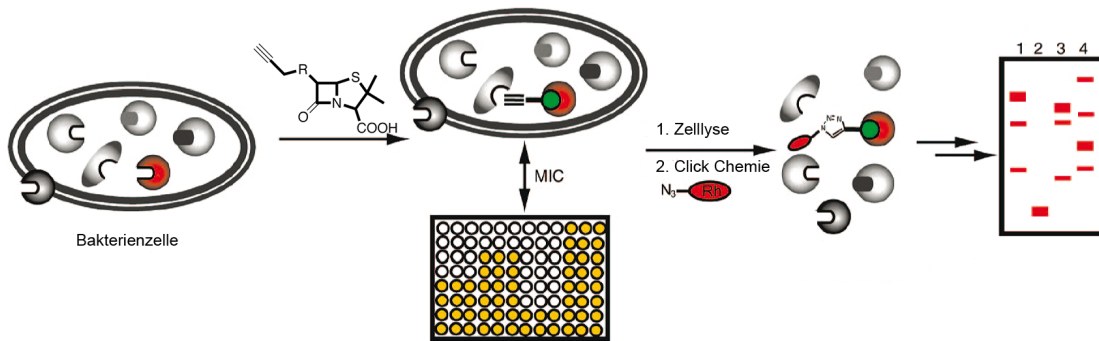


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Enzymmarkierung *in vivo* und die Fluoreszenz-Aufnahmen der Bakterienstämme *P. putida*, *L. welshimeri* und *B. licheniformis*

Zum Eintritt in die Zelle und zur vollständigen Absättigung der enzymatischen Targets benötigen die antibiotischen Sonden ein bis zwei Stunden (Abbildung A3). In innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführten ABPP-Experimenten konnte allerdings gezeigt werden, dass viele andere ABPP-Sonden eine wesentlich geringere Inkubationszeit benötigen, um an die Zielenzyme zu binden. Eine Steigerung der Markierungsintensitäten mit sukzessiver Erhöhung der Inkubationszeiten zeigt

darüber hinaus jedoch, dass die Reaktion der Sonden mit ihren enzymatischen Targets tatsächlich *in situ* verfolgt werden kann. Eine Markierung erst nach der Zellyse würde keine Steigerung der Markierungsintensitäten mit sich bringen. Die Analyse kovalent gebundener Enzyme per Massenspektrometrie ergab, dass es sich bis auf eine Ausnahme um PBP handelt. Vergleicht man eine Coomassie-Färbung mit den gescannten Markierungsprofilen wird auch hier klar, dass auf diese Weise eine äußerst sensitive Methode des Profilings von PBP erreicht werden kann (Abbildung 37 B). PBP 4 aus *P. putida* und PBP 5 aus *B. licheniformis* wurden zur Verifikation rekombinant exprimiert und konnten durch die entsprechende Sonde markiert werden. Ein Vergleich mit den Markierungsereignissen im Lysat bestätigt die korrekte Identifikation per Massenspektrometrie.

Die antibakterielle Aktivität der β -Lactamantibiotika beruht auf der kovalenten Inhibition von PBP. Um herauszufinden, ob die Sonden trotz ihrer Modifikation mit einem Alkinrest ihre antibakterielle Aktivität behalten, wurden die MIC-Werte (Minimal Inhibitory Concentration) der Sonden mit denen der zugrundeliegenden Antibiotikaverbindungen verglichen. In Mikrotiterplatten wurde untersucht, ab welcher Konzentration die Substanz ein Bakterienwachstum im angeimpften Medium unterbindet (Tabelle 3).

Bakterienstamm	Substanz	MIC (μ M)
<i>P. putida</i>	Ampicillin	> 100
	AmpN (2)	> 100
	Aztreonam	25
	Azt (3)	100
<i>B. licheniformis</i>	Ampicillin	1
	AmpN (2)	8
	Aztreonam	> 350
	Azt (3)	> 350
<i>L. welshimeri</i>	Ampicillin	0.5
	AmpN (2)	1
	Aztreonam	> 100
	Azt (3)	> 100

Tabelle 3: MIC-Werte der Sonden im Vergleich zu den Antibiotika für nichtpathogene Bakterienstämme

Die ermittelten MIC-Werte der Sonden im Vergleich mit den ihnen zugrundeliegenden Antibiotika veranschaulichen, dass die Alkinmodifizierung die antibiotische Aktivität und damit die Reaktivität der Sonde in der Bakterienzelle kaum beeinträchtigt.

Vergleicht man die Markierungsprofile von *P. putida in vitro* und *in vivo*, so ergibt sich im Falle von AmpN (2) und CephN (4) eine Abweichung (Tabelle 4, Abbildung A4). Die Aktivität gegenüber den biologischen Zielenzymen ist in lebenden Zellen also nur bedingt mit denen in Lysaten vergleichbar. Dies hebt die Vorzüge der ABPP-Methodik für die Analyse der Aktivität von antibiotisch aktiven Verbindungen in ihrer natürlichen biologischen Umgebung hervor. Die Markierungspräferenz der verschiedenen Lactamgrundstrukturen für hoch- und niedermolekulare PBP bietet die Möglichkeit, die Sonden als analytisches Werkzeug für die Untersuchung bestimmter PBP weiterzuentwickeln. So enthalten einige PBP in ihrer Struktur bestimmte Domänen, deren Funktion noch nicht komplett verstanden ist. Zum Beispiel enthält PBP 2 aus *L. welshimeri* zusätzlich einen PASTA Kinase Komplex. Es wird vermutet, dass dieser als Erkennungssegment für Peptidoglycan dient, aber dies konnte bisher nicht bewiesen werden.^[83]

Bakterienstamm	Protein (kDa)	<i>In Vitro</i> Markierung	<i>In Vivo</i> Markierung
<i>P. putida</i>	PBP(117)	Azt (3)	Azt (3), AmpN (2)
	PBP(89)	Azt (3)	Azt (3), AmpN (2)
	PBP(85)	Azt (3), CephN (4)	Azt (3), AmpN (2)
	PBP 5 (50)	Azt (3), CephN (4), AmpN (2)	Azt (3), AmpN (2)
	PBP 4 (42)	AmpN (2)	Azt (3), CephN (4)

Tabelle 4: Vergleich der Markierungsereignisse für die antibiotischen Sonden *in vivo* und *in vitro*

2.1.4 Etablierung von monocyclischen β -Lactamsonden

In den drei Bakterienstämmen wurden auch die synthetischen Lactamsonden (13 – 18) unter *in vivo* Bedingungen getestet. Dabei konnten spezifische und selektive Markierungen für alle drei Proteome erhalten werden.

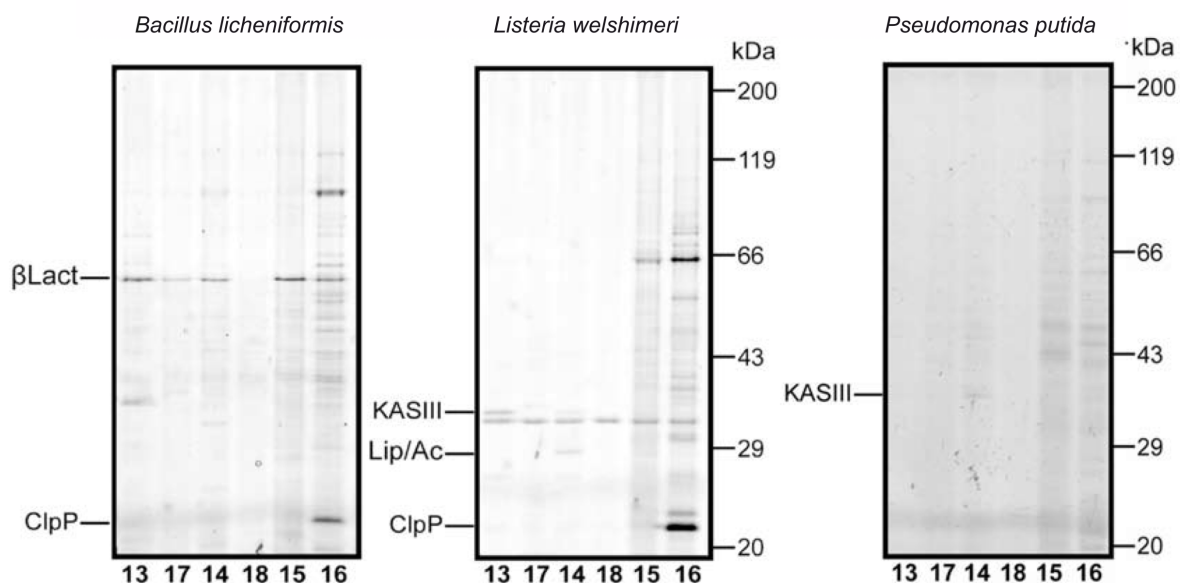


Abbildung 40: *In vivo* Markierung mit synthetischen Lactamsonden (13-18). Konzentrationen: SPHx (13) 100 μ M, SPSO₃ (17), SBzHx (14), SBzSO₃ (18), SOctHx (15) jeweils 250 μ M, NCO (16) 10 μ M

Die optimale Konzentration für *in situ* Markierungen mit den synthetischen Lactamsonden wurde durch Konzentrationsreihen bestimmt. Während die Sonden SPHx (13), SBzHx (14) und SOctHx (15) eine Konzentration zwischen 100 und 250 μ M für die Markierung ihrer enzymatischen Ziele in diesen Organismen benötigen, sollte die NCO-Sonde (16) nur mit ca. 10 μ M eingesetzt werden. Die durch die Acylierung des Lactamstickstoffs erhöhte chemische Reaktivität spiegelt sich in der Anzahl der markierten Enzyme im Fluoreszenzgel wieder. Die Sonde NCO (16) besitzt des Weiteren keine Seitenketten mit höherem sterischen Anspruch, welche als Erkennungsregionen für bestimmte Enzyme die Reaktivität im Proteom steuern könnten. Bei zu hohen Konzentrationen verringert sich deswegen die Markierungsqualität hinsichtlich Spezifität und Selektivität, so dass die Konzentration der NCO-Sonde (16) im Vergleich mit der Sondenbibliothek niedriger gewählt werden

sollte. Die Sonde SBzSO₃ (18) war nicht in der Lage, die aktive Tasche eines Enzyms in bakteriellen Proteomen zu erreichen. SPSO₃ (17) konnte zwar ein Enzym markieren aber im Vergleich zu den anderen Sonden ist die Intensität der Markierung gering. Die grundsätzliche Möglichkeit dieser Sonden, Enzyme via ABPP zu markieren, ist deswegen aber nicht ausgeschlossen. So konnte eine starke Markierung für SPSO₃ (17) beispielsweise im Lysat von HeLa-Zellen festgestellt werden. HeLa-Zellen sind menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs) und die ersten menschlichen Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde. Durch dieses Beispiel kann damit gleichzeitig eine weitere Anwendung der ABPP-Methodik aufgezeigt werden: Antibiotische Wirkstoffe können auf ihre Reaktivität in humanen Proteomen getestet werden, um die Auswirkungen und Folgen der Medikamenteneinnahme abzuschätzen. Die antibiotischen Sonden zeigten bis auf CephN (4) keinerlei Angriffsziele in der humanen Zelllinie. Diese Beobachtung stimmt mit der lange bekannten Erfahrung der guten Verträglichkeit vor allem von neueren β -Lactamantibiotika überein, welche auf die geringe Wechselwirkung mit menschlichen Proteinen zurückzuführen ist.^[8, 42] Es gibt allerdings auch ältere Antibiotikasubstanzen, die aufgrund ihrer Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Nierenschädigungen, nicht mehr verwendet werden. Ampicillin und Aztreonam werden aber nach wie vor zur Behandlung bakterieller Infektionen eingesetzt.

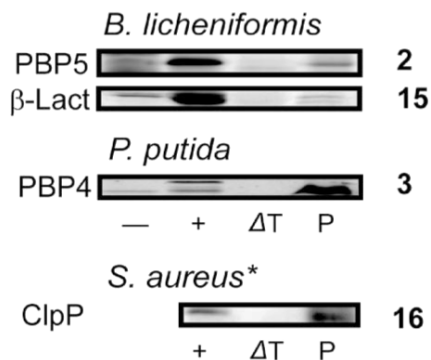
Die Angriffsziele der synthetischen Sonden in den bakteriellen Proteomen wurden identifiziert und sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Bakterienstamm	Protein	Sondenpräferenz
<i>P. putida</i>	KAS III	SPHx (13), SBzHx (14)
	AhpC	NCO (16)
<i>L. welshimeri</i>	KAS III	SPHx (13), SBzHx (14)
	Lip/Ac	SBzHx (14)
	ClpP	NCO (16)
<i>B. licheniformis</i>	β -Lac	SPHx (13), SPSO ₃ (17), SBzHx (14), SOctHx (15), NCO (16)
	DltD	CephN (4)
	ClpP	NCO (16)

Tabelle 5: Angriffsziele der Lactamsonden in nichtpathogenen Bakterien

In den untersuchten bakteriellen Proteomen wurden von den synthetischen Sonden interessanterweise keine der klassischen zellwandsynthetisierenden PBP markiert. Die Sonden inhibieren stattdessen vorrangig Vertreter anderer Enzymklassen. Durch rekombinante Expression wurden die wichtigsten Zielenzyme erhalten und anschließend mit den entsprechenden Sonden markiert. Zusätzlich wurde die Laufhöhe der überexprimierten und markierten Enzyme mit den vorhergehenden Proben auf einem Gel verglichen (Abbildung 37 A). Die durch Massenspektroskopie identifizierten Enzyme konnten so bestätigt werden. Alle markierten Enzyme greifen den Lactamring nukleophil durch einen Cystein- (KAS III und AhpC) oder einen Serinrest (β -Lact, Lip/Ac und ClpP) in der katalytisch aktiven Tasche an. Die Ergebnisse zeigen dabei deutlich auf, dass die Reaktivität der Lactamstruktur im bakteriellen Proteom durch entsprechende Dekoration des Grundgerüsts gezielt gesteuert werden kann. Die selektive Markierung einzelner Enzyme geschieht mit den synthetischen β -Lactamsonden schneller als mit den antibiotischen Sonden. Nach bereits 15 min Inkubationszeit mit den lebenden Zellen war die Aktivität von ClpP mit NCO (16) durch eine Fluoreszenzaufnahme des Gels nachzuweisen (Abbildung Anhang A3).

A)



B)

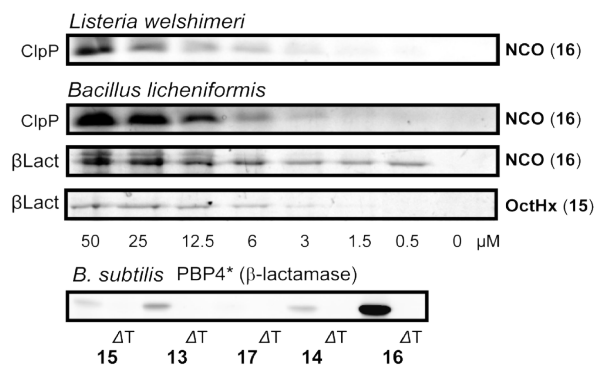


Abbildung 41:

A) Rekombinant exprimierte Enzyme aus *B. licheniformis*, *P. putida* und *S. aureus* (- = vor Induktion, + = nach Induktion, ΔT = Hitzekontrolle, P = Markierung im Proteom des jeweiligen Organismus)

B) Konzentrationsreihe von ClpP und β -Lact für ausgewählte Sonden in vivo, sowie Markierung einer β -Lactamase aus *B. subtilis*

Dabei ist zudem nur eine sehr geringe Konzentration von 1.5 μ M der Sonde notwendig (Abbildung 41 B, Abbildung Anhang A5). ClpP spielt in der Stresstoleranz und Virulenz in vielen pathogenen Bakterien wie *S. aureus*, *L. monocytogenes* und

P. aeruginosa eine fundamentale Rolle. In einer Vielzahl von Studien mit *S. aureus* Knockout-Mutanten, denen ClpP als Enzymkomplex fehlt, konnte eine wesentlich verringerte Virulenz des Bakteriums festgestellt werden. In vorhergehenden Experimenten der Arbeitsgruppe wurde aufgezeigt, dass β -Lactonsonden ClpP inhibieren können.^[84] Tatsächlich kann auch die NCO-Sonde (16) rekombinantes ClpP-Protein aus *S. aureus* markieren und inhibieren (Abbildung 41 A). Ein Peptidaseassay mit dem fluorogenen Modellpeptid *N*-Succinyl-Leu-Tyr-7-amido-4-methylcumarin erlaubt die Ermittlung des IC₅₀-Wertes der Sonde. Durch die Peptidaseaktivität von ClpP wird das Substrat gespalten und 7-Amino-4-Methylcumarin freigesetzt, dessen Fluoreszenz bei 450 nm gemessen werden kann.^[84b, 85] Der erhaltene IC₅₀ von 75 μ M ist im Vergleich zu β -Lactonverbindungen recht hoch. Die Erkenntnisse über die erforderliche Reaktivität und Struktur eines Inhibitors für ClpP können die Optimierung einer Lactamverbindung aber wesentlich erleichtern. Schon jetzt stellt die Sonde somit ein molekulares Werkzeug für die empfindliche Detektion der Aktivität des Enzyms im lebenden Organismus dar.

Über die Fähigkeit, Enzyme in einem Proteom zu markieren, entscheiden nicht nur die grundsätzliche chemische Reaktivität, sondern auch strukturelle Aspekte eines Inhibitors. Veranschaulichen lässt sich diese Aussage in den Markierungsereignissen einer β -Lactamase in *B. Licheniformis* (Abbildung 41). Die Sonden SPHx (13), SPSO₃ (17), SBzHx (14), SOctHx (15) und NCO (16) markieren diese, trotz vergleichbaren chemischen Eigenschaften, mit unterschiedlicher Intensität. Offensichtlich führt die Einführung der Benzylseitenkette zu einem verminderten Zugang zur aktiven Tasche des Enzyms. Dabei ist auch nicht die Größe des Substituenten ausschlaggebend, da sich die Sonde SOctHx (15) mit einem großen Octylrest als sehr selektiver Inhibitor mit starker Enzymwechselwirkung erweist, die sich noch bis zu einer Konzentration von 3 μ M nachweisen lässt (Abbildung 41 B). Bis zu einer Konzentration von 50 μ M ist die β -Lactamase weiterhin das einzige Target von SOctHx (15). Das Detektionslimit für die NCO-Sonde (16) ist mit < 0.5 μ M sogar noch geringer, allerdings werden ab 3 μ M noch weitere Enzyme im Proteom von *B. Licheniformis* markiert. Resistenzen von bakteriellen Pathogenen gegen β -Lactamantibiotika sind meistens auf die Expression von β -Lactamasen zurückzuführen. Möglichkeiten, die Regulation und Aktivität dieser Enzyme in ihrer natürlichen Umgebung im lebenden Organismus zu untersuchen sind deswegen von großem Interesse. Um zu klären, ob die kovalente Bindung der Sonde zu einer

Inhibition des Enzyms führt und wie groß das Inhibitionspotential ist, wurde der IC_{50} (mittlere inhibitorische Konzentration) für ausgewählte Sonden gemessen. Dafür wurde die β -Lactamase aus *B. Licheniformis* rekombinant exprimiert und aufgereinigt. Mit dem chromogenen Modellsubstrat *p*-Nitrophenylacetat kann die Aktivität der β -Lactamase verfolgt werden.^[86] Das Enzym katalysiert die Hydrolyse des Substrats, wobei *p*-Nitrophenol frei wird, das ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 400 nm aufweist. Die spektrometrische Messung ergab folgende IC_{50} -Werte:

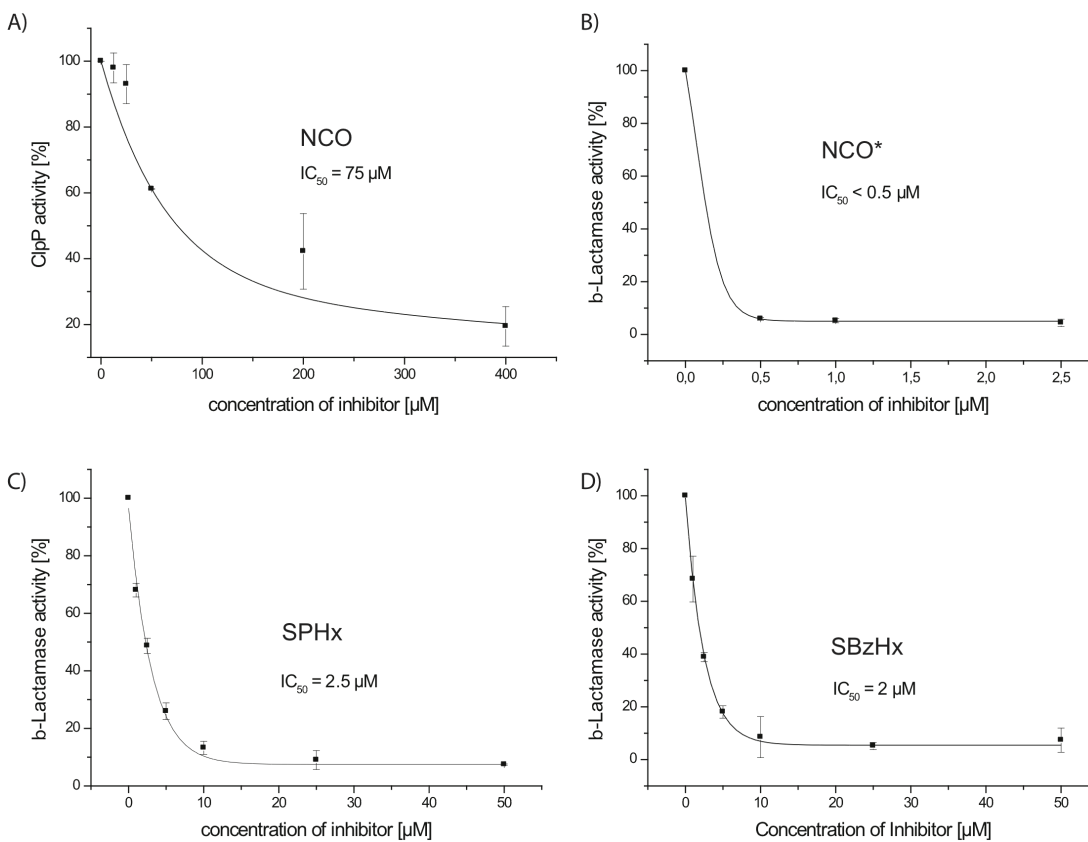


Abbildung 42: Inhibition und IC_{50} -Bestimmung von ClpP (aus *S. aureus*) und der markierten β -Lactamase (aus *B. licheniformis*) durch die entsprechenden Sonden

Sonde	IC_{50} (μ M)
SPHx (13)	2.5
SBzHx (14)	2
NCO (16)	< 0.5
SOctHx (15)	< 10*

Tabelle 6: IC_{50} -Werte für ausgewählte Sonden

Die Sonde SOctHx (15) war durch den langen hydrophoben Rest nur bis zu einer Konzentration von 25 μM löslich, zeigte jedoch darunter ebenfalls auch eine sehr gute Inhibitionsfähigkeit.

Über ABPP-Bibliotheken können also Inhibitorstrukturen für resistenzassoziierte Enzyme wie β -Lactamasen gefunden werden. Dies konnte dadurch belegt werden, dass alle Sonden bis auf SPSO₃ (17) in der Lage sind, auch eine weitere rekombinate β -Lactamase (PBP 4) aus *B. subtilis* zu markieren (Abbildung 41 B). Damit kann aufgezeigt werden, dass ABPP-Bibliotheken basierend auf der Lactamstruktur auch potentiell neue, noch nicht bekannte β -Lactamasen detektieren können, welche die Entwicklung einer Resistenz verursachen können.

2.1.5 Zusammenfassung

Sowohl antibiotisch aktive, als auch rein synthetische β -Lactame konnten als molekulare Sonden für die ABPP-Methodik validiert werden. Die antibiotischen Verbindungen markierten in gram-positiven und gram-negativen Bakterien bekannte Zielenzyme, die zellwandsynthetisierenden PBP. Die unterschiedliche Präferenz für verschiedene PBP begründet sich in der den Sonden zugrundeliegenden bicyclischen Lactamstrukturen.^[8, 41] Daraus ergeben sich mehrere Anwendungsmöglichkeiten. Zum einen können bekannte Lactamantibiotika auf ihre enzymatischen Angriffsziele mit der ABPP-Methodik untersucht werden. Bisher wurden die zellulären Targets der Lactamantibiotika durch radioaktive Derivatisierung der Verbindungen und Aufnahme eines Radiogrammes aufgeklärt.^[87] Eine andere Möglichkeit besteht in der Anbindung von Fluoreszenzfarbstoffen an die antibiotisch aktive Verbindung.^[88] Dies führt aber meist dazu, dass *in vivo*-Versuche nicht durchführbar sind, da der Farbstoff den Eintritt in die lebende Zelle verhindert. Durch ABPP-Experimente lassen sich solche aufwendigen Verfahrensweisen vermeiden. Auch die Bindungsaktivitäten neuer, potentiell antibiotisch aktiver Lactamnaturstoffe im bakteriellen Proteom können durch die Umwandlung der Moleküle in ABPP-Sonden aufgeklärt und deren Struktur auf Basis der Ergebnisse gegebenenfalls optimiert werden. Durch synthetische Lactamsonden sind Enzyme dabei einer Untersuchung zugänglich, die nicht durch die klassischen Lactamantibiotika inhibiert werden. Mehrere der bisher identifizierten Enzyme sind in wichtige Zellfunktionen involviert, wie in Primär- (KAS I und II) und Sekundärmetabolismus,

Antibiotikaresistenz, und Virulenz. Von besonderem medizinischen Interesse sind neben dem ClpP-Komplex β -Lactamaseenzyme, welche oft für die Resistenz von pathogenen Krankheitserregern gegenüber den β -Lactamantibiotika verantwortlich sind. Viele pathogene Bakterien entwickeln immer wieder Enzyme mit neuen Substratpräferenzen und bisher konnte kein Inhibitor alle β -Lactamaseklassen erreichen. Für die Wahl der effektiven Medikation und die gezielte Entwicklung von Inhibitoren ist die Identifizierung solcher Resistenzenzyme daher von großer Bedeutung. Der Einsatz von Lactamverbindungen als molekulares Werkzeug in der ABPP-Methodik eignet sich aber nicht nur für die Detektion und Untersuchung von PBP, sondern auch als Biomarker, um resistenzassoziierte Enzyme zu identifizieren.

2.2 Anwendung der Sondenbibliothek

2.2.1 Multiresistenter und Antibiotika-sensitiver *S. aureus*

Bakterielle Infekte durch *Staphylococcus aureus* (SA), einem gram-positiven pathogenen Bakterium, können in ungünstigen Fällen zu lebensbedrohlichen Erkrankungen führen. Eine Behandlung mit Antibiotika ist dann unumgänglich. Falls diese Bakterien jedoch Resistenzen gegen mehrere wichtige Antibiotika erworben (Multiresistenz) haben, sind sie besonders schwer zu eliminieren und werden bei Übertragung auf Dritte auch für diese zur Gefahr. Solche multiresistenten *Staphylococcus aureus*-Stämme werden als MRSA-Stämme bezeichnet.^[89] Um resistente Individuen nicht zu selektionieren und um die richtige Therapie auswählen zu können, sind Kenntnisse über Mechanismus und Ausprägung von Resistenzen notwendig. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es daher von großem Interesse, welche Unterscheidung zwischen antibiotika-sensitiven und -resistenten SA vorgenommen werden kann.

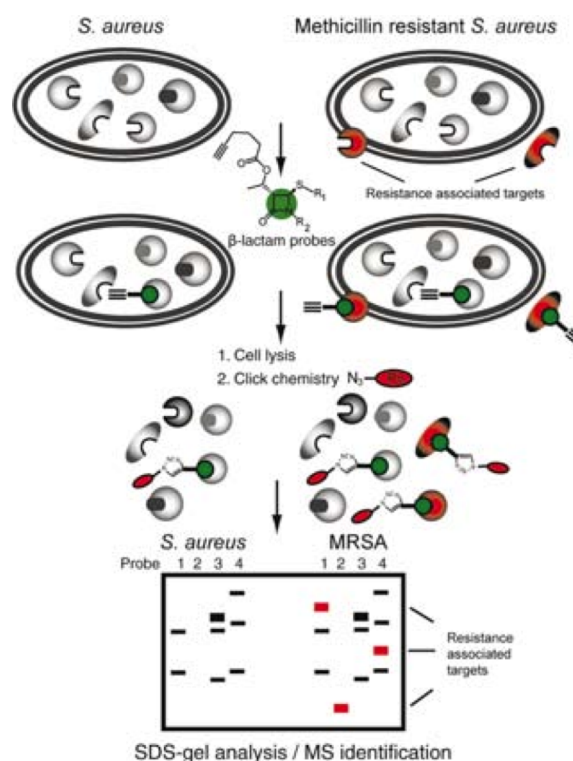


Abbildung 43: Schematische Darstellung für die *in situ* Markierung von SA NCTC und SA Mu50 durch beta-Lactamsonden und Vergleich der Markierungsprofile per Fluoreszenzanalyse

Die optimale Konzentration für einen Vergleich zwischen den Sonden wurde durch Variieren der Sondenkonzentration herausgefunden. In *S. aureus* Stämmen wurde mit einer Konzentration von 250 μM für die antibiotischen Sonden und mit 100 bis 300 μM für die monocyclischen Lactamsonden *in vivo* gearbeitet. Wiederum zeigte sich für die reaktivere NCO-Sonde (16), dass die geringere Konzentration von 100 μM zur Absättigung der enzymatischen Ziele ausreichend ist. Das Standardprotokoll beinhaltet neben der zweistündigen Inkubation der Sonden mit den lebenden SA-Zellen mehrere Waschschriffe und Lyse der Zellen. Es muss allerdings für pathogene Bakterienstämme unter besonderen Sicherheitsbestimmungen (S2) gearbeitet werden. Setzt man die Sonden für einen Vergleich des *MRSA*-Stammes Mu50 und dem Antibiotika-sensitiven Laborstamm NCTC 8325 ein, so ergeben sich tatsächlich unterschiedliche Reaktivitätsprofile.

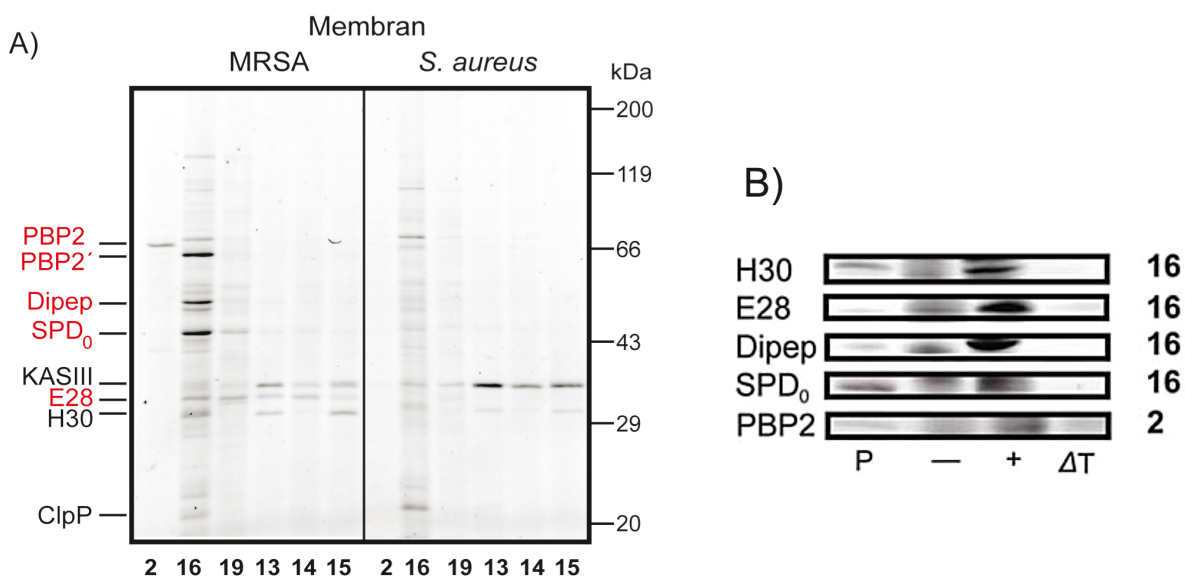


Abbildung 44:

A) Vergleich der Markierungsprofile von ausgewählten Sonden von MRSA Mu50 mit dem Antibiotika-sensitiven SA NCTC 8325

B) Rekombinante Expression ausgewählter Enzyme und Markierung mit der entsprechenden Sonde (P = im Proteom, – = vor Induktion, + = nach Induktion, ΔT = Hitzekontrolle)

Wie in den Bakterienstämmen *P. putida*, *B. licheniformis* und *L. welshimeri* reagieren die Sonden auch in *S. aureus* sehr selektiv mit einigen Enzymen. Im Gegensatz zu den nichtpathogenen Stämmen finden sich für die antibiotischen Sonden CephN (4) und Azt (3) in beiden *S. aureus* Stämmen keine enzymatischen Angriffsziele. Dagegen zeigen die synthetischen Sonden 13 – 16 Markierungsereignisse in beiden Proteomen. Die Identifikation der Enzyme gelang durch LC-MS Analyse.

Vergleichbar mit den nichtpathogenen Stämmen konnten die Sonden den Virulenz-Regulator ClpP, das metabolische Enzym KAS III und auch eine bislang nicht charakterisierte Hydrolase (Hy30) in den beiden SA-Stämmen markieren. Tatsächlich gibt es aber auch Reaktivitätsunterschiede zwischen Antibiotika-sensitiven und Antibiotika-resistenten *S. aureus*. So sind fünf Markierungsereignisse nur im MRSA-Stamm nachzuweisen und könnten in der Entwicklung und Ausprägung des Resistenzprozesses eine Rolle spielen. Dagegen wurden keine Enzymaktivitäten beobachtet, welche nur im Antibiotika-sensitiven *S. aureus* auftreten. Eine Zusammenfassung der Markierungsereignisse ist in Tabelle 7 gegeben.

Enzym	SA	MRSA	Funktion
Dipeptidase PepV (Dipep)	–	X	Unbekannt
Hypothetisches Enzym SA V2581 (Hy30)	X	X	Unbekannt
Serin Proteinase (SPD ₀)	–	X	Unbekannt
Carboxyesterase Precursor-like Enzym (E28)	–	X	Unbekannt
PBP 2	–	X	Zellwandverknüpfung
PBP 2'	–	X	Zellwandverknüpfung (MRSA)
MecR1 ungebunden, Kette A, Extrazelluläre Antibiotika-Sensor Domäne (MECR1)	–	X	Antibiotika-Sensor-Prozess (MRSA)
3-Oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III (KAS III)	X	X	Fettsäurebiosynthese
ATP-dependent Clp Protease proteolytic subunit (ClpP)	X	X	Virulenzregulation

Tabelle 7: Angriffsziele der Sondenbibliothek in SA NCTC 8325 und Mu50 und deren Funktion

Die wichtigsten Angriffsziele konnten überexprimiert und rein erhalten werden (Abbildung 44 B). Eine Bestätigung der MS-Analysedaten erfolgte durch Markierung der rekombinanten Enzyme mit der entsprechenden Sonde und anschließendem Vergleich mit den Markierungsereignissen in den SA-Stämmen. Die Aufreinigung der Serinprotease (SPD₀) verlief dagegen nicht erfolgreich. Proteasen sind Enzyme, die

Proteine oder Peptide spalten können, indem sie die Hydrolyse von Peptidbindungen katalysieren. In Serinproteasen führt ein aktivierter Serinrest den nukleophilen Angriff auf die Peptidbindung aus. Proteasen sind ubiquitär, d.h. sie kommen in allen Geweben und Zellen aller Organismen vor. Beim Aufschluss einer Bakterienzelle werden mitunter große Mengen von Proteasen freigesetzt, so dass die Aufreinigung eines überexprimierten Enzyms schnell und in der Kälte durchgeführt wird, um den Einfluss der Proteasen zu reduzieren. Oft werden deswegen in diesen Schritten auch Protease-Inhibitoren zugesetzt. Soll eine Protease für ABPP-Experimente isoliert werden, ist dieses Verfahren nicht nutzbar, da durch die Blockierung des aktiven Zentrums keine Markierung mehr stattfinden kann. Je nach Spezifität und Menge kann sich die Protease auch selbst abbauen. Dies verhinderte wahrscheinlich die Aufreinigung und selbst durch die Verringerung der Temperatur für die Kultivierung der BL21 Zellen konnte die Serinprotease nicht isoliert werden.

Die Identifikation des einzigen enzymatischen Angriffsziels für AmpN (2) per MS ergab eine Markierung nur im antibiotika-resistenten SA Mu50 für PBP 2. Die Sonde NCO (16) konnte in diesem SA-Stamm unter anderem PBP 2' markieren, dessen Bande durch die geringere Masse von 75.972 zu 80.236 im Fluoreszenzbild leicht darunter erscheint. PBP 2' wird exprimiert, wenn der MRSA-Stamm β -Lactamantibiotika ausgesetzt wird.^[90] Es vermittelt Resistenzeigenschaften, da es selbst bei Hemmung aller anderen PBP die Zellwandsynthese aufrechterhalten kann und im Gegensatz zu anderen PBP eine geringe Affinität gegenüber den bekannten β -Lactamantibiotika zeigt.^[91] Diese Tatsache wird durch die ABPP-Methodik anschaulich belegt, denn AmpN (2) vermag PBP 2' nicht zu markieren. Derzeit versucht man durch Strukturabkömmlinge der bekannten β -Lactamantibiotika auch dieses Enzym zu inhibieren, um so auch MRSA-Stämme behandeln zu können. Aussichtsreiche Kandidaten beinhalten eine freie Hydroxylgruppe in C-1'-Position.^[92] Diese Verbindungen zeigen damit eine auffällige strukturelle Ähnlichkeit zur Sonde NCO (16), welche ebenfalls in C-1'-Position eine freie OH-Gruppe trägt. Um die Rolle dieses Strukturelementes bezüglich der Bindungsfähigkeit mit PBP 2' zu erforschen, wurde eine weitere Sonde synthetisiert und in die Bibliothek mit aufgenommen.

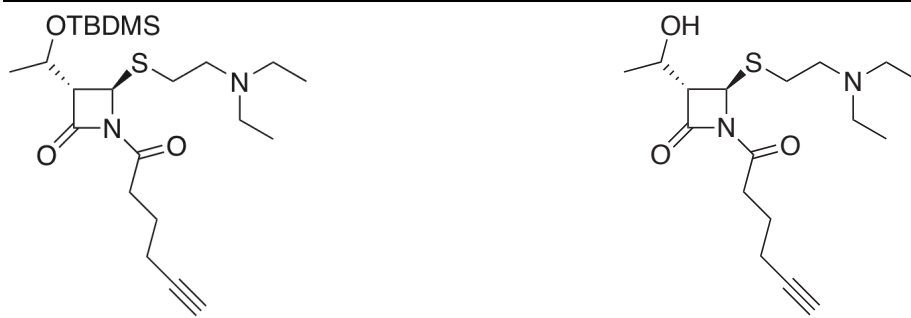


Abbildung 45: Strukturvergleich zwischen PNCO (19) links und NCO (16) rechts

Die Synthese geht dabei von Verbindung (8) aus. Es wurde im Gegensatz zu den Synthesen für die Lactambibliothek auf die Entschützung der TBDMS-Gruppe verzichtet. Mit Hex-5-insäurechlorid (28) und Triethylamin als Base erhält man die chemische Sonde PNCO (19). Diese Sonde unterscheidet sich damit von NCO (16) durch die TBDMS-Schutzgruppe.

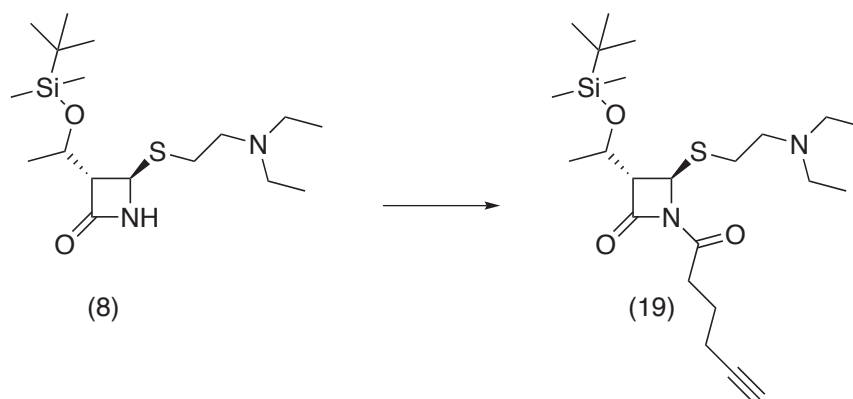


Abbildung 46: Syntheschema der chemischen Sonde PNCO (19)

Markierungsexperimente mit der Sonde PNCO (19) zeigten sowohl für PBP 2' als auch für alle anderen enzymatischen Ziele keine Signale mehr in den Gelen (Abbildung 44 A). Die Sonde mit geschützter Hydroxylfunktion (PNCO, 19) ist nicht mehr in der Lage, Zugang zu elektrophilen Resten innerhalb eines Enzyms zu finden, um mit diesen kovalent zu reagieren. Dies lässt auf eine wichtige Rolle der freien OH-Gruppe als Strukturelement in der Fähigkeit der Wechselwirkung mit PBP 2' und anderen Enzymen schließen. Die Ergebnisse solcher ABPP-Experimente können somit wichtige Detailinformationen für den strukturellen Aufbau potenter Inhibitoren für bestimmte Enzyme liefern. Die Expression von PBP 2' wird in resistenten SA-Stämmen durch die Aktivität der MecR1 Sensor Domäne hervorgerufen, dessen C-

terminales Ende an der Zellaußenwand lokalisiert ist. β -Lactamverbindungen in der extrazellulären Umgebung werden kovalent an das aktive Zentrum gebunden, wodurch über eine Signalkaskade intrazellulär die Ablesung von PBP 2' eingeleitet wird. Der Extrazellulärraum enthält je nach Wachstumsbedingungen allgemein auch Metaboliten, Ionen und Proteine, die von der Zelle abgegeben wurden. Diese, sowie weitere nichtzelleigene Substanzen, können die Zellfunktionen entscheidend mitbestimmen. Für die Analyse des extrazellulären Mediums mittels der ABPP-Methodik wurde daher eine Vorgehensweise entworfen. Dafür wurden eine Stunde nach Übergang der Bakterienkultur in die stationäre Phase die lebenden Zellen abzentrifugiert. Nach Abtrennung des Mediums vom Pellet wurde durch eine Filtration sichergestellt, dass sich keine intakten Zellen mehr im Medium befinden. Dazu wurde ein Sterilfilter mit 0.2 μ M Porengröße verwendet, wodurch Bakterienzellen, nicht jedoch Proteine zurückgehalten werden. Das so erhaltene Medium wurde mit einer äquivalenten Menge eiskaltem EtOH versetzt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Auf diese Weise gefällte Proteine und andere Substanzen werden durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt, wobei die Menge an gefällten Substanzen nicht unbedingt mit dem menschlichen Auge erfassbar sein muss. Aufgrund der Empfindlichkeit der ABPP-Methodik lassen sich auch solche Kleinstmengen detektieren, sobald eine kovalente Bindung mit der Sonde hergestellt werden kann. Das Detektionslimit ist hierbei in erster Linie durch die nachfolgenden Separationsmethoden begrenzt, wie z.B. die Auflösung der Gelelektrophorese. Analysiert man das extrazelluläre Medium der ausgewählten SA-Stämme auf diese Weise, lässt sich tatsächlich eine Bande für die antibiotischen Sonden AmpN (2), Azt (3) und CephN (4) im Fluoreszenzbild feststellen (Abbildung 47). Die Bande tritt nur beim MRSA-Stamm auf und während die Sonden Azt (3) und CephN (4) keine Angriffsziele im Proteom von Mu50 und NCTC aufweisen, ist diese auch nicht im Proteomprofiling für AmpN (2) zu sehen.

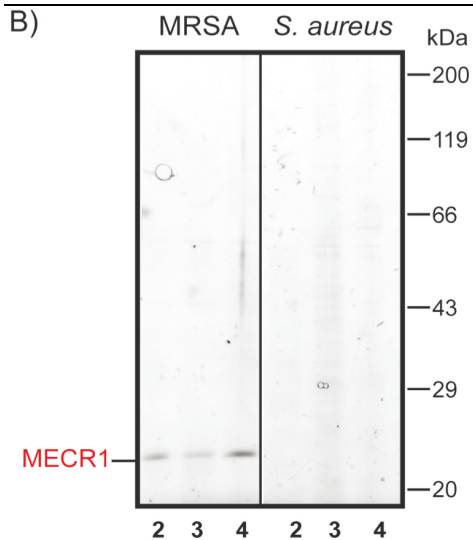
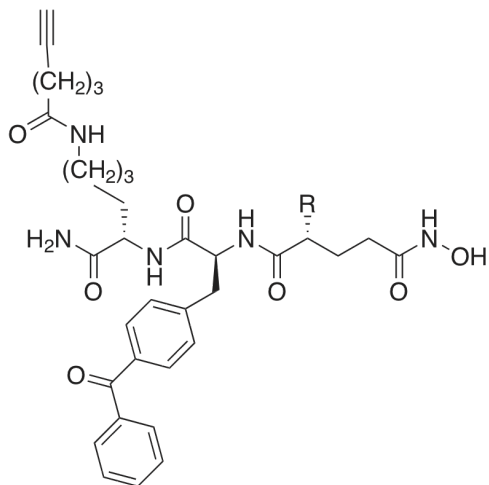


Abbildung 47: Fluoreszenzgel der Markierung des extrazellulären Mediums von SA NCTC und MRSA Mu50 mit den antibiotischen Sonden 2 – 4

Trotz der sehr geringen Mengen war eine Anreicherung und die anschließende LC-MS-Analyse erfolgreich. Es konnte der C-terminale Teil des MecR1-Enzyms nachgewiesen werden, welcher β -Lactamantibiotika kovalent bindet und über eine Konformationsänderung die Expression von PBP 2' im Zellinneren einleitet.^[67] Warum dieser Teil des Enzyms während des Wachstums ins extrazelluläre Medium abgegeben wird, ist unbekannt. Es ergibt sich damit aber eine sehr eindeutige und einzigartige Signatur im ABPP-Profil für MRSA-Stämme. Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die erfolgreiche Behandlung bakterieller Infektionen mit SA-Stämmen ist die Kenntnis über die Resistenzeigenschaften des krankheitsverursachenden Erregers. Über den Signaltransduktionspfad für die Expression von PBP 2' verfügen nur β -lactamantibiotikaresistente SA-Bakterien, da sie die genetische Information für die Bildung für PBP 2' besitzen, welches das Überleben des Pathogens trotz einer Antibiotikabehandlung sichert. Mit den antibiotischen Sonden als Biomarker können über ABPP-Experimente schnell und verlässlich diese potentiell medikamentenresistenten SA-Stämme eindeutig von nichtresistenten Stämmen unterschieden werden.

Außer den Enzymen PBP 2, PBP 2' und MecR1, deren Funktion im Zellgeschehen bekannt ist, sind die weiteren nur in MRSA markierten Enzyme noch uncharakterisiert und wurden bislang nicht mit Resistenzeigenschaften von MRSA-Stämmen in Verbindung gebracht. Zwei dieser Enzyme gehören der Enzymklasse der Serinhydrolasen an und greifen den β -Lactamring nukleophil über einen katalytisch aktiven Serinrest an. Interessanterweise weist die Dipeptidase (Dipep)

eine hohe Sequenzhomologie zur Enzymklasse der Metalloproteasen auf. Diese Enzyme nutzen Zinkionen in ihrer Substratbindetasche zur Ausführung der Katalysereaktion. Die Dipeptidase konnte rekombinant in reiner Form erhalten und durch Markierung und Laufhöhenvergleich bestätigt werden. Zu beachten ist, dass das bisher verwendete Standardprotokoll zur Aufreinigung von Proteinen EDTA enthält. Dieses Reagenz darf zur Aufreinigung von Metalloenzymen allerdings nicht verwendet werden, da durch Chelatbildung zweiwertige Metallionen unter Umständen aus dem aktiven Zentrum entfernt werden. Durch ABPP-Experimente mit rekombinantem Enzym gelang die Zuordnung der gefundenen Dipeptidase zur Enzymklasse der Metalloproteasen. Vor kurzem wurden ABPP-Sonden für die Markierung und Erforschung von Metalloproteasen (MP) entwickelt. Die Mitglieder dieser Bibliothek verfügen über eine Hydroxamatgruppe, die als Ligand an das Metallzentrum des Enzyms koordiniert und ein Benzophenonrest stellt anschließend eine kovalente Bindung durch Photoaktivierung her (Abbildung 48).^[28b] Da die Substratpräferenzen der Dipeptidase nicht bekannt sind, wurden MP-Sonden mit verschiedenen Seitenketten ausgewählt.



R = Lysin, Leucin, Aspartat

Abbildung 48: Struktur der MP-Sonden

Die Dipeptidase konnte im Lysat von BL21-Zellen intensiv von der Sonde LysR₂ markiert werden, während die MP-Sonde AspR₂ mit der negativ geladenen Seitenkette Aspartat kaum Wechselwirkung mit dem Enzym zeigt (Abbildung 49). Die Dipeptidase gehört also tatsächlich zur Enzymfamilie der Metalloproteasen und wird bevorzugt von Hydroxamatinhibitoren mit negativ geladenen Seitenketten gehemmt.

Eine Vorinkubation des Lysats mit Phenylmethylsulfonylfluorid PMSF (Abbildung 49) und GM6001 (Abbildung 49), die als Inhibitoren der aktiven Zentren von Serin-Proteasen und Metalloproteasen bekannt sind,^[93] zeigte in der Tat, dass hierbei eine anschließende Markierung im Falle von GM6001 durch die Sonde NCO (16) unterbunden wurde (Abbildung 49). Das stützt nicht nur die Zuordnung der Dipeptidase zu den Metalloproteasen, sondern zeigt auch, dass zur Anbindung des Enzyms durch die NCO-Sonde (16) ein katalytisch aktives Metallzentrum erforderlich ist.

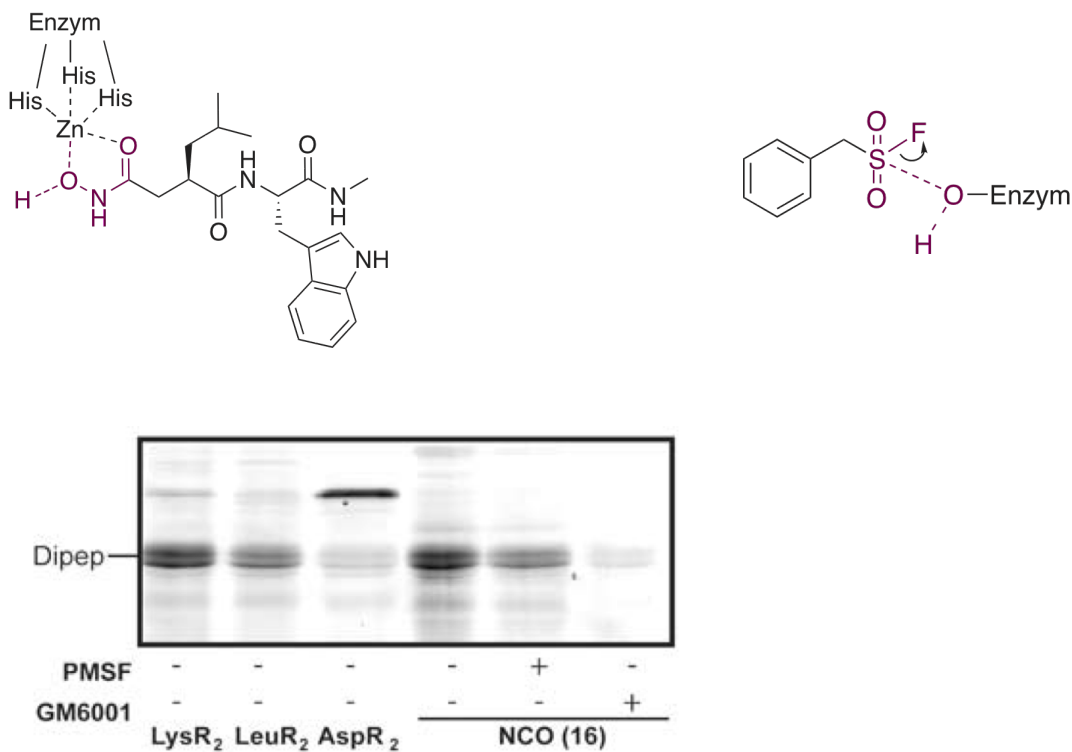


Abbildung 49: Komplexierung eines enzymatischen Zn-Ions durch GM6001 (links) und Bindung eines Enzyms durch PMSF über einen Serinrest (rechts). Markierungsereignisse der Dipeptidase mit MP-Sonden und Inhibitionsexperiment mit GM 6001 und PMSF

Obwohl die MRSA-Dipeptidase bislang uncharakterisiert und deren Funktion unbekannt ist, weist sie eine hohe Homologie zu den Metalloproteasen auf, welche zwei Metallionenzentren in ihrem Aufbau besitzen (z.B. Dipeptidase V). Interessanterweise gehören auch Metallo- β -Lactamasen dieser Enzymfamilie an. Metallo- β -Lactamasen spielen eine bedeutende Rolle im Resistenzmechanismus vieler Pathogene, da sie über ihre Metallzentren in der Lage sind, die β -Lactambindung zu spalten und Lactamantibiotika zu inaktivieren. Metallo- β -Lactamasen werden nicht durch konventionelle β -Lactamaseinhibitoren

gehemmt (Kapitel 1.4). Die steigende Entwicklung immer neuer Varianten dieser effizienten Verteidigungsenzyme in Pathogenen und der Mangel an biochemischen Nachweisverfahren stellt die Antibiotikaforschung bislang vor große Probleme. Einer der Vorzüge des ABPP-Verfahrens für das Profiling von Enzymen ist die Kenntnis der chemischen Struktur eines Inhibitors. Daraus lassen sich nicht nur Aufschlüsse auf den Reaktionsmechanismus gewinnen, welcher zur Inhibition führt. Es können sich auch Informationen über mögliche Substrate des Enzyms ergeben. Es wurde daher überprüft, ob die Dipeptidase nicht nur β -Lactammoleküle binden kann, sondern auch in der Lage ist, β -Lactamantibiotika zu hydrolysieren (und damit β -Lactamaseaktivität zu entfalten).

Dazu wurden zunächst die in ihrer Lactamstruktur unterschiedlichen β -Lactamantibiotika Penicillin G (Abbildung 18), Aztreonam und Cefotaxim (Abbildung 14) für eine Stunde mit der rekombinant erhaltenen Dipeptidase inkubiert. Nach Zentrifugation wurde im Anschluss das HPLC-Chromatogramm des Überstands auf zusätzliche Peaks neben dem des intakten β -Lactamantibiotikums untersucht. Für Penicillin G zeigte das Chromatogramm eine deutliche Verschiebung der Hauptfraktion zu einer kleineren Retentionszeit (Abbildung 50). Tatsächlich handelt es sich um das Hydrolyseprodukt von Penicillin G, welches über Massenspektrometrie (berechnet für $C_{16}H_{21}N_2O_5S^+$: 353.1166, gefunden: 353.1154) bestätigt werden konnte. In einem Kontrollexperiment wurde eine kommerziell erhältliche β -Lactamase aus *Bacillus cereus* eingesetzt, aus deren Aktivität auf Penicillin G ebenfalls der Peak des Hydrolyseprodukts mit der gleichen Retentionszeit resultierte.

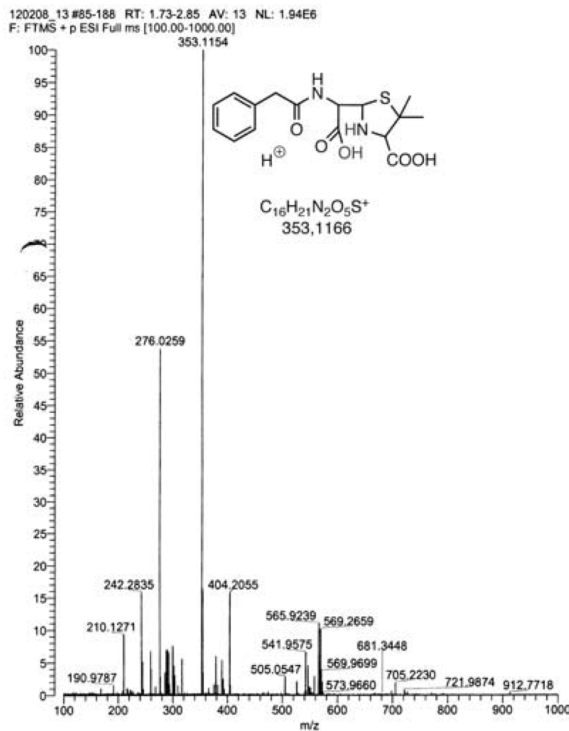
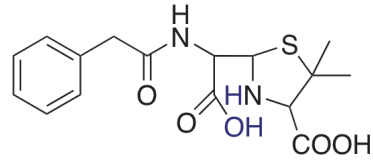
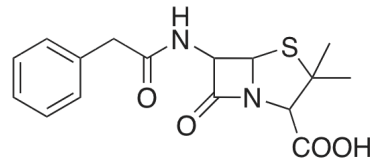
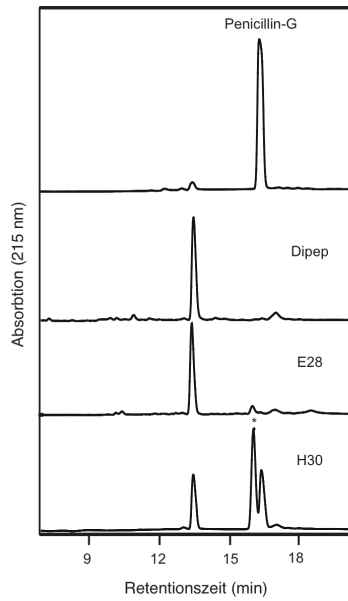
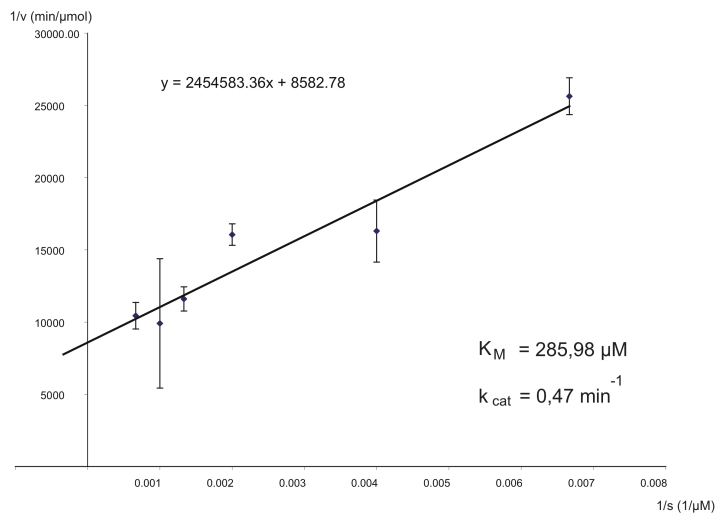


Abbildung 50: HPLC-Chromatogramme der Hydrolyse von Penicillin G durch die Enzyme Dipep, E28, H30 / Struktur Penicillin G und Hydrolyseprodukt. Nachweis der Hydrolyse durch ESI-Massenspektrometrie

Wie die Dipeptidase unterliegen auch die weiteren durch die Lactambibliothek markierten Enzyme den selben Strukturvoraussetzungen, um β -Lactamantibiotika als mögliches Substrat umzusetzen. So besitzen auch die Esterase (E28) und die Hydrolase (H30) die Fähigkeit, die Halbwertszeit von Penicillin G im Puffersystem zu verkürzen. Interessanterweise kann hier beobachtet werden, dass die nur im MRSA-

Stamm aktive Esterase (E28) das Substrat im Versuchszeitraum komplett hydrolysiert, während die in beiden Stämmen aktive Hydrolase (H30) Penicillin G nur teilweise umsetzt. Mit dem entwickelten HPLC-Assay können zusätzlich unter der Annahme gleicher Absorption für Edukt und Hydrolyseprodukt wichtige biochemische Charakteristika der Enzymreaktion ermittelt werden. Nach Bestimmung des linearen Bereichs für den Substratumsatz von Penicillin G durch die Dipeptidase und die Esterase wurden HPLC-Chromatogramme nach zwei Inkubationszeiten mit mehreren Substratkonzentrationen ausgewertet. Die Reaktionen wurden dabei jeweils durch Zugabe von eiskaltem Aceton und Zentrifugation gequenchet. Das Integral über die Peaks im HPLC-Spektrum wurde mit der Konzentration korreliert und aus der Steigung die Umsatzgeschwindigkeit bestimmt. Der reziproke Wert für Substratkonzentrationen und Umsatzgeschwindigkeit gehen in den Lineweaver-Burk Plot ein, woraus sich die Michaelis-Konstante und die molekulare Aktivität (turnover number) berechnen lassen (Abbildung 51).

A)



B)

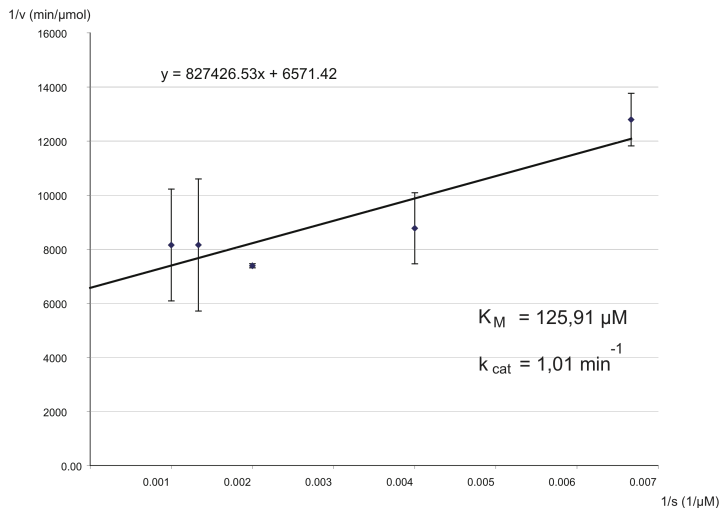


Abbildung 51: Lineweaver-Burk Plots von A) Dipep und B) E28

In der Enzymkinetik wird gelegentlich K_m , die Michaeliskonstante, als Maß für die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat angegeben.^[94] Die erhaltenen Werte von $285.89 \mu\text{M}$ für die Dipeptidase und $125.91 \mu\text{M}$ stimmen mit in der Literatur bekannten Werten für Metallo- und Serin- β -Lactamasen überein. Die k_{cat} Werte, ein Maß für die Effizienz eines Katalysators, fallen im Vergleich mit den Literaturdaten jedoch zu niedrig aus.^[95] Verschiedene Faktoren können dafür verantwortlich sein. Neben den experimentellen Voraussetzungen und Annahmen (Absorption), spielen auch die natürliche Umgebung in der lebenden Zelle eine wichtige Rolle für die Katalysereaktion, die in diesem Assay eventuell nur unzureichend simuliert werden konnte. Die Substratpräferenz der Enzyme Dipep, E28 und H30 für β -Lactamantibiotika beschränkt sich offensichtlich auch nur auf Lactamverbindungen mit Penicillingerüst. Während Lactamwirkstoffe wie Cefotaxim aus der Gruppe der

Cephalosporine und Monobactame wie Aztreonam neben den aktiven Enzymen intakt bleiben, wird Ampicillin (Penicillinstruktur) zu seinem Hydrolyseprodukt umgesetzt (Abbildung A6). Die Hydrolyse von Ampicillin geschieht unter gleichen Versuchsbedingungen wie für Penicillin G allerdings nicht vollständig. Deswegen ist auch eine differenziertere Funktion der Enzyme im Zellgeschehen vorstellbar. Durch einen Vergleich mit anderen Metalloproteasen ist hingegen eine Bedeutung für die Entwicklung und Ausprägung einer Resistenz für β -Lactamantibiotika in Betracht zu ziehen. Die Metalloprotease MMP 7 wurde ebenfalls auf die Fähigkeit überprüft, Penicillin G als Substrat zu hydrolysieren. Es ergaben sich selbst bei hohen Enzymkonzentrationen keine Auswirkungen auf die Halbwertszeit von Penicillin G (Abbildung A7). Die gefundenen Enzyme müssen also die strukturellen und mechanistischen Voraussetzungen enthalten, um Penicilline als Substrat zu akzeptieren und umzusetzen. Dabei kann vor allem das Verständnis des Reaktionsmechanismus der Dipeptidase von wichtiger Bedeutung sein, da dieses als Metallo-Enzym charakterisiert werden konnte. Durch seine enzymatischen Charakteristika bezüglich der Hydrolysefähigkeit von β -Lactamantibiotika könnte dieses als Modell-Enzym das Wissen über Aufbau und Eigenschaften von Metallo- β -Lactamasen erweitern. Neben den Metallozentren spielen auch verschiedene Aminosäurereste eine wichtige Rolle im Katalysezyklus von Metallo- β -Lactamasen. Die Art und Anordnung der aktiven Zentren beeinflussen die Substratpräferenz eines Enzyms und sind für das Verständnis des Reaktionsmechanismus und die Entwicklung effektiver Inhibitoren maßgebend. Für die Dipeptidase wurde bereits festgestellt, dass keine reaktiven Serinreste vorliegen, welche die Sonde NCO (16) nukleophil angreifen und für die Inhibition verantwortlich sind. Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass Serinreste aktiv in den Ablauf der Hydrolysereaktion der Penicilline eingreifen. Für einen nukleophilen Angriff der Lactambindung eignen sich neben Serinen auch Cysteinreste. Die Dipeptidase enthält vier Cysteine in ihrer Aminosäuresequenz und es soll mit Hilfe von Punktmutationen der Dipeptidase und ABPP-Experimenten herausgefunden werden, welches Cystein den nukleophilen Angriff auf die NCO-Sonde (16) ausführt. Dazu wurden die Cysteine in der Aminosäuresequenz der Dipeptidase via PCR jeweils durch Alanin ersetzt und vervielfältigt (Abbildung 52 A). Die rekombinanten Mutanten konnten in BLUE-Zellen überexprimiert und aufgereinigt erhalten werden. Den Austausch der Cysteinreste durch Alanin bestätigte eine Sequenzanalyse. Die Sonde NCO (16) wurde mit den

rekombinanten Enzymen eine Stunde inkubiert und nach Click-Chemie und Gelelektrophorese wurde das Fluoreszenzbild aufgenommen.

A)

```
1 mwkekvvqqye dqiindlkg1 laiesvrdda kasedapvqp gprkaldymy eiahrdgttt
61 hdvdhiagri eagkndvlg ilchvdvvpv gdgwdsnpfe pvvtedaiia rgtlddkgpt
121 iaayyaikil edmnvdwkkv ihmiigtdee sdwkclddryf kteemptlgf apdaefpkih
181 gekgittfdl vqnkltedqd epdyelitfk sgerynmvvpd haearvvlvke nmtdvigqdfv
241 yflegqnhlqg dstvdsgilv ltvegkavhg mdpsigvnag lyllkflasl nldnnaqafv
301 afsnrylfns dfgekmgmkf htdvmgdvtt nigvitydne naglfginlr ypegfefeka
361 mdrfaneiqq ygfevklgkv qpphyvdknd pfvqklvtay rnqndmtep ytigggtyar
421 nldkgvafga mfsdsedlmh qkneyitkkq lfnatsiyle aiyslqvee //
```

B)

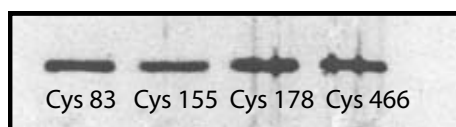


Abbildung 52:

A) Proteinsequenz Dipep

B) Markierung der Punktmutanten von Dipep mit NCO (16)

Die Aufnahme zeigt, dass die NCO-Sonde (16) alle Mutantenzymen trotz Austausch des Cysteins weiterhin markieren kann und keine Intensitätsunterschiede zu erkennen sind (Abbildung 52 B). Das heißt die Dipeptidase enthält weitere, für einen nukleophilen Angriff aktivierte Aminosäurereste, welche sich bei Hemmung eines Cysteins am Reaktionsmechanismus beteiligen können. Die Mutanten wurden auch auf ihre Fähigkeit getestet, die Hydrolyse von Penicillin G zu katalysieren. Es wurde festgestellt, dass die Enzymaktivität zwar um etwa 50 % weniger effizient als im Vergleich zum Wildtyp abläuft, aber die Enzyme ihre Funktion weiterhin ausführen können. Solche Ergebnisse von ABPP-Experimenten können die Auswertung von Kristallstrukturdaten entscheidend unterstützen, damit auch weitere, zur Katalyse befähigte Aminosäurezentren mit in die Betrachtung einbezogen werden können. Offensichtlich ist auch der Nutzen für die Entwicklung effizienter Inhibitoren und deren Einsatz als Arznei. Wenn sich solche Beobachtungen tatsächlich auf einige Metallo- β -Lactamasen übertragen lassen, müssten Hemmstoffe beide reaktiven

Aminosäurezentren zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms inhibieren. Ein Inhibitor muss unter Umständen strukturell bzw. in der Konzentration angepasst werden oder es ist eine Kombinationsgabe von zwei unterschiedlichen Arzneisubstanzen notwendig.

2.2.2 Zusammenfassung

Eine Sondenbibliothek auf Basis des privilegierten Lactammotivs konnte erfolgreich für den Einsatz in ABPP-Experimenten etabliert werden. In den nichtpathogenen Stämmen markieren die antibiotischen Sonden spezifisch und selektiv PBP, wobei sich die verschiedenen Grundstrukturen auf die Präferenz für die PBP auswirken. Die strukturellen Voraussetzungen konnten anhand von ABPP-Experimenten mit diesen Sonden veranschaulicht werden. Die Sonden eignen sich für eine *in situ*-Darstellung der enzymatischen Reaktivität und Aktivität im lebenden Mikroorganismus, was konventionelle Methoden oft nicht leisten können. Neu entwickelte Lactamwirkstoffe können auf Basis dieser Ergebnisse *in vivo* auf ihre enzymatischen Angriffsziele getestet und gegebenenfalls durch Strukturvariation auf bestimmte Inhibitoreigenschaften angepasst werden. Synthetische Lactamsonden markierten in Nichtpathogenen selektiv andere Enzymklassen, die nicht durch klassische β -Lactamantibiotika erreicht werden. Die Vertreter dieser Enzymklassen greifen den Lactamring über einen aktivierten nukleophilen Aminosäurerest an. Unter den markierten Enzymen sind einige Vertreter in wichtige bakterielle Zellaktivitäten involviert. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Inhibitionsfähigkeit für β -Lactamasen, die eine wichtige Rolle in der gefürchteten Antibiotikaresistenz von Bakterien spielen.

Anschaulich demonstriert werden konnte das Potential von β -Lactamsonden durch einen Vergleich des Antibiotika-sensitiven SA-Stammes NCTC 8325 und dem multiresistenten Stamm Mu50. Es gelang die visuelle Darstellung einer einzigartigen Proteomsignatur in multiresistenten SA, welche durch die Aufnahme der MecR1 Genkassette ein Signalsystem für β -Lactamantibiotika entwickelten und zur Resistenz der Bakterienstämme aufgrund der Expression von PBP 2' führt. Dies erlaubt die schnelle Unterscheidung von *S. aureus* Stämmen, welche aufgrund ihrer

genetischen Voraussetzungen eine potentielle Resistenz gegen konventionelle β -Lactamantibiotika aufweisen. Wichtige Strukturelemente für die Inhibition von PBP 2' durch eine Lactamverbindung konnten durch Derivatisierung der NCO-Sonde (16) aufgedeckt werden. Darüber hinaus war es durch diese Sonde möglich, mehrere bis jetzt uncharakterisierte Enzyme zu detektieren. Diesen Enzymen konnte in dieser Arbeit erstmals die Fähigkeit zur Hydrolyse von Penicillinen zugeordnet werden. Ob die Enzyme im Zellgeschehen primär als Penicillase zur Resistenzausprägung beitragen, kann nun näher durch ergänzende Verfahren erforscht werden (genetischer Knock-out, Inhibition und MIC-Messung). Unter den markierten Enzymen befindet sich eine ebenfalls uncharakterisierte Dipeptidase, welche durch ABPP-Experimente als Metalloprotease klassifiziert werden konnte. Die Penicillaseaktivität der Metalloproteasen ist dabei von besonderem Interesse, da Metallo- β -Lactamasen nicht von konventionellen β -Lactamantibiotika und Lactamase-Inhibitoren blockiert werden und alternative Reaktionsmechanismen zum Tragen kommen.

2.3 γ -Lactonderivate als ABPP-Sonden

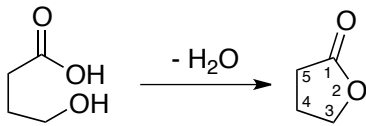
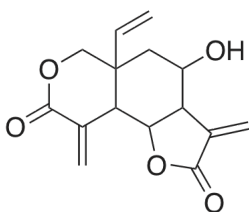


Abbildung 53: Aufbau eines Lactons durch Kondensation

Als Lactone bezeichnet man Moleküle, in denen eine Esterbindung zwischen einer Hydroxy- und einer Carboxylgruppe desselben Moleküls aufgebaut wird, sodass unter Kondensation ein Ring entsteht (Abbildung 53).^[96] Heterocyclen im Allgemeinen finden sich in vielen Naturstoffen. Die Anellierung cyclischer Systeme führt dabei oft zu γ -Lactonderivaten, welche als Strukturelemente eine biologische Wirkung herbeiführen können. Das aus Pflanzen gewonnene heterocyclische System Vernolepin verfügt über eine Doppelbindung in Ringposition C-5 (Abbildung 54). Im Zusammenhang mit der Lactonstruktur ermöglicht dies eine kovalente Bindung von enzymatischen Sulfhydrylgruppen durch eine Variante der Michaeladdition. Konkret inhibiert Vernolepin das Enzym Phosphofruktokinase über eine nukleophile Addition von SH-Gruppierungen des Enzyms und diente deshalb als Anti-Tumor-Kandidat in der Krebsforschung.^[97] Ein Beispiel, in dem der Lactonring ohne anellierte Ringsysteme seine bioaktive Wirkung entfaltet, ist das Signalmolekül *N*-Acyl-Homoserin-Lacton (AHL).



Vernolepin

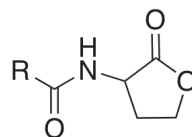


Abbildung 54: Struktur von Vernolepin (links) und von *N*-Acyl-Homoserin-Lactonen (rechts)

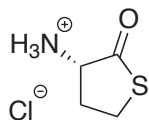
Diese Struktur ist als Signalmolekül im Quorum sensing von Bakterien involviert. Durch Quorum sensing wird das Verhalten der Erreger auf engem Raum koordiniert.

Es bezeichnet die Fähigkeit von Einzellern, über chemische Kommunikation die Zelldichte der Population ermitteln zu können, indem sie ihre Anwesenheit durch in das Medium abgegebene Signalstoffe anderen Bakterien mitteilen. Der innerartlichen Kommunikation dient dabei *N*-Acyl-Homoserin-Lacton (Autoinducer-1). Bestimmte Gene werden nur dann aktiviert, wenn eine gewisse Zelldichte über- oder unterschritten wird. Dies geschieht um Prozesse zu koordinieren, die ineffizient wären, wenn sie nur von einzelnen Zellen durchgeführt würden (z. B. die Bildung von Biofilmen oder die Sekretion von Antibiotika oder Pathogenitätsfaktoren). Dabei ist auch die Kommunikation zwischen unterschiedlichen Bakterienarten über andere Signalmoleküle möglich. *Pseudomonas aeruginosa*, ein Erreger von Lungenentzündung und anderen lebensbedrohlichen Infektionen, kann innerhalb seines Wirts leben, ohne ihn zu schädigen. Wenn er sich jedoch stark vermehrt, ändert er seine „Verhaltensweise“: Die Zellen bilden Biofilme und können zur Erkrankung des Wirts führen.^[98] Das Quorum sensing zu verhindern ist daher ein vielversprechender Ansatzpunkt für neue Antibiotika. Denn alle bekannten Antibiotika töten Bakterien ab oder blockieren die Vermehrung durch Zellteilung. Der daraus resultierende Selektionsdruck führt dazu, dass sich früher oder später resistente Mutanten bilden, die dem Angriff der Antibiotika entgehen. Eine Unterbindung des Quorum Sensing tötet die Bakterien nicht ab, sondern versucht nur, deren Virulenz herabzusetzen. Die hohe Resistenzneigung könnte damit verhindert werden.^[99]

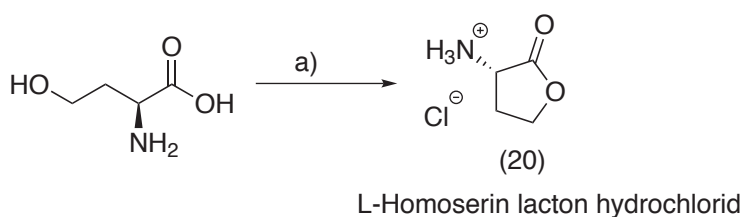
2.3.1 Synthesestrategie

Nachdem in der Arbeitsgruppe β -Lactone und β -Lactame für die ABPP-Methodik erfolgreich etabliert wurden, sollten die Strukturen für ABPP-Sonden auf γ -Lactonderivate zunächst auf der Basisstruktur des AHL erweitert werden. Die Synthese der Sondenbibliothek ging von den kommerziell erhältlichen Substanzen L-Homocysteinthiolactonhydrochlorid und der Aminosäure L-Homoserin aus. Durch die Kondensationsreaktion mit Hilfe von HCl erhält man aus L-Homoserin einen Lactonring, der an Ringposition C-5 ein primäres Amin besitzt (Abbildung 55)^[100]. Diese Aminofunktion kann in weiteren Syntheseschritten modifiziert werden. L-Homocysteinthiolactonhydrochlorid besitzt bereits den Fünfring-Heterocycclus, wobei dieser anstatt einem intramolekularen Ester den Thioester enthält. Dies könnte

einen Einfluss auf die Anbindung an Enzyme bewirken, weshalb diese Veränderung der Heteroatome im Cyclus in der Synthese einer Sondenbibliothek mit berücksichtigt werden sollte.



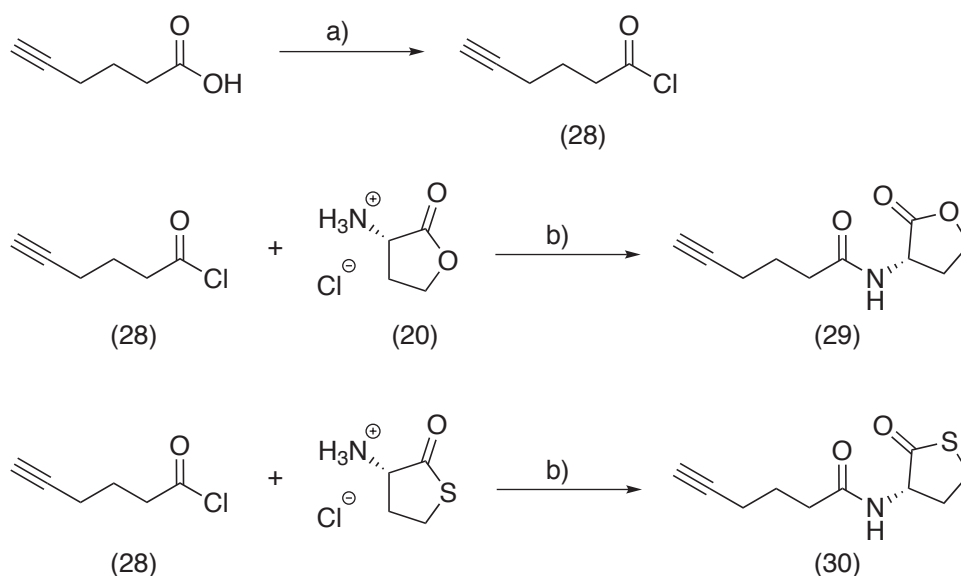
L-homocystein thiolacton hydrochlorid



a) HCl, Δ T

Abbildung 55: Struktur des kommerziell erhältlichen L-Homocysteinthiolactonhydrochlorid und Synthese von L-Homoserinlactonhydrochlorid

Um die für ABPP-Experimente notwendige terminale Alkinbindung einzuführen, wurde Hex-5-insäure in das Säurechlorid (28) umgewandelt und über eine Kupplungsreaktion an das primäre Amin des Lactons gebunden.

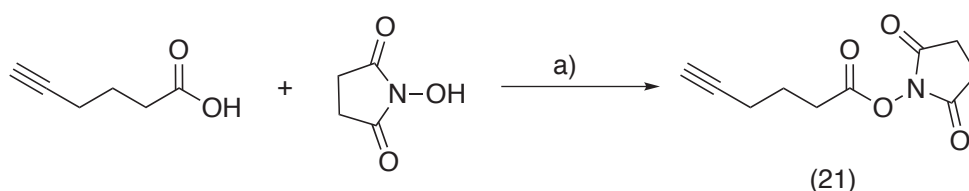


a) SOCl_2 , Rückfluss.

b) DIPEA, DMF.

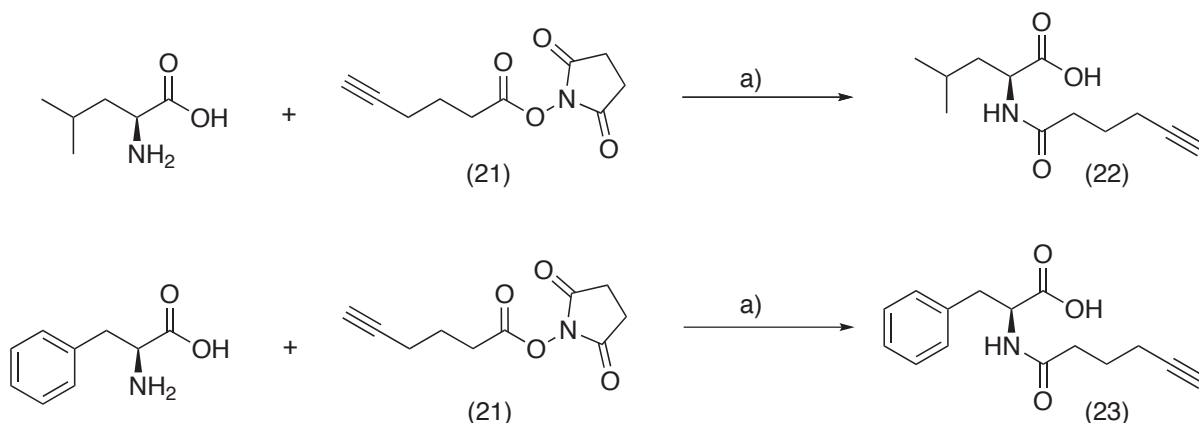
Abbildung 56: Syntheschema für Lactonsonden (29) und (30)

Die Sonden HxSL (29) und HxCL (30) enthalten den Alkinlinker auf diese Weise über eine Peptidbindung am Lacton- bzw. Thiolactonring an der Ringposition C-5. Das Ziel in der Synthese weiterer Sonden sollte eine Diversifizierung in dieser Seitenkette erreichen. Die Aminosäuren L-Leucin und L-Phenylalanin wurden deswegen zwischen den Lactonring und Alkinlinker eingefügt. Diese Aminosäuren sind in organischen Lösemitteln aufgrund ihres zwitterionischen Charakters extrem schlecht löslich. Die Kupplung mit dem Säurechlorid der Hex-5-Insäure ist somit nicht durchführbar. Es wurde deswegen die Aktivierung der Säurekomponente durch die Überführung in einen NHS-Ester vorgenommen (Abbildung 57). NHS-Ester sind weitgehend hydrolysestabil und die folgende Kupplungsreaktion kann in Wasser vorgenommen werden. Zur Bindung an die primäre Aminofunktion des Lactons bzw. Thiolactons wurde die Säurekomponente mit DIC aktiviert.



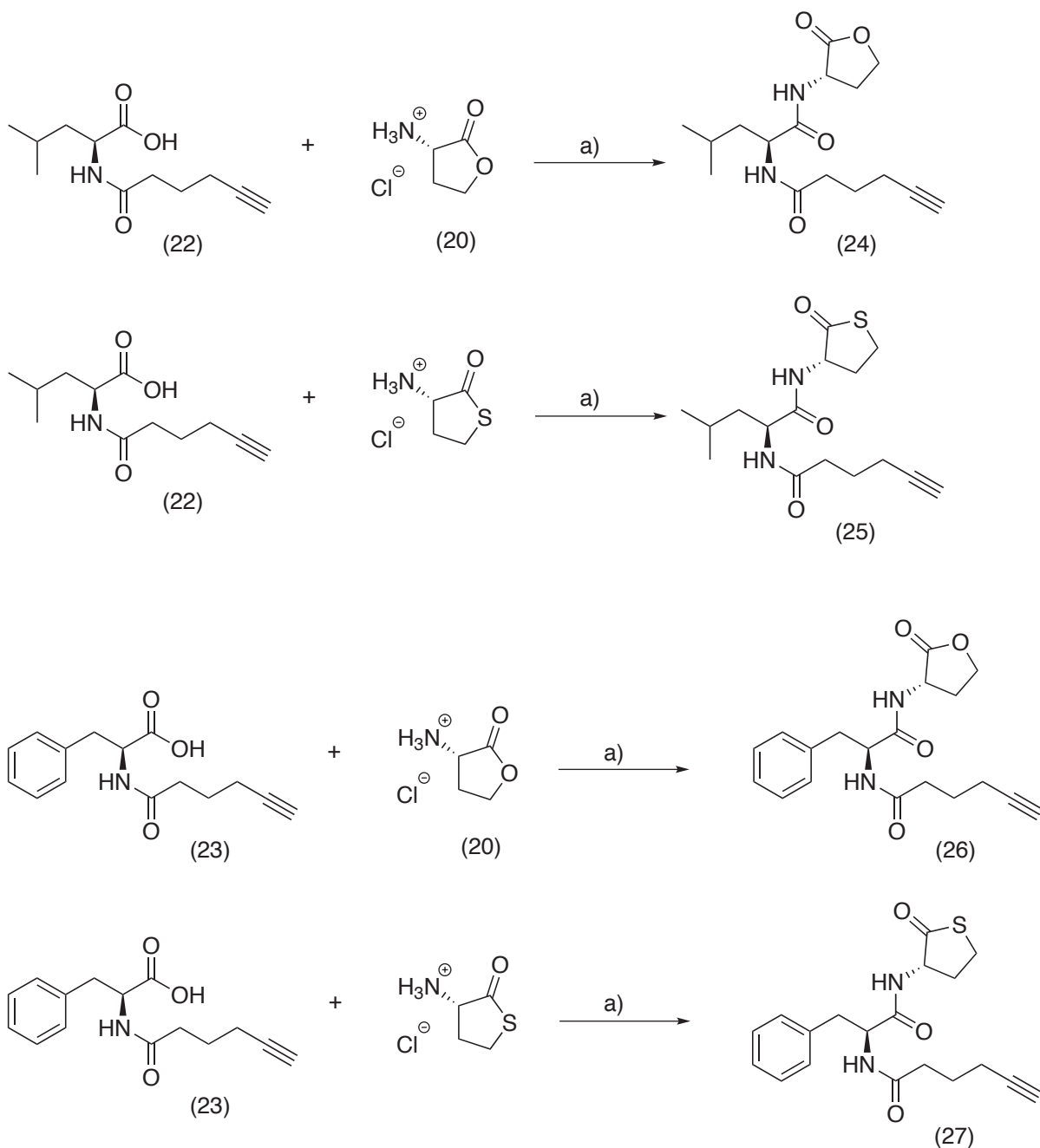
a) EDAC, DCM.

Abbildung 57: Aktivierung der Säurekomponente durch Umwandlung in NHS-Ester



a) NEt_3 , $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$.

Abbildung 58: Kupplung der NHS-Ester an Aminosäuren

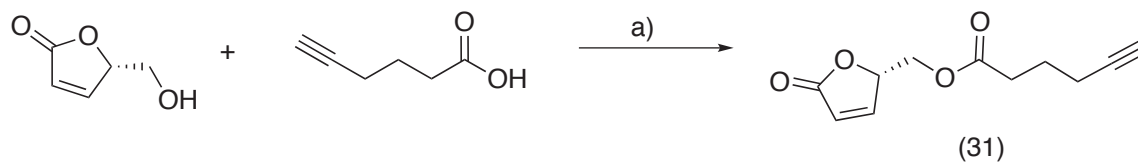


a) DIC, DIPEA, DMF.

Abbildung 59: Kupplung der modifizierten Aminosäuren an die Lactoneinheit

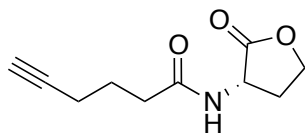
Außerdem wurde die Sonde HxML (31) synthetisiert, welche sich aufgrund des Michaelssystems als „aktiviertes“ Lacton eignen könnte, da sie eine 1,4-Addition mit weichen nukleophilen Substanzen eingehen kann. Aus der kommerziell erhältlichen Ausgangssubstanz (S)-(-)-5-Hydroxymethyl-2(5H)-furanon lässt sich über die

Kupplungsreaktion mit DIC diese Sonde mit intramolekularer Doppelbindung herstellen (Abbildung 60).

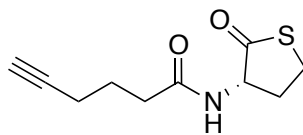


a) DIC, DCM.

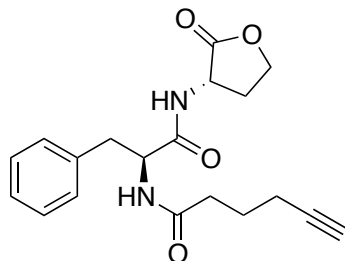
Abbildung 60: Synthese der Lactonsonde (31)



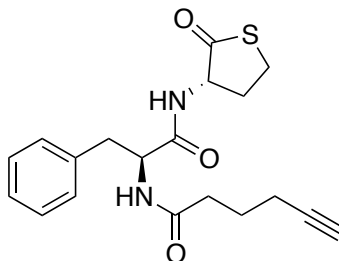
HxSL (29)



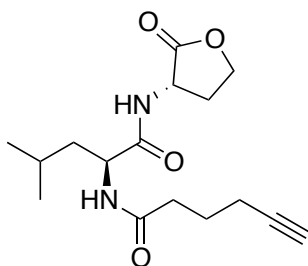
HxCL (30)



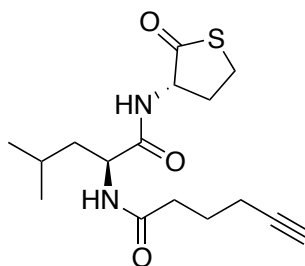
PheSL (26)



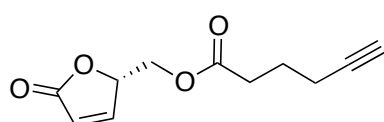
PheCL (27)



LeuSL (24)



LeuCL (25)



HxML (31)

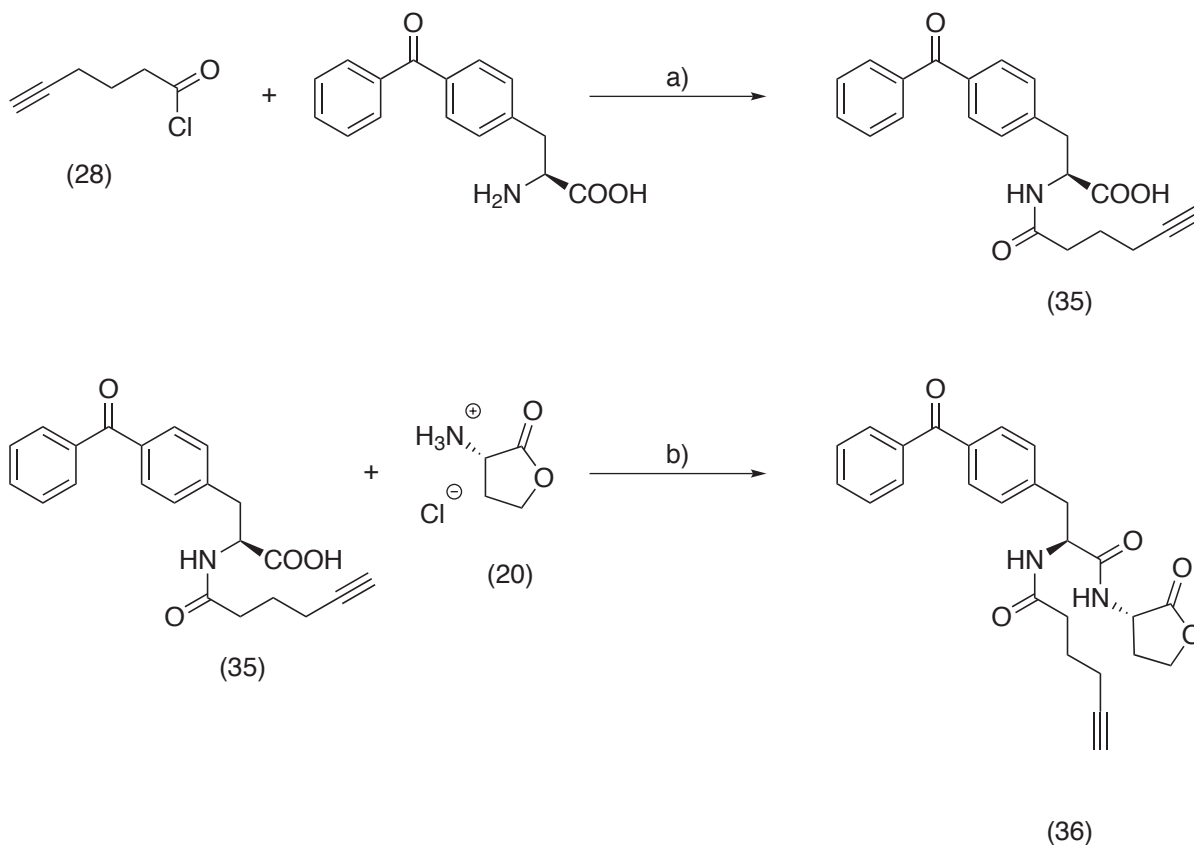
Abbildung 61: Strukturen der Sonden (24) bis (31)

Lysate von nichtpathogenen Bakterienstämmen wie *E. coli* und *P. putida* und auch von pathogenen Stämmen, wie *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cenocepacia* wurden auf eine Reaktion mit diesen Sonden untersucht. Dabei konnten keine Markierungsereignisse festgestellt werden. Auch unter *in situ* Bedingungen gibt es keine Enzyme, welche durch diese Sonden inhibiert wurden. Das heißt jedoch nicht zwingend, dass es in den Proteomen keine Enzyme gibt, welche die für diese Art der Lactonstruktur passende Substratbindetasche aufweisen. Es findet evtl. eine

Metabolisierung der Lactonmoleküle statt, die nicht in einer kovalenten Addition der Sonde an das Enzym endet. Vielmehr können die Enzyme diese Sonden auch als „echtes“ Substrat anerkennen, in kurzer Zeit umsetzen und wieder in das Medium entlassen. Diese Möglichkeit ist allgemein bei ABPP-Experimenten immer gegeben und kann nicht verfolgt werden, wenn keine kovalente Anbindung der Alkineinheit an das Enzym erfolgt ist. Wahrscheinlicher erscheint auf den ersten Blick aber die zweite Möglichkeit – und zwar die nichtkovalente Wechselwirkung von Enzymen mit solchen einfachen Lactonverbindungen, die man in den durchgeführten ABPP-Experimenten nur nicht erkennen kann, da sie eine kovalente Bindung voraussetzen. Das Signalmolekül *N*-Acyl-Homoserin-Lacton (AHL) zum Beispiel ist im Gegensatz zu einem Michael-Lacton-System nicht im Sinne eines kovalenten Angriffspunktes aktiviert. Vielmehr binden AHLs über eine affinitive Wechselwirkung an das Rezeptorprotein, welches im weiteren Verlauf die biogene Wirkung weitervermittelt. Die den AHL-Molekülen eigene besondere Struktur bedingt die nichtkovalente aber spezifische Wechselwirkung mit dem Zielprotein. Eine nichtkovalente Wechselwirkung lässt sich in ABPP-Experimenten nur durch einen Affinitätslinker in der Verbindung sichtbar machen. Deswegen wurde die Strategie durch die Synthese weiterer Lactonsonden angepasst.

2.3.2 Erweiterung der Sondenbibliothek

Zur Erweiterung der Sondenbibliothek wurde vergleichbar zu den Synthesen der Sonden PheSL (24) und LeuSL (26) die kommerziell erhältliche Aminosäure *H*-*p*-Bz-Ph-OH (Bachem) mit dem Säurechlorid von Hex-5-Insäure umgesetzt. Die so erhaltene Verbindung ist die Säurekomponente für eine Peptidkupplung mit Homoserinlactonhydrochlorid, welche mit DIC als Aktivierungsreagenz und DBU als Base gelang. Die Sonde BPL (36) ist durch den Photocrosslinker Benzophenon in der Lage, auch affinitive Wechselwirkungen zwischen Enzym und Sonde zu erfassen (Abbildung 62).



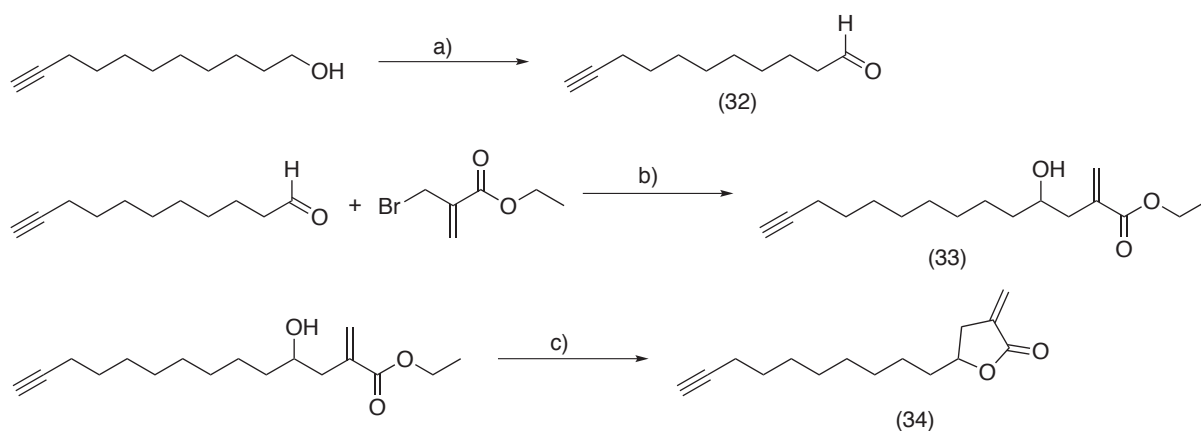
a) DBU, DCM.

b) DIC, HOBT, DBU, DCM.

Abbildung 62: Synthese der Lactonsonde BPL (36)

γ -Lactone und γ -Thiolactone sind chemisch stabile Verbindungen.^[96] In Gegenwart von Säuren verestern die entsprechenden Hydroxycarbonsäuren meistens schon spontan bei Raumtemperatur zum γ -Lacton. Dagegen erfordert die Hydrolyse oft harsche Reaktionsbedingungen wie die Erhitzung in NaOH.^[96] Es sind nur wenige Enzyme bekannt, die in biologischem Umfeld die Spaltung des γ -Lactons bewerkstelligen können. Deshalb wurde eine weitere Sonde in die Sondenbibliothek mit aufgenommen, welche der Additionsreaktion durch nukleophile Reste eines Enzyms leichter zugänglich sein sollte. Diese wurde durch die Synthese der α , β -ungesättigten Lactonsonde UExL (34) (Abbildung 63) mit exocyclischer Doppelbindung realisiert. Tatsächlich enthalten ca. 3 % der bekannten Naturstoffe eine α -Methylen- γ -butyrolactoneinheit. Ein großer Anteil erweist sich in vielen Prozessen als bioaktive Substanz. Das α -Methylen- γ -butyrolactonmotiv gilt dabei als hochreaktives Michael-System. Generell gilt, dass alle Verbindungen, welche zu

einer 1,4-Addition in der Lage sind, potentiell toxische und cancerogene Substanzen sind, weil sie lebenswichtige Enzyme wie die DNA-Polymerase inhibieren können.^[101]



a) DMP, DCM.

b) Zn-Staub, NH₄Cl/THF.

c) *p*-TsOH, Toluol.

Abbildung 63: Synthese der Lactonsonde UExL (34)

Die Ausgangsverbindung für die Synthese der chemischen Sonde UExL (34) ist Undec-10-inol, welches sich mit dem Oxidationsmittel Dess-Martin Periodan (DMP) selektiv in den entsprechenden Aldehyd umwandeln lässt. Durch Insertion von Zink in die Halogenbindung von Ethyl-2-(Bromomethyl)-acrylat schließt sich eine nukleophile Addition der Br-Zn-Bindung durch die Umpolung dieser Bindung an den Aldehyd an^[102]. Ein Ringschluss lässt sich daraufhin säurekatalysiert mit TsOH erreichen^[103].

Im Syntheseweg der Sonden PBL (36) und UExL (34) wurde die Lactoneinheit jeweils im letzten Schritt angefügt. Die Vorstufe gleicht dem Aufbau der Sonde oder besitzt schon die chemische Reaktivität und enthält daneben das notwendige Alkin für das Anbringen des Farbstoffs. Die Vorläuferverbindungen (33, 35) eignen sich daher, um den Einfluss der Lactoneinheit auf die Reaktivität gegenüber Enzymen herauszuarbeiten und darzustellen.

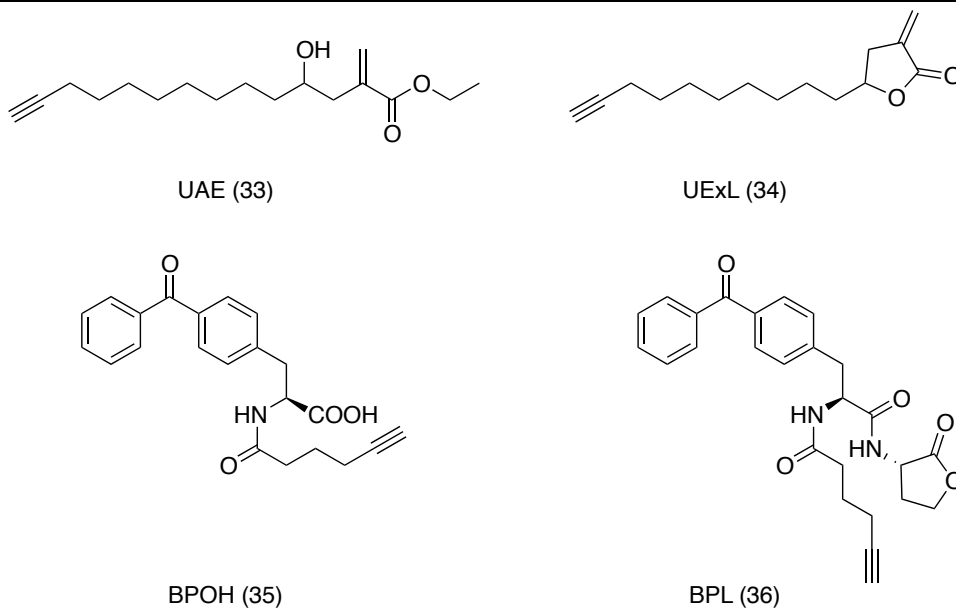


Abbildung 64: Strukturen der Sonden (33) bis (36)

2.3.3 Markierungsexperimente mit Sonde UExL (34)

Zur Etablierung der Sonde UExL (34) für die ABPP-Methodik wurde im ersten Schritt getestet, ob die Sonde zellpermeabel ist und Enzyme unter *in situ* Bedingungen zu markieren vermag. Dazu wurden lebende Zellen von nichtpathogenen und pathogenen Bakterien wie *P. putida*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* (Mu50 und NCTC 8325) mit der Sonde inkubiert. Nach Waschschrinen und Lyse der Zellen wurde Rhodaminazid als Fluoreszenzmarker an die markierten Proteine über Click-Chemie angefügt. Anschließende SDS-PAGE und Fluoreszenzanalyse der Gele ergaben selektive Markierungen diverser Enzyme. Die Sonde UExL (34) ist generell fähig, die Zellmembran zu überwinden und proteomische Ziele der Bakterien zu erreichen. Die optimale Konzentration für die Markierung wurde durch Variation der Sondenkonzentration in den untersuchten Bakterienspezies ermittelt. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 200 μM für die Markierung der Ziele im gram-negativen Organismus erforderlich war, während im gram-positiven Bakterienstamm SA 40 μM für die Saturierung der Zielenzyme ausreichten. Die offenkettige Lactonsonde UAE (33) konnte selbst bei höheren Konzentrationen keine Enzyme markieren, was ein direkter Vergleich im Fluoreszenzgel zeigt. Die Sonde UExL (34) erreicht dagegen ihre Angriffsziele bereits innerhalb einer Inkubationszeit von einer Stunde und erweist

sich gegenüber einigen Enzyme als hochempfindlich. Schon ab einer Sondenkonzentration von 5 μM können Enzyme im lebenden Organismus detektiert werden (Abbildung 65 A).

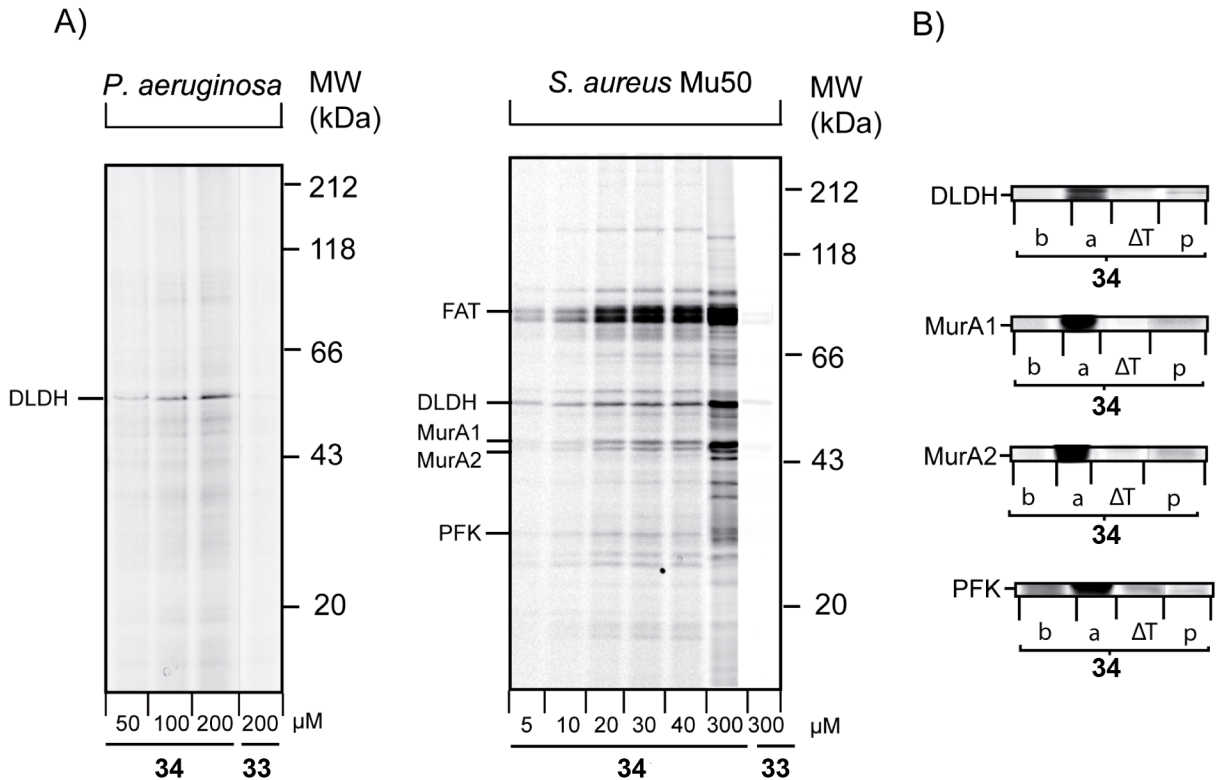


Abbildung 65:

A) Fluoreszenzgele der Markierungsexperimente mit UExL (34) in *P. aeruginosa* und MRSA Mu50

B) Rekombinante Expression der wichtigsten Angriffsziele, Markierung mit der Sonde und Hitzecontrollen (b = vor Induktion, a = nach Induktion, p = Markierung im Proteom, ΔT = Hitzekontrolle)

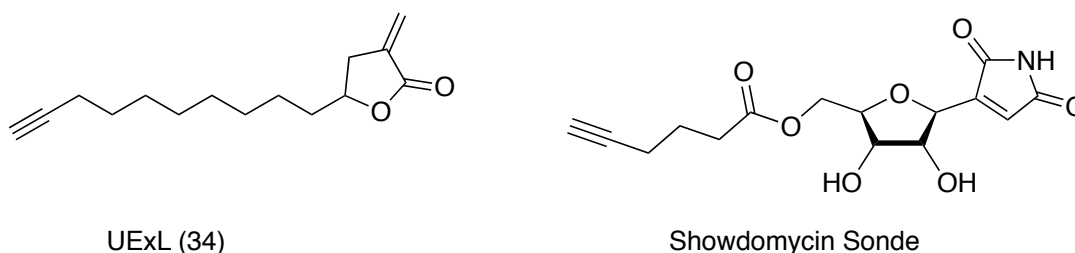
Innerhalb von Bakterien derselben Gattung wie *P. putida* und *P. aeruginosa* und SA NCTC und Mu50 ergeben sich bis auf eine bereits bekannte Ausnahme (MurA2) keine Unterschiede in den Markierungsereignissen (Abbildungen 65 A und A8). Es gibt also keine gegenüber der Sondenstruktur reaktiven Enzyme, welche die unterschiedlichen Eigenschaften wie Pathogenität oder Resistenz begründen könnten. Interessanterweise ist die Sonde UExL (34) allerdings in der Lage, hochselektiv im pathogenen gram-negativen Organismus *P. aeruginosa* nur ein einzelnes Enzym zu inhibieren, während im gram-positiven *S. aureus* verschiedene Enzyme mit unterschiedlichen Funktionen markiert werden.

Enzym	Organismus
Dihydrolipoamid dehydrogenase (DLDH)	<i>P. aeruginosa</i>
Formatacyltransferase (FAT)	<i>S. aureus</i> Mu50 / NCTC 8325
Dihydrolipoamid dehydrogenase (DLDH)	<i>S. aureus</i> Mu50 / NCTC 8325
UDP-N-acetylglucosamin-1-carboxy- vinyltransferase 1 (MurA1)	<i>S. aureus</i> Mu50 / NCTC 8325
UDP-N-acetylglucosamin-1-carboxy- vinyltransferase 2 (MurA2)	<i>S. aureus</i> Mu50
6-Phosphofructo-kinase (PFK)	<i>S. aureus</i> Mu50 / NCTC 8325

Tabelle 8: Angriffsziele der Sonde UExL in SA Mu50 und PA

Die wichtigsten Angriffsziele wurden rekombinant exprimiert und konnten durch Markierung mit der Sonde bestätigt werden (Abbildung 65 B). Die Hitzekontrollen belegen weiterhin die spezifische aktivitätsbasierte Reaktion dieser Enzyme mit der Sonde. Als sehr selektiver Inhibitor für DLDH erwies sich die Sonde in *P. aeruginosa*. Die durch LC-MS identifizierten Enzyme in *S. aureus* übernehmen dagegen unterschiedliche Aufgaben in der Zelle des Pathogens, wobei einige von medizinischem Interesse sind. Enzyme wie die Phosphofruktokinase (PFK) und Dihydrolipoyldehydrogenase (DLDH) spielen im Primärstoffwechsel von Bakterien eine Schlüsselrolle. Als zentrales Element reguliert die Phosphofruktokinase die Glykolyse. Dihydrolipoyldehydrogenasen sind dagegen in der Umwandlung von 2-Oxo-Säuren zu Acyl-CoA involviert. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass DLDH-negative *Streptococcus pneumoniae* Bakterien im Mausmodell keine Infektionen mit Lungenentzündung und Sepsis mehr hervorrufen.^[104] Die Ausschaltung der Dihydrolipoyldehydrogenasen beeinflusst offensichtlich weitere für das Überleben im Wirtsorganismus wichtige Enzymfunktionen. Die Beeinträchtigung entscheidender Schritte im Metabolismus eines Bakteriums führt in vielen Fällen zu einem Absinken der Virulenz. Die Aufklärung der Mechanismen könnten hier neue Ansätze für die Entwicklung von Antibiotika liefern. Die Wirkung der Sonde erstreckt sich in MRSA auch auf die Enzyme MurA1 und MurA2. Die UDP-N-Acetylglucosamin-1-Carboxyvinyltransferase 1 katalysiert den ersten Schritt der Zellwandbiosynthese und ist daher ein essentielles Enzym.^[105] In vorhergehenden Arbeiten des Arbeitskreises konnte eine Inhibition durch Showdomycin nachgewiesen werden.^[106] Beide

Moleküle enthalten ein Michael-Akzeptormotiv, welches die kovalente Inhibition des aktiven Restes ermöglicht.



UExL (34)

Showdomycin Sonde

Abbildung 66: Strukturvergleich zwischen der Sonde UExL (34) und einer Sonde basierend auf dem Antibiotikum Showdomycin

Es konnte gezeigt werden, dass die Sonde UExL (34) als analytisches Werkzeug für das Verständnis der Wechselwirkung von Enzymen im Primärstoffwechsel gram-positiver Mikroorganismen dienen kann. In *P. aeruginosa* sind neben der Dihydrolipoamiddehydrogenase keine weiteren enzymatischen Angriffsziele nachweisbar. Die Sonde UExL (34) stellt damit einen hochselektiven Inhibitor für DLDH im gram-negativen Bakterienstamm *P. aeruginosa* dar. In den getesteten SA-Stämmen werden neben DLDHs auch weitere Enzymfunktionen inhibiert, welche vor allem, aber nicht ausschließlich, den bakteriellen Metabolismus betreffen. Die Bindung und Umsetzung eines Substrats an ein Enzym setzt oft eine exakte geometrische Anpassungsfähigkeit voraus. Die Sonde UExL (34) findet dabei durch den eher einfachen Aufbau offensichtlich Zugang zur aktiven Tasche verschiedener Enzyme und besitzt die passende Reaktivität zur Markierung. Diese Tatsache beinhaltet die Chance, die Bioaktivität von Strukturvarianten auf Basis der durch ABPP-Experimente gefundenen Reaktivität dieser Sonde gezielt zu steuern. Dabei muss die chemische Reaktivität besonders im Zusammenhang mit der Struktur betrachtet werden. Es konnte durch einen Vergleich der Sonden UAE (33) und UExL (34) gezeigt werden, dass die Lactoneinheit eine notwendige Voraussetzung für die beobachtete Selektivität darstellt und sich daher besonders eignet, die Strukturpräferenzen von Enzymen für Lactone aufzudecken.

2.3.4 Markierungsexperimente mit PBL (36)

Zur Evaluierung der Bindungsereignisse der Sonde BPL (36) wurde die Sonde mit Lysaten von nichtpathogenen und pathogenen Bakterienstämmen, wie *P. putida* und *P. aeruginosa*, *B. thailandensis* und *B. cenocepacia*, sowie *E. coli* für eine Stunde unter Eiskühlung und UV-Bestrahlung bei 366 nm inkubiert. Ein Benzophenonrest kann aufgrund seiner Größe Einfluss auf die Markierungspräferenz einer Sonde nehmen. Um den Effekt der Lactoneinheit herauszuarbeiten, wurde deswegen die Sonde BPOH (35) ohne Lactonstruktur mit in die Versuchsreihen einbezogen. Beide Sonden wurden dabei mit einer Konzentration von 20 µM eingesetzt. Nach Click-Chemie und Gelelektrophorese wurden die in Abbildung 67 dargestellten Fluoreszenzgele erhalten. Das Gel zeigt mehrere Banden, wobei eine davon ausschließlich durch die Sonde BPL (36) verursacht wird. Ein Lactonmotiv ist offensichtlich Voraussetzung zur Markierung dieses Enzyms.

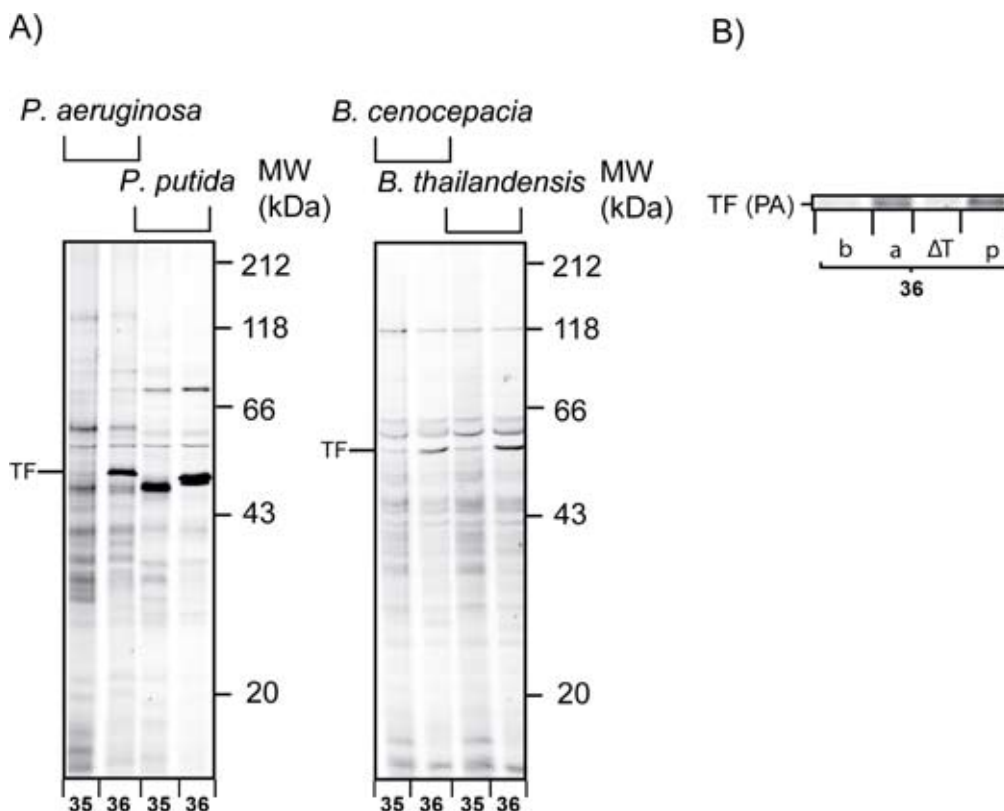


Abbildung 67: Markierungsereignisse der Sonden BPOH (35) und BPL (36) in *P. putida* und *P. aeruginosa*, sowie *B. cenocepacia* und *B. thailandensis*

In den unterschiedlichen Bakterienarten konnte die Bande durch Massenspektrometrie als **Trigger Factor** identifiziert werden. Es gelang die

rekombinante Expression dieses Enzyms aus dem Proteom von *P. aeruginosa*. Markierungsexperimente mit der Sonde PBL (36) bestätigen die korrekte Zuordnung der Massenspektrogramme und Hitzekontrollen zeigten weiterhin, dass die Markierung in der katalytischen Tasche in aktivitätsbasierter Weise erfolgte.

Für die effektive Funktion und das Überleben von Zellen ist die korrekte räumliche Faltung von Proteinen essentiell. Chaperone sind als proteinäre „Helfer“ maßgeblich beim Faltungsprozess von Proteinen beteiligt. Proteine werden an den Ribosomen als lineare Makromoleküle synthetisiert und falten sich nach oder schon während ihrer Synthese in eine durch die Aminosäuresequenz bestimmte, definierte dreidimensionale Struktur. Entscheidend unterstützt bzw. erst ermöglicht wird die korrekte Faltung durch Chaperone, die lebenswichtig und in allen Organismen zu finden sind. In Bakterien wie *E. coli* gibt es ein spezielles ribosomassoziertes Chaperon, den sogenannten **Trigger Factor**. Der Trigger Factor wölbt sich über den Ausgang des ribosomalen Tunnels, aus dem das Protein als Aminosäurenkette austritt und stellt einen geschützten Faltungsraum sicher. Zellen besitzen immer ein Netzwerk aus verschiedenen Chaperonen, wobei sie ohne den Trigger Factor durchaus lebensfähig sind. Aber ein genetischer Knockout des Trigger Factors in *E. coli* und seines Kooperationspartners des Hsp70-Chaperons DnaK, erweist sich als letal für den Mikroorganismus.^[107] Die selektive Inhibition eines einzelnen Enzyms aus dem Multikomponentensystem der Proteinfaltung kann dazu beitragen, grundlegende Erkenntnisse über Funktion und Auswirkung der Einzelbestandteile auf proteinärer Ebene zu gewinnen. Darüber hinaus besitzen eukaryontische Zellen keinen Trigger Factor zur Faltung von Proteinen, sondern andere ribosomenassozierte Chaperon-Systeme. Enzyme, welche in den bakteriellen Proteinfaltungsprozess involviert sind, könnten dabei als Angriffsziele neuer antibiotisch aktiver Verbindungen dienen. Die Sonde BPL (36) vergrößert als analytisches Werkzeug dafür das Repertoire der ABPP-Sonden zur Erforschung der affinitiven Wirkungsweise nichtaktivierter Heterocyclen im bakteriellen Proteom.

2.3.5 Zusammenfassung

Die Kenntnis um die grundlegende Reaktivität eines Moleküls im proteomischen Gemisch ist der erste Schritt, um selektive Inhibitoren zu entwickeln und diese als

molekulares analytisches Werkzeug einzusetzen. Während einfache γ -Lactonverbindungen vorzugsweise nichtkovalent und sehr selektiv mit einzelnen Enzymen wechselwirken, bewirkt die aktivierte Struktur der Sonde UExL (34) eine kovalente Bindung an nukleophile Reste von Enzymen verschiedener Enzymklassen. Wie anhand des Vergleichs der Sonden UAE (33) und UExL (34) und BPOH (35) und BPL (36) belegt werden konnte, ist für das Reaktivitätsprofil die Lactonstruktur ausschlaggebend. Diese steuert als selektivitätsvermittelndes Strukturelement eine hohe chemische Reaktivität (UExL, 34) oder definiert die zur Bindung notwendige Strukturvorgabe der aktiven Tasche eines Enzyms (BPL, 36). Durch den Einsatz der Sondenbibliothek konnte ein Überblick über die Reaktionsmechanismen von γ -Lactonderivaten im Proteom von Bakterien erhalten werden. Die Kenntnis über die strukturellen Voraussetzungen dieser Verbindungen zur Inhibition diverser Enzyme ermöglicht nun den gezielten Aufbau von Sondenbibliotheken zur Erforschung verschiedener zellulärer Prozesse.

3 Ausblick

Medienberichte über Hygienemängel in deutschen Kliniken und die daraus resultierende Infektionsgefahr mit multiresistenten Erregern entfachten in jüngster Zeit intensive Diskussionen in der Gesellschaft. Die Forderungen beziehen sich vor allem auf die Verbesserung der Hygienestandards und die dafür benötigten Geldmittel. Doch selbst wenn Maßnahmen zur Verbesserung der Hygienebedingungen greifen und man die gefährlichen multiresistenten Erreger zurückdrängen kann – die absolut keimfreie Klinik wird es nicht geben. Dazu kommt, dass Entwicklungsländer meist nicht die notwendigen Voraussetzungen zur Umsetzung solcher Vorhaben mitbringen. Durch die häufige Reisetätigkeit verbreiten sich multiresistente Erreger längst auch außerhalb von Gesundheitseinrichtungen über die ganze Welt.^[5] Somit besteht auch langfristig keine Alternative zum Einsatz von Antibiotika. Aktuell versuchen Wissenschaftler, den resistenten Mikroorganismen durch die Kombination von verschiedenen bekannten Wirkstoffen beizukommen.^[4] Nach wie vor werden damit aber wieder nur die bekannten bakteriellen Targets adressiert. Obwohl sich die Wahrscheinlichkeit einer Resistenz dadurch drastisch verringert, lässt sich damit wohl nur etwas Zeit gewinnen, denn die genetischen Resistenzinformationen existieren bereits. Das Auffinden neuer biologischer Angriffsziele, für die sich noch keine Resistenzen entwickelt haben, setzt ein tiefes Verständnis der zellulären Regulationsmechanismen voraus. Durch die ABPP-Methodik lassen sich wertvolle Einblicke in die einzelnen biochemischen Vorgänge in einer Bakterienzelle erhalten. Der Vorteil gegenüber konventionellen Verfahren zur Untersuchung des Proteoms besteht in der Vereinfachung der komplexen proteomischen Struktur eines Organismus. Indem man eine Verbindung mit definierter chemischer Reaktivität zur Verfügung stellt, lassen sich nur die aktiven Proteine herausfiltern, welche entsprechende strukturelle Voraussetzungen zur Bindung mitbringen. Die rasche Aufdeckung und Charakterisierung der Angriffsziele wird dabei durch die gleichzeitige Identifikation von Inhibitor und Zielenzym im ABPP ermöglicht. Daraus ergeben sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten.

In der vorliegenden Arbeit konnten Sonden auf der Strukturbasis bekannter β -Lactamantibiotika und synthetischer Lactamverbindungen erfolgreich für den Einsatz im ABPP etabliert werden. Die Ergebnisse wurden durch weitere Experimente wie MIC-Messung, die rekombinante Expression der Zielenzyme und

IC₅₀ Bestimmung, sowie Kompetitionsassays validiert. Darüber hinaus bestätigt ein Abgleich mit in der Literatur bekannten Forschungsergebnissen die Eignung der Sondenbibliothek zur Darstellung der enzymatischen Reaktionen *in vivo*. Die Aufdeckung der antibiotischen Eigenschaft einer Verbindung geschieht meist durch die Messung des MIC-Wertes. Die Inhibition von essentiellen Enzymen als Grundlage einer beobachteten antibiotischen Aktivität konnte bis heute *in vivo* jedoch nur durch die radioaktive Derivatisierung nachgewiesen werden. Die Anbindung eines Farbstoffs würde die Zellgängigkeit und Bindungseigenschaften von Substanzen beeinflussen und es können nur eingeschränkt Aussagen über die Inhibitionsfähigkeit einer Verbindung getroffen werden. Durch die Umwandlung von β -Lactamantibiotika in ABPP-Sonden lassen sich nun die zellulären Angriffsziele durch ABPP darstellen und solche aufwendigen Verfahren können vermieden werden. Antibiotische β -Lactamsonden markieren selektiv und spezifisch PBP, wobei für die verschiedenen Lactamringstrukturen unterschiedliche Reaktivitätsprofile beobachtet werden können. Dadurch lassen sich Enzympräferenzen der β -Lactamgrundstrukturen in verschiedenen Bakterienarten erforschen und man erhält einen generellen Überblick über die Wirkung einer β -Lactamverbindung im Proteom. Denkbar ist damit zukünftig eine gezieltere therapeutische Intervention durch Abstimmung der Lactamwirkstoffe auf die enzymatischen Begebenheiten eines bestimmten Pathogens. Dafür wäre allerdings nicht nur die Erstellung von Reaktivitätsprofilen für die bisher bekannten antibiotisch aktiven β -Lactamstrukturen in unterschiedlichen Bakteriengattungen erforderlich. Zudem ist die Kenntnis des krankheitsverursachenden Erregers und seiner phänotypischen Resistenzeigenschaften Voraussetzung für eine zielgerichtete Behandlung mit β -Lactamantibiotika. Nicht zuletzt weil Bakterien immer neue Mechanismen zur Abwehr einer Behandlung entwickeln, fehlt es jedoch an diagnostischen Nachweisverfahren. Auch hierfür bietet ABPP eine nützliche analytische Plattform. Es konnten durch einen Vergleich von Antibiotika-sensitiven und Antibiotika-resistenten SA-Stämmen charakteristische Proteomsignaturen erarbeitet werden, welche eine Unterscheidung beider Stämme hinsichtlich der zu erwartenden Resistenzausprägung gegenüber β -Lactamantibiotika erlauben. Gleichzeitig wurden die strukturellen Voraussetzungen für eine Inhibition von resistenzvermittelnden Enzymen ausgelotet. ABPP bietet eine Basis für solche Untersuchungen, um zukünftige Wirkstoffe gezielt an ihr Zielenzym anpassen zu können. Nicht nur die

Markierung und Inhibition von bekannten β -Lactamasen und PBP 2' belegt, dass vor allem synthetische β -Lactamsonden ein großes Potential für die Erforschung von Resistenzmechanismen besitzen. In der vorliegenden Arbeit gelang die Identifikation bisher uncharakterisierter Enzyme, welche Penicillaseaktivität aufweisen und damit zum ersten Mal mit der bakteriellen Resistenz in Verbindung gebracht werden konnten.

Die Entwicklung gänzlich neuer Strategien in der Behandlung von Infektionskrankheiten umfasst die Identifikation von potentiellen Leitstrukturen, die Aufklärung der Wirkungsweise und die Optimierung der Wirkstoffkandidaten. Grundsätzlich speist sich die Suche nach neuen Arzneimitteln bisher vor allem aus dem Pool der Naturstoffe, welche aus natürlichen Quellen isoliert werden. Aufgrund der strukturellen Komplexität gelingt es jedoch bisweilen oft nicht, pharmakologisch aktive Substanzen synthetisch darzustellen. Durch die Verwendung kleiner Moleküle im ABPP bietet sich nun die Möglichkeit, die für die biologische Wirkung verantwortlichen Strukturmerkmale ausfindig zu machen und die Komplexität eines Naturstoffs auf wenige bioaktive Gruppen zu reduzieren. Auf Basis dieser Ergebnisse können dann einfachere, naturstoffnahe Derivate synthetisiert werden, welche den „Flaschenhals“ der Naturstoff-Forschung, der in der Verfügbarkeit des Materials liegt, dauerhaft zu überwinden.^[108] Durch die Synthese einer γ -Lactonsondenbibliothek konnte in dieser Arbeit ein genereller Überblick über das Reaktionsverhalten verschiedener Strukturvarianten im bakteriellen Proteom gewonnen werden. Die beschriebenen Sonden erweisen sich als geeignete Strukturvorlagen zur Entwicklung von Inhibitoren, welche als analytische Werkzeuge zur Untersuchung bakterieller Zellprozesse dienen können. Nichtaktivierte Lactone bieten in Verbindung mit einem Photocrosslinker dabei die Möglichkeit zur Identifikation von nichtkovalenten Wechselwirkungen zwischen γ -Lactongrundmotiv und Enzymen. Die entsprechende Sonde kann so bereits heute ohne weitere Strukturoptimierung als hochselektiver Inhibitor für die Erforschung des bakteriellen Proteinfaltungsmechanismus eingesetzt werden. In den Markierungsprofilen der Bibliothek wurden sowohl hohe Selektivitäten für die Inhibition einzelner Proteine, als auch ein erhöhtes proteomisches Reaktionsvermögen festgestellt und auf den Aufbau der Sonden zurückgeführt. Die aktivierte α -Methylen- γ -butyrolactoneinheit erweist sich dabei als besonders geeignetes Strukturmotiv zur enzymklassenübergreifenden Markierung *in situ*. Der Aufbau einer Sondenbibliothek auf Basis dieser Struktur erscheint daher

aussichtsreich und könnte zur Entwicklung maßgeschneiderter Inhibitoren mit einem neuen Leitmotiv dienen.

4 Materialien und Methoden

4.1 Allgemeine Methoden

HPL-Chromatographie

Für HPLC-Analysen und HPLC-Aufreinigungen der Verbindungen stand ein Gerät der Firma Waters 2695 Separationsmodul mit einem Waters 2996 PDA Detektor zur Verfügung. Analysen 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. Dabei wurde für die Analysen ein Gradient von 0 / 100 % – 100 / 0 % Acetonitril / Wasser in 20 min mit einer Flussrate von 0.5 mL / min verwendet. Für präparative Trennungen wurde der Gradient auf Basis des analytischen Spektrums mit einer Flussrate von 5 mL / min hinsichtlich einer ressourcenschonenden Aufreinigung individuell optimiert. Für peptidartige Verbindungen wurde in einigen Fällen 0.1 % TFA zur Verbesserung der Auflösung zugesetzt. Zum Teil wurde für die Aufreinigungen auch MeOH / Wasser als mobile Phase verwendet.

Kernresonanzspektroskopie

¹H und ¹³C NMR Spektren wurden bei Raumtemperatur mit den Geräten Varian Mercury 200 VX und Varian Oxford 200 (jeweils 200 MHz-Spektren) aufgenommen. Kernresonanzspektren höherer Feldstärke wurden von der Kernresonanzabteilung des Departments Chemie und Pharmazie der LMU München erstellt, wobei die Geräte der Firma Bruker: Varian NMR-System 300 (300 MHz), Varian NMR-System INOVA 400 (400 MHz) oder Varian NMR-System 600 (600 MHz) verwendet wurden. Die benutzten Messfrequenzen in MHz und das jeweilige Lösungsmittel ist vermerkt. Die chemische Verschiebung δ wurde auf die Signale der remanenten Protonen beziehungsweise Kohlenstoffatome 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), sext (Sextett) und sept (Septett) oder deren Kombinationen aufgeführt. Weiterhin gilt die Bezeichnung ps (pseudo) für Aufspaltungen, deren Erscheinungsbild durch das Zusammenfallen von Signalen aufgrund der Aufspaltung mit gleichen Kopplungskonstanten gekennzeichnet ist.

Lösungsmittel / Chemikalien

Lösungsmittel und Chemikalien wurden in der Regel von den Firmen Stigma Aldrich oder Acros in den kommerziell erhältlichen Reinheitsgraden *puriss.*, *p. a.* oder *purum* eingesetzt. Trockene Lösungsmittel wurden von den Firmen in einem Behältnis mit Molekularsieb unter Argonatmosphäre bezogen. Lösungsmittel für Extraktionen und Säulenchromatographie wurden vor Verwendung destilliert. Säulenchromatographische Aufreinigungen wurden mit Kieselgel der Korngrößenverteilung 0.035 – 0.070 mm und der Porengröße 60 Å (Acros Organics) durchgeführt.

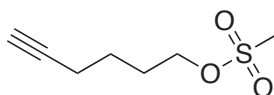
Massenspektroskopie

ESI-Massenspektren wurden an einem Thermo Finnigan LTQ FT-Massenspektrometer aufgenommen.

Die Proteinanalytik wurde an einer LTQ Orbitrap XL (Thermo Scientific) durchgeführt. Für die Aufnahme von MALDI-Spektren wurde das Gerät der Bezeichnung Autoflex II (MALDI-ToF) der Firma Bruker unter Verwendung einer HCCA-Matrix (α -Cyano-4-hydroxymizimtsäure) verwendet.

4.2 Synthesevorschriften für β -Lactamsonden

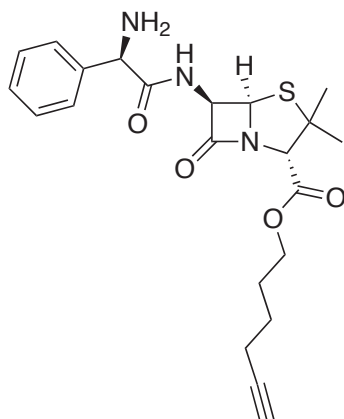
Hex-5-inylmethansulfonat (1a)



Hex-5-in-1-ol (451.9 μ L, 4.00 mmol, 1.0 Äquiv.) und DMAP (48.9 mg, 0.40 mmol, 0.1 Äquiv.) wurden in 50 mL trockenem DCM vorgelegt und NEt_3 (672.4 μ L, 4.80 mmol, 1.2 Äquiv.) zugegeben. Anschließend wurde die Lösung auf 0 °C gekühlt und unter N_2 -Atmosphäre Methansulfonylchlorid (342.0 μ L, 4.40 mmol, 1.1 Äquiv.) langsam zugetropft. Für zwei Std wurde die Temperatur gehalten und über Nacht bei RT weitergerührt. Die Reaktionslösung wurde dann mit 0.5 M HCl und gesättigter NaHCO_3 -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt konnte als farbloses Öl (540.1 mg, 77 %) erhalten werden.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 4.27 (t, $J = 6.2$ Hz, 2 H, MeSO_3CH_2), 3.01 (s, 3 H, CH_3), 2.27 (dt, $J = 6.8, 2.6$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 1.98 (t, $J = 2.7$ Hz, 1 H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 1.86 (psquin, $J = 6.8$ Hz, 2 H, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.62 (psquin, $J = 6.8$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$).

Chemische Sonde AmpC (1)



Ampicillin-Na-Salz (185.7 mg, 0.50 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 1.4 mL DMF vorgelegt und langsam Hex-5-ynylmethansulfonat (1a) (126.4, 0.717mmol, 1.4 Äquiv.) in 0.5 mL DMF zugetropft. Die Reaktionslösung wurde über Nacht gerührt und dann 15 mL EtOAc zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde filtriert und das Filtrat mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde per präparativer HPLC aufgereinigt. Das Acetonitril der entsprechenden Fraktion wurde am Rotationsverdampfer entfernt und die wässrige Suspension durch Lyophilisieren getrocknet. Die chemische Sonde **AmpC (1)** (10.8 mg, 5 %) konnte als weißer Feststoff erhalten werden.

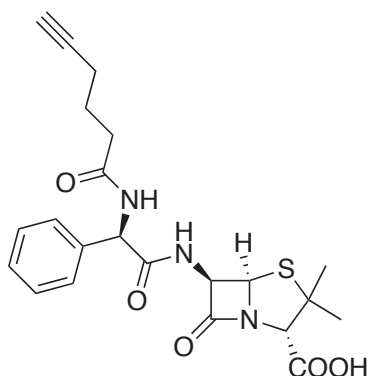
¹H NMR (400 MHz, CD₃CN): δ 7.61 (d, *J* = 7.8 Hz, 1 H, NH), 7.42 - 7.51 (m, 5 H, CH_{Arom.}), 5.57 (dd, *J* = 7.9, 4.1 Hz, 1 H, O=C-CH), 5.46 (d, *J* = 4.1 Hz, 1 H, N-CH), 5.23 (s, 1 H, NH₂-CH), 4.36 (s, 1 H, COO-CH), 4.16 und 4.15 (ABCD, *J* = 14.2, 10.9, 6.4 Hz, 2 x 1 H, COO-CH₂), 2.21 (dt, *J* = 7.0, 2.7 Hz, 2 H, CH₂-C≡CH), 2.17 (t, *J* = 2.6 Hz, 1 H, C≡CH), 1.74 (psquin, *J* = 7.2 Hz, 2 H, COO-CH₂-CH₂), 1.57 (psquin, *J* = 7.2 Hz, 2 H, CH₂-CH₂-C≡CH), 1.45 (s, 3 H, CH₃), 1.38 (s, 3 H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃CN): δ 172.9, 168.5, 168.4, 133.4, 130.8, 130.0, 129.4, 84.8, 71.1, 70.0, 68.4, 65.9, 65.3, 60.2, 57.3, 32.2, 28.2, 26.9, 25.7, 18.3.

ESI-MS, positiver Modus (*m/z*): ber. für C₂₂H₂₈N₃O₄S⁺ [M + H]⁺ 430.1795, gef. 430.1823.

ESI-MS, negativer Modus (m/z): ber. für $C_{22}H_{26}N_3O_4S^-$ $[M - H]^-$ 428.1650, gef. 428.1651.

Chemische Sonde AmpN (2)



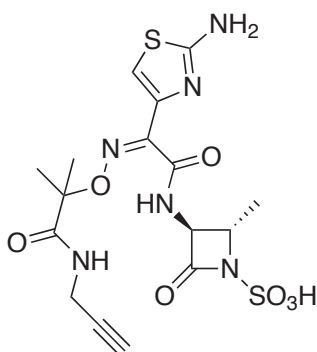
Eine Lösung aus Hex-5-insäure (35.8 μ L, 0.32 mmol, 1.3 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (35.7 μ L, 0.32 mmol, 1.3 Äquiv.) in 5 mL trockenem THF wurde auf -13 °C gekühlt und dann Isobutylchloroformat (42.5 μ L, 0.32 mmol, 1.3 Äquiv.) zugegeben. Nach 45 min Rühren bei -10 °C wurde eine Suspension aus Ampicillin-Na-Salz (92.8 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äquiv.) in 3.7 mL THF / Wasser (20:1) zugetropft und die Temperatur für weitere 45 min gehalten. Nachdem die Reaktionsmischung Raumtemperatur erreicht hatte, wurde die Lösung eingeeengt und per präparativer HPLC aufgereinigt. Das Acetonitril der entsprechenden Fraktion wurde am Rotationsverdampfer entfernt und die wässrige Suspension durch Lyophilisieren getrocknet. Die chemische Sonde **AmpN (2)** (4.7 mg, 4 %) konnte als weißer Feststoff erhalten werden.

1H NMR (400 MHz, CD_3CN): δ 7.32 - 7.41 (m, 5 H, $CH_{Arom.}$), 7.25 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H, $O=C-CH-NH$), 7.13 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H, $O=C-NH$), 5.58 (dd, $J = 8.7, 4.2$ Hz, 1 H, $O=C-CH$), 5.47 (d, $J = 7.0$ Hz, 1 H, Phe- CH), 5.43 (d, $J = 4.2$ Hz, 1 H, N- CH), 4.35 (s, 1 H, N- $CH-COOH$), 2.35 und 2.31 (ABCD, 2 x 1 H, $J = 19.5, 15.0, 7.4$ Hz, $NHCO-CHH$), 2.20 (dt, $J = 7.1, 2.6$ Hz, 2 H, $CH_2-C\equiv CH$), 2.16 - 2.19 (m, 1 H, $C\equiv CH$), 1.76 (psquin, $J = 7.1$ Hz, 2 H, $COO-CH_2-CH_2$), 1.57 (s, 3 H, CH_3), 1.47 (s, 3 H, CH_3).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN): δ 174.2, 172.8, 170.8, 169.0, 138.5, 129.6, 129.1, 128.5, 84.7, 71.0, 70.1, 68.4, 65.0, 59.6, 58.0, 35.0, 31.7, 27.0, 25.2, 18.3.

MS (MALDI-ToF, HCCA): 444.0 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 466.0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, 482.0 $[\text{M} + \text{K}]^+$.

Chemische Sonde Azt (3)



Aztreonam (60.0 mg, 0.14 mmol, 1.0 Äquiv.), HOBt (27.9 mg, 0.21 mmol, 1.5 Äquiv.) und DIPEA (60.0 μL , 0.34 mmol, 2.5 Äquiv.) wurden in 3 mL trockenem DMF vorgelegt und bei 0 °C unter N_2 -Atmosphäre DIC (32.0 μL , 0.21 mmol, 1.5 Äquiv.) zugegeben. Nach 30 min Rühren wurde ebenfalls bei 0 °C Propargylamin (13.2 μL , 0.21 mmol, 1.5 Äquiv.) zugegeben. Nach weiteren 30 min Rühren bei RT wurde die Lösung eingeeengt und der Rückstand per präparativer HPLC aufgereinigt. Das Acetonitril der entsprechenden Fraktion wurde am Rotationsverdampfer entfernt und die wässrige Suspension durch Lyophilisieren getrocknet. Die chemische Sonde **Azt (3)** (12.5 mg, 19 %) konnte als weißer Feststoff erhalten werden.

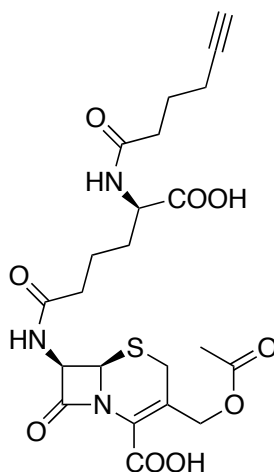
^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO): δ 9.40 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H, NH), 7.76 (t, $J = 5.8$, 1 H, NH), 6.91 (s, 1 H, SCH), 4.54 (dd, $J = 8.2, 2.6$ Hz, 1 H, NH-CH-CO), 3.90 (dd, $J = 5.9, 2.4$ Hz, 2 H, NH-CH₂), 3.72 (dq, $J = 6.2, 2.5$ Hz, 1 H, NSO₃H-CH), 3.01 (t, $J = 2.5$ Hz, 1 H, C≡CH), 1.43 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, CH₃-CH-NSO₃H), 1.42 (s, 3 H, C-(CH₃)₂), 1.40 (s, 3 H, C-(CH₃)₂).

^{13}C NMR (101 MHz, d_6 -DMSO): δ 173.3, 169.7, 162.3, 161.7, 148.2, 138.7, 111.3, 83.8, 81.6, 73.2, 60.6, 57.5, 28.6, 24.6, 24.1, 18.4.

ESI-MS, positiver Modus, (m/z): ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_2^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 473.0908, gef. 473.0902.

ESI-MS, negativer Modus (m/z): ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_2^-$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 471.0762, gef. 471.0759.

Chemische Sonde CephN (4)



Eine Lösung aus Hex-5-insäure (83.1 μL , 0.73 mmol, 1.4 Äquiv.) und *N*-Methylmorpholin (80.3 μL , 0.73 mmol, 1.4 Äquiv.) in 10 mL trockenem THF wurde auf $-13\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt und dann Isobutylchloroformat (95.6 μL , 0.73 mmol, 1.4 Äquiv.) zugegeben. Nach 1 Std Rühren bei $-10\text{ }^\circ\text{C}$ wurde eine Suspension aus Cephalosporin C-Zn-Salz (250.0 mg, 0.52 mmol, 1.0 Äquiv.) und 70 μL NEt_3 in 3.6 mL THF/Wasser (6:1) zugetropft und die Temperatur für weitere 30 min gehalten. Nachdem die Reaktionsmischung RT erreicht hatte, wurde die Lösung eingeeengt und per präparativer HPLC aufgereinigt. Das Acetonitril der entsprechenden Fraktion wurde am Rotationsverdampfer entfernt und die wässrige Suspension durch Lyophilisieren getrocknet. **CephN (4)** (24.1 mg, 9 %) konnte als weißer Feststoff erhalten werden.

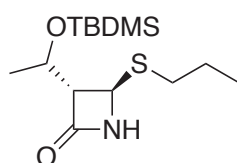
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeCN/D₂O, 10:1): δ 5.74 (d, $J = 4.8$ Hz, 1 H, NHCO-CH₂-CON), 5.04 (d, $J = 4.9$ Hz, 1 H, N-CH₂-S), 5.02 (d, $J = 13.8$ Hz, 1 H, CH_aH_b-COOMe), 4.76 (d, $J = 13.1$ Hz, 1 H, CH_aH_b-COOMe), 4.30 - 4.34 (m, 1 H, COOH-CH₂-NHCO), 3.63 (d, $J = 18.3$ Hz, 1 H, S-CH_aH_b), 3.45 (d, $J = 18.4$ Hz, 1 H, S-CH_aH_b), 2.25 - 2.35 (m, 4 H, CH₂-CONH), 2.19 - 2.24 (m, 3 H, CH₂-C \equiv CH), 2.04 (s, 3 H, COO-CH₃), 1.60 - 1.86 (m, 6 H, CH₂-CH₂-C \equiv CH, COOH-CH-CH₂-CH₂).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD₃CN/ D₂O 10:1): δ 173.8, 173.4, 173.3, 171.1, 165.4, 162.9, 126.1, 125.6, 84.1, 69.5, 63.1, 59.5, 57.6, 52.0, 34.6, 34.4, 30.7, 26.1, 24.6, 21.8, 20.2, 17.5.

ESI-MS, positiver Modus, (m/z): ber. für C₂₂H₂₈N₃O₉S⁺ [M + H]⁺ 510.1541, gef. 510.1536.

ESI-MS, negativer Modus (m/z): ber. für C₂₂H₂₆N₃O₉S⁻ [M - H]⁻ 508.1395, gef. 508.1391.

(3*S*,4*R*)-3-((*R*)-1-(Tert-butyl dimethylsilyloxy)ethyl)-4-(propylthio)-azetidin-2-on
(5)

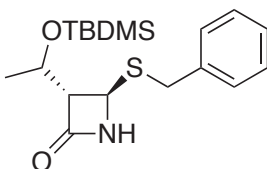


Zu einer Lösung aus 1-Propanthiol (230 μL , 189.3 mg, 2.49 mmol, 1.3 Äquiv.) in 2.3 mL Aceton, wurde 2.6 mL 1 M NaOH-Lösung gegeben. Nach 15 min wurde [3*R*(1'*R*, 4*R*)]-(+)-4-Acetoxy-3-[1-(tert-butyl dimethylsilyloxy)ethyl]-2-azetidinon (550.0 mg, 1.91 mmol, 1.0 Äquiv.) in 4.5 mL Aceton zutropft. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Et₂O aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter Nachlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Aufreinigung mit Silica

Gel (iso-Hexan/EtOAc, 5:1 $R_f = 0.34$) ergab das Produkt (520.3 mg, 90 %) als fahlgelben Feststoff.

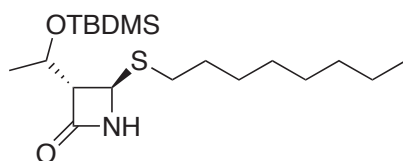
$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 5.97 (br, 1 H, N-H), 4.83 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, NH-CHS), 4.25 (dq, $J = 6.3$ Hz, 3.6 Hz, 1 H, CHO), 3.09 - 3.14 (m, 1 H, O=C-CH), 2.60 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H, S-CH₂), 1.64 (pssext, $J = 7.3$ Hz, 2 H, S-CH₂-CH₂), 1.24 (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H, CH₃-CHO), 1.01 (t, $J = 7.3$ Hz, 3 H, S-CH₂-CH₂-CH₃), 0.86 (s, 9 H, Si-t-Butyl), 0.06 - 0.08 (2 x s, 6 H, Si-CH₃).

(3*S*,4*R*)-4-(Benzylthio)-3-((*R*)-1-(tert-butyl dimethylsilyloxy)ethyl)azetidin-2-on (6)



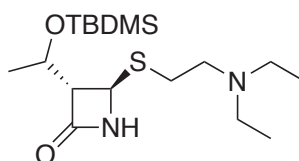
Zu einer Lösung aus Benzylmercaptan (379 μL , 399.3 mg, 3.22 mmol, 1.4 Äquiv.) in 2.8 mL Aceton, wurde 3.4 mL 1 M NaOH-Lösung zugegeben. Nach 15 min wurde [3*R*(1'*R*, 4*R*)]-(+)-4-Acetoxy-3-[1-(tert-butyl dimethylsilyloxy)ethyl]-2-azetidinon (660.0 mg, 2.30 mmol, 1.0 Äquiv.) in 4.5 mL Aceton zutropft. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Et₂O aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter Nachlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Aufreinigung mit Silica Gel (iso-Hexan/EtOAc, 5:1 $R_f = 0.31$) ergab das Produkt (685.7 mg, 85 %) als gelben Feststoff.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 7.28 - 7.35 (m, 5 H, CH_{Arom.}), 5.30 (br, 1 H, N-H), 4.78 (d, $J = 2.2$ Hz, 1 H, NH-CHS), 4.18 (dq, $J = 6.4$ Hz, 3.2 Hz, 1 H, CHO), 3.86 (s, 2 H, S-CH₂-Ph), 3.02 - 3.06 (m, 1 H, O=C-CH), 1.16 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, CH₃-CHO), 0.85 (s, 9 H, Si-t-Butyl), 0.01 - 0.06 (2 x s, 6 H, Si-CH₃).

(3*S*,4*R*)-3-((*R*)-1-(Tert-butyldimethylsilyloxy)ethyl)-4-(octylthio)azetidin-2-on (7)

Zu einer Lösung aus 1-Octanthiol (290 μ L, 244.3 mg, 1.67 mmol, 1.2 Äquiv.) in 1.6 mL Aceton, wurde 1.8 mL 1 M NaOH-Lösung zugegeben. Nach 15 min wurde [3*R*(1'*R*, 4*R*)]-(+)-4-Acetoxy-3-[1-(tert-butyldimethylsilyloxy)ethyl]-2-azetidinon (400.0 mg, 1.39 mmol, 1.0 Äquiv.) in 1.4 mL Aceton zugetropft. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in Et₂O aufgenommen. Die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter Nachlösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Aufreinigung mit Silica Gel (iso-Hexan/EtOAc, 5:1, R_f = 0.60) ergab das Produkt (468.1 mg, 90 %) als weißen Feststoff.

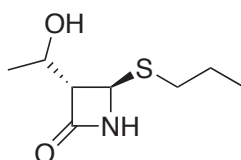
¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 5.92 (br, 1 H, N-H), 4.83 (d, J = 2.3 Hz, 1 H, NH-CHS), 4.25 (dq, J = 6.4 Hz, 3.4 Hz, 1 H, CH_O), 3.09 - 3.14 (m, 1 H, O=C-CH), 2.61 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, S-CH₂), 1.60 (psquin, J = 7.3 Hz, 2 H, S-CH₂-CH₂), 1.26 - 1.45 (m, 10 H, S-CH₂-CH₂-C₅H₁₀-CH₃), 1.23 (d, J = 6.4 Hz, 3 H, CH₃-CHO), 0.88 (s, 9 H, Si-t-Butyl), 0.85 - 0.94 (m, 3 H, S-C₇H₁₄-CH₃), 0.07 - 0.09 (2 x s, 6 H, Si-CH₃).

(3*S*,4*R*)-3-((*R*)-1-(Tert-butyldimethylsilyloxy)ethyl)-4-(2-(diethylamino)ethylthio)azetidin-2-on (8)

Zu einer Lösung aus 2-Diethylaminoethanthiolhydrochlorid (391.2 mg, 2.07 mmol, 1.2 Äquiv.) in 2.0 mL Aceton, wurde 4.3 mL 1 M NaOH-Lösung zugegeben. Nach 15 min wurde [3*R*(1'*R*, 4*R*)]-(+)-4-Acetoxy-3-[1-(tert-butyldimethylsilyloxy)ethyl]-2-azetidion (496.1 mg, 1.70 mmol, 1.0 Äquiv.) in 1.7 mL Aceton zugetropft. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde das Lösemittel entfernt die wässrige Phase mit EtOAc extrahiert. Die organische Phase wurde mit Wasser und gesättigter Nach-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Die säulenchromatographische Aufreinigung mit Silica Gel (DCM/MeOH, 8:1, R_f = 0.37) ergab das Produkt (329.2 mg, 53 %) als farbloses Öl.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 6.90 (br, 1 H, N-H), 4.77 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, NH-CHS), 4.25 (dq, *J* = 6.3 Hz, 3.8 Hz, 1 H, CH_O), 2.98 - 3.03 (m, 1 H, O=C-CH), 2.70 - 2.78 (m, 4 H, S-CH₂-CH₂), 2.40 - 2.70 (m, 4 H, N-(CH₂-CH₃)₂), 1.23 (d, *J* = 6.3 Hz, 3 H, CH₃-CHO), 1.06 (t, *J* = 7.2 Hz, 6 H, N-(CH₂-CH₃)₂), 0.87 (s, 9 H, Si-t-Butyl), 0.07 (2 x s, 6 H, Si-CH₃).

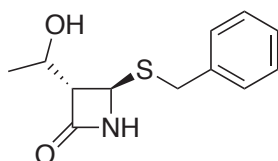
(3*S*,4*R*)-3-((*R*)-1-Hydroxyethyl)-4-(propylthio)azetidion (9)



5.1 mL TBAF (1 M Lösung in THF, 5.14 mmol, 3.0 Äquiv.) wurde unter Eiskühlung in N₂-Atmosphäre innerhalb von 10 min direkt zu Verbindung (5) (520.3 mg, 1.71 mmol, 1.0 Äquiv.) getropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 1 M HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Aufreinigung mit Silica Gel (i-Hexan/EtOAc 1:4, R_f = 0.40) ergab das Produkt (151.1 mg, 47 %) als farbloses Öl.

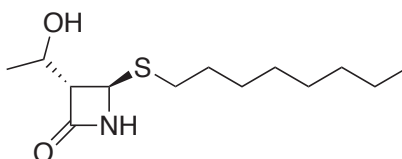
$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 6.73 (br, 1 H, N-H), 4.83 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, NH-CHS), 4.24 (dq, $J = 6.4, 4.3$ Hz, 1 H, CHO), 3.14 (ddd, $J = 4.3, 2.3, 0.7$ Hz, 1 H, O=C-CH), 2.60 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H, S-CH₂), 1.64 (pssext, $J = 7.3$ Hz, 2 H, S-CH₂-CH₂), 1.29 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, CH₃-CHO), 0.99 (t, $J = 7.3$ Hz, 3 H, S-CH₂-CH₂-CH₃).

(3S,4R)-4-(Benzylthio)-3-((R)-1-Hydroxyethyl)azetidin-2-on (10)



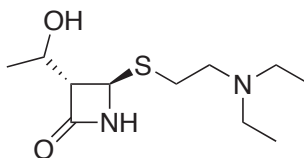
6.3 mL TBAF (1 M Lösung in THF, 6.30 mmol, 3.2 Äquiv.) wurde unter Eiskühlung in N_2 -Atmosphäre innerhalb von 10 min direkt zu Verbindung (6) (685.7 mg, 1.95 mmol, 1.0 Äquiv.) getropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 1 M HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die säulenchromatographische Aufreinigung mit Silica Gel (i-Hexan/EtOAc 1:4, $R_f = 0.37$) ergab das Produkt (262.1 mg, 57 %) als gelbes Öl.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 7.28 - 7.37 (m, 5 H, CH_{Arom.}), 5.41 (br, 1 H, N-H), 4.77 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, NH-CHS), 4.20 (dq, $J = 6.4, 4.7$ Hz, 1 H, CHO), 3.88 (s, 2 H, S-CH₂-Ph), 3.10 (ddd, $J = 4.7, 2.5, 0.9$ Hz, 1 H, O=C-CH), 1.27 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, CH₃-CHO).

(3S,4R)-3-((R)-1-Hydroxyethyl)-4-(octylthio)azetidin-2-on (11)

4.0 mL TBAF (1 M Lösung in THF, 4.00 mmol, 3.2 Äquiv.) wurde unter Eiskühlung in N₂-Atmosphäre innerhalb von 10 min direkt zu Verbindung (7) (468.1 mg, 1.25 mmol, 1.0 Äquiv.) getropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt und nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 1 M HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Aufreinigung mit Silica Gel (i-Hexan/EtOAc 1:4, R_f = 0.48) ergab das Produkt (153.7 mg, 47 %) als fahlgelben Feststoff.

¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 6.23 (br, 1 H, N-H), 4.84 (d, J = 2.4 Hz, 1 H, NH-CHS), 4.26 (dq, J = 6.4 Hz, 4.6 Hz, 1 H, CHO), 3.18 (ddd, J = 4.6, 2.4, 0.7 Hz, 1 H, O=C-CH), 2.63 (t, J = 7.3 Hz, 2 H, S-CH₂), 1.59 (psquin, J = 7.3 Hz, 2 H, S-CH₂-CH₂), 1.32 (d, J = 6.4 Hz, 3 H, CH₃-CHO), 1.22 - 1.70 (m, 10 H, S-CH₂-CH₂-C₅H₁₀-CH₃), 0.88 (t, J = 6.4 Hz, 3 H, S-C₇H₁₄-CH₃).

(3S,4R)-4-(2-(Diethylamino)ethylthio)-3-((R)-1-hydroxyethyl)azetidin-2-on (12)

2.4 mL TBAF (1 M Lösung in THF, 2.40 mmol, 3.0 Äquiv.) wurde unter Eiskühlung in N₂-Atmosphäre innerhalb von 10 min direkt zu Verbindung (8) (286.2 mg, 0.79 mmol, 1.0 Äquiv.) getropft. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach

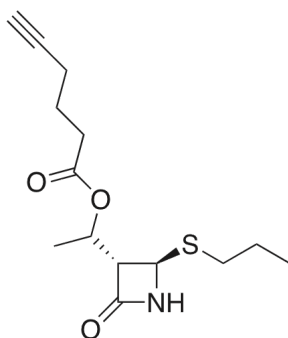
Einengen der Lösung wurde der Rückstand per präparativer HPLC aufgereinigt. Das Acetonitril der entsprechenden Fraktion wurde am Rotationsverdampfer entfernt und die wässrige Suspension durch Lyophilisieren getrocknet. Das Produkt (127.8 mg, 65 %) konnte als farbloses Öl erhalten werden.

^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 4.77 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, NH-CH $\underline{\text{S}}$), 4.23 (m, 1 H, CH $\underline{\text{O}}$), 3.07 (dd, $J = 4.9, 2.3$ Hz, 1 H, O=C-CH $\underline{\text{H}}$), 2.60 - 2.80 (m, 4 H, S-CH $\underline{2}$ -CH $\underline{2}$), 2.40 - 2.60 (m, 4 H, N-(CH $\underline{2}$ -CH $\underline{3}$) $_2$), 1.30 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, CH $\underline{3}$ -CHO), 1.03 (t, $J = 7.2$ Hz, 6 H, N-(CH $\underline{2}$ -CH $\underline{3}$) $_2$).

ESI-MS, positiver Modus, (m/z): ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 247.1475, gef. 247.1476.

Chemische Sonde SPHx (13)

(*R*)-1-((3*S*,4*R*)-2-Oxo-4-(propylthio)azetidin-3-yl)ethylhex-5-inoat



Verbindung (9) (68.2 mg, 0.36 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 8 mL trockenem DCM vorgelegt und unter N_2 -Atmosphäre Hex-5-inoylchlorid (70.6 mg, 0.54 mmol, 1.5 Äquiv.) zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde NEt_3 (75.3 μL , 54.7 mg, 0.54 mmol, 1.5 Äquiv.) zugetropft und weiterhin für 1 Std gerührt. Nach Einengen der Reaktionsmischung am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand säulenchromatographisch mit Silica Gel (i-Hexan/EtOAc 2:1, $R_f = 0.36$) aufgereinigt. Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt der Hauptfraktionen per präparativer HPLC konnte das Produkt **SPHx (13)** (9.8 mg, 10 %) als fahlgelbes Öl erhalten werden.

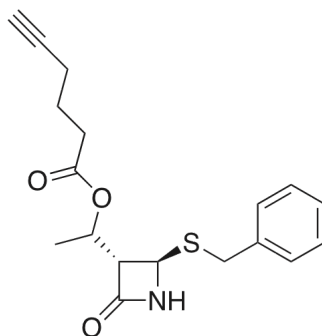
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 6.09 (br, 1 H, N-H), 5.29 (psquin, $J = 6.6$ Hz, 1 H, CHO), 4.75 (d, $J = 2.4$ Hz, 1 H, NH-CHS), 3.24 (ddd, $J = 7.1, 2.4, 0.9$, 1 H, O=C-CH), 2.57 - 2.61 (2 x t, $J = 7.3$ Hz, 2 H, S-CH₂), 2.45 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H, COOCH₂), 2.27 (dt, $J = 6.9, 2.5$ Hz, 2 H, CH₂-C \equiv CH), 1.97 (t, $J = 2.6$ Hz, 1 H, C \equiv CH), 1.85 (psquin, $J = 7.2$ Hz, 2 H, CH₂-CH₂-COO), 1.64 (psquin, $J = 7.2$ Hz, 2 H, S-CH₂-CH₂), 1.39 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, CH₃-CHO), 1.01 (t, $J = 7.3$ Hz, 3 H, S-CH₂-CH₂-CH₃).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): δ 172.1, 165.3, 83.2, 69.2, 67.6, 63.9, 56.3, 33.0, 32.2, 23.6, 23.3, 18.3, 17.8, 13.4.

ESI-MS, positiver Modus, (m/z): ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_3\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 284.1315, gef. 284.1320, ber. für $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NNaO}_3\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 306.1134, gef. 306.1140.

Chemische Sonde SBzHx (14)

(*R*)-1-((2*R*,3*S*)-2-(Benzylthio)-4-oxoazetidin-3-yl)ethylhex-5-inoat



Verbindung (10) (58.3 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 6 mL trockenem DCM vorgelegt und unter N_2 -Atmosphäre Hex-5-inoylchlorid (114.9 mg, 0.88 mmol, 3.6 Äquiv.) zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde NEt_3 (114 μL , 82.8 mg, 0.54 mmol, 3.3 Äquiv.) zugetropft und über Nacht gerührt. Nach Einengen der Reaktionsmischung am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand direkt säulenchromatographisch mit Silica Gel (i-Hexan/EtOAc 3:1, $R_f = 0.22$) aufgereinigt. Das Produkt **SBzHx (14)** (24.8 mg, 30 %) konnte als gelbes Öl erhalten werden.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 7.26 - 7.36 (m, 5 H, CH_{Arom.}), 5.57 (br, 1 H, N-H), 5.23 (psquin, $J = 6.5$ Hz, 1 H, CHO), 4.69 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, NH-CHS), 3.85 (s, 2 H, S-

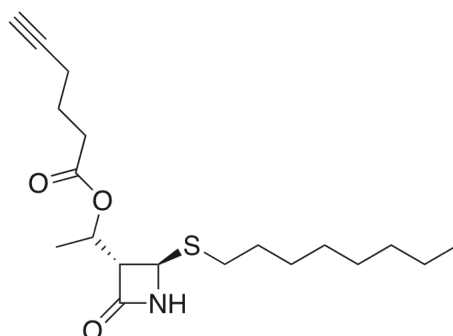
$\text{CH}_2\text{-Ph}$), 3.71 (ddd, $J = 7.0, 2.5, 0.9$, 1 H, $\text{O}=\text{C}-\text{CH}$), 2.42 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H, COOCH_2), 2.25 (dt, $J = 7.0, 2.6$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 1.97 (t, $J = 2.6$ Hz, 1 H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 1.82 (psquin, $J = 7.2$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COO}$), 1.31 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, $\text{CH}_3\text{-CHO}$).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): δ 172.1, 165.2, 137.7, 129.0, 128.7, 127.6, 83.2, 69.2, 67.3, 63.5, 56.2, 35.9, 33.0, 23.6, 18.2, 17.8.

ESI-MS, positiver Modus, (m/z): ber. für $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_3\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 332.1315, gef. 332.1322.

Chemische Sonde **SOctHx (15)**

(*R*)-1-((2*R*,3*S*)-2-(octylthio)-4-oxoazetidin-3-yl)ethylhex-5-inoat



Verbindung (11) (76.9 mg, 0.30 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 7 mL trockenem DCM vorgelegt und unter N_2 -Atmosphäre Hex-5-inoylchlorid (58.0 mg, 0.44 mmol, 1.5 Äquiv.) zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde NEt_3 (61.9 μL , 45.0 mg, 0.44 mmol, 1.5 Äquiv.) zugetropft und für 1 Std gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand in Et_2O aufgenommen und die organische Phase mit 1 M HCl und 10 %iger NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung des Rückstandes per präparativer HPLC ergab das Produkt **SOctHx (15)** (19.5 mg, 19 %) als farbloses Öl.

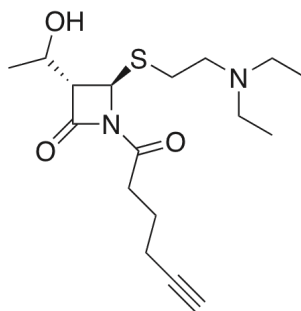
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 6.04 (br, 1 H, N-H), 5.30 (psquin, $J = 6.5$ Hz, 1 H, CHO), 4.75 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, NH-CHS), 3.25 (ddd, $J = 7.0, 1.7$ Hz, 0.5 Hz, 1 H, O=C-CH), 2.60 (2 x t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, S-CH_aH_b), 2.45 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H, COOCH₂), 2.27 (dt, $J = 7.0, 2.6$ Hz, 2 H, CH₂-C \equiv CH), 1.97 (t, $J = 2.6$ Hz, 1 H, C \equiv CH), 1.85 (psquin, $J = 7.2$ Hz, 2 H, CH₂-CH₂-COO), 1.57 - 1.66 (m, 2 H, S-CH₂-CH₂), 1.39 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, CH₃-CHO), 1.22 - 1.40 (m, 10 H, S-CH₂-CH₂-C₅H₁₀-CH₃), 0.88 (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H, S-C₇H₁₄-CH₃).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): δ 172.1, 165.3, 83.6, 69.2, 67.5, 63.8, 56.2, 33.0, 31.8, 30.1, 29.9, 29.1, 29.1, 28.9, 23.6, 22.6, 18.3, 17.8, 14.1.

ESI-MS, positiver Modus, (m/z): ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{NO}_3\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 354.2097, gef. 354.2105.

Chemische Sonde NCO (16)

(3*S*,4*R*)-4-(2-(Diethylamino)ethylthio)-1-hex-5-inoyl-3-((*R*)-1-hydroxyethyl)azetidin-2-on



Verbindung (12) (42.6 mg, 0.17 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 4 mL trockenem DCM vorgelegt und unter N_2 -Atmosphäre Hex-5-inoylchlorid (45.0 mg, 0.34 mmol, 2.0 Äquiv.) zugegeben. Nach 10 min Rühren, wurde NEt_3 (38.5 μL , 28.0 mg, 0.28 mmol, 1.6 Äquiv.) zugetropft und für 1 Std gerührt. Nach Entfernen des Lösemittels am Rotationsverdampfer wurde der Rückstand per präparativer HPLC aufgereinigt. Das Produkt **NCO (16)** (5.0 mg, 9 %) konnte als farbloses Öl erhalten werden.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ 5.50 (d, $J = 3.2$ Hz, 1 H, NH-CHS), 4.21 (psquin, $J = 7.2$ Hz, 1 H, CHO), 3.48 - 3.54 (m, 1 H, S-CH₂-CH_aH_b), 3.36 - 3.42 (m, 1 H, S-CH_aH_b-CH₂), 3.24 - 3.32 (m, 2 H, S-CH_aH_b-CH_aH_b), 3.13 (q, $J = 7.2$ Hz, 4 H, N-(CH₂-CH₃)₂,

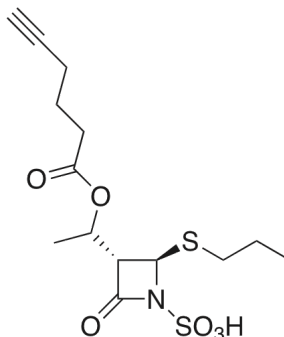
3.13 (dd, $J = 7.3, 3.3$ Hz, 1 H, O=C-CH), 2.85 (dt, $J = 17.0, 7.4$ Hz, 1 H, N-CO-CH_aH_b), 2.81 (dt, $J = 17.1, 7.3$ Hz, 1 H, N-CO-CH_aH_b), 2.28 (dt, $J = 7.1, 2.6$ Hz, 1 H, CH_aH_b-C≡CH), 2.28 (dt, $J = 6.8, 2.7$ Hz, 1 H, CH_aH_b-C≡CH), 2.00 (t, $J = 2.6$ Hz, 1 H, C≡CH), 1.88 (psquin, $J = 7.2$ Hz, 2 H, CH₂-CH₂-CON), 1.38 (t, $J = 7.3$ Hz, 6 H, N-(CH₂-CH₃)₂), 1.38 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, CH₃-CHO).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 170.6, 164.5, 83.1, 69.4, 65.8, 65.1, 58.1, 51.8, 46.7 (2x), 35.4, 27.6, 22.6, 21.3, 17.8, 8.8 (2x).

ESI-MS, positiver Modus, (m/z): ber. für C₁₇H₂₉N₂O₃S⁺ [M + H]⁺ 341.1893, gef. 341.1894.

Chemische Sonde SPSO₃ (17)

(3*S*,4*R*)-3-((*R*)-1-(Hex-5-inoxyloxy)ethyl)-2-oxo-4-(propylthio)azetidin-1-sulfonsäure



Verbindung (13) (20.0 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 150 µL trockenem Pyridin vorgelegt und Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex (44.9 mg, 0.28 mmol, 4.0 Äquiv.) zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 1 Std auf 90 °C erhitzt und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wurde dann zu 1.9 mL 1 M KH₂PO₄-Lösung gegeben und weiterhin *n*-Bu₄NHSO₄ (25.2 mg, 0.07 mmol, 1.1 Äquiv.) zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde die Reaktionsmischung mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Aufreinigung mit Silica Gel (EtOAc →

EtOAc / MeOH 98:2, $R_f = 0.3$) ergab das Produkt **SPSO₃ (17)** (8.7 mg, 34 %) als gelbes Öl.

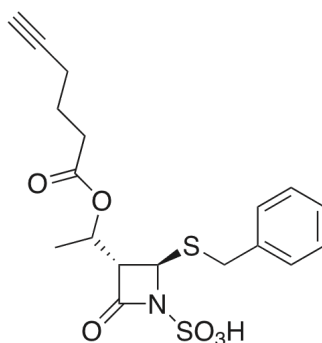
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 5.39 (psquin, $J = 6.4$ Hz, 1 H, CH_O), 5.13 (d, $J = 2.9$ Hz, 1 H, NSO₃-CH_S), 3.26 (dd, $J = 7.4, 2.9$, 1 H, O=C-CH₂), 2.74 - 2.82 (m, 1 H, S-CH_aH_b), 2.82 - 2.91 (m, 1 H, S-CH_aH_b), 2.46 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H, COOCH₂), 2.26 (dt, $J = 7.0, 2.6$ Hz, 2 H, CH₂-C≡CH), 2.00 (t, $J = 2.6$ Hz, 1 H, C≡CH), 1.83 (psquin, $J = 7.2$ Hz, 2 H, CH₂-CH₂-COO), 1.58 - 1.70 (m, 2 H, S-CH₂-CH₂), 1.36 (d, $J = 6.4$ Hz, 3 H, CH₃-CHO), 0.99 (t, $J = 7.3$ Hz, 3 H, S-CH₂-CH₂-CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ 172.8, 165.0, 83.4, 69.3, 67.5, 62.0, 61.9, 33.5, 33.0, 23.5, 22.7, 18.5, 17.8, 13.6.

ESI-MS, negativer Modus, (m/z): ber. für C₁₄H₂₀NO₆S₂⁻ [M - H]⁻ 362.0738, gef. 362.0746.

Chemische Sonde SBzSO₃ (18)

(2*R*,3*S*)-2-(Benzylthio)-3-((*R*)-1-(hex-5-inoxyloxy)ethyl)-4-oxoazetidin-1-sulfonsäure



Verbindung (14) (20.0 mg, 0.06 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 150 µL trockenem Pyridin vorgelegt und Schwefeltrioxid-Pyridin-Komplex (38.4 mg, 0.24 mmol, 4.0 Äquiv.) zugegeben. Anschließend wurde die Reaktionsmischung für 1 Std auf 90 °C erhitzt und über Nacht bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Lösung wurde dann zu 1.7 mL 1 M KH₂PO₄-Lösung gegeben und weiterhin *n*-Bu₄NHSO₄ (22.5 mg, 0.06 mmol, 1.1

Äquiv.) zugegeben. Nach 10 min Rühren wurde die Reaktions-Mischung mit DCM extrahiert und die vereinigten organischen Phasen am Rotationsverdampfer eingengt. Die säulenchromatographische Aufreinigung mit Silica Gel (EtOAc → EtOAc / MeOH 98:2, $R_f = 0.2$) ergab das Produkt **SBzSO₃ (18)** (16.8 mg, 68 %) als gelben Feststoff.

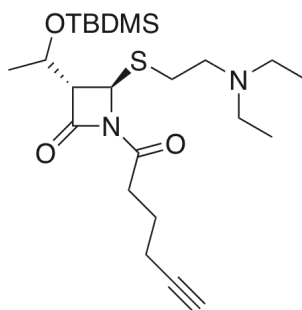
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.16 - 7.38 (m, 5 H, CH_{Arom.}), 5.22 (psquin, $J = 6.5$ Hz, 1 H, CHO), 5.08 (d, $J = 1.7$ Hz, 1 H, NSO₃-CHS), 4.11 (d, $J = 13.1$ Hz, 1 H, S-CH_aH_b-Ph), 3.97 (d, $J = 13.1$ Hz, 1 H, S-CH_aH_b-Ph), 3.10 (d, $J = 5.0$, 1 H, O=C-CH), 2.20 - 2.35 (m, 2 H, COOCH_aH_b), 2.13 (dt, $J = 7.0, 2.6$ Hz, 2 H, CH₂-C≡CH), 1.95 (t, $J = 2.6$ Hz, 1 H, C≡CH), 1.70 (psquin, $J = 7.2$ Hz, 2 H, CH₂-CH₂-COO), 1.09 (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H, CH₃-CHO).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 172.6, 165.3, 137.5, 129.5, 128.6, 127.1, 83.4, 69.3, 67.1, 61.1, 60.5, 35.7, 32.9, 23.4, 18.2, 17.8.

ESI-MS, negativer Modus, (m/z): ber. für C₁₈H₂₀NO₆S₂⁻ [M - H]⁻ 410.0738, gef. 410.0752.

Chemische Sonde PNCO (19)

(3*S*,4*R*)-3-((*R*)-1-(*Tert*-butyldimethylsilyloxy)ethyl)-4-(2-(diethylamino)ethylthio)-1-hex-5-inoylazetidin-2-on



Verbindung (8) (23.5 mg, 0.07 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 0.8 mL trockenem DCM vorgelegt und auf 12 °C gekühlt. Dann wurden unter N₂-Atmosphäre NEt₃ (27.2 µL,

19.7 mg, 0.20 mmol, 3.0 Äquiv.), DMAP (1.8 mg, 0.015 mmol, 0.2 Äquiv.) und Hex-5-inoylchlorid (28) (28.0 mg, 0.21 mmol, 3.3 Äquiv.) zugegeben. Nach 50 min Rühren bei RT wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in EtOAc aufgenommen. Die organische Phase wurde mit H₂O gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingengt. Die Aufreinigung per präparativer HPLC ergab das Produkt **PNCO (19)** (6.3 mg, 21 %) als fahlgelbes Öl.

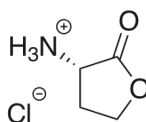
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 5.21 (d, *J* = 3.3 Hz, 1 H, NH-CH_S), 4.23 (dq, *J* = 7.2, 2.6 Hz, 1 H, CH-O-Si), 3.13 (psquin, *J* = 13.0, 6.6, 6.6 Hz, 1 H, S-CH_aH_b-CH₂), 2.94 (pst, *J* = 2.7 Hz, 1 H, O=C-CH), 2.86 (psquin, *J* = 13.1, 6.7, 6.7 Hz, 1 H, S-CH_aH_b-CH₂), 2.70 (m, 2 H, N-CO-CH₂), 2.64 – 2.68 (m, 2 H, S-CH₂-CH₂), 2.45 - 2.55 (m, 4 H, N-(CH₂-CH₃)₂), 2.12 - 2.22 (m, 2 H, CH₂-C≡CH), 1.89 (t, *J* = 2.6 Hz, 1 H, C≡CH), 1.76 - 1.84 (m, 2 H, CH₂-CH₂-C≡CH), 1.17 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H, CH₃-CH-O-Si), 0.95 (t, 6 H, *J* = 6.9 Hz, N-(CH₂-CH₃)₂), 0.73 (s, 9 H, Si-tert-Butyl), – 0.06 (s, 3 H, Si-CH₃), – 0.02 (s, 3 H, Si-CH₃).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃) δ 169.8, 165.4, 83.0, 69.0, 64.2, 63.9, 56.1, 52.6, 46.4, 35.1, 30.4, 25.3, 22.4, 21.6, 17.6, 17.5, 11.4, – 4.5, – 5.5.

ESI-MS, positiver Modus, (*m/z*): ber. für C₂₃H₄₃N₂O₃SSi⁺ [M + H]⁺ 455.2758, gef. 455.2762.

4.3 Synthesevorschriften für γ -Lactonsonden

(S)-2-Oxotetrahydrofuran-3-aminiumchlorid (20)

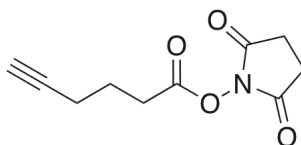


L-Homoserin (200.0 mg, 1.679 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 3.3 mL 2.4 M HCl suspendiert und die Reaktionsmischung für 7 Std unter Rückfluss (140 °C) erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung über Nacht wurden 20 mL eiskaltes EtOH zugegeben und die Lösung am Rotationsverdampfer bis auf ca. 3 mL eingengt. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert und mit eiskaltem EtOH gewaschen. Es konnte das Produkt (157.6 mg, 68 %) als weißer Feststoff erhalten werden.

^1H NMR (600 MHz, D_2O): δ 4.49 (pst, $J = 9.3$ Hz, 1 H, NH_3^+-CH), 4.29 - 4.35 (m, 2 H, $\text{COO}-\text{CH}_2$), 2.65 - 2.70 (m, 1 H, $\text{CH}-\text{CH}_a\text{H}_b$), 2.31 (psquin, 1 H, $J = 10.9$ Hz, $\text{CH}-\text{CH}_a\text{H}_b$).

^{13}C NMR (101 MHz, D_2O): δ 174.4, 67.3, 48.4, 26.7.

2,5-Dioxopyrrolidin-1-ylhex-5-inoat (21)

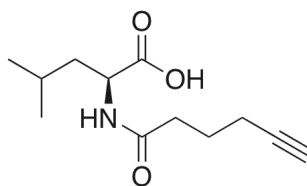


Hex-5-ensäure (984 μL , 8.92 mmol, 1.0 Äquiv.) wurde in 40 mL DCM vorgelegt und *N*-Hydroxysuccinimid (1.076 g, 9.35 mmol, 1.1 Äquiv.) sowie EDAC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidhydrochlorid) (1.794 g, 9.36 mmol, 1.1 Äquiv.) zugegeben. Nach 7 Std Rühren bei RT wurde die Reaktionsmischung dreimal mit 30 mL H_2O und einmal mit 30 mL gesättigter HCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde noch einmal mit 30 mL DCM rückextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Es konnte das Produkt (1.825 g, 93 %) als fahlgelbes Öl erhalten werden.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 2.83 (s, 4 H, $\text{C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)}$), 2.77 (t, J = 7.4 Hz, 2 H, C(O)-CH_2), 2.34 (dt, J = 6.9, 2.7 Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2$), 2.01 (t, J = 2.7 Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1.92 (psquin, J = 7.1 Hz, 2 H, $\text{C(O)-CH}_2\text{-CH}_2$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 168.9, 168.0, 82.2, 69.6, 29.5, 25.4, 23.2, 17.4.

N-Hex-5-inoyl-L-leucin (22)



L-Leucin (262.0 mg, 2.0 mmol, 1.0 Äquiv.) und NEt_3 (1.7 mL, 12 mmol, 6 Äquiv.) wurden in 3 mL MeCN und 3.5 mL Wasser vorgelegt und 2,5-Dioxopyrrolidin-1-ylhex-5-inoat (418.0 mg, 2.0 mmol, 1.0 Äquiv.) zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Einengen der Reaktionsmischung wurde der Rückstand direkt säulenchromatographisch mit Silica Gel (DCM/EtOH 10:1, R_f = 0.35) aufgereinigt. Das Produkt (340.8 mg, 75 %) konnte als fahlgelbes Öl erhalten werden.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.20 (d, J = 8.3 Hz, 1 H, NH), 4.57 (ddd, J = 9.2, 8.5, 4.7 Hz, 1 H, NH-CH-C(O)OH), 2.39 (t, J = 7.4 Hz, 2 H, C(O)-CH_2), 2.26 (dt, J = 6.7, 2.6 Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2$), 1.98 (t, J = 2.5 Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1.86 (psquin, J = 7.1 Hz, 2 H, $\text{C(O)-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.53 - 1.62 (m, 1 H, $(\text{CH}_3)_2\text{-CH}$), 1.65 - 1.74 (m, 2 H, $(\text{CH}_3)\text{-CH-CH}_2$), 0.95 (d, J = 6.0 Hz, 3 H, CH_3), 0.94 (d, J = 5.9 Hz, 3 H, CH_3).

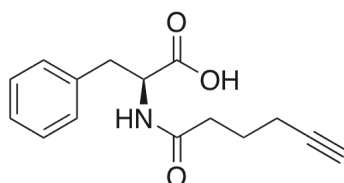
^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 176.3, 173.3, 83.4, 69.3, 50.9, 41.0, 34.8, 24.9, 24.0, 22.8, 21.8, 17.7.

ESI-MS, positiver Modus (m/z): ber. für $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{NO}_3^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 226.1438, gef. 226.1434, ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_6^+$ $[2\text{M} + \text{H}]^+$ 451.2803, gef. 451.2792, ber. für $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_6^+$ $[2\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 468.3068, gef. 468.3057, ber. für $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{N}_3\text{O}_9^+$ $[3\text{M} + \text{H}]^+$

676.4168, gef. 676.4155, ber. für $C_{36}H_{61}N_4O_9^+ [3M + NH_4]^+$ 693.4433, gef. 693.4422, ber. für $C_{36}H_{57}N_3NaO_9^+ [3M + Na]^+$ 698.3987, gef. 698.3974.

ESI-MS, negativer Modus (m/z): ber. für $C_{12}H_{18}NO_3^- [M - H]^-$ 224.1292, gef. 224.1297, ber. für $C_{24}H_{37}N_2O_6^- [M - H]^-$ 449.2657, gef. 449.2660.

N-Hex-5-inoyl-L-phenylalanin (23)



L-Phenylalanin (330.0 mg, 2.0 mmol, 1.0 Äquiv.) und NEt_3 (1.7 mL, 12 mmol, 6 Äquiv.) wurden in 2 mL MeCN und 3.0 mL Wasser vorgelegt und 2,5-Dioxopyrrolidin-1-ylhex-5-inoat (418.0 mg, 2.0 mmol, 1.0 Äquiv.) zugegeben. Die Lösung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nach Einengen der Reaktionsmischung wurde der Rückstand direkt säulenchromatographisch mit Silica Gel (DCM/EtOH 10:1, $R_f = 0.69$) aufgereinigt. Das Produkt (439.9 mg, 58 %) konnte als fahlgelber Feststoff erhalten werden.

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.31 - 7.24 (m, 3 H, $CH_{Arom.}$), 7.17 - 7.16 (m, 2 H, $CH_{Arom.}$), 6.13 (br, d, $J = 5.5$ Hz, 1 H, NH), 4.85 (psdt, $J = 6.8, 5.6$ Hz, 1 H, $NH-CH-C(O)OH$), 3.23 (dd, $J = 14.1, 5.4$ Hz, 1 H, $CH-CH_aH_b$), 3.10 (dd, $J = 14.1, 6.6$ Hz, 1 H, $CH-CH_aH_b$), 2.32 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H, $C(O)-CH_2$), 2.22 - 2.12 (m, 2 H, $HC\equiv C-CH_2$), 1.95 (t, $J = 2.6$ Hz, 1 H, $HC\equiv C$), 1.79 (psquin, $J = 7.1$ Hz, 2 H, $C(O)-CH_2-CH_2$).

^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 174.5, 173.0, 135.7, 129.3, 128.7, 127.2, 83.3, 69.3, 50.8, 37.3, 34.7, 25.3, 17.7$.

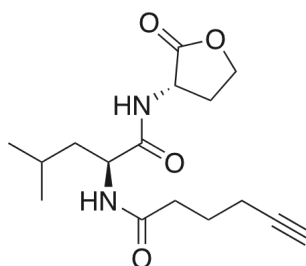
ESI-MS, positiver Modus (m/z): ber. für $C_{15}H_{18}NO_3^+ [M + H]^+$ 260.1287, gef. 260.1277, ber. für $C_{15}H_{17}NNaO_3^+ [M + Na]^+$ 282.1106, gef. 282.1096, ber. für $C_{30}H_{35}N_2O_6^+ [2M + H]^+$ 519.2495, gef. 519.2477, ber. für $C_{30}H_{38}N_3O_6^+ [2M + NH_4]^+$

536.2755, gef. 536.2746, ber. für $C_{30}H_{34}N_2NaO_6^+ [2M + Na]^+$ 541.2309, gef. 541.2299, ber. für $C_{30}H_{34}KN_2O_9^+ [2M + K]^+$ 557.2048, gef. 557.1950, ber. für $C_{45}H_{51}N_3NaO_9^+ [3M + Na]^+$ 800.3517, gef. 800.3380.

ESI-MS, negativer Modus (m/z): ber. für $C_{15}H_{16}NO_3^- [M - H]^-$ 258.1136, gef. 258.1136, ber. für $C_{30}H_{33}N_2O_6^- [2M - H]^-$ 517.2344, gef. 517.2333.

Chemische Sonde LeuSL (24)

N-((*S*)-4-Methyl-1-oxo-1-((*S*)-2-oxotetrahydrofuran-3-ylamino)pentan-2-yl)hex-5-inamid



In 1 mL trockenem DMF wurde *N*-Hex-5-inoyl-L-leucin (23) (38.3 mg 0.170 mmol, 1.7 Äquiv.) und DIPEA (68.0 μ L, 0.400 mmol, 4.0 Äquiv.) vorgelegt. Nach 10 min Rühren wurde DIC (50.0 μ L, 0.320 mmol, 3.2 Äquiv.) zugetropft und nach weiteren 10 min L-Homoserinlactonhydrochlorid (13.8 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äquiv.) zugegeben. Nach Rühren über Nacht wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand per präparativer HPLC aufgereinigt. Das Acetonitril der entsprechenden Fraktion wurde am Rotationsverdampfer entfernt und die wässrige Suspension durch Lyophilisieren getrocknet. Das Produkt **LeuSL (24)** (25.9 mg, 84 %) konnte als farbloses Öl erhalten werden.

1H NMR (400 MHz, CD_3CN): δ 7.13 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, $NH-C(O)-CH-NH$), 6.66 (d, $J = 7.6$ Hz, 1 H, $NH-C(O)-CH-NH$), 4.48 (ddd, $J = 11.0, 9.2, 8.0$, 1 H, $OC(O)-CH-NH$), 4.39 - 4.30 (m, 2 H, $NH-C(O)-CH-NH$, $C(O)O-CH_aH_b$), 4.21 (ddd, $J = 10.5, 9.0, 6.6$ Hz, 1 H, $C(O)O-CH_aH_b$), 2.46 (dddd, $J = 12.3, 9.1, 6.5, 1.9$ Hz, 1 H, $C(O)O-CH_2-CH_aH_b$), 2.29 (t, $J = 7.1$ Hz, 2 H, $C(O)-CH_2$), 2.24 - 2.18 (m, 4 H, $C(O)O-CH_2-CH_aH_b$,

$\text{HC}\equiv\text{C}$, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$), 1.76 (psquin, $J = 7.1$ Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$), 1.69 - 1.47 (m, 3 H, $\text{CH}_a\text{H}_b-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}_a\text{H}_b-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.93 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H, CH_3), 0.89 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, CH_3).

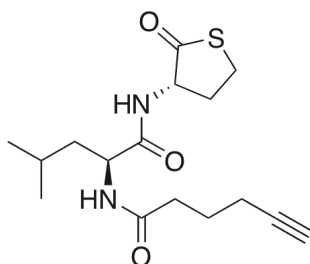
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN): δ 175.9, 173.5, 173.3, 84.7, 70.1, 66.5, 52.4, 49.2, 41.5, 35.2, 29.1, 25.4, 25.2, 23.2, 21.8, 18.3.

ESI-MS positiver Modus (m/z): ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 309.1809, gef. 309.1800, ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 326.2074, gef. 326.2065, ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{NaO}_4^+$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 331.1628, gef. 331.1619, ber. für $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_8^+$ $[2\text{M} + \text{H}]^+$ 617.3545, gef. 617.3525, ber. für $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{NaO}_8^+$ $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ 639.3364, gef. 639.3342.

ESI-MS, negativer Modus (m/z): ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4^-$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 307.1663, gef. 307.1677.

Chemische Sonde LeuCL (25)

N-((*S*)-4-Methyl-1-oxo-1-((*S*)-2-oxotetrahydrothiophen-3-ylamino)pentan-2-yl)hex-5-inamid



In 2 mL trockenem DMF wurde *N*-Hex-5-inoyl-L-leucin (76.6 mg 0.340 mmol, 1.7 Äquiv.) und DIPEA (136.0 μL , 0.800 mmol, 4.0 Äquiv.) vorgelegt. Nach 10 min Rühren wurde DIC (52.7 μL , 0.340 mmol, 1.7 Äquiv.) zugetropft und nach weiteren 5 min L-Homocysteinthiolactonhydrochlorid (30.6 mg, 0.20 mmol, 1.0 Äquiv.) zugegeben. Nach Rühren über Nacht wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand direkt säulenchromatographisch mit Silica Gel (iso-Hexan/EtOAc 1:1, $R_f =$

0.36) aufgereinigt. Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt per präparativer HPLC konnte das Produkt **LeuCL (25)** (3.9 mg, 6 %) als farbloser Feststoff erhalten werden.

^1H NMR (400 MHz, CD_3CN): δ 6.87 (d, $J = 7.4$ Hz, 1 H, NH), 6.57 (d, $J = 7.7$ Hz, 1 H, NH), 4.55 (dddd, $J = 12.7, 8.1, 7.0, 0.4$ Hz, 1 H, SC(O)-CH-NH), 4.31 (ddd, $J = 9.7, 7.9, 5.2$ Hz, 1 H, NH-C(O)-CH-NH), 3.36 (ddd, $J = 11.9, 11.3, 5.4$ Hz, 1 H, $\text{C(O)S-CH}_a\text{H}_b$), 3.25 (dddd, $J = 11.2, 7.0, 1.5, 0.4$ Hz, 1 H, $\text{C(O)S-CH}_a\text{H}_b$), 2.51 (dddd, $J = 12.4, 7.0, 5.4, 1.6$ Hz, 1 H, $\text{C(O)S-CH}_2\text{-CH}_a\text{H}_b$), 2.28 (t, $J = 7.4$ Hz, 2 H, C(O)-CH_2), 2.23 - 2.17 (m, 3 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2$), 2.12 - 2.06 (m, 1 H, $\text{C(O)S-CH}_2\text{-CH}_a\text{H}_b$), 1.76 (psquin, $J = 7.1$ Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$), 1.68 - 1.46 (m, 3 H, $\text{CH}_a\text{H}_b\text{-CH(CH}_3)_2$, $\text{CH}_a\text{H}_b\text{-CH(CH}_3)_2$, $\text{CH(CH}_3)_2$), 0.93 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, CH_3), 0.88 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, CH_3).

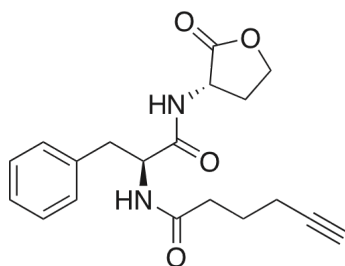
^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN): δ 206.0, 173.5, 173.2, 84.6, 70.1, 59.3, 52.5, 41.5, 35.1, 31.3, 27.8, 25.4, 25.1, 23.2, 21.7, 18.2.

ESI-MS, positiver Modus (m/z): ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 325.1580, gef. 325.1572, ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{NaO}_3\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 347.1400, gef. 347.1391, ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{KN}_2\text{O}_3\text{S}^+$ $[\text{M} + \text{K}]^+$ 363.1139, gef. 363.1130, ber. für $\text{C}_{32}\text{H}_{49}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2^+$ $[2\text{M} + \text{H}]^+$ 649.3088, gef. 649.3066, ber. für $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{NaO}_6\text{S}_2^+$ $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ 671.2907, gef. 671.2884, ber. für $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{KN}_4\text{O}_6\text{S}_2^+$ $[2\text{M} + \text{K}]^+$ 687.2647, gef. 687.2625.

ESI-MS, negativer Modus (m/z): ber. für $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^-$ $[\text{M} - \text{H}]^-$ 323.1435, gef. 323.1477, ber. für $\text{C}_{16}\text{ClH}_{24}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}^-$ $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ 359.1202, gef. 359.1255.

Chemische Sonde PheSL (26)

N-((*S*)-1-Oxo-1-((*S*)-2-oxotetrahydrofuran-3-ylamino)-3-phenylpropan-2-yl)hex-5-inamid



In 2 mL trockenem DMF wurde *N*-Hex-5-inoyl-L-phenylalanin (88.2 mg 0.340 mmol, 1.7 Äquiv.) und DIPEA (136.0 μ L, 0.800 mmol, 4.0 Äquiv.) vorgelegt. Nach 10 min Rühren wurde DIC (52.7 μ L, 0.340 mmol, 1.7 Äquiv.) zugetropft und nach weiteren 5 min L-Homoserinlactonhydrochlorid (27.5 mg, 0.20 mmol, 1.0 Äquiv.) zugegeben. Nach Rühren über Nacht wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand direkt säulenchromatographisch mit Silica Gel (iso-Hexan/EtOAc 1:6, R_f = 0.51) aufgereinigt. Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt per präparativer HPLC konnte das Produkt **PheSL (26)** (22.1 mg, 32 %) als farbloser Feststoff erhalten werden.

^1H NMR (400 MHz, CD_3CN): δ 7.31 - 7.20 (m, 5 H, $\text{CH}_{\text{Arom.}}$), 7.12 (d, J = 7.1 Hz, 1 H NH-C(O)-CH-NH), 6.63 (d, J = 7.7 Hz, 1 H, NH-C(O)-CH-NH), 4.60 (ddd, J = 9.0, 8.4, 5.1 Hz, 1 H, NH-C(O)-CH-NH), 4.46 (ddd, J = 10.9, 9.1, 7.9 Hz, 1 H, OC(O)-CH-NH), 4.38 (psdt, J = 9.0, 2.0 Hz, 1 H, $\text{C(O)O-CH}_a\text{H}_b$), 4.22 (ddd, J = 10.5, 9.0, 6.6 Hz, 1 H, $\text{C(O)O-CH}_a\text{H}_b$), 3.16 (dd, J = 13.9, 5.1 Hz 1 H, $\text{Ph-CH}_a\text{H}_b$), 2.83 (dd, J = 14.0, 9.1 Hz, 1 H, $\text{Ph-CH}_a\text{H}_b$), 2.46 (dddd, J = 12.3, 9.2, 6.6, 2.0 Hz, 1 H, $\text{C(O)O-CH}_2\text{-CH}_a\text{H}_b$), 2.15 - 2.27 (m, 4 H, $\text{C(O)O-CH}_2\text{-CH}_a\text{H}_b$, C(O)-CH_2 , $\text{HC}\equiv\text{C}$), 2.06 (dt, J = 7.1, 2.7 Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2$), 1.63 (psquin, J = 7.2 Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3CN): δ 175.5, 172.7, 171.9, 138.1, 129.9, 129.9, 128.9, 127.2, 117.9, 84.3, 69.8, 66.2, 54.5, 49.0, 37.9, 34.8, 28.7, 24.8, 17.8.

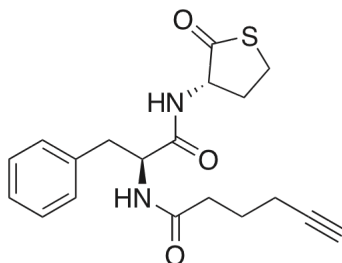
ESI-MS, positiver Modus (m/z): ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ 343.1652, gef. 343.1643, ber. für $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_4^+$ $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 360.1918, gef. 360.1908, ber. für

$C_{19}H_{22}N_2NaO_4^+ [M + Na]^+$ 365.1472, gef. 365.1462, ber. für $C_{38}H_{45}N_4O_8^+ [2M + H]^+$ 685.3232, gef. 685.3210, ber. für $C_{38}H_{48}N_5O_8^+ [2M + NH_4]^+$ 702.3497, gef. 702.3470, ber. für $C_{38}H_{44}N_4NaO_8^+ [2M + Na]^+$ 707.3051, gef. 707.3029.

ESI-MS, negativer Modus (m/z): ber. für $C_{19}H_{21}N_2O_4^- [M - H]^-$ 341.1507, gef. 341.1539, ber. für $C_{20}H_{23}N_2O_6^- [M + FA - H]^-$ 387.1562, gef. 387.1630.

Chemische Sonde PheCL (27)

N-((*S*)-1-Oxo-1-((*S*)-2-oxotetrahydrothiophen-3-ylamino)-3-phenylpropan-2-yl)hex-5-inamid



In 1.5 mL trockenem DMF wurde *N*-Hex-5-inoyl-L-phenylalanin (79.0 mg 0.30 mmol, 1.5 Äquiv.) und DIPEA (106.0 μ L, 0.62 mmol, 3.1 Äquiv.) vorgelegt. Nach 10 min Rühren wurde DIC (46.5 μ L, 0.30 mmol, 1.5 Äquiv.) zugetropft und nach weiteren 5 min L-Homocysteinthiolactonhydrochlorid (30.6 mg, 0.20 mmol, 1.0 Äquiv.) zugegeben. Nach Rühren über Nacht wurde das Lösemittel entfernt und der Rückstand direkt säulenchromatographisch mit Silica Gel (iso-Hexan/EtOAc 1:3, R_f = 0.52) aufgereinigt. Nach einem weiteren Aufreinigungsschritt per präparativer HPLC konnte das Produkt **PheCL (27)** (7.8 mg, 11 %) als farbloser Feststoff erhalten werden.

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 7.32 - 7.21 (m, 5 H, $CH_{Arom.}$), 6.42 (d, J = 5.9 Hz, 1 H, $NH-C(O)-CH-NH$), 6.14 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, $NH-C(O)-CH-NH$), 4.72 (psq, J = 7.0 Hz, 1 H, $NH-C(O)-CH$), 4.41 (pstd, J = 13.0, 6.6 Hz, 1 H, $NH-CH-C(O)S$), 3.33 (psdt, J = 11.8, 5.2 Hz, 1 H, $C(O)S-CH_aH_b$), 3.24 (ddd, J = 11.3, 6.9, 1.0 Hz, 1 H, $C(O)S-CH_aH_b$), 3.10 (dd, J = 14.5, 6.8, Hz, 1 H, $Ph-CH_aH_b$), 3.08 (dd, J = 14.5, 6.8, Hz, 1 H, $Ph-CH_aH_b$), 2.80 (dddd, J = 12.5, 6.6, 5.2, 1.2 Hz, 1 H, $C(O)S-CH_2-CH_aH_b$), 2.31 (t, J

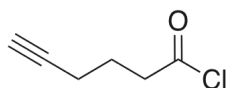
= 7.4 Hz, 2 H, C(O)-CH₂), 2.12 - 2.23 (m, 2 H, HC≡C-CH₂), 1.96 (t, *J* = 2.6 Hz, 1 H, HC≡C), 1.93 (dq, *J* = 12.4, 7.0 Hz, 1 H, C(O)S-CH₂-CH_aH_b), 1.79 (psquin, *J* = 7.0 Hz, 2 H, HC≡C-CH₂-CH₂).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): δ = 204.2, 172.3, 171.4, 136.0, 129.3, 129.3, 128.8, 128.8, 127.2, 83.3, 69.4, 59.3, 54.2, 38.3, 34.8, 31.3, 27.5, 23.9, 17.7.

ESI-MS, positiver Modus (*m/z*): ber. für C₁₉H₂₃N₂O₃S⁺ [M + H]⁺ 359.1424, gef. 359.1416, ber. für C₁₉H₂₆N₃O₃S⁺ [M + NH₄]⁺ 376.1689, gef. 376.1681, ber. für C₁₉H₂₂N₂NaO₃S⁺ [M + Na]⁺ 381.1243, gef. 381.1237, ber. für C₃₈H₄₅N₄O₆S₂⁺ [2M + H]⁺ 717.2775, ber. für C₃₈H₄₈N₅O₆S₂⁺ [2M + NH₄]⁺ 734.3040, gef. 734.3025, ber. für C₃₈H₄₄N₄NaO₆S₂⁺ [2M + Na]⁺ 739.2594, gef. 739.2581.

ESI-MS, negativer Modus (*m/z*): ber. für C₁₉H₂₁N₂O₃S⁻ [M - H]⁻ 357.1278, gef. 357.1309, ber. für C₂₀H₂₃N₂O₅S⁻ [M + Fa - H]⁻ 403.1333, gef. 403.1401.

Hex-5-inoylchlorid (28)



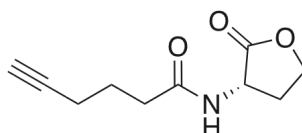
Es wurde in einem 10 mL Rundkolben unter Argon-Atmosphäre Hex-5-insäure (1.1 mL, 10 mmol, 1.0 Äquiv.) und Thionylchlorid (1.1 mL, 12 mmol, 1.2 Äquiv.) vorgelegt und die Reaktionsmischung für 1 Std unter Rückfluss (90 °C) erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Produkt destilliert (*T_b* = 32 °C, 100 mbar). Auf diese Weise konnte Hex-5-inoylchlorid (1.25 g, 96 %) als farblose Flüssigkeit erhalten werden.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.07 (t, *J* = 7.2 Hz, 2 H, C(O)-CH₂), 2.30 (dt, *J* = 6.8, 2.7 Hz, 2 H, HC≡C-CH₂), 2.02 (t, *J* = 2.7 Hz, 1 H, HC≡C), 1.92 (psquin, *J* = 7.0 Hz, 2 H, C(O)-CH₂-CH₂).

^{13}C NMR (90 MHz, CDCl_3): $\delta = 173.5, 82.1, 70.0, 45.6, 23.6, 17.2$.

Chemische Sonde HxSL (29)

(S)-N-(2-Oxotetrahydrofuran-3-yl)hex-5-inamid



In 2 mL trockenem DMF wurden L-Homoserinlactonhydrochlorid (34.8 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äquiv.) und DIPEA (418 μL , 2.40 mmol, 9.6 Äquiv.) vorgelegt und Hex-5-insäurechlorid (28) (32.6 mg, 0.25 mmol, 1.0 Äquiv.) zugefügt. Nach 6 Std Rühren wurde erneut DIPEA (418 μL , 2.40 mmol, 9.6 Äquiv.) und Hex-5-insäurechlorid (3.3 mg, 0.03 mmol, 0.1 Äquiv.) zugegeben, bevor das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt wurde. Der Rückstand wurde in 10 mL Et_2O aufgenommen und mit 5 mL 1 M HCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit jeweils 15 mL DCM rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit Silica Gel (iso-Hexan/ EtOAc 1:4, $R_f = 0.28$) konnte das Produkt **HxSL (29)** als farbloser Feststoff (23.2 mg, 48 %) erhalten werden.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.35$ (br, d, $J = 5.0$ Hz, 1 H, NH), 4.58 (ddd, $J = 11.6, 8.7, 6.3$ Hz, 1 H, OC(O)-CH-NH), 4.45 (psdt, $J = 9.1, 1.2$ Hz, 1 H, $\text{C(O)O-CH}_a\text{H}_b$), 4.27 (ddd, $J = 11.2, 9.3, 6.0$ Hz, 1 H, $\text{C(O)O-CH}_a\text{H}_b$), 2.79 (dddd, $J = 12.5, 8.7, 6.0, 1.2$, 1 H, $\text{C(O)O-CH}_2\text{-CH}_a\text{H}_b$), 2.39 (psdt, $J = 7.6, 1.7$ Hz, 2 H, C(O)-CH_2), 2.26 (dt, $J = 6.8, 2.7$, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2$), 2.16 (psddt, $J = 12.5, 11.4, 8.9$ Hz, 1 H, $\text{C(O)O-CH}_2\text{-CH}_a\text{H}_b$), 1.98 (t, $J = 2.6$ Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1.86 (psquin, $J = 7.3$ Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$).

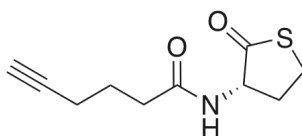
^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3): $\delta = 175.5, 172.9, 83.3, 69.3, 66.0, 49.1, 34.4, 30.2, 23.8, 17.7$.

GC Retentionszeit: 8.8 min

EI-MS (m/z): ber. für $[M]^+$ 195.0895, gef. 195.0877, ber. für $[M-C_3H_5]^+$ 143.0582, gef. 143.0568.

Chemische Sonde HxCL (30)

(S)-N-(2-Oxotetrahydrothiophen-3-yl)hex-5-inamid



In 2 mL trockenem DMF wurden L-Homoserinlactonhydrochlorid (15.4 mg, 0.10 mmol, 1.0 Äquiv.) und DIPEA (209 μ L, 1.2 mmol, 12.0 Äquiv.) vorgelegt und Hex-5-insäurechlorid (28) (22.0 mg, 0.17 mmol, 1.7 Äquiv.) zugefügt. Nach 12 Std Rühren wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in 8 mL DCM aufgenommen. Die organische Phase wurde mit 5 mL 1 M HCl-Lösung gewaschen und die wässrige Phase noch zweimal mit jeweils 8 mL DCM rückextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit Silica Gel (iso-Hexan/EtOAc 2:3, $R_f = 0.20$) konnte das Produkt **HxCL (30)** als farbloser Feststoff (12.6 mg, 60 %) erhalten werden.

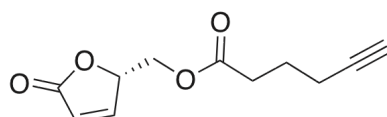
1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 5.99$ (br, 1 H, NH), 4.52 (ddd, $J = 12.8, 6.9, 6.0$ Hz, 1 H, SC(O)-CH-NH), 3.36 (ddd, $J = 12.1, 11.5, 5.1$ Hz, 1 H, C(O)S-CH_aH_b), 3.25 (ddd, $J = 11.4, 7.0, 1.2$ Hz, 1 H, C(O)S-CH_aH_b), 2.94 (dddd, $J = 12.3, 6.6, 5.1, 1.3$, 1 H, C(O)S-CH₂-CH_aH_b), 2.39 (t, $J = 7.6$ Hz, 2 H, C(O)-CH₂), 2.27 (dt, $J = 7.1, 2.6$, 2 H, HC \equiv C-CH₂), 1.98 (t, $J = 2.7$ Hz, 1 H, HC \equiv C), 1.99-1.93 (m, 1 H, C(O)S-CH₂-CH_aH_b), 1.87 (psquin, $J = 7.2$ Hz, 2 H, HC \equiv C-CH₂-CH₂).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 205.5, 172.8, 83.3, 69.4, 59.5, 34.7, 32.0, 27.6, 23.9, 17.8$.

DEI MS (m/z): ber. für $[M]^+$ 2011.0667, gef. 211.0658.

Chemische Sonde HxML (31)

(S)-(5-Oxo-2,5-dihydrofuran-2-yl)methylhex-5-inoat



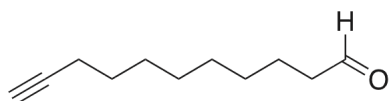
Es wurden in 5 mL trockenem DCM Hex-5-insäure (66.5 μ L, 0.6 mmol, 1.2 Äquiv.) vorgelegt und mit DIC (92.9 μ L, 0.6 mmol, 1.2 Äquiv.) versetzt. Nach 10 min wurde (S)-(-)-5-(Hydroxymethyl)-2(5H)furanon (57.1 mg, 0.5 mmol, 1.0 Äquiv.) zugegeben. Nach Rühren über Nacht wurde das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand per präparativer HPLC gereinigt. Es konnte das Produkt **HxML (31)** (39.9 mg, 38 %) als farbloser Feststoff erhalten werden.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.42 (dd, J = 5.8, 1.6 Hz, 1 H, $\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{C}(\text{O})\text{O}$), 6.19 (dd, J = 5.8, 2.1 Hz, 1 H, $\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}-\text{C}(\text{O})\text{O}$), 5.22 (dddd, J = 4.9, 4.0, 2.1, 1.7 Hz, 1 H, $\text{C}(\text{O})\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}$), 4.37 (dd, J = 12.1, 3.7 Hz, 1 H, $\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_a\text{H}_b$), 4.31 (dd, J = 12.0, 4.8 Hz, 1 H, $\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_a\text{H}_b$), 2.45 (t, J = 7.4 Hz, 2 H, $\text{C}(\text{O})-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 2.23 (dt, J = 6.9, 2.6 Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 1.96 (t, J = 2.7 Hz, 1 H, $\underline{\text{H}}\text{C}\equiv\text{C}$), 1.80 (psquin, J = 7.3 Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ 172.6, 172.1, 152.3, 123.3, 82.9, 80.8, 69.6, 62.5, 32.4, 23.3, 17.7.

ESI-MS, positiver Modus (m/z): ber. für $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_4$ 226.1074 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, gef. 226.1067.

Undec-10-inal (32)

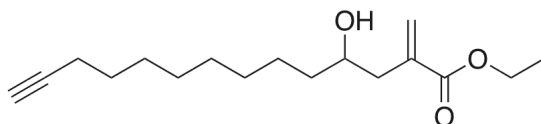


In 30.0 mL trockenem DCM wurde (2.320 g, 5.470 mmol, 1.0 Äquiv.) Dess-Martin-Periodan suspendiert und bei 0 °C Undec-10-in-1-ol (1.050 mL, 5.470 mmol, 1.0 Äquiv.) zugetropft. Bei RT wurde 3 Std gerührt und dann die Reaktionsmischung in einen Falcontube überführt und zentrifugiert (4000 rpm, 10 min). Der Überstand wurde abdekantiert und am Rotationsverdampfer (> 500 mbar) eingeeengt. Danach wurde eine eiskalte Lösung aus Pentan/Diethylether (4 : 1) zugegeben und der entstehende Niederschlag gefiltert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt (> 200 mbar) und nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit Silica Gel (Pentan/DE 9:1, $R_f = 0.32$) konnte das Produkt als farbloses Öl (657.8 mg, 72 %) erhalten werden.

$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 9.76$ (t, $J = 1.9$ Hz, 1 H, CHO), 2.42 (dt, $J = 7.3$, 1.9 Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CHO}$), 2.17 (dt, $J = 6.8$, 2.5 Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2$), 1.93 (t, $J = 2.6$ Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1.20 (m, 12 H, C_6H_{12}).

Chemische Sonde UAE (33)

Ethyl-4-hydroxy-2-methyltetradec-13-inoat



Es wurden in 5 mL $\text{NH}_4\text{Cl}_{\text{ges}}$ /THF (4:1) (193.8 mg, 1.166 mmol, 1.5 Äquiv.) Undec-10-inal (32) und Zn-Staub (76.2 mg, 1.166 mmol, 1.5 Äquiv.) vorgelegt. Zu dieser Suspension wurde Ethyl-2-(bromomethyl)-acrylat (107.4 μL , 0.777 mmol, 1.0 Äquiv) zugetropft. Nach Rühren über Nacht wurden 12 mL EtOAc zugesetzt und die

organische Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit 12 mL EtOAc rückextrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit 10 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeengt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung mit Silica Gel (iso-Hexan/EtOAc 6:1, R_f = 0.26) konnte das Produkt **UAE (33)** als farbloses Öl (84.9 mg, 42 %) erhalten werden.

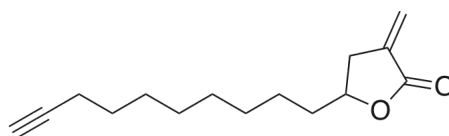
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 6.24 (d, *J* = 1.1 Hz, 1 H, C=H_aH_b), 5.64 (br, 1 H, C=H_aH_b), 4.21 (q, *J* = 7.1, 2 H, C(O)O-CH₂), 3.72 (br, m, 1 H, CH-OH), 2.58 (dd, *J* = 14.0, 2.5 Hz, 1 H, C=C-CH_aH_b), 2.32 (dd, *J* = 14.0, 8.5 Hz, 1 H, C=C-CH_aH_b), 2.17 (dt, *J* = 7.1, 2.4 Hz, 2 H, HC≡C-CH₂), 1.93 (t, *J* = 2.3 Hz, 1 H, HC≡C), 1.51 (psquin, *J* = 7.4 Hz, 2 H, HC≡C-CH₂-CH₂), 1.28 - 1.48 (m, 15 H, C₆H₁₂, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ = 167.7, 137.8, 127.4, 84.8, 70.6, 68.0, 61.0, 40.4, 37.2, 29.5, 29.4, 29.0, 28.7, 28.4, 25.6, 18.4, 14.2.

ESI-MS, positiver Modus (*m/z*): ber. für C₁₇H₂₉O₃ [M+H]⁺ 281.2111, gef. 281.2104, ber. für C₃₄H₅₇O₃ [2M+H]⁺ 561.4150, gef. 561.4130.

Chemische Sonde UExL (34)

5-(Dec-9-in-1-yl)-3-methylendihydrofuran-2(3*H*)-on



In 2.6 mL Toluol wurde Verbindung (33) (66.9 mg, 0.239 mmol, 1 Äquiv.) vorgelegt und 4-Toluolsulfonsäuremonohydrat (18.6 mg, 0.098 mmol, 0.4 Äquiv.) zugegeben. Nach Rühren über Nacht wurde die Reaktionsmischung eingeengt und der Rückstand direkt säulenchromatographisch mit Silica Gel (iso-Hexan/EtOAc 8:1, R_f = 0.22) aufgereinigt. Es konnte das Produkt **UExL (34)** als farbloses Öl (20.0 mg, 36 %) erhalten werden.

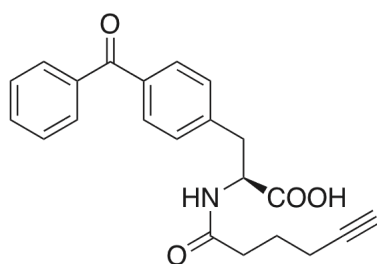
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 6.22 (pst, J = 2.8 Hz, 1 H, $\text{C}=\underline{\text{H}}_a\text{H}_b$), 5.62 (pst, J = 2.5 Hz, 1 H, $\text{C}=\text{H}_a\underline{\text{H}}_b$), 4.51 (psstt, J = 7.6, 2.5 Hz, 1 H, $\text{CH}-\text{O}$), 3.05 (pstdd, J = 17.0, 7.7, 2.5 Hz, 1 H, $\text{C}=\text{C}-\underline{\text{C}}_a\text{H}_b$), 2.57 (pstdd, J = 17.0, 6.0, 2.9 Hz, 1 H, $\text{C}=\text{C}-\text{C}\underline{\text{H}}_a\text{H}_b$), 2.18 (dt, J = 7.1, 2.6 Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 1.93 (t, J = 2.6, 1 H, $\underline{\text{H}}\text{C}\equiv\text{C}$), 1.69 - 1.76 (m, 1 H, $\underline{\text{C}}_a\text{H}_b-\text{CH}-\text{O}$), 1.58-1.64 (m, 1 H, $\text{C}\underline{\text{H}}_a\text{H}_b-\text{CH}-\text{O}$), 1.51 (psquin, J = 7.2 Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{C}\underline{\text{H}}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2$), 1.28 - 1.58 (m, 10 H, $\text{C}_5\underline{\text{H}}_{10}$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3): δ = 170.3, 134.7, 121.9, 84.7, 77.5, 68.1, 36.2, 33.6, 29.3, 29.1, 28.9, 28.6, 28.4, 24.8, 18.4.

ESI-MS, positiver Modus (m/z): ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 235.1693, gef. 235.1687, ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{NO}_2$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 252.1958, gef. 252.1952, ber. für $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NaO}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 257.1512, gef. 257.1505, ber. für $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{NO}_2$ $[\text{2M}+\text{NH}_4]^+$ 486.3578, gef. 486.3563, ber. für $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{NaO}_2$ $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 491.3132, gef. 491.3117.

Chemische Sonde BPOH (35)

(S)-3-(4-Benzoylphenyl)-2-hex-5-inamidopropansäure



Es wurde in 1.5 mL trockenem DCM H-p-Bz-Phe-OH (Bachem) (103.0 mg, 0.383 mmol, 1.0 Äquiv.) vorgelegt und DBU (142.9 μL , 0.956 mmol, 2.5 Äquiv.) zugefügt. Nachdem sich die Edukte gelöst hatten wurde Hex-5-inoylchlorid (28) (66.6 mg, 0.510 mmol, 1.3 Äquiv) zugetropft. Nach Rühren über Nacht wurden 0.3 mL 2 M HCl zugegeben und das organische Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde per präparativer HPLC aufgereinigt und es konnte das Produkt **BPOH (35)** (68.5 mg, 49 %) als fahlgelber Feststoff erhalten werden.

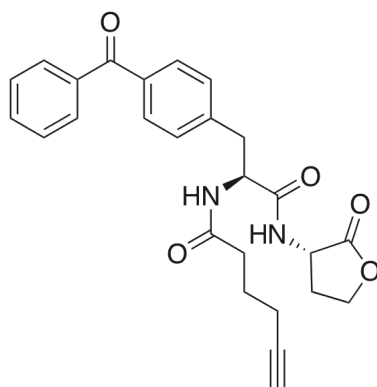
^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 7.82 - 7.28 (m, 9 H, H_{Arom}), 6.30 (d, J = 7.6 Hz, 1 H, NH), 4.94 (psq, J = 6.1 Hz, 1 H, CH-C(O)OH), 3.35 (dd, J = 14.1, 5.7, 1 H, $\text{C}_{\text{Arom.}}-\text{CH}_a\text{H}_b$), 3.19 (dd, 1 H, J = 14.0, 6.4 Hz, $\text{C}_{\text{Arom.}}-\text{CH}_a\text{H}_b$), 2.36 (t, J = 7.3, 2 H, NH-C(O)-CH_2), 2.25 - 2.15 (m, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2$), 1.95 (t, J = 2.6 Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 1.81 (psquin, J = 6.8 Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2-\text{CH}_2$).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 196.6, 173.8, 172.9, 141.0, 137.4, 136.4, 132.6, 130.4, 130.1, 130.0, 129.8, 129.4, 128.5, 128.3, 128.3, 83.2, 69.5, 53.1, 37.4, 34.7, 24.0, 17.7.

ESI-MS, positiver Modus (m/z): ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 364.1543, gef. 364.1554, ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 381.1809, gef. 381.1809, ber. für $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NNaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 386.1363, gef. 386.1363, ber. für $\text{C}_{44}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_8$ $[\text{2M}+\text{NH}_4]^+$ 744.3279, gef. 744.3277, ber. für $\text{C}_{44}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{NaO}_8$ $[\text{2M}+\text{Na}]^+$ 749.2833, gef. 749.2832.

Chemische Sonde BPL (36)

N-((*S*)-3-(4-Benzoylphenyl)-1-oxo-1-((*S*)-2-oxotetrahydrofuran-3-ylamino)propan-2-yl)hex-5-inamid



Es wurde in 0.5 mL trockenem DCM Verbindung (35) (52.9 mg, 0.146 mmol, 1 Äquiv.) vorgelegt und DBU (21.8 μL , 0.146 mmol, 1.0 Äquiv.) sowie HOBT (25.6 mg, 1.189 mmol, 1.3 Äquiv) zugegeben. Nach Lösung wurde DIC (33.8 μL , 27.5 mg, 0.218 mmol, 1.5 Äquiv.) zugefügt und für 3 Std bei RT gerührt. Die

Reaktionsmischung wurde dann zu einer Lösung aus (S)-2-Oxotetrahydrofuran-3-aminiumchlorid (20.0 mg, 0.146 mmol, 1.0 Äquiv.) und DBU (28.4 μ L, 28.9 mg, 0.190 mmol, 1.3 Äquiv.) in 0.5 mL trockenem DCM getropft. Es wurde über Nacht gerührt und das Lösemittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde per präparativer HPLC gereinigt. Es konnte das Produkt **BPL (36)** (6.4 mg, 10 %) als fahlgelbes Öl erhalten werden.

^1H NMR (200 MHz, CD_3OD): δ = 7.78 - 7.40 (m, 9 H, $\text{H}_{\text{Arom.}}$), 4.75 (dd, J = 9.3, 5.7 Hz, 1 H, $\text{NH-CH}_2\text{-C(O)}$), 4.62 (dd, J = 10.9, 9.0 Hz, 1 H, $\text{NH-CH}_2\text{-C(O)}$) 4.58-4.21 (m, 2 H, C(O)O-CH_2), 3.28 - 3.23 (m, 1 H, $\text{CH}_a\text{H}_b\text{-C}_{\text{Arom.}}$), 3.06 - 2.92 (m, 1 H, $\text{CH}_a\text{H}_b\text{-C}_{\text{Arom.}}$), 2.62 - 2.42 (m, 1 H, $\text{C(O)O-CH}_2\text{-CH}_a\text{H}_b$), 2.38 - 2.24 (m, 3 H, NH-C(O)-CH_2 , $\text{C(O)O-CH}_2\text{-CH}_a\text{H}_b$), 2.21 (t, J = 2.6 Hz, 1 H, $\text{HC}\equiv\text{C}$), 2.05 (dt, J = 7.2, 2.6 Hz, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2$), 1.68 (psquin, J = 7.2, 2 H, $\text{HC}\equiv\text{C-CH}_2\text{-CH}_2$).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD): δ 198.4, 177.1, 175.2, 173.6, 144.1, 139.0, 137.3, 133.7, 131.3, 131.3, 131.0, 131.0, 130.6, 130.6, 129.5, 129.5, 84.2, 70.3, 67.5, 59.1, 55.4, 39.2, 35.6, 29.6, 25.9, 18.5.

ESI-MS, positiver Modus (m/z): ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 447.1915, gef. 447.1915, ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 464.2180, gef. 464.2180, ber. für $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{NaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 469.1734, gef. 3469.1734, ber. für $\text{C}_{52}\text{H}_{56}\text{N}_5\text{O}_{10}$ $[\text{2M}+\text{NH}_4]^+$ 910.4022, gef. 910.4019.

4.4 Chemisch-biologische Methoden

Die verwendeten Methoden wurden von Herrn Dr. Thomas Böttcher zusammengestellt und in seiner Dissertation bereits veröffentlicht.^[106]

Allgemeine Methoden:

Formulierungen der verwendeten Medien:

Flüssigmedien:

Die Medien wurden wie im Folgenden beschrieben hergestellt und 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

Agarplatten:

LB Agarplatten mit Antibiotika:

500 mL frisch hergestelltes LB Medium pH 7.5 mit 7.5 g Agar Agar wurde autoklaviert und nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit 500 µL Antibiotika Stammlösung versetzt und in Platten gegossen.

Mikrobiologie:

Bakterienstämme:

In der Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienspezies, sowie ihre Stämme mit Bezugsquelle angegeben.

Spezies	Stamm	Bezugsquelle
<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	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
<i>Listeria monocytogenes</i>	EGD-e	Institute Pasteur, Frankreich
	F2365	BCCM TM /LMG, Belgien
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	Institut Pasteur, Frankreich
<i>Staphylococcus aureus</i>	NCTC 8325	Institut Pasteur, Frankreich
	Mu50 (ATCC 700699)	Institut Pasteur, Frankreich

Kultivierung:

Bakterien der Gattungen *Bacillus*, *Escherichia* und *Pseudomonas* wurden, wenn nicht anders angegeben, in LB Medium, *Listeria* und *Staphylococcus* in BHB Medium gezüchtet. Das Wachstum aller Bakterien erfolgte bei 37 °C und ca. 250 rpm Schüttelfrequenz in einem Inkubator. Übernachtskulturen wurden in sterilen 15 mL FalconTM 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 Std. 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.

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 4000 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 4000 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 flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung wurden die kompetenten Zellen bei – 80 °C gelagert.

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.

Molekularbiologische Methoden:

Pufferzusammensetzungen:

6x DNA-Auftragspuffer:

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

PBS:

NaCl	136.9 mmol	8.00 g/L
Na ₂ HPO ₄	10.1 mmol	1.44 g/L
KCl	2.7 mmol	0.20 g/L
KH ₂ PO ₄	1.8 mmol	0.24 g/L
	(in H ₂ O _{deion} , pH 7.4)	

Puffer E (Proteinaufreinigung, Elutionspuffer):

Tris-HCl	50 mmol	15.76 g/L
NaCl	150 mmol	8.77 g/L
EDTA	1 mmol	372 mg/L
Desthiobiotin	2.5 mmol	536 mg/L
	(in H ₂ O _{deion} , pH 8.0)	

Sammelgelpuffer (Gelelektrophorese):

Tris	0.5 mol	60.6 g/L
	(in H ₂ O _{deion} , pH 6.8)	

2x SDS-Auftragspuffer:

Tris-HCl	63 mmol	9.93 g/L
Glycerin	10 % (v/v)	100 mL/L
SDS	2 % (w/v)	20.0 g/L
Bromphenolblau	0.0025 % (w/v)	25 mg/L

β -Mercaptoethanol	5 % (v/v) (in H ₂ O _{deion})	50 mL/L
--------------------------	--	---------

1x SDS Laufpuffer (Gelelektrophorese):

Tris	24.8 mmol	3.0 g/L
Glycerin	191.8 mmol	14.4 g/L
SDS	3.5 mmol (in H ₂ O _{deion} , pH 8.3)	1.0 g/L

50x TAE Puffer (Klonierung):

Tris	2.0 mol	242.28 g/L
Essigsäure	1.0 mol	57.7 mL/L
EDTA	0.1 mol (in H ₂ O _{deion} , pH 7.0)	37.22 g/L

TE Puffer (Klonierung):

Tris	10 mmol	1.21 g/L
EDTA	1 mmol (in H ₂ O _{deion} , pH 8.0)	372 mg/L

Trenngelpuffer (Gelelektrophorese):

Tris	3.0 mol (in H ₂ O _{deion} , pH 8.8)	364.4 g/L
------	--	-----------

Lösungen:

APS Lösung (10 % w/v, Gelelektrophorese):

Ammoniumperoxodisulfat 5 g / 50 mL H₂O

Coomassie Färbelösung:

Coomassie Brilliant Blue R250	0.25 % (w/v)	2.5 g/L
Essigsäure (konz.)	9.2 % (v/v)	92 mL/L
Ethanol	45.4 % (v/v) (in H ₂ O _{deion})	454 mL/L

Coomassie Entfärbelösung:

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

SDS-Lösung:

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

Stammlösungen:

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

Click-Chemie:

Hauptstock Rhodaminazid (193 mM)

Rhodaminazid	9.9 mg
	in 100 µL Methanol

0.65 mM Stock Rhodaminazid

1 µL Hauptstock Rhodaminazid	
	in 295 µL DMSO

10 mM trifunktioneller Linker

Rhodaminbiotinazid	1 mg
	in 85.4 µL DMSO

50x Ligand Stock

Ligand	17.7 mg
	in 400 µL DMSO

1x Ligand Stock	
50x Ligand Stock	20 μ L
DMSO	180 μ L
<i>tert</i> -Butanol	800 μ L
50 mM CuSO ₄	
CuSO ₄ \times 5 H ₂ O	12.5 mg
	in 1 mL H ₂ O _{deion}

4.5 Methoden der Proteomik

Präparation von Proteomen:

Die Proteome der verschiedenen Bakterienstämme für die *in vitro* Markierung mit ABPP-Sonden wurden in der Regel aus 1 L oder 0.5 L Flüssigkulturen hergestellt. Die Kulturen wurden in den entsprechenden Kulturmedien (LB oder BHB) eine Stunde nach Eintritt in die stationäre Phase durch Zentrifugieren 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 500-1000 PSI unter Kühlung. Im Falle von pathogenen Bakterienstämmen erfolgte der Aufschluss per Ultraschall ebenfalls unter Eiskühlung. Zellfragmente und nichtlysierte Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 4000 rpm für 5 min abgetrennt. Die Membranfraktion wurde jeweils durch Zentrifugation für 45 min bei 18000 rpm pelletiert, die cytosolische Fraktion abgenommen und die Membranfraktion nach Waschen mit PBS resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung der Proteompräparationen erfolgte durch den Bradford Assay. Die Proteome wurden bis zu ihrer Verwendung bei – 80 °C aufbewahrt.

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 der Tabelle aufgelistet ist.

Konzentration BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Volumen H_2O (μL)	Volumen BSA-Standard (μL)
0.00	40	0
0.25	35	5
0.50	30	10
0.75	25	15
1.00	20	20
1.50	10	30

Eine Bradford Stammlösung, Roti[®] - Quant (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde mit deionisiertem Wasser verdünnt (1:4), filtriert und davon 2 mL zu jeder Probe der BSA Kalibration 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.

ABPP Markierung von Proteomen

Die jeweiligen Proteome wurden in den Markierungsexperimenten, wenn nicht anders angegeben, 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 Proteinkonzentration von 1 mg/mL ergab. Das Proteom wurde zunächst mit PBS auf ein Volumen von 43 μL aufgefüllt 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 aufgefüllt 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 betrug, wenn nicht anders angegeben, 60 min. Anschließend wurde 1 μL 0.65 mM Rhodaminazid, 1 μL einer frisch angesetzten 52 mM Lösung von Tris(2-carboxyethyl)phosphinhydrochlorid (TCEP, 15 g/L) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ und 3 μL 1 \times Ligand (1.667 mM) hinzugefügt. Die Proben wurden gevortext und die Click-Chemie durch die Zugabe von 1 μL 50 mM CuSO_4 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gestartet. Nach erneutem Mischen wurde die Click-Reaktion für 1 Std bei RT inkubiert. Ein 50 μL Standardansatz enthielt somit für die Click-Chemie 13 μM Rhodaminazid, 1 mM

TCEP, 100 μ M Ligand und 1 mM CuSO_4 . Die Reaktion wurde nach 1 Std durch die Zugabe von 50 μ L 2 \times SDS Auftragspuffer beendet. Bis zum Auftragen der Proben für die Gelelektrophorese wurden diese bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

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. 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 in der Auswertung zu subtrahieren.

Für ein typisches präparatives *in vitro* Markierungsexperiment wurde eine Proteommenge von 1 mg eingesetzt, die auf ein Gesamtvolumen von 1 mL Ansatzgröße nach Zugabe aller Reagenzien die Proteinkonzentration 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 exemplarischen Ansatz beschrieben.

Das Proteom wurde mit PBS auf 946 μ L Gesamtvolumen aufgefüllt und mit 1 μ L Sonde der entsprechenden Konzentration bzw. DMSO für die Kontrollen 60 min inkubiert. Anschließend wurden sequenziell 3 μ L 10 mM trifunktionaler Linker, gefolgt von 10 μ L 52 mM TCEP in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ und 30 μ L 1 \times Ligand (1.667 mM) hinzugegeben. Die Proben wurden gevortext und die Click-Chemie durch die Zugabe von 10 μ L 50 mM CuSO_4 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gestartet. Nach erneutem Mischen wurde die Reaktion für 1 Std bei RT inkubiert. Anschließend wurde jeder 1 mL Ansatz auf 2 \times 500 μ L aufgeteilt und mit je 500 μ L eiskaltem Aceton gefällt. Nach Inkubation für ca. 20 min auf Eis wurden die so gefällten Proteine durch Zentrifugieren bei 13000 rpm für 10 min bei 4 $^\circ\text{C}$ pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 μ L eiskaltem Methanol durch Ultraschall resuspendiert (Bandelin Sonopuls, ca. 5-10 sec bei 50 % der maximalen Intensität). Die beiden Pellets aus einem Ansatz wurden mit denen aus dem zweiten der 2 \times 1 mL Ansätze vereinigt (4 \times 200 μ L) und bei 13000 rpm für 10 min bei 4 $^\circ\text{C}$ pelletiert. Das resultierende Pellet wurde erneut in 200 μ L 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 aus egg white, 1.1 mg/mL wässrige Glycerinsuspension, Sigma-Aldrich) wurden vor Gebrauch mit dreimal je 1 mL PBS gewaschen und durch Zentrifugieren bei 2000 rpm gesammelt. Um die Integrität der Beads zu gewährleisten wurden Zentrifugationen bei allen folgenden Waschschritten für 2-5 min bei 2000 rpm durchgeführt. Das in PBS mit 0.4 % SDS resuspendierte Proteom wurde auf die gewaschenen Avidin-Agarosebeads gegeben und 1 Std bei RT unter kontinuierlicher Durchmischung mit Hilfe eines KPG-Rührers 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 96 °C. Die Beads wurden bei 13000 rpm pelletiert und der Überstand mit den abgespaltenen Proteinen abgenommen und bis zur Auftragung auf ein präparatives SDS-Gel bei – 80 °C aufbewahrt.

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 bei 37° C wachsen gelassen. Davon wurden pro Ansatz 2 mL abgenommen, die Zellen durch Zentrifugieren für 10 min bei 6000 rpm pelletiert und das Medium abdekantiert. Die pelletierten Kulturen wurden mit je 1 mL PBS gewaschen und in 100 µL PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Sonde hinzugegeben und für 2 Std bei RT inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut pelletiert und zweimal mit je 1 mL PBS gewaschen. Dieser Schritt gewährleistet die Entfernung von Sondenmolekülen außerhalb der Zelle. Das Pellet wurde dann in 100 µL PBS durch Ultraschall (Bandelin Sonopuls) mit 4 × 20 sec bei 80 % der maximalen Intensität (für SA 95 % der maximalen Intensität) aufgeschlossen. Die Membranfraktion wurde bei 13000 rpm für 10 min pelletiert und das Cytosol abgenommen. Die Membranfraktion wurde mit 100 µL PBS gewaschen und in 100 µL PBS durch Ultraschall resuspendiert. Jeweils 44 µL der markierten Proteomfraktionen wurden für die Click-Chemie analog der analytischen *in vitro* Markierung eingesetzt.

Präparative *in situ* Markierung von Proteomen

Für präparative *in situ* Experimente wurden analog zur analytischen Markierung 5 mL einer bis eine Stunde nach Eintritt in die stationäre Phase hochgezüchteten Bakterienkultur eingesetzt. Die pelletierten Kulturen wurden mit 5 mL PBS gewaschen und in 500 μ L PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Sonde (Konzentration je nach Signalintensität in analytischen Gelen) hinzugegeben und für 2 Std 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 trifunktionalem Linker gefolgt von 10 μ L 52 mM TCEP in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ 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 CuSO_4 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ gestartet. Nach erneutem Mischen wurde die Reaktion für 1 Std 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.

Markierung des extrazellulären Mediums

Für Markierungsexperimente des extrazellulären Mediums wurden Bakterienkulturen eine Std nach Eintritt in die stationäre Phase zentrifugiert und das überstehende Medium steril gefiltert. Die Sonden wurden zu 500 μ L des so erhaltenen Mediums gegeben (5 mL für präparative Ansätze) und für eine Std bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde 500 μ L eiskaltes EtOH zugegeben (5 mL für präparative Ansätze) und die Proben über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Danach wurden die Proben 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in 19 μ L PBS resuspendiert. Nach Zugabe der Chemikalien für die Click-Chemie wurde 25 μ L 2 \times SDS Auftragspuffer zugegeben.

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 unterschiedliche isoelektrische Punkte aufweisen und daher in Puffersystemen verschiedene Nettoladungen 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 Proteingrößen 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 ein starkes elektrisches Feld 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 daher 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.

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 1/4 der Menge des Trenngels und 3/8 der Menge des Sammelgels nach Tabelle 8 verwendet. Nach beginnender Aushärtung des Trenngels 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.

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

Zusammensetzung von SDS Gelen

Acrylamid %	H ₂ O _{deion} (mL)	Rotiphorese Gel 30 (mL)	Puffer	10% SDS- Lsg.	APS- Lsg.	TEMED
Trenngel			Trenngel- puffer			
10 %	14.4	12	9 mL	360 µL	150 µL	15 µL
12.5 %	11.4	15	9 mL	360 µL	150 µL	15 µL
15 %	8.4	18	9 mL	360 µL	150 µL	15 µL
Sammelgel			Sammelgel- puffer			
3.75 %	7.35	1.5	3 mL	120 µL	60 µL	12 µL

Durchführung der SDS PAGE

Analytische und präparative Gele wurden in der Gelapparatur nach Auftragung der Proben mit 1× SDS Laufpuffer bei 55 mA unter dynamischer Anpassung der Spannung für etwa 6-7 Std mit einem Consort EV261 Electrophoresis Power Supply betrieben. Die Fluoreszenzaufnahme von SDS-Gelelen 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 werden können. Die Gelbande wurde dabei als maximal 2 mm breiter Streifen herausgetrennt und in Würfel von etwa 1 mm Dicke geschnitten.

Identifikation von markierten Proteinen

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 durchmischt. 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 entfernt, 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 nach Abkühlen auf RT und nach Entfernen der DTT-Lösung zur Alkylierung der reduzierten Thiole unmittelbar mit 100 µL einer 55 mM Iodacetamid Lösung in 50 mM NH₄HCO₃ versetzt und lichtgeschützt für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Gelstücke mit einer Mischung aus 100 µL 50 mM NH₄HCO₃ 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 weiterhin per SpeedVac getrocknet.

Für den tryptischen Verdau wurden die Gelstücke in einer frisch angesetzten Trypsin/Puffer-Lösung (1 µL in 100 µL 25 mM NH₄HCO₃) rehydriert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Gelbandenextraktion der tryptisch verdauten Proteine

Die 100 µL des tryptischen Verdau wurden von den Gelstücken abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Gefäß gegeben. Durch die nachfolgenden Waschschriffe mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität unter Inkubation bei RT im Ultraschallbad können die Peptide aus den Gelstücken extrahiert werden. Es wurden 100 µL 25 mM NH₄HCO₃ zugefügt und nach 15 min Inkubation mit 100 µL Acetonitril versetzt und weitere 15 min inkubiert. Die 200 µL der NH₄HCO₃-Acetonitril Lösung wurden gesammelt und die Gelstücke mit 100 µL 5 %ige Ameisensäure für 15 min inkubiert und mit 100 µL Acetonitril weitere 15 min inkubiert. Die gesammelten vereinigten Lösungen aller Extraktionsschriffe und des tryptischen Verdau (Gesamtvolumen 500 µL) wurden per SpeedVac auf ca. 20 µL aufkonzentriert und für die Massenspektrometrie eingesetzt.

Masenspektrometrie und Auswertung

Die tryptischen Peptide wurden auf eine Dionex C18 Nano Trap Säule (100 µm) geladen, eluiert und über eine Dionex C18 PepMap 100 (3 µm) Säule separiert. Die Analyse erfolgte durch Tandem-Massenspektrometrie gefolgt von hochauflösender 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 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. Die minimalen p-Werte und Xcorr Werte der einzelnen Läufe sowie die Gesamtanzahl an detektierten Peptidfragmenten sind den Tabellen mit angegeben.

Messungen der Enzyminhibition

Für die Bestimmung der IC_{50} Werte für die Inhibition einer enzymatischen Reaktion durch die Bindung der jeweiligen Sonden wurde für jedes untersuchte Enzym ein entsprechender Substratassay genutzt, mit dem die Enzymaktivität gemessen werden konnte. Die IC_{50} Werte wurden aus der Kurvenanpassung der Werte der Enzymaktivität gegen die Inhibitorkonzentration durch MicrocalTM Origin 6.0 als Inhibitorkonzentration bei halbmaximaler Aktivität ermittelt. Für jede Inhibitorkonzentration wurden mindestens drei Replikate gemessen.

Inhibition der β -Lactamase aus *B. licheniformis*

Der IC_{50} der β -Lactamase aus *B. licheniformis* wurde mit dem rekombinant exprimiertem, Strep-Tag gereinigtem Protein bestimmt. Mit dem chromogenen Modellsubstrat *para*-Nitrophenylacetat wurde die Aktivität der β -Lactamase verfolgt.^[86] Das Enzym katalysiert in dieser Testreaktion die Hydrolyse des Substrats, wobei *para*-Nitrophenol frei wird, das ein ausgeprägtes Absorptionsmaximum bei 400 nm aufweist und spektrometrisch verfolgt werden kann.

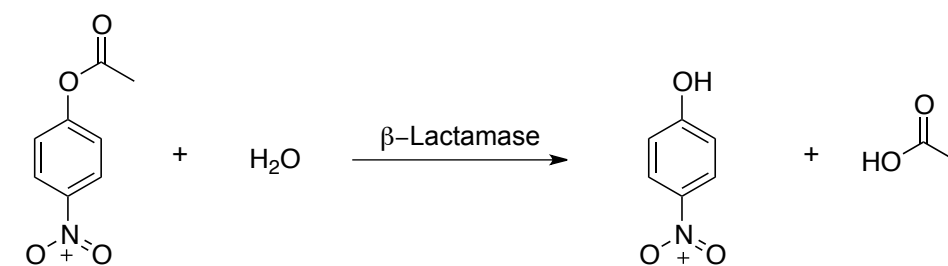


Abbildung A: Hydrolyse von *para*-Nitrophenylacetat als chromogenes Substrat durch β -Lactamase

Für eine typische Messung wurden die Sonden aus verschiedenen Stockkonzentrationen in DMSO zu einer 2.4 M Lösung des Substrats *para*-Nitrophenylacetat in PBS gegeben und durchmischt. Die Reaktion wurde im Anschluss unmittelbar vor der Messung durch Zugabe eines β -Lactamase Stocks in

PBS entsprechend einer Endkonzentration von 500 nM gestartet. Die Ermittlung der Steigung der Absorptionswerte wurden dabei immer in einem Gesamtvolumen von 1 mL in einer 1 mL Küvette gemessen. Der katalytische Umsatz des Substrats wurde über 10 min bei 400 nm an einem Varian Cary 100 Bio UV-Visible Spectrophotometer ermittelt. Durch eine simultan durchgeführte Kontrolle ohne Enzym und einer des zugegebenen Sondenstocks entsprechenden Menge DMSO wurde die Hintergrundhydrolyse des Substrats ermittelt, um die Messwerte zu korrigieren. Die aus der Auftragung einer kinetischen Messreihe (Absorption gegen Zeit) ermittelte Steigung wurde über drei Replikate gemittelt und gegen die Konzentration des Sonde aufgetragen, um den IC₅₀ als Konzentration bei 50 % Inhibition der Enzymaktivität zu erhalten.

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 Sonden auf ClpP herangezogen werden.^[84b, 85] 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 der Sonde NCO (16) 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.

MIC Bestimmung

Für die Bestimmung des MIC-Wertes wurden in Greiner CELLSTAR® 96-well-Microtiterplatten 99 µL frisches 1:1000 angeimpftes Medium aus einer Übernachtskultur zu 1 µL der Sonden verschiedener Konzentrationen in DMSO gegeben. Nach Inkubation bei 37 °C bei 260 rpm für 14 Stunden wurde die minimale

Konzentration der Sonde für die Hemmung des Bakterienwachstums durch einen Vergleich mit einem Kontrollexperiment mit 1 μL DMSO festgestellt. Für jede Sondenkonzentration wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

HPLC Assays und Messung der Enzymkinetik für Dipep und E28 aus SA Mu50

Aufgrund der Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial treten Penicillin G und sein Hydrolyseprodukt bei unterschiedlichen Retentionszeiten im HPLC-Chromatogramm in Erscheinung. Dies kann unter Annahme gleicher UV-Absorptionswerte von Penicillin G und Hydrolyseprodukt zur Analyse der Enzymaktivität herangezogen werden. Die Reaktionen wurden in PBS-Puffer (pH 7.3) in einem Endvolumen von 50 μL durchgeführt. Zu unterschiedlichen Konzentrationen von Penicillin G wurde das Enzym in PBS entsprechend einer Endkonzentration von 5 μM für Dipep und 3 μM für E28 gegeben. Die Reaktionen wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von 50 μL eiskaltem Aceton und anschließende Zentrifugation bei 13000 rpm gequenchet. Im Anschluss wurden die HPLC-Chromatogramme aufgenommen und die Menge des Hydrolyseprodukts durch Integration der Peaks bei 215 nm bestimmt. Die Identität des Hydrolyseprodukts wurde nach sofortigem Einfrieren der aufgefangenen Fraktionen per ESI-MS bestätigt. Es wurden die Geschwindigkeit (Steigung) der Hydrolysereaktionen bei variierenden Substratkonzentrationen durch Ermittlung der Hydrolyseproduktmenge zu zwei verschiedenen Zeitpunkten innerhalb des linearen Reaktionsbereiches berechnet. Die reziproken Werte der Geschwindigkeiten, sowie der reziproke Wert der jeweiligen Substratkonzentration gehen in das Lineweaver-Burk-Diagramm ein. K_m ergibt sich dann aus der Geradengleichung mit $y = 0 = - (1 / K_m)$. V_{\max} und k_{cat} ergeben sich aus der Geradengleichung durch $x = 0 = 1 / V_{\max}$ und $V_{\max} / \text{Enzymmenge} = k_{\text{cat}}$.

4.6 Methoden der Genomik

Präparation genomischer DNA

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

Polymerasekettenreaktion (PCR)

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 Ablauf mit verschiedenen Temperaturstufen werden die Doppelstränge einer DNA-Probe zunächst aufgetrennt und anschließend können sich bei niedrigerer Temperatur kurze komplementäre Sequenzen, die sogenannten Primer anlagern, an denen im folgenden Schritt 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.

Primerdesign

Das Primerdesign erfolgte nach der Gateway® Technologie. Hierbei wurden 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 Guanosinbausteinen 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 unten angegeben.

6-Phosphofruktokinase aus *S. aureus* NCTC 8325

vorwärts Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GAA TGC TGC CGT A-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA TAT AGA TAA CTT GTT AG-3'

Dihydrolipoamide dehydrogenase aus *P. aeruginosa* PAO1

vorwärts Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GAG CCA GAA ATT CGA CGT-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TCA GCG CTT CTT GCG GT-3'

Trigger factor aus *P. aeruginosa* PAO1

vorwärts Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GCA AGT TTC TGT TGA AAG CAC-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TCA GGC CGC TTG CGG A-3'

UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase *murA1* aus *S. aureus* NCTC 8325

vorwärts Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GGA TAA AAT AGT AAT CAA AGG-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA ATC GTT AAT ACG TTC AAT GT-3'

UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase *murA2* aus *S. aureus* Mu50

vorwärts Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GGC TCA AGA GGT AAT AAA AAT-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG CTA TAC AGT TTC CGT CCA AA-3'

Carboxyesterase precursor-like protein (E28) aus *S. aureus* Mu50

vorwärts Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GCA GAT AAA ATT ACC AAA A-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA TTC TGA CCA GTC TAA T-3'

Hypothetical protein SAV2581 (Hy30) aus *S. aureus* Mu50

vorwärts Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GGA AAC TTT AGA ATT AC-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA ACC CCA CAT ATT TAA T-3'

PBP 2 aus *S. aureus* Mu50

vorwärts Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GAC GGA AAA CAA AGG A-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA GTT GAA TAT ACC TGT TAA T-3'

Dipeptidase PepV (Dipep) aus *S. aureus* Mu50

vorwärts Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TTT CAT TAT GCG TGG AGG AAT AA-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA TTC
CTC CAC GCA TAA TGA A-3'

Punktmutation Cys 83 Dipeptidase PepV (Dipep) aus *S. aureus* Mu50

vorwärts Primer: 5'-GCA GGT AAA GGA AAT GAC GTA TTA GGT ATC TTA GCT
CAT GTT GAC GTT GTT C-3'

rückwärts Primer: 5'-GAA CAA CGT CAA CAT GAG CTA AGA TAG CTA ATA CGT
CAT TTC CTT TAC CTG C-3'

Punktmutation Cys 155 Dipeptidase PepV (Dipep) aus *S. aureus* Mu50

vorwärts Primer: 5'-TGG TAC GGA TGA AGA ATC TGA TTG GAA AGC TAC GGA
TCG CTA TTT-3'

rückwärts Primer: 5'-AAA TAG CGA TCC GTA GCT TCC CAA TCA GAT TCT TCA
TCC GTA CCA-3'

Punktmutation Cys 178 Dipeptidase PepV (Dipep) aus *S. aureus* Mu50

vorwärts Primer: 5'-GCA CCA GAT GCA GAA TTT CCA GCT ATT CAT GGT GAA
AAA GGC AT-3'

rückwärts Primer: 5'-ATG CCT TTT TCA CAA TGA ATA GCT GGA AAT TCT GCA
TCT GGT GC-3'

Punktmutation Cys 466 Dipeptidase PepV (Dipep) aus *S. aureus* Mu50

vorwärts Primer: 5'-CAA CTA GTA TTT ACT TAG AAG CAA TTT ATT CAT TAG
CCG TGG AGG AAT AAT ACC C-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG TAT TAT TCC TCC ACG GCT AAT GAA TAA ATT GCT
TCT AAG TAA ATA CTA GTT G-3'

Serin Proteinase D₀ (SPD₀) aus *S. aureus* Mu50

vorwärts Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAT GTC
AGA TTT TAA TCA TAC AG-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA TCT
AAA GAA ATC TCT ATC G-3'

D-alanyl-D-alanin carboxypeptidase (PBP 4) aus *P. putida* KT 2440

vorwärts Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GCC
ACT TGC CTT GCC CAG CCA CG-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TCA GTT
GGC CGC TGT ACT GCC AGC C-3'

D-alanyl-D-alanin carboxypeptidase (PBP 5) aus *B. licheniformis* ATCC 14580

vorwärts Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GAA
AAG CAA GAG ATT AAA GCA G-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG TTA AAA
CCA GCC GGT TAC CAT-3'

β -Lactamase aus *B. licheniformis* ATCC 14580

vorwärts Primer: 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CAT GAA
ACA GTC ATT AAA GG-3'

rückwärts Primer: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG CTA TTT
CCG GAC AGC-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/ μ L, 13 ng/ μ L und 6.5 ng/ μ L eingesetzt, um die erfolgreiche Amplifikation des Zielgens zu gewährleisten. Vor Gebrauch wurden die 100 pmol/ μ L Primerlösungen auf 10 pmol/ μ L 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 μ L	10× Pfx Puffer
11.5 μ L	deionisiertes Wasser
1 μ L	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.

Temperatur:	Zeit:
96 °C	1:30 min
Zyklus 4 Wiederholungen:	
94 °C	0:10 min
$T_m - 2$ °C	0:15 min
68 °C	1:00 min pro 1000 Bp
Zyklus 6 Wiederholungen	
94 °C	0:10
$T_m - 2$ °C – 0.2° C/Zyklus	0:15
68 °C	1:00 min pro 1000 Bp
Zyklus 30 Wiederholungen	
96 °C	0:10 min
$T_m - 0.5$ °C	0:15 min
68 °C	1:00 min pro 1000 Bp
68 °C	7:00 min
Ende der Zyklen	
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.

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. Nach kurzer Abkühlzeit wurden 10 µL einer 1 g/L

Ethidiumbromid (EtBr)-Lösung in H₂O_{deion} hinzugesetzt und die noch warme 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 Std durchgeführt. Die DNA-Banden wurden mittels eines IDA Image Documentation & Analysis Systems (raytest GmbH, Deutschland) bei 312 nm visualisiert und bei Auftreten von mehreren PCR-Produkten 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.

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 10000 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 Zentrifugieren bei 13000 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 13000 rpm zentrifugiert. Die Konzentration der Plasmid DNA wurde an einem NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer von peQLab durch Absorptionsmessung bei 260 nm ermittelt.

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 inkloniert. 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 inklonierte 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^[109] umklontiert. 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.

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:

$$m = N \cdot 0.066 \text{ ng} / \text{bp}$$

mit der Länge N des Gens in Bp berechnet. In einer typischen BP Reaktion wurden zu den 100 fmol *attB* PCR Produkt 1 μL 150 ng/ μL pDONRTM201 Vektor (50 fmol) gegeben und mit TE Puffer auf 7 μL Gesamtvolumen ergänzt. Anschließend wurden 2 μL Gateway[®] BP ClonaseTM II Enzym Mix hinzugegeben und nach Mischen die Reaktion für mindestens 3 Std 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.

Transformation des Vektors

Die Transformation des jeweiligen Vektors erfolgte in chemisch kompetente One Shot[®] TOP10 *E. coli* (Invitrogen) Zellen. Zu etwa 50 bis 100 μL auf Eis aufgetauten, chemisch kompetenten One Shot[®] TOP10 Zellen in einem 1.5 mL Eppendorf-Gefäß wurden 5 μL 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 Std bei 37 °C unter Schütteln bei 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB Agarplatten mit 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin ausplattiert. Angewachsene Klone wurden gepickt und für Übernachtskulturen in LB Medium mit 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin überimpft.

Plasmidpräparation

Die Extraktion von Plasmiden (pDONRTM201, pDEST007) für die Sequenzierung und Umklonierungsschritte während der Herstellung rekombinanter Expressionsklone erfolgte mit einem E.Z.N.A.TM 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 9000 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 13000 rpm für 10 min bei RT pelletiert. E.Z.N.A.TM HighBind[®] DNA Minicolumns wurden mit 100 µL *Equilibration Buffer* konditioniert und mit je einem 2 mL *Collection Tube* assembliert bei 13000 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 Zentrifugieren für 1 min bei 13000 rpm wurde der Durchfluss verworfen und 500 µL *Buffer HB* auf die Minicolumn gegeben. Der Durchfluss wurde nach Zentrifugieren bei 13000 rpm für 1 min verworfen und die HighBind[®] DNA Minicolumn zweimal mit je 700 µL *Wash Buffer* gewaschen. Der Durchfluss wurde jeweils nach Zentrifugieren bei 13000 rpm für 1 min verworfen. Um Pufferreste zu entfernen wurde die HighBind[®] DNA Minicolumn für 2 min bei 13000 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 13000 rpm zentrifugiert. Die Konzentration der Plasmid DNA wurde an einem NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer von peQLab durch Absorptionsmessung bei 260 nm ermittelt:

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

Die Validität einiger Klone wurde durch Sequenzierung der Plasmide bestätigt.

LR Klonierung

Für die LR Klonierung wurden 150 ng des pDONRTM201 Vektor mit TE Puffer auf 7 µL gefüllt und 1 µL 150 ng/µL pDEST007 hinzugefügt. Die Umklonierung wurde durch Zugabe von 2 µL Gateway[®] LR ClonaseTM II Enzym Mix gestartet und mindestens 3 Std 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 pDONRTM201 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.

Mutagenese

Rekombinante Proteine

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 $OD_{600} = 0.6$ wachsen gelassen und anschließend die Expression mit 1:10000 Anhydrotetracyclin (Stock 2 mg/mL in DMF) induziert. Die Expression erfolgte in der Regel für 2 Std bei 37 °C.

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 - 1000 PSI unter Kühlung aufgeschlossen. Die cytosolische Fraktion wurde von der Membran und nicht lysierten Zellen durch Zentrifugieren bei 4 °C für 45 min mit 9000 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 Anhang

Tabelle A1: Ergebnisse der Massenspektrometrie der Markierungsexperimente aus Kapitel 2.1.3 und 2.1.4

Species	Protein	Protein ID	Calc. MW (NCBI)	R	max. p Value	max. Xcorr	NP		
<i>P. putida</i>	Membrane Carboxypeptidase (Penicillin-binding protein), PBP(117)	NP_743219	116912	1	$1.4 \cdot 10^{-11}$	4.75	16		
				2	$1.7 \cdot 10^{-14}$	4.60	12		
	Penicillin-binding protein, PBP(89)	NP_747185	89064	1	$2.9 \cdot 10^{-14}$	4.96	16		
				2	$3.7 \cdot 10^{-11}$	4.11	7		
				3	$1.7 \cdot 10^{-14}$	4.19	11		
	Penicillin-binding protein (1b family), PBP(85)	NP_746792	85025	1	$1.6 \cdot 10^{-7}$	3.43	3		
				2	$2.9 \cdot 10^{-12}$	4.28	7		
				3	$1.2 \cdot 10^{-10}$	3.51	2		
	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (penicillin-binding protein 4), PBP4	NP_744248	50668	1	$5.2 \cdot 10^{-7}$	2.91	3		
				2	$3.3 \cdot 10^{-15}$	4.25	8		
				3	$2.8 \cdot 10^{-14}$	5.29	3		
				4	$1.0 \cdot 10^{-30}$	5.76	27		
	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (penicillin-binding protein 5), PBP5	NP_746908	42157	1	$1.0 \cdot 10^{-30}$	5.67	24		
				2	$1.2 \cdot 10^{-9}$	4.65	7		
	Beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III, KAS III Antioxidant, AhpC/Tsa family, AhpC	NP_746654	42195	1	$1.3 \cdot 10^{-14}$	5.19	13		
				NP_743245	21599	1	$7.3 \cdot 10^{-8}$	2.98	2
						2	$5.0 \cdot 10^{-14}$	4.06	3

<i>Listeria welshimeri</i>	Penicillin-binding protein (1a family), PBP(91)	YP_850108	91585	1	$1.5 \cdot 10^{-10}$	4.44	16		
				2	$2.7 \cdot 10^{-12}$	3.58	13		
				3	$1.1 \cdot 10^{-7}$	5.09	11		
	Penicillin-binding protein 2 (PASTA- Domain), PBP2	YP_850250	82046	1	$1.8 \cdot 10^{-9}$	4.65	13		
				2	$1.6 \cdot 10^{-8}$	3.86	7		
				3	$2.1 \cdot 10^{-11}$	4.23	16		
	Penicillin-binding protein, PBP(78)	YP_850443	77693	1	$7.7 \cdot 10^{-12}$	5.37	5		
				2	$6.4 \cdot 10^{-10}$	5.66	7		
				3	$7.2 \cdot 10^{-12}$	4.80	4		
Beta-ketoacyl-ACP synthase III, (KAS III)	YP_850416	33898	1	$8.8 \cdot 10^{-8}$	3.06	4			
			2	$8.6 \cdot 10^{-14}$	3.68	6			
			3	$9.7 \cdot 10^{-9}$	4.28	4			
Lipase/acylhydrolase, Lip/Ac	YP_850078	29499	1	$1.6 \cdot 10^{-7}$	3.80	3			
			ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, ClpP	YP_850614	21474	1	$3.6 \cdot 10^{-10}$	3.25	5
						2	$2.2 \cdot 10^{-8}$	3.20	3
<i>Bacillus Licheniformis</i>	PonA, (Penicillin- binding protein), PBP1A/1B	YP_091940	97682	1	$1.0 \cdot 10^{-10}$	4.28	9		
				2	$1.8 \cdot 10^{-14}$	5.59	29		
				3	$8.9 \cdot 10^{-15}$	5.64	20		
Penicillin-binding protein 3, PBP3	YP_078689	73661	1	$4.4 \cdot 10^{-12}$	4.87	39			
			2	$2.9 \cdot 10^{-12}$	5.59	30			

Penicillin-binding protein (Beta-lactamase), β-Lac	YP_077572	64611	1	$1.2 \cdot 10^{-11}$	4.22	7
			2	$7.0 \cdot 10^{-11}$	4.22	7
			3	$7.5 \cdot 10^{-12}$	5.00	4
			4	$5.8 \cdot 10^{-13}$	5.41	19
D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (Penicillin-binding Protein 5), PBP5	YP_077292	48450	1	$7.8 \cdot 10^{-15}$	5.72	11
			2	$6.4 \cdot 10^{-11}$	4.25	8
DltD, DltD	YP_093589	44511	1	$9.1 \cdot 10^{-9}$	3.86	4
			2	$2.1 \cdot 10^{-9}$	4.45	8
ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, ClpP	YP_093222	21673	1	$1.9 \cdot 10^{-8}$	3.39	2
			2	$5.2 \cdot 10^{-8}$	3.15	2

Tabelle A2: Ergebnisse der Massenspektrometrie der Markierungsexperimente aus Kapitel 2.2.1

Bakterium	Protein	Protein ID	MW (NCBI)	R	min. p	max. Xcorr	NP
SA Mu50	Penicillin binding protein 2 prime	NP_370565	75972	1	$8.9 \cdot 10^{-16}$	5.36	20
				2	$2.1 \cdot 10^{-13}$	4.75	8
				3	$2.4 \cdot 10^{-9}$	3.33	7
				4	$3.6 \cdot 10^{-13}$	4.90	6
	1	$1.0 \cdot 10^{-30}$	4.59	7			
Dipeptidase PepV	NP_372275	52693	2	$6.7 \cdot 10^{-16}$	4.95	8	
			3	$3.6 \cdot 10^{-15}$	5.82	7	

				1	$3.0 \cdot 10^{-11}$	4.19	12
	Serine proteinase D ₀	NP_372252	45672	2	$3.7 \cdot 10^{-7}$	3.44	2
				3	$1.6 \cdot 10^{-10}$	4.18	11
				1	$1.0 \cdot 10^{-12}$	5.29	5
				2	$6.7 \cdot 10^{-10}$	4.51	2
	Carboxyesterase precursor-like protein	NP_371303	28024	3	$1.0 \cdot 10^{-11}$	3.88	2
				4	$2.3 \cdot 10^{-14}$	5.81	3
				5	$6.2 \cdot 10^{-15}$	4.73	6
				1	$2.3 \cdot 10^{-11}$	3.82	4
	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit-like protein	NP_371292	21382	2	$3.3 \cdot 10^{-11}$	3.71	6
				3	$3.7 \cdot 10^{-11}$	3.57	7
				1	$8.0 \cdot 10^{-15}$	5.57	18
				2	$3.1 \cdot 10^{-1}$	5.33	9
	PBP2	NP_371974	80236	3	$3.2 \cdot 10^{-14}$	5.23	5
				4	$1.7 \cdot 10^{-15}$	5.16	20
				1	$1.0 \cdot 10^{-30}$	5.04	6
	3-oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III	NP_371507	33748	2	$1.0 \cdot 10^{-30}$	6.21	6
				3	$1.1 \cdot 10^{-16}$	6.36	7
				1	$4.4 \cdot 10^{-16}$	6.06	9
				2	$1.3 \cdot 10^{-14}$	4.38	4
	hypothetical protein SAV2581	NP_373105	30874	3	$1.1 \cdot 10^{-15}$	5.68	5
				4	$1.0 \cdot 10^{-30}$	5.17	13
EZM, SA Mu50	Chain A, MecR1 Unbound Extracellular Antibiotic-Sensor Domain	2IWB_A	29214	1	$4.2 \cdot 10^{-9}$	4.25	12
				2	$1.1 \cdot 10^{-10}$	3.89	7

				3	$1.6 \cdot 10^{-10}$	3.70	7
				4	$4.5 \cdot 10^{-10}$	3.67	9
				5	$4.5 \cdot 10^{-10}$	3.99	7
				6	$3.1 \cdot 10^{-10}$	4.14	9
				1	$1.0 \cdot 10^{-30}$	6.00	8
SA NCTC 8325	beta-ketoacyl-ACP synthase III	BAD72838	32680	2	$8.9 \cdot 10^{-16}$	6.66	8

Tabelle A3: Ergebnisse der Massenspektrometrie für die Markierungsexperimente Kapitel 2.3.3 und 2.3.4

Bakterium	Protein	Protein ID	MW (NCBI)	R	min. p	max. Xcorr	NP
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> PAO1	Trigger Factor (TF)	Q9I2U2	48582	1	$2.3 \cdot 10^{-9}$	5.57	7
				2	$9.3 \cdot 10^{-11}$	5.58	14
	Dihydrolipoamide dehydrogenase (DLDH)	Q9I3D1	50165	1	$1.8 \cdot 10^{-13}$	5.77	15
				2	$5.4 \cdot 10^{-12}$	5.6	16
<i>Pseudomonas putida</i> KT2446	Trigger Factor (TF)	Q88KJ1	48517	1	$1.1 \cdot 10^{-15}$	6.39	11
				2	$2.2 \cdot 10^{-14}$	5.76	20

<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	Trigger Factor (TF)	Q2SWQ8	49688	1	$4.4 \cdot 10^{-8}$	4.50	4
				2	$6.7 \cdot 10^{-10}$	4.25	9
<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	Trigger Factor (TF)	B4EBM4	49868	1	$2.1 \cdot 10^{-7}$	3.85	5
				2	$5.6 \cdot 10^{-9}$	4.54	8
<i>Staphylococcus aureus</i> Mu50	Dihydrolipoamide dehydrogenase (DLDH)	P0A0E6	49451	1	$2.0 \cdot 10^{-9}$	4.74	16
	UDP-N-acetylglucosamine- 1-carboxyvinyltransferase 2 (MurA2)	P65456	45075	1	$7.7 \cdot 10^{-15}$	4.88	24
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325	Dihydrolipoamide dehydrogenase (DLDH)	Q2G2A3	49481	1	$1.9 \cdot 10^{-11}$	4.76	19
	UDP-N-acetylglucosamine- 1-carboxyvinyltransferase 1 (MurA1)	Q2FWF4	44941	1	$6.7 \cdot 10^{-11}$	4.52	9
	6-Phosphofructokinase, putative (PFK)	Q2FXM8	33397	1	$3.9 \cdot 10^{-10}$	4.62	2
				2	$2.4 \cdot 10^{-9}$	4.87	7

Tabelle A4: Empirische Voraussage Annealingtemperaturen von Primern in °C in Abhängigkeit der Primerlänge und des GC Gehalts^[109]

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

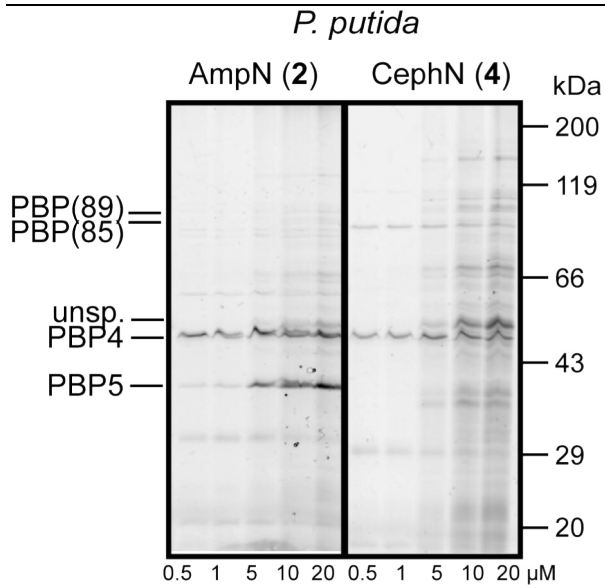


Abbildung A1: Konzentrationsreihe für die *in vitro* Markierung des Lysats von *P. putida* mit den bicyclischen Sonden AmpN (2) und CephN (4). Eine Konzentration der Sonden von 5 μM zur Absättigung der Banden in der Membranfraktion ist ausreichend.

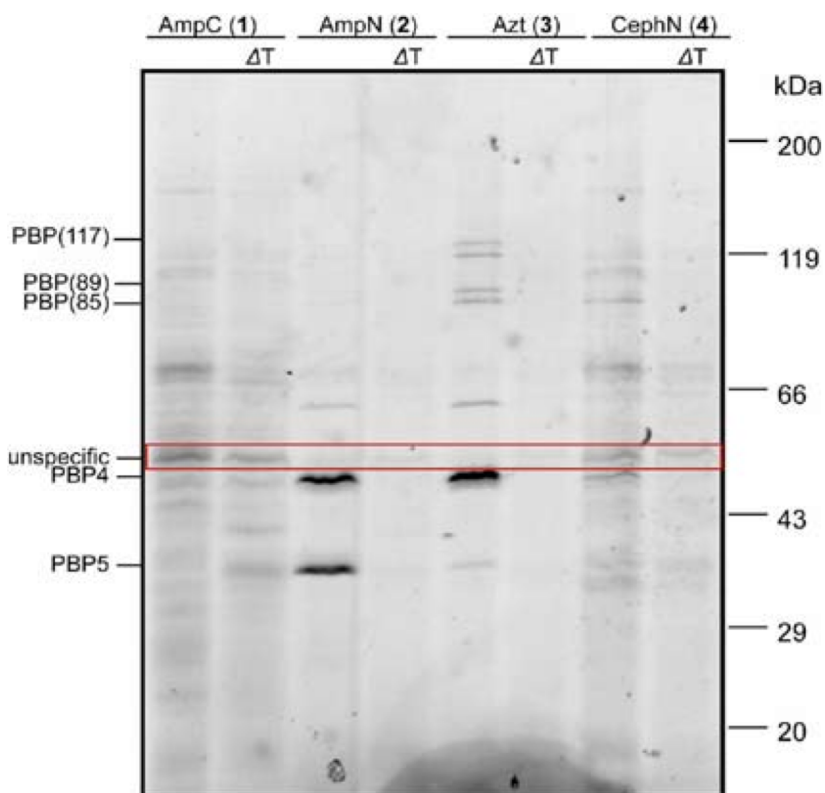


Abbildung A2: Hitzekontrollen der Markierungsereignisse der antibiotischen Sonden (1-4) in der Membranfraktion von *P. putida*. Es erfolgte eine unspezifische Markierung.

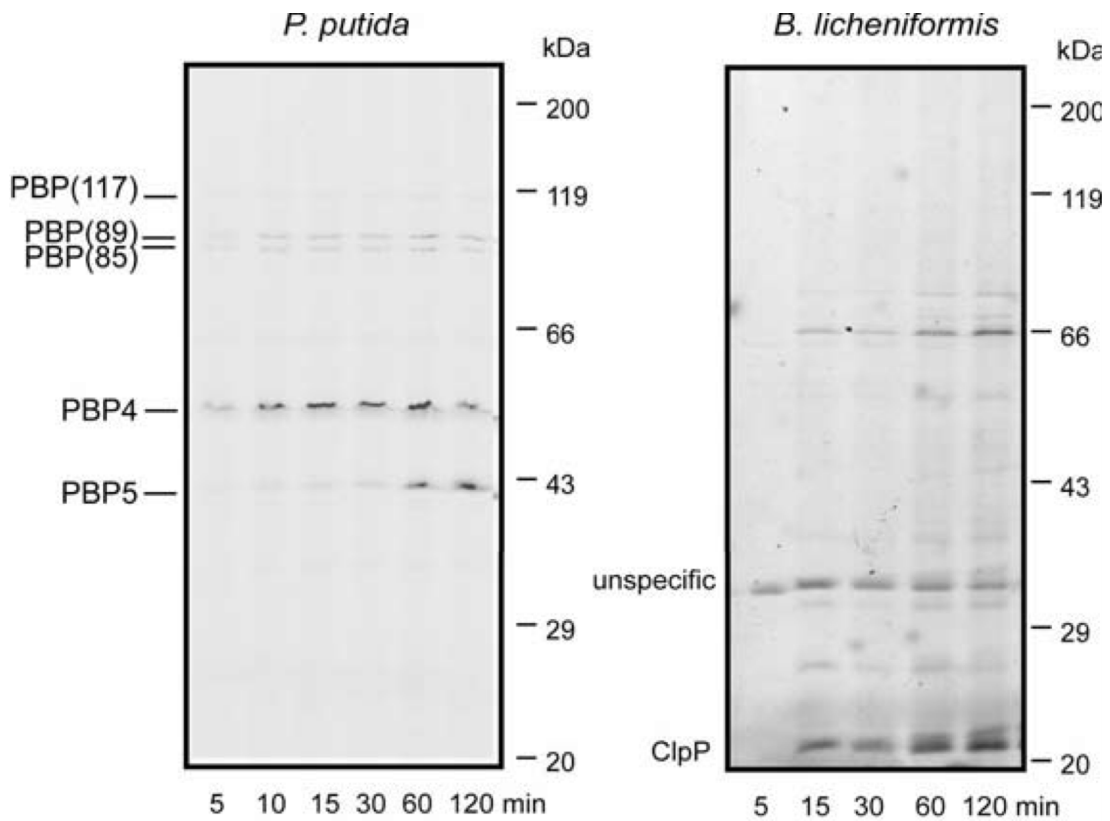


Abbildung A3: Zeitabhängige Analyse zur *in vivo* Markierung von *P. putida* und *B. licheniformis* mit Azt (3) 250 μ M und NCO (16) 20 μ M NCO. Die Intensität verstärkt sich zeitabhängig und erreicht eine Targetabsättigung im Zeitraum zwischen ein und zwei Stunden Inkubationszeit.

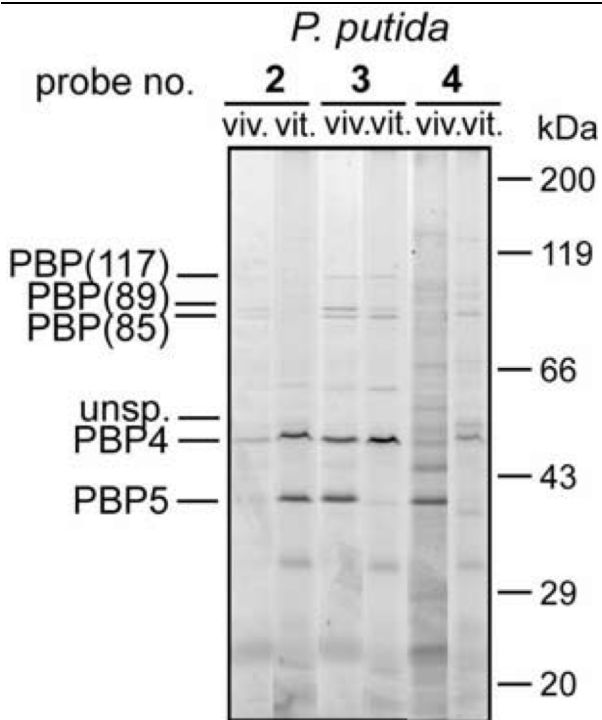


Abbildung A4: Vergleich zwischen den Markierungsereignissen *in vitro* und *in vivo* im Proteom von *P. putida* mit den Sonden AmpN (2), Azt (3), und CephN (4).

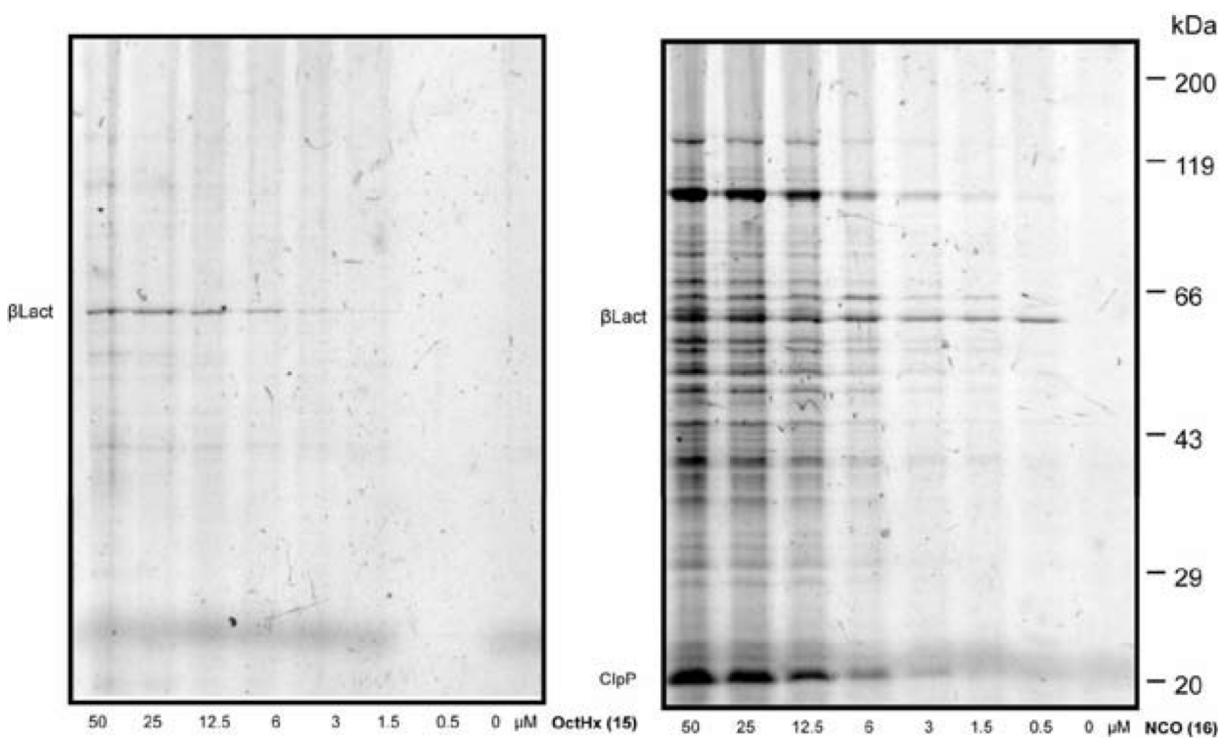


Abbildung A5: Konzentrationsreihe zur Detektion von β -Lact und ClpP im Proteom von *B. Licheniformis* *in vivo* (Inkubationszeit der Sonden 120 min).

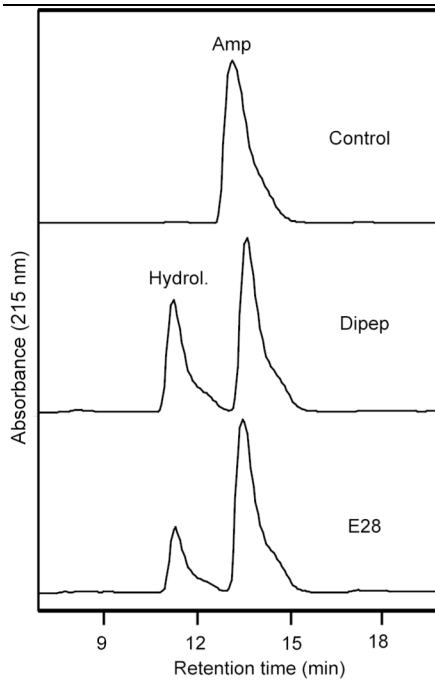


Abbildung A6: HPLC-Chromatogramm nach Inkubation von Ampicillin mit den Enzymen Dipep und E28.

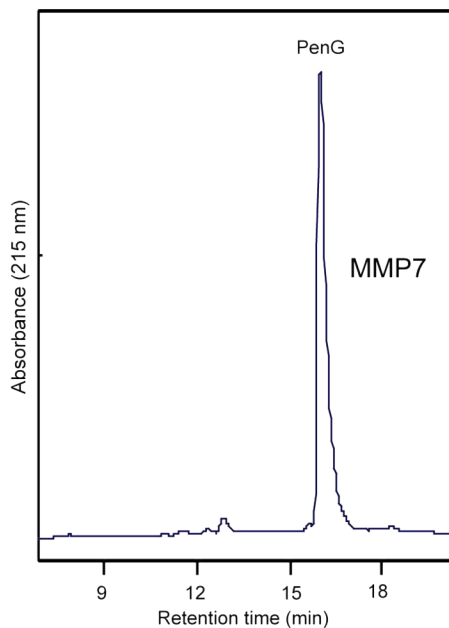


Abbildung A7: HPLC-Chromatogramm nach Inkubation von Penicillin G mit der Matrix Metalloprotease 7 (MMP 7)

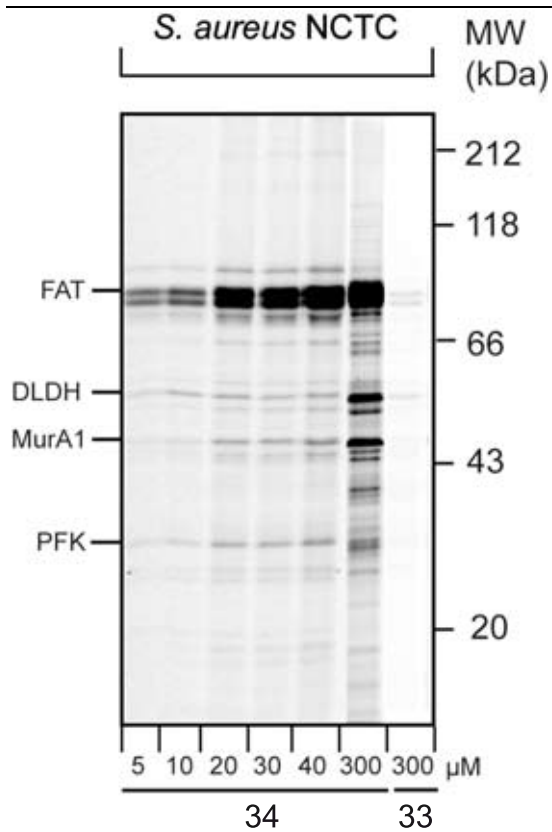


Abbildung A8: Markierung des Proteoms von SA NCTC 8325 durch die Sonde UExL (34).

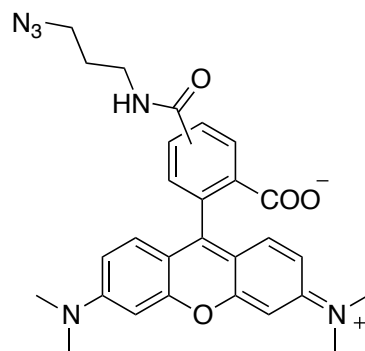


Abbildung A9: Struktur von Rhodaminazid, das als Gemisch zweier Isomeren vorliegt; systematischer Name: 5(6)-(3-Azidopropylcarbamoyl)tetramethylrhodamin ($M = 512.56 \text{ g/mol}$).

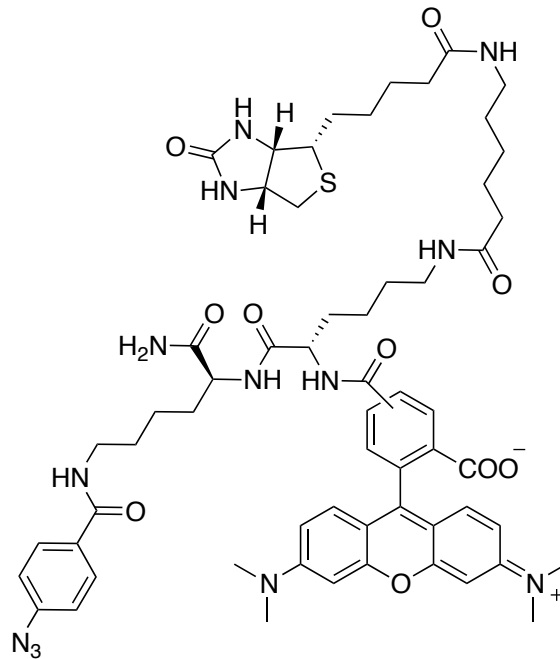


Abbildung A10: Struktur des trifunktionalen Linkers, der als Gemisch zweier Isomeren vorliegt; systematischer Name: 5(6)-(1-[5-(4-Azido-benzoylamino)-1-carbamoyl-pentylcarbamoyl]-5-(6-biotinoylamino-hexanoylamino)-pentylcarbamoyl)-tetramethylrhodamin ($M = 1170.38 \text{ g/mol}$).

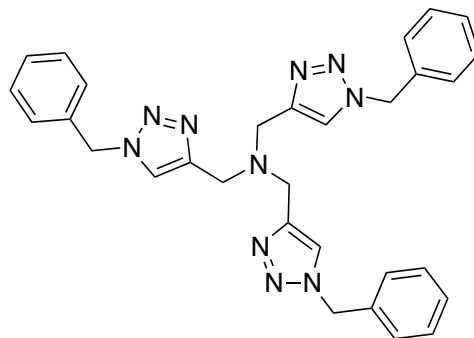


Abbildung A11: Struktur des Liganden für die Click-Chemie; systematischer Name: Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin ($M = 530.63 \text{ g/mol}$).

6 Abkürzungsverzeichnis

ABP	aktivitätsbasierte Sonde
ABPP	funktionelle bzw. aktivitätsbasierte Proteomik
abs	absolut
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BHB	Brain heart broth
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
ber	berechnet
BG	bindende Gruppe
bp	Basenpaare
cyt	Zellplasma (Cytosol)
δ	chemische Verschiebung [ppm]
d	Dublett
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCM	Dichlormethan
DIC	<i>N,N</i> -Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	Äquivalent(e)
ESI	Elektrospray-Ionisation
EtBr	Ethidiumbromid
EtOAc	Essigsäureethylester
FA	Formic acid
gef	gefunden
Glu	Glutaminsäure
GluNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
h	Stunde(n)

HCl	Chlorwasserstoffsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HR	Hochauflösung
Hz	Hertz
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
<i>J</i>	Kopplungskonstante in [Hz]
K ₂ HPO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LB	Lysogeny broth
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>L. welshimeri</i>	<i>Listeria welshimeri</i>
Lys	Lysin
M	mol / L
m/z	Molekülmasse pro Ladung
MALDI	Matrixunterstützte Laser-Desorption/Ionisierung
MeCN	Acetonitril
Mem	Membran
MeOH	Methanol
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
min	Minute(n)
MP	Metalloprotease
MS	Massenspektrum / -spektroskopie
Mur	Murein
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	Kernspinresonanz
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PCR	Polymerase chain reaction
Phe	Phenylalanin
ppm	Teile pro Million
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
Pro	Prolin
PSA	prostata-spezifisches Antigen

RG	reaktive Gruppe
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reportergruppe
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
Std	Stunde(n)
TBAF	Tetra-n-butylammoniumfluorid
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
ToF	Flugzeit-Massenspektroskopie
t_R	Retentionszeit
UV	Ultraviolett

7 Literaturverzeichnis

Literaturangaben, aus denen wörtlich oder fast wörtlich zitiert wurde, sind durch kursive Ziffern kenntlich gemacht.

- [1] R. Suguna, C. Leanne, *Current Medicinal Chemistry* **2004**, *11*, 775.
- [2] P. Imming, *Pharmazie in unserer Zeit* **1989**, *18*, 20.
- [3] Der Kommentar des US Surgeon General W. H. Stewart *Das Buch der Infektionskrankheiten könne nun endlich geschlossen werden* wird in diesem Zusammenhang häufig zitiert.
- [4] *Die Rache der Bakterien*, Dokumentation, Frankreich, **2008**.
- [5] S. Meinert, E. John, *Chemie in unserer Zeit* **2009**, *43*, 296.
- [6] A. E. Clatworthy, E. Pierson, D. T. Hung, *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 541.
- [7] a) M. T. Madigan, J. M. Martinko, J. Parker, *Brock Mikrobiologie*, 1. Ausgabe, Spektrum Akademischer Verlag (Heidelberg, Berlin), **2001**, 1132, 847-848, 853-858; b) E. Reinhard, *Pharmazie in unserer Zeit* **1972**, *1*, 9.
- [8] F. von Nussbaum, M. Brands, B. Hinzen, S. Weigand, D. Häbich, *Angewandte Chemie* **2006**, *118*, 5194.
- [9] M. L. Cohen, *Science* **1992**, *257*, 1050.
- [10] A. Lönnroth, Europäische Kommission, Generaldirektion Forschung, **2001**.
- [11] T. Nordenberg, U. S. Food and Drug Administration, **1998**, 1.
- [12] a) H. C. Neu, *Science* **1992**, *257*, 1064; b) V. Běhal, *Folia Microbiologica* **2006**, *51*, 359; c) C. Walsh, *Nat. Rev. Microbiol.* **2003**, *1*, 65.
- [13] C. Fuda, M. Suvorov, S. B. Vakulenko, S. Mobashery, *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279*, 40802.
- [14] M. R. Barbachyn, C. W. Ford, *Angewandte Chemie International Edition* **2003**, *42*, 2010.
- [15] a) A. Raja, J. LaBonte, J. Lebbos, P. Kirkpatrick, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 943; b) J. D. Alder, *Drugs Today* **2005**, *41*, 81.
- [16] a) E. A. Eady, J. H. Cove, *Current Opinion in Infectious Diseases* **2003**, *16*, 103; b) U. Theuretzbacher, *Chemother. J.* **2004**, *13*, 206.
- [17] D. Knopf, spektrumdirekt, *Proteomik - jetzt beginnt die eigentliche Arbeit*, <http://www.wissenschaft-online.de/artikel/344462&z=859070>, **2000**.
- [18] E. S. Witze, W. M. Old, K. A. Resing, N. G. Ahn, *Nat. Meth.* **2007**, *4*, 798.
- [19] Z. Chang, *Science in China Series C: Life Sciences* **2009**, *52*, 515.
- [20] J. Reinders, A. Sickmann, *Biomolecular Engineering* **2007**, *24*, 169.
- [21] P. G. Sammes, J. B. Tayler, *Comprehensive Medicinal Chemistry*, Vol. 2, Pergamon Press (Oxford), **1990**.
- [22] spektrumdirekt, *Proteinschau im Mausgehirn*, <http://www.wissenschaft-online.de/artikel/588908&z=859070>, **2002**.
- [23] A. Saghatelyan, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 130.
- [24] a) A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 4686; b) M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 3279.
- [25] S. H. Verhelst, M. Bogyo, *Biotechniques* **2005**, *38*, 175.
- [26] a) B. M. Cullen, I. M. Halliday, G. Kay, J. Nelson, B. Walker, *Biochem. J.* **1992**, *283*, 461; b) B. Walker, B. M. Cullen, G. Kay, I. M. Halliday, A. McGinty, J. Nelson, *Biochem. J.* **1992**, *283*, 449.

-
- [27] a) A. S. Abuelyaman, D. Hudig, S. L. Woodard, J. C. Powers, *Bioconjugate Chemistry* **1994**, *5*, 400; b) C. M. Kam, A. S. Abuelyaman, Z. Li, D. Hudig, J. C. Powers, *Bioconjugate Chemistry* **1993**, *4*, 560.
- [28] a) A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 10000; b) S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 274.
- [29] N. M. Green, *Biochem. J.* **1963**, *89*, 585.
- [30] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 3192.
- [31] a) M. P. Patricelli, D. K. Giang, L. M. Stamp, J. J. Burbaum, *Proteomics* **2001**, *1*, 1067; b) Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 14694; c) D. Kidd, Y. Liu, B. F. Cravatt, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4005.
- [32] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotech.* **2002**, *20*, 805.
- [33] a) K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Chemistry & Biology* **2004**, *11*, 1523; b) K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 7408.
- [34] a) E. Weerapana, G. M. Simon, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 405; b) E. J. Moran, S. Sarshar, J. F. Cargill, M. M. Shahbaz, A. Lio, A. M. M. Mjalli, R. W. Armstrong, *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 10787; c) M. Pitscheider, S. A. Sieber, *Chemical Communications* **2009**, 3741.
- [35] a) A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, M. A. Brown, H. Kirschke, C. G. Knight, M. Tamai, K. Hanada, *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189; b) A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, K. Hanada, *Acta. Biol. Med. Ger.* **1981**, *40*, 1513; c) J. T. Palmer, D. Rasnick, J. L. Klaus, D. Bromme, *Journal of Medicinal Chemistry* **1995**, *38*, 3193; d) E. Shaw, *Peptidyl diazomethanes as inhibitors of cysteine and serine proteinases in Methods in Enzymology, Vol. 244*, Academic Press, **1994**, 649; e) E. Shaw, H. Angliker, P. Rauber, B. Walker, P. Wikstrom, *Biomed. Biochim. Acta* **1986**, *45*, 1397; f) D. H. Pliura, B. J. Bonaventura, R. A. Smith, P. J. Coles, A. Krantz, *Biochem. J.* **1992**, *288*, 759; g) M. Fonovic, S. H. L. Verhelst, M. T. Sorum, M. Bogyo, *Molecular & Cellular Proteomics* **2007**, *6*, 1761.
- [36] M. Uttamchandani, J. Wang, J. Li, M. Hu, H. Sun, K. Y. T. Chen, K. Liu, S. Q. Yao, *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 7848.
- [37] T. Böttcher, M. Pitscheider, S. A. Sieber, *Angewandte Chemie* **2010**, *122*, 2740.
- [38] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 41.
- [39] S. Liu, B. Zhou, H. Yang, Y. He, Z.-X. Jiang, S. Kumar, L. Wu, Z.-Y. Zhang, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 8251.
- [40] H. R. Pfändler, R. Knorr, *Organische Chemie* 2, 3. Ausgabe, Verlag UNI-DRUCK (München), **1999**.
- [41] U. Holzgrabe, *Pharmazie in unserer Zeit* **2006**, *35*, 410.
- [42] R. Stahlmann, *Pharmazie in unserer Zeit* **1979**, *8*, 18.
- [43] J. Lessel, *Pharmazie in unserer Zeit* **1996**, *25*, 17.
- [44] R. B. Woodward, *The Chemistry of Penicillin*, Princeton University Press (Princeton), **1949**, 440.
- [45] a) R. M. Sweet, L. F. Dahl, *Journal of the American Chemical Society* **1970**, *92*, 5489; b) R. M. Sweet, H. Flynn, *Cephalosporins and Penicillins*, Academic Press (New York, London), **1972**.
-

-
- [46] a) E. P. Abraham, *Spektrum der Wissenschaft* **1981**, 8, 46; b) H. R. Pfändler, R. Straßer, *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 911.
- [47] P. Heisig, *Pharmazie in unserer Zeit* **2006**, 35, 400.
- [48] W. Vollmer, J.-V. Höltje, *J. Bacteriol.* **2004**, 186, 5978.
- [49] a) J.-M. Ghuysen, *Trends in Microbiology* **1994**, 2, 372; b) H. Labischinski, *Medical Microbiology and Immunology* **1992**, 181, 241.
- [50] H.-D. Höltje, *Pharmazie in unserer Zeit* **1976**, 5, 161.
- [51] J.-V. Höltje, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, 62, 181.
- [52] K. Lewis, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, 64, 503.
- [53] J. Groopman, *The New Yorker*, Zeitungsartikel, **2008**.
- [54] a) T. D. Gootz, *Expert Review of Anti-infective Therapy* **2004**, 2, 317; b) J. F. Fisher, S. O. Meroueh, S. Mobashery, *Chemical Reviews* **2005**, 105, 395; c) T. D. Gootz, *Expert Review of Anti-infective Therapy* **2004**, 2, 317.
- [55] J. Spencer, T. R. Walsh, *Angewandte Chemie* **2006**, 118, 1038.
- [56] V. P. Sandanayaka, A. S. Prashad, *Current Medicinal Chemistry* **2002**, 9, 1145.
- [57] R. G. Micetich, S. M. Salama, S. N. Maiti, A. V. N. Reddy, R. Singh, *Curr. Med. Chem. Anti-Infect. Agents* **2002**, 1, 193.
- [58] U. Theuretzbacher, *Pharmazie in unserer Zeit* **2006**, 35, 416.
- [59] a) G. M. Eliopoulos, K. Bush, *Clinical Infectious Diseases* **2001**, 32, 1085; b) Lahey clinic, <http://www.lahey.org/studies>, **2011**.
- [60] G. A. Jacoby, L. S. Munoz-Price, *New England Journal of Medicine* **2005**, 352, 380.
- [61] A. G. Brown, D. F. Corbett, J. Goodacre, J. B. Harbridge, T. T. Howarth, R. J. Ponsford, I. Stirling, T. J. King, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1984**, 635.
- [62] C. Acuna, X. Rabasseda, *Drugs Today* **2001**, 37, 193.
- [63] C. M. Perry, A. Markham, *Drugs* **1999**, 57, 805.
- [64] R. P. Ambler, *Philos. Trans. R. Soc. London, B* **1980**, 289, 321.
- [65] a) A. Felici, G. Amicosante, A. Oratore, R. Strom, P. Ledent, B. Joris, L. Fanuel, J. M. Frère, *Biochem. J.* **1993**, 291, 151; b) C. Prosperi-Meys, G. Llabres, D. de Seny, R. Paul Soto, M. Hernandez Valladares, N. Laraki, J.-M. Frere, M. Galleni, *FEBS letters* **1999**, 443, 109.
- [66] D. L. Paterson, R. A. Bonomo, *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, 18, 657.
- [67] D. Lim, N. C. J. Strynadka, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2002**, 9, 870.
- [68] H. Z. Zhang, C. J. Hackbarth, K. M. Chansky, H. F. Chambers, *Science* **2001**, 291, 1962.
- [69] R. Breinbauer, I. R. Vetter, H. Waldmann, *Angewandte Chemie* **2002**, 114, 3002.
- [70] R. D. Firm, C. G. Jones, *Natural Product Reports* **2003**, 20, 382.
- [71] B. E. Evans, K. E. Rittle, M. G. Bock, R. M. DiPardo, R. M. Freidinger, W. L. Whitter, G. F. Lundell, D. F. Veber, P. S. Anderson, *Journal of Medicinal Chemistry* **1988**, 31, 2235.
- [72] A. E. Allsop, G. Brooks, G. Bruton, S. Coulton, P. D. Edwards, I. K. Hatton, A. C. Kaura, S. D. McLean, N. D. Pearson, T. C. Smale, R. Southgate, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1995**, 5, 443.
- [73] D. D. Rees, J. D. Brain, M. E. Wohl, J. L. Humes, R. A. Mumford, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1997**, 283, 1201.
- [74] a) D. Kuhn, P. Imming, C. Imming, D. Dettmering, D. Dix, *Pharmazeutische Zeitung online* **1999**; b) R. M. Adlington, J. E. Baldwin, B. Chen, S. L. Cooper, W. McCoull, G. J. Pritchard, T. J. Howe, G. W. Becker, R. B.
-

-
- Hermann, A. M. McNulty, B. L. Neubauer, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1997**, 7, 1689.
- [75] H. Wild, *The Organic Chemistry of β -Lactams*, 1. Ausgabe, VCH (New York), **1993**.
- [76] C. T. Walsh, *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press (Washington DC), **2003**.
- [77] Wikipedia, *Methansulfonylchlorid*,
<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Methansulfonylchlorid&oldid=85473959>, **2011**.
- [78] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, 3. Ausgabe, Spektrum Akademischer Verlag Elsevier GmbH (München), **2004**.
- [79] L. Heinisch, S. Wittmann, T. Stoiber, A. Berg, D. Ankel-Fuchs, U. Möllmann, *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, 45, 3032.
- [80] R. Moreira, A. B. Santana, J. Iley, J. Neres, K. T. Douglas, P. N. Horton, M. B. Hursthouse, *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, 4861.
- [81] L. Banfi, G. Cascio, G. Guanti, E. Manghisi, E. Narisano, R. Riva, *Tetrahedron* **1994**, 50, 11967.
- [82] G. I. Georg, *The Organic Chemistry of β -Lactams*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim/VCH Publishers (New York), **1993**.
- [83] P. Macheboeuf, C. Contreras-Martel, V. Job, O. Dideberg, A. Dessen, *FEMS Microbiology Reviews* **2006**, 30, 673.
- [84] a) T. Böttcher, S. A. Sieber, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, 14400; b) M. W. Thompson, M. R. Maurizi, *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, 18201.
- [85] M. R. Maurizi, M. W. Thompson, S. K. Singh, S.-H. Kim, *Endopeptidase Clp: ATP-dependent Clp protease from Escherichia coli* in *Methods in Enzymology*, Vol. 244, Academic Press, **1994**, 314.
- [86] N. Valkova, F. Lépine, L. Labrie, M. Dupont, R. Beaudet, *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, 12779.
- [87] D. A. Preston, C. Y. Wu, L. C. Blaszczak, D. E. Seitz, N. G. Halligan, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, 34, 718.
- [88] G. Zhao, T. I. Meier, S. D. Kahl, K. R. Gee, L. C. Blaszczak, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 1124.
- [89] Wikipedia, *Staphylococcus aureus*,
http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Staphylococcus_aureus&oldid=87000382, **2011**.
- [90] J. Cha, S. B. Vakulenko, S. Mobashery, *Biochemistry* **2007**, 46, 7822.
- [91] Y. Katayama, H.-Z. Zhang, H. F. Chambers, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 453.
- [92] A. Villegas-Estrada, M. Lee, D. Heseck, S. B. Vakulenko, S. Mobashery, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, 130, 9212.
- [93] a) J. C. Powers, J. L. Asgian, Ö. D. Ekici, K. E. James, *Chemical Reviews* **2002**, 102, 4639; b) R. E. Galardy, *Drugs Future* **1993**, 18, 1109.
- [94] Wikipedia, *Affinität (Biochemie)*,
[http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Affinität_\(Biochemie\)&oldid=65107795](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Affinität_(Biochemie)&oldid=65107795), **2009**.
- [95] a) C. Bebrone, *Biochemical Pharmacology* **2007**, 74, 1686; b) D. J. Zygmunt, C. W. Stratton, D. S. Kernodle, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, 36, 440.
- [96] Wikipedia, *Lactone*,
<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Lactone&oldid=83733621>, **2011**.
-

-
- [97] R. L. Hanson, H. A. Lardy, S. M. Kupchan, *Science* **1970**, 168, 378.
- [98] Wikipedia, *Quorum sensing*,
http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Quorum_sensing&oldid=74247178,
2010.
- [99] Pharmazeutische Zeitung online, *Neue Antibiotika: Bakterien ohne Schutzschild*, <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=29354>,
2009.
- [100] P. H. Boyle, A. P. Davis, K. J. Dempsey, G. D. Hosken, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 2819.
- [101] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, **2001**.
- [102] F. Richter, M. Bauer, C. Perez, Maichle-Mössmer C., M. E. Maier, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, 67, 2474.
- [103] J. Nokami, T. Tamaoka, H. Ogawa, S. Wakabayashi, *Chem. Lett.* **1986**, 15, 541.
- [104] A. W. Smith, H. Roche, M.-C. Trombe, D. E. Briles, A. Håkansson, *Molecular Microbiology* **2002**, 44, 431.
- [105] 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.
- [106] T. Böttcher, *Naturstoffe und ihre Derivate als molekulare Sonden: Identifikation ihrer Angriffsziele und Inhibition der Virulenz in pathogenen Bakterien*, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2009**.
- [107] BIOPRO Baden-Württemberg GmbH, *Chaperon-Forschung mit Bäckerhefe und Bakterien*, <http://www.bio-pro.de/magazin/thema/04228/index.html?lang=de&artikelid=/artikel/04282/index.html>, **2009**.
- [108] P. Proksch, Wissenschaftlicher Beirat der Bundesregierung Globale Umweltveränderungen, Heinrich-Heine-Universität (Düsseldorf), **2004**.
- [109] C. Pieck, *Reparatur und Replikation des Sporen Photoproduktes sowie ortsspezifische Generierung eines CPD bzw. Sporen Photoproduktes in DNA*, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität (München), **2007**.