
Charakterisierung von Wirkmechanismen der peptidischen Naturstoffe Labyrinthopeptin und Cystobactamid

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Jana Richter, geb. Krull, M. Sc.

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Mark Brönstrup
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Lothar Jänsch
Tag der Promotion: 17.12.2021

Abstract

The treatment of infectious diseases caused by either new virus variants or multidrug-resistant bacteria is a huge challenge in modern medicine. The biodiversity of nature provides an enormous reservoir for the discovery of new natural products with biological potential, for example antibiotics, antivirals or anticancer agents. A phenotypical screening method can be used to identify such natural products to treat either bacterial or viral infections. However, the mode of action of those lead structures is still unknown. The characterisation of the mode of action of those molecules can be carried out with a variety of different strategies. Omic studies cover all levels of biomolecules from the transcriptome and proteome to the metabolome including the lipidome and can be used to characterise potential secondary targets, the binding site of a already known primary target or the effect of target abundance on the cellular efficacy. Furthermore, photopharmacology provides the possibility to evaluate the effect of configurational change on the biological activity along with information about structure activity relationship (SAR).

In this study, the mechanisms of action of the two natural products cystobactamid and labyrinthopeptin were characterised by applying different omic strategies. Cystobactamids show antibacterial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria of the ESKAPE-panel. The antibacterial activity occurs by inhibition of gyrase and topoisomerase IV. First of all, cystobactamids with one or two photoswitchable moieties were characterised regarding their kinetic and biological properties. The conformational change from *trans* to *cis* induced a slight increase in biological activity. Furthermore, the resistance mechanisms of the enzymes AlbD and AlbA could be overcome in *trans*-state for GT4-059. By adding a photoaffinity moiety into the cystobactamid, a covalent bond could be introduced between the molecule and gyrase. Proteome based studies of the labeled gyrase were used to map the binding site of cystobactamids to gyrase. Furthermore, affinity based protein profiling was used to identify potential secondary targets of cystobactamids.

Labyrinthopeptin is a potent broad-spectrum antiviral agent, which shows antiviral activity against many enveloped viruses, like dengue virus (DENV), zika virus (ZIKV) and West Nile virus (WNV). The binding of labyrinthopeptin to phosphatidylethanolamine (PE) is the reason for its broad spectrum antiviral activity. In this study, a targeted mass spectrometry-based method was developed to assess the lipidome of purified dengue virus particles. By using different cell lines to propagate DENV, virus particles with different lipid envelopes could be generated. A dose-response assay could show that the activity of labyrinthopeptin depends on the amount of PE in the viral envelope.

keywords: mode of action, natural products, photopharmacology, proteomics, dengue virus, lipidomics.



Zusammenfassung

Immer neu auftretende Virusvarianten oder die Entstehung multiresistenter Bakterien stellen eine enorme Herausforderung in der heutigen Medizin dar. Die Biodiversität der Natur bietet ein großes Reservoir für die Entdeckung neuer Naturstoffe mit biologischem Potential wie antibakteriellen, antiviralen oder antikanzerogenen Eigenschaften. Ein phänotypisches Selektionsverfahren kann zur Identifizierung potentieller Leitstrukturen zur Behandlung von beispielsweise bakteriellen oder viralen Infektionen dienen. Jedoch ist der Wirkmechanismus der identifizierten Leitstrukturen zunächst unbekannt. Die Charakterisierung der Wirkmechanismen kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Strategien durchgeführt werden. “Omics”-Studien reichen von Transkriptom- über Proteom- bis hin zu Metabolom- bzw. Lipidomanalysen und bieten somit eine hervorragende Möglichkeit sekundäre Zielstrukturen und Bindungsstellen an primäre Zielstrukturen zu identifizieren oder den Effekt von Zielstruktur-Abundanz auf die zelluläre Aktivität zu charakterisieren. Darüber hinaus bietet Photopharmakologie die Möglichkeit sowohl die Auswirkung einer Konfigurationsänderung auf die biologische Aktivität zu evaluieren als auch Informationen über die Struktur-Aktivitäts-Beziehung zu gewinnen.

In dieser Arbeit wurden die Wirkmechanismen von Cystobactamiden und Labyrinthopeptinen unter Einsatz verschiedener “Omic”-Strategien charakterisiert. Cystobactamide zeigen antibakterielle Aktivität gegen sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien der ESKAPE-Pathogene. Die antibakterielle Aktivität wird durch die Inhibierung von Gyrase und Topoisomerase IV hervorgerufen. Zunächst wurden Cystobactamide kinetisch und biologisch charakterisiert, die einen oder mehrere sogenannte Photoschalter im Molekül haben. Die Konfigurationsänderung von *trans* nach *cis* resultiert in einem leichten Anstieg der biologischen Aktivität. Zusätzlich konnten die Resistenzmechanismen der Enzyme AlbA und AlbD durch die *trans*-Konfiguration von GT4-059 überwunden werden. Durch den gezielten Einbau einer Photoaffinitätsgruppe konnte das Cystobactamid kovalent an Gyrase gebunden werden. Proteomstudien der gelabelten Gyrase konnten Hinweise auf die mögliche Cystobactamid-Gyrase-Bindungsstelle liefern. Darüber hinaus wurden Proteomstudien eingesetzt, um potenzielle sekundäre Zielstrukturen zu identifizieren.

Labyrinthopeptin ist eine potente antivirale Substanz mit einem breiten Wirkungsspektrum gegen umhüllte Viren, wie Dengue (DENV), Zika (ZIKV) und West-Nil Virus (WNV). Die antivirale Aktivität resultiert aus der Bindung an Phosphatidylethanolamin (PE) in der Virushülle. In dieser Arbeit wurde eine gezielte massenspektrometrische Methode entwickelt, um das Lipidom aufgereinigter DENV zu charakterisieren. Darüber hinaus konnten unter Verwendung verschiedener Zelllinien DENV Partikel mit unterschiedlichem Lipidom generiert werden. In einem konzentrationsabhängigen antiviralen Experiment wurde gezeigt, dass die Labyrinthopeptin-Aktivität von dem PE-Anteil in der Virushülle beeinflusst wird.

Schlagwörter: Wirkmechanismen, Naturstoffe, Photopharmakologie, Proteomstudien, DENV, Lipidomstudien.

Inhaltsverzeichnis

Abstract	I
Zusammenfassung	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XIII
Abkürzungsverzeichnis	XV
1 Einleitung	1
2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Cystobactamid-basierten Sonden	5
2.1 Theoretische Grundlagen	5
2.1.1 DNA-Topoisomerase	5
2.1.1.1 Katalytischer Mechanismus der Gyrase	6
2.1.1.2 Wirkungsorte bekannter Gyrase-Hemmer	8
2.1.2 Albicidin und bekannte Resistenzmechanismen	9
2.1.3 Cystobactamide - Isolierung und Totalsynthese	11
2.1.4 ESKAPE-Pathogene	12
2.1.5 Photopharmakologie - Prinzip und Anwendung	14
2.1.6 Chemische Proteomik	16
2.1.6.1 Aktivitäts-basiertes Protein Profiling (ABPP) versus Affinitäts-basiertes Protein Profiling (AfBPP)	16
2.1.6.2 Photoaffinitätsmarkierung zur Identifizierung der Bindungsstelle	19
2.1.6.3 Klick-Reaktion - Bioorthogonale Ligationschemie	19
2.1.6.4 Quantitative Proteomik	20
2.1.6.5 Techniken der chemischen Proteomik	22
2.2 Zielsetzung	27
2.3 Material und Methoden	28
2.3.1 Chemikalien, Medienzusammensetzung und Bakterienstämme	28
2.3.2 Bestimmung der optischen Dichte (OD)	28
2.3.3 Antimikrobieller Test	29

2.3.4	Enzymatischer Gyrase Test	29
2.3.5	Cystobactamide mit einem Photoschalter	30
2.3.5.1	Kinetische Charakterisierung der Moleküle	31
2.3.5.2	Antimikrobieller Test	34
2.3.5.3	Enzymatischer Gyrase Test	34
2.3.5.4	Enzymatischer AlbD Test	34
2.3.5.5	Enzymatischer AlbA Test	35
2.3.6	Affinitätsanreicherung von potentiellen Zielproteinen in bakteriellem Lysat	35
2.3.6.1	Bestimmung der Wachstumskurven von <i>E. coli</i> BW25113 und <i>S. aureus</i> Newman	35
2.3.6.2	Lysatherstellung	36
2.3.6.3	Inkubation, Klick-Reaktion und Streptavidin-Anreicherung	36
2.3.6.4	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	38
2.3.6.5	Vorbereitung der Proteine nach dem sp3 Protokoll für LC/MS/MS basierte Proteomstudien	39
2.3.6.6	Charakterisierung der Peptide mittels LC/MS/MS Analytik	40
2.3.6.7	Annotation der Peptide mittels PEAKS Xpro und statistische Auswertung mittels Perseus	42
2.3.6.8	Aufreinigung von Pyruvat-Dehydrogenase aus <i>S. aureus</i> Newman und Nachweis enzymatischer Aktivität	42
2.3.6.9	Trypsinverdau von Gelbanden nach Coomassie-Färbung	43
2.3.7	Charakterisierung der Bindungsstelle von Cystobactamiden an Gyrase mittels Photoaffinitätsmarkierung (PAL)	44
2.3.7.1	Inkubation, Bestrahlung und enzymatischer Verdau	44
2.3.7.2	Charakterisierung der Peptide mittels LC/MS/MS	45
2.3.7.3	Annotation der Peptide und Analyse der Daten	45
2.4	Ergebnisse und Diskussion	46
2.4.1	Charakterisierung von Cystobactamiden mit einem Photoschalter im Molekül	46
2.4.1.1	Kinetische Charakterisierung - UV/Vis-Spektren, Aktivierungsenergie und Halbwertszeit	46
2.4.1.2	Biologische Charakterisierung - antibakterielle Aktivität und Resistenzmechanismen	51
2.4.2	Identifizierung sekundärer Zielstrukturen der Cystobactamide	56
2.4.2.1	Bestimmung der Wachstumskurven von <i>E. coli</i> BW25113 und <i>S. aureus</i> Newman	56
2.4.2.2	Validierung der für die spezifische Anreicherung modifizierten Cystobactamide	57
2.4.2.3	Optimierung der Klick-Reaktion	57
2.4.2.4	Massenspektrometrische Proteomstudien mit DK501 auf <i>E. coli</i> BW25113 und <i>S. aureus</i> Newman Lysat	59
2.4.2.5	Validierung potentieller sekundärer Zielstrukturen	64
2.4.3	Charakterisierung der Gyrase-Bindungsstelle von Cystobactamiden unter Verwendung von Photoaffinitätsmarkierung (Photoaffinity Labelling, PAL)	67

2.4.3.1	Vorexperiment: Nachweis der Gyrase Aktivität und der Effektivität der Vernetzung	67
2.4.3.2	Vorexperiment: Ermittlung der charakteristischen Fragmentierungsmuster der Cystobactamide DK501 und DK352	69
2.4.3.3	Photoaffinitätsmarkierung in Kombination mit Proteomstudien zur Charakterisierung der Bindungsstelle	70
2.5	Zusammenfassung und Ausblick	78
3	Lipidome Studien von Dengue Viren	81
3.1	Theoretische Grundlagen	81
3.1.1	Dengue Virus	81
3.1.1.1	Aufbau	82
3.1.1.2	Lebenszyklus	82
3.1.2	Das Lantipeptid Labyrinthopeptin	84
3.1.2.1	Isolierung und Struktur	85
3.1.2.2	Wirkungsspektrum und Wirkmechanismus - Labyrinthopeptin bindet an Phosphatidylethanolamin (PE)	85
3.1.3	Lipidomstudien	86
3.2	Zielsetzung	89
3.3	Material und Methoden	90
3.3.1	Zellkultur - Aussäen, Zellpflege und Aufbewahrung	90
3.3.1.1	Aedes albopictus C6/36	90
3.3.1.2	Vero B4 Zellen	90
3.3.1.3	Huh7.5.1 Zellen	90
3.3.2	Dengue-Virus	91
3.3.3	Viruspropagierung in C6/36 Zellen und Aufreinigung	91
3.3.4	Viruspropagierung in Huh7.5.1 Zellen	91
3.3.5	Western-Blot zur Identifizierung des Dengue E-Proteins	92
3.3.6	Quantifizierung des Virustiters (Plaque Assay)	92
3.3.7	Konzentrationsabhängiger Inhibitionstest	93
3.3.8	Lipidextraktion für massenspektrometrische Analyse	94
3.3.9	Gezielte massenspektrometrische Analyse	94
3.3.10	Globale LC/MS/MS Analyse	96
3.3.10.1	Methode	96
3.3.10.2	Datenanalyse	97
3.4	Ergebnisse und Diskussion	100
3.4.1	Optimierung der Viruspropagierung in Insektenzellen C6/36 und der Virusaufreinigung	100
3.4.2	Gezielte LC/MS/MS basierte Lipidomstudien	103
3.4.2.1	Charakterisierung des Lipidoms von C6/36 Zellen, infizierten C6/36 Zellen und in C6/36 propagierten DENV	103
3.4.2.2	Veränderung des Wirtszelllipidoms zur Propagierung von DENV mit neuer Lipidhülle	107

3.4.2.3	Charakterisierung des Lipidoms von Huh7.5.1 Zellen und darin propagierten DENV	108
3.4.2.4	Vergleich der Lipidome unterschiedlicher Zelllinien und daraus propagierten Viren	113
3.4.3	Globale LC/MS/MS basierte Lipidom-Studien	114
3.4.4	Vergleich der gezielten und globalen Lipidomstudien	115
3.4.5	Einfluss des Phosphatidylethanolamin-Gehalts in der Virushülle von DENV auf die Labyrinthopeptin-Aktivität	116
3.5	Zusammenfassung und Ausblick	119
4	Ausblick	121
	Literaturverzeichnis	123
	Danksagung	147
	Anhang	149
	Agar-Diffusions-Test - Plattenbilder	149
	Photoschalter - Kinetikexperimente: Berechnung der Konzentrationen des photostationären Zustandes aus den gemessenen Absorptionen	149
	Charakterisierung von sekundären Zielstrukturen - Identifizierte Proteine	151
	Charakterisierung von sekundären Zielstrukturen - Reproduzierbarkeit	177
	MS-Spektren den massenspektrometrisch analysierten Gelstücke des aufgerinigten <i>S. aureus</i> Newman Lysats	187
	Modifizierte Peptide der Photoaffinitätsmakrierungs-Experimente mit DK501 und DK352	190
	Massenliste der gezielten massenspektrometrischen Methoden	196
	Identifizierte Lipide - globale massenspektrometrische Analyse	222
	Publikationen	229
	Posterbeiträge	229
	Lebenslauf	231

Abbildungsverzeichnis

1.0.1	Darstellung der chemischen Strukturen der Naturstoffe A) Penicillin und B) Chinin zur Behandlung.	2
1.0.2	Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Identifizierung neuer Zielstrukturen. Links: Phänotypisches Screening und rechts: strukturbasiertes Screening. Abbildung modifiziert nach [20].	2
2.1.1	Darstellung der cryo-elektronenmikroskopischen Struktur der <i>E. coli</i> Gyrase als A ₂ B ₂ -Komplex.	6
2.1.2	Darstellung des Wirkmechanismus von Gyrase.	7
2.1.3	Darstellung des katalytischen Zyklus der Gyrase mit den Wirkungsorten des Quinolons Ciprofloxacin - stabilisiert den Spaltungskomplex - des Coumarins Novobiocin - hemmt ATPase Aktivität - und Simocyclinon - verhindert DNA Bindung.	8
2.1.4	Darstellung der Molekülstruktur von Albicidin.	10
2.1.5	Darstellung des durch AlbD katalysierten Spaltungsmechanismus.	10
2.1.6	Darstellung der Molekülstruktur der Cystobactamide 919-1 (1) und 919-2 (2).	11
2.1.7	Prinzip der Photopharmakologie (hier am Beispiel der Rezeptorinteraktion).	14
2.1.8	Molekülstruktur der Azobenzene und Darstellung der reversiblen Konfigurationsänderung durch UV/Vis. Abbildung modifiziert nach [122,123].	15
2.1.9	Darstellung des Sondendesigns für ABPP und AfBPP Experimente.	17
2.1.10	Prinzip der Photoaffinitätsmarkierung.	18
2.1.11	Prinzip der biorthogonalen Kupfer-katalysierten Klick-Reaktion unter Ausbildung eines 1,2,3-Triazols. Abbildung modifiziert nach [155].	20
2.1.12	Schematische Darstellung des Aufbaus eines TIMS-qTOFPros	24
2.1.13	Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs einer Proteomanalyse von spezifisch angereicherten Proteinen.	25
2.3.1	Links: Darstellung linearisierter DNA vor der Inkubation mit Gyrase. Rechts: Beispiel Gelbild für einen Gyrase Test mit einem Konzentrationsverlauf von 25 μM bis 0,03 μM des Cystobactamids und MiliQ als Negativkontrolle. 1) linearisierte Form der DNA, 2) superspiralisierte Form der DNA.	30
2.3.2	Darstellung der UV/Vis-Spektren eines Cystobactamids mit einem Photoschalter im Grundzustand (Dark) und im angeregten, sogenannten photo-stationären Zustand, nach einstündiger Bestrahlung mit 365 nm (PSS (365 nm)).	31
2.3.3	Darstellung der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k.	32

2.3.4	Darstellung des HPLC Laufs mit UV-Detektor eines Cystobactamids mit Photoschalter im Grundzustand (oben) und im photostationären Zustand (unten).	33
2.3.5	UHPLC-Gradient der mobilen Phase zur Auftrennung der Probenbestandteile zur Charakterisierung der Photoschalter.	33
2.3.6	Gezielte Anreicherung von Proteinen mit Hilfe von Biotin und Streptavidin.	37
2.3.7	Strukturen der verwendeten Reportereinheiten zur spezifischen Anreicherung von Proteinen.	38
2.3.8	Proteinaufarbeitung nach sp3 Protokoll für die LC/MS/MS Analyse.	39
2.3.9	Schematischer Aufbau der Messapparatur für die Proteomanalyse	41
2.4.1	Strukturen und UV/Vis-Spektren der drei Photoschalter.	46
2.4.2	UV-Chromatogramme von GT4-059, GT4-181 und AR446 im Grund- und photostationären Zustand.	47
2.4.3	Beispielhafte Darstellung der Ermittlung der Aktivierungsenergie für GT4-059.	49
2.4.4	Wechselschalten des doppelten Photoschalter AR446 mit 365 nm und 450 nm.	51
2.4.5	Ergebnisse des AlbD-Spaltungsexperiments für je einen N-, C- und doppelten Photoschalter.	53
2.4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse des AlbA Agar-Diffusionsexperiments.	54
2.4.7	Wachstumskurven für <i>E. coli</i> BW25113 und <i>S. aureus</i> Newman in LB-Medium.	56
2.4.8	Darstellung des Konzentrations-abhängigen Wachstums von <i>E. coli</i> BW25113 und <i>S. aureus</i> Newman in Anwesenheit von DK501 und der daraus resultierenden minimalen Hemmkonzentrationen.	57
2.4.9	Extracted Ion Chromatogramme der optimierten Klick-Reaktion für A) DK501 und B) DMSO.	58
2.4.10	Darstellung der Fluoreszenz-Gelbilder spezifisch angereicherter Proteine unter Verwendung eines trifunktionalen Linkers. A) Klick-Reaktion nach Vernetzung im Lysat und B) Inkubation des Lysates mit dem bereits an Biotin geklickten Cystobactamid. Jeweils 1) DMSO <i>E. coli</i> BW25113, 2) DK501 <i>E. coli</i> BW25113 3) DMSO <i>S. aureus</i> Newman und 4) DK501 <i>S. aureus</i> Newman.	59
2.4.11	Darstellung der Volcano-Plot aller LC/MS/MS basierten Proteomstudien mit <i>E. coli</i> BW25113 und <i>S. aureus</i> Newman.	61
2.4.12	Darstellung der Abundanzen der identifizieren Proteine innerhalb eines Experiments (A für <i>E. coli</i> Bw25113 und B für <i>S. aureus</i> Newman) und zwischen den Wiederholungsexperimenten (C für <i>E. coli</i> Bw25113 und D für <i>S. aureus</i> Newman).	63
2.4.13	Darstellung des Gelbildes des aufgereinigten Lysates (A), der enzymatischen Aktivität von PDH ohne Inhibitor (B) und einer tabellarischen Zusammenfassung der Enzymaktivitäten mit steigender Konzentration von DK501 in Doppelbestimmung (C).	64
2.4.14	Darstellung der Gelbilder nach Gesamtproteinfärbung mit Coomassie (links) und durch Fluorophor markierte Proteine (rechts).	65
2.4.15	Ergebnisse des enzymatischen Gyrase Tests.	68
2.4.16	Gelbild: PAL rekombinanter Gyrase	68
2.4.17	Fragmentierungsmuster der Cystobactamids DK501.	69

2.4.18	Fragmentierungsmuster der Cystobactamids DK352.	70
2.4.19	Sequenzabdeckung von GyrA und GyrB nach Verdau mit Trypsin, GluC und Chymotrypsin.	71
2.4.20	Beispielhafte Darstellung der Annotation der verschiedenen Peptide in GyrB nach Trypsinverdau.	72
2.4.21	MS2 Spektrum zur Identifizierung des GyrB Peptids VTVKDAIAADQLFTTlmG-DAV nach Vernetzung mit DK501 und Trypsinverdau.	73
2.4.22	Darstellung der Cryo-EM Struktur von <i>E. coli</i> Gyrase 6rkv (DNA-Bindungs- und spaltungsstelle des A ₂ B ₂ Komplexes) mit den durch DK501 (blau) und DK352 (gelb) modifizierten Peptiden.	76
2.4.23	Darstellung der Cryo-EM Struktur von <i>E. coli</i> Gyrase 6rkw (DNA-Bindungsstelle und ATPase Domäne des A ₂ B ₂ Komplexes) mit den durch DK501 (blau) und DK352 (gelb) modifizierten Peptiden.	77
3.1.1	Darstellung der cyro-Elektronenmikroskopischen Aufnahme eines Dengue Virus Partikels. Abbildung modifiziert nach [227].	82
3.1.2	Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Dengue Viren.	83
3.1.3	Darstellung der Molekülstruktur von A) Labyrinthopeptin A1 und B) Labyrinthopeptin A2. Struktur des Labionin in rot und proteinogene Aminosäuren in grün. Abbildung modifiziert nach Meindl <i>et al.</i> [243].	85
3.1.4	Übersicht über die prominentesten Lipidklassen mit Darstellung der jeweiligen charakteristischen Strukturbausteine.	87
3.3.1	Spektrum des Standards PC d7 aufgenommen durch Direktinjektion an der QTrap von Sciex.	96
3.3.2	UHPLC-Gradient der mobilen Phase während der ungezielten LC/MS/MS Analyse zur Auftrennung der Lipide.	96
3.4.1	Optimierung der Viruspropagierung.	100
3.4.2	SDS-Page der verschiedenen Aufreinigungsschritte der Virussuspension fünf Tage nach Infektion mittels 2-facher Saccharose-Zentrifugation.	102
3.4.3	Balkendiagramm des C6/36 Lipidoms als Übersicht und Heatmap der detaillierten Darstellung aller Lipide.	105
3.4.4	Auftragung der Abundanzen der jeweiligen Lipide in der dazugehörigen Lipidklasse für C6/36 Zellen, infizierte C6/36 Zellen und aus C6/36 Zellen propagierten DENV.	106
3.4.5	Darstellung des Lipidoms von unbehandelten und mit NaCHO behandelten C6/36 Zellen.	107
3.4.6	Darstellung der Lipidzusammensetzung von humanen Leberzellen (Huh7.5.1), infizierten Huh7.5.1 Zellen und daraus propagiertem DENV.	108
3.4.7	Heatmap der Lipidanteile in DENV aus Huh7.5.1 und infizierten Huh7.5.1 im Verhältnis zur nicht-infizierten Wirtszelle.	110
3.4.8	Darstellung des Lipidoms von unbehandelten und mit NaCHO behandelten Huh7.5.1 Zellen.	111

3.4.9	Auftragung der Abundanzen der jeweiligen Lipide in der dazugehörigen Lipidklasse für Huh7.5.1 Zellen, infizierte Huh7.5.1 Zellen und aus Huh7.5.1 Zellen propagierten DENV.	112
3.4.10	Vergleich der Lipidzusammensetzung von C6/36 und Huh7.5.1 Zellen als zwei verschiedene Wirtszellen zur Propagierung von DENV.	113
3.4.11	Darstellung der Ergebnisse der globalen Lipidomstudien - Übersicht.	114
3.4.12	Darstellung der konzentrationsabhängigen Aktivität von Labyrinthopeptin auf DENV propagiert in C6/36 und Huh7.5.1 Zellen.	117
4.0.1	Berechnung der Konzentrationen der cis-Konfiguration aus den gemessenen Absorptionen. A) Absorptionenwerte zu den jeweiligen Zeitpunkten, B) lineare Regression zur Umrechnung der Absorptionen in fiktive Anteile der trans-Konfiguration, C) Berechnung der Konzentration der trans-Konfiguration unter Verwendung der Gleichung in B, daraus erschließt sich die Konzentration des cis-Zustandes zur Berechnung von k.	150
4.0.2	Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für <i>E. coli</i> BW25113 im Lysat 1.178	
4.0.3	Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für <i>E. coli</i> BW25113 im Lysat 2.179	
4.0.4	Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für <i>E. coli</i> BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat 1.	180
4.0.5	Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für <i>E. coli</i> BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat 2.	181
4.0.6	Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für <i>S. aureus</i> Newman im Lysat 1.	182
4.0.7	Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für <i>S. aureus</i> Newman im Lysat 2.	183
4.0.8	Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für <i>S. aureus</i> Newman Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat 1.	184
4.0.9	Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für <i>S. aureus</i> Newman Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat 2.	185
4.0.10	Vergleich der Intensitäten der Wiederholungsversuche der Anreicherungsexperimente. Links oben: <i>E. coli</i> BW25113 im Lysat, rechts oben: <i>S. aureus</i> Newman im Lysat, links unten: <i>E. coli</i> BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat, rechts unten: <i>S. aureus</i> Newman Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat.	186

Tabellenverzeichnis

2.1.1	Übersicht über proteolytische Verdauungsenzyme für die Preotomanalys.	23
2.3.1	Zusammensetzung der verwendeten Kultivierungsmedien.	28
2.3.2	Auflistung der verwendeten Bakterienstämme mit den dazugehörigen Genotypen und Herkünften.	28
2.3.3	Plattenschema für einen antimikrobiellen Test	29
2.3.4	Zusammensetzung des SDS-Ladepuffers (links) und Pipettierschema zur Herstellung eines 10%-igen SDS-Gels der Dicke 1 mm.	38
2.3.5	Einstellung des Massenspektrometers Bruker TimsTOFPro unter Verwendung einer Bruker Methode für Proteomics.	41
2.3.6	Parameter zur Annotation der Proteine unter Verwendung der Software PEAKS XPro.	42
2.3.7	Zusammensetzung der Reaktionsmischung für den Nachweis der PDH-Aktivität.	43
2.4.1	Verteilung der cis und trans-Form im Grund- und photostationären Zustand für die drei Photoschalter GT4-059, GT4-181 und AR446.	47
2.4.2	Zusammenfassung der kinetischen Daten für GT4-059, GT4-181 und AR446.	50
2.4.3	Charakterisierung der antibakteriellen Aktivität von Cystobactamiden mit einem Photoschalter.	51
2.4.4	Peakflächen der Spaltungsprodukte und des ungespalteten Moleküls in Anwesenheit (+ AlbD) und Abwesenheit (- AlbD) von AlbD und jeweils im Grund(- UV) und angeregten Zustand (+ UV).	53
2.4.5	Zusammenfassung der jeweils drei am stärksten signifikant angereicherten Proteinen in allen acht Experimenten.	62
2.4.6	Zusammenfassung der annotierten Proteine der Banden 1-5 aus Abbildung 2.4.14.	66
2.4.7	ppm-Abweichung der detektierten Fragmentmassen im Verhältnis zur exakten Masse.	73
2.4.8	Modifizierte Peptide der PAL Experimente mit DK501.	74
2.4.9	Modifizierte Peptide der PAL Experimente mit DK352.	75
3.3.1	Zusammensetzung des internen Standards SPLASH [®] LIPIDOMIX [®] Mass Spec Standard.	95
3.3.2	Einstellungen des Massenspektrometers Bruker TimsTOFPro unter Verwendung einer Bruker Methode für Lipidomics.	97
3.3.3	Zusammensetzung des Tune-Mix zur initialen Kalibrierung des Massenspektrometers.	98

TABELLENVERZEICHNIS

3.3.4	Gemessene Parameter des Tune-Mix zur Kalibrierung der Ionenmobilität. . . .	98
3.3.5	Verwendete charakteristische Fragmente der einzelnen Lipidklassen für die manuelle Qualitätskontrolle. KG steht für Kopfgruppe und NL für Neutral Loss. . .	99
3.4.1	Übersicht C6/36-Lipidom.	103
3.4.2	Tabellarische Darstellung der Lipidzusammensetzung von humanen Leberzellen (Huh7.5.1), infizierten Huh7.5.1 Zellen und daraus propagiertem DENV.	108

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABPP	Aktivitäts-basiertes Protein-Profilng
ADP	Adenosindiphosphat
AfBPP	Affinitäts-basiertes Protein-Profilng
AMR	engl. antimicrobial resistance
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSL-3	engl. Biosafety Level 3
BTAA	2-(4-((Bis((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)-methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetic acid
bzw	beziehungsweise
C-Protein	Capsid-Protein
CDT	C-terminale Domäne
CHIKV	Chinkungunya Virus
css	engl. Collision Cross Section
CuAAC	Kupfer katalysierte Alkin Azid Cycloaddition
D	Asparaginsäure
DAG	Diradylglycerols
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DENV	Dengue Virus
DMEM	engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. Deoxyribonucleic Acid
DTT	Dithiothreitol
E-Protein	Envelope Protein
ECL	engl. Enhanced chemiluminescence
<i>E. coli</i> BW25113	<i>Escherichia coli</i> BW25113
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	engl. Extracted Ion Correlation
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	Latein <i>exempli gratia</i> , zum Beispiel
FBS	engl. Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

TABELLENVERZEICHNIS

FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GyrA	Gyrase Untereinheit A
GyrB	Gyrase Untereinheit B
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSP70	Hitzeschock Protein 70
Hsp90	Hitzeschock Protein 90
HSV	Herpes-Simplex-Virus
<i>IC₅₀</i>	engl. Inhibitory concentration 50 %
KG	Kopfgruppe
Laby A1	Labyrinthopeptin A1
Laby A2	Labyrinthopeptin A2
LB	engl. Lysogeny Broth
LC	Liquid Chromatographie
LED	Licht emittierende Diode
M-Protein	Membran-Protein
MAG	Monoacylglycerols
MHK	minimale Hemmkonzentration
MiliQ	destilliertes Wasser
MMTS	Methylmethanethosulfonat
MOI	enlg. Multiplicity of Infection
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NL	engl. Neutral Loss
NS	Nichtstrukturprotein
OD	Optische Dichte
PA	engl. Phosphatidic acids
PASEF	engl. Parallel accumulation–serial fragmentation
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholine
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PE	Phosphatidylethanolamine
PFA	para-Formaldehyd
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
ppm	engl. parts per million
PS	Phosphatidylserin
PSS	engl. Photo Stationary State

TABELLENVERZEICHNIS

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLU	engl. Relative Luminescenc Unit
RNA	engl. Ribonucleic acid
RT	engl. retention time
S	Serin
<i>S. aureus</i> Newman	<i>Staphylococcus aureus</i> Newman
SAR	engl. structure activity relationship
SDS	engl. Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-Page	engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SILAC	engl. stable isotope labeling by/with amino acids in cell culture
SM	Sphingomyelin
TAG	Triadylglycerols
TBEV	Tick-borne encephalitis virus
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEAB	engl. Triethylammonium bicarbonate buffer
THPTA	Tris(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl amin
TOF	engl. Time of flight
TIMS	engl. trapped ion mobility spectrometry
UHPLC	engl. Ultra High Performance Liquid Chromatography
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
Vis	Sichtbares Licht
W	Tryptophan
WHO	World Health Organisation
WNV	West Nil Virus
WT	Wildtyp
YFV	Yellow Fever Virus
ZIKV	Zika Virus

Kapitel 1

Einleitung

Die Entstehung immer neuer Virusvarianten, wie die des neuartigen Coronavirus, die die Welt in Atem hält, und das Auftreten multiresistenter Bakterienstämme, die nicht mehr mit handelsüblichen Antibiotika behandelt werden können, stellen eine große Herausforderung für die Medizin dar. Die Entdeckung oder Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung neuartiger Virusvarianten oder antibiotikaresistenten Bakterien steht daher im Fokus der aktuellen Forschung.

Die Natur bietet ein riesiges Reservoir an potentiell biologisch aktiven Substanzen, die entweder als Antibiotikum, antivirale Substanz oder Krebstherapeutikum eingesetzt werden können. Weniger als 10% der gesamten Biodiversität wurden bisher auf ihr biologisch aktives Potential untersucht, daher bildet diese Diversität eine vielversprechende Quelle für neue biologisch aktive Naturstoffe. Die Naturstoffforschung lässt sich bis 2600 Jahre v. Chr. zurückverfolgen, als die ersten Öle aus Pflanzen wie *Cupressus semipervirens* (Zypresse) und *Commiphora* sp. (Myrr) isoliert wurden. Diese Substanzen werden auch heute noch zur Behandlung von Husten, Erkältungen und Entzündungen verwendet [1]. Wie in diesen Beispielen dienten meist Pflanzen als Grundlage für die Gewinnung von biologisch aktiven Naturstoffen, doch auch Pilze, marine Organismen oder Actino- und Myxobakterien bilden vielseitige Reservoirs [2–7]. Beispielsweise wurde aus dem Pilz *Penicillium notatum* der wohl bekannteste Naturstoff Penicillin von Alexander Fleming im Jahre 1929 isoliert [8]. Nicht nur antibakterielle sondern auch antivirale Substanzen wurden bereits erfolgreich aus der Natur gewonnen. Die Entdeckung von Chinin, das im 17. Jahrhundert aus der Chinarinde isoliert wurde, stellte einen großen Fortschritt in der Behandlung von Malaria dar. Im Jahre 2004 wurde Chinin als Malaria-Medikament von der FDA (Food and Drug Administration, USA) zugelassen [9,10]. Die Strukturen dieser beiden Naturstoffe zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen oder Malaria sind in Abbildung 1.0.1 dargestellt.

Neben der reinen Isolierung biologisch aktiver Substanzen bietet die Weiterentwicklung dieser Strukturen mittels chemischer Semi- und Totalsynthese großes Potential, die Eigenschaften der Naturstoffe weiter zu verbessern [12–15]. Ein einfaches und prominentes Beispiel für den Erfolg der Synthese zur Weiterentwicklung von Naturstoffen ist die Synthese der entzündungshemmenden Acetylsalicylsäure, auch bekannt als Aspirin, ausgehend von Salicin einem Naturstoff, der aus der Borke des Weidenbaums *Salix alba* L. isoliert wurde [16]. Die bereits erfolgreiche Isolierung vieler biologisch aktiver Substanzen aus der Natur hebt das Potential der Naturstoffe zur Behandlung bakterieller und viraler Infektionen hervor. Die Identifizierung neuer Leitstrukturen

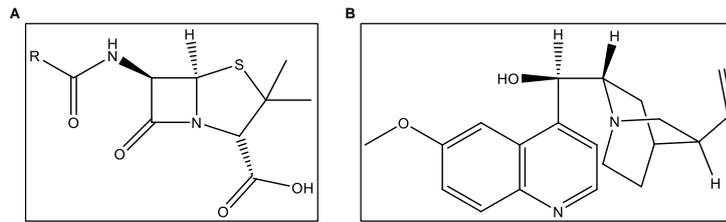


Abbildung 1.0.1: Darstellung der chemischen Strukturen der Naturstoffe A) Penicillin und B) Chinin zur Behandlung von A) bakteriellen Infektionen und B) Malaria [11].

kann dabei auf zwei Wegen durchgeführt werden. Die beiden verschiedenen Herangehensweisen sind schematisch in Abbildung 1.0.2 dargestellt.

Das phänotypische Screening bietet die Möglichkeit zur Identifizierung von Substanzen, die in zellbasierten Experimenten einen bestimmten Phänotypen, wie beispielsweise die Inhibierung bakteriellen Wachstums, hervorrufen. Jedoch ist die Zielstruktur und der zugrundeliegende Wirkmechanismus der jeweils aktiven Substanz unbekannt. Die Zielstruktur und der Wirkmechanismus müssen durch Folgeexperimente identifiziert und validiert werden [17]. Neben dem phänotypischen Screening gibt es die Möglichkeit des strukturbasierten Ansatzes, der auf der Entwicklung selektiver Liganden für ein zuvor definiertes Zielprotein beruht. Das gewählte Zielprotein stellt dabei ein Protein mit biologischer Relevanz in Infektions- bzw. Krankheitsmodellen, wie beispielsweise einer viralen Infektion, dar. Dieser Ansatz findet unter artifizialen Bedingungen statt und birgt vor allem darin seine Schwächen [17]. Meist müssen bei in beiden Ansätzen identifizierten Leitstrukturen erhebliche Modifikationen vorgenommen werden, um die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften anzupassen [18]. Darüber hinaus stellt die Selektivität der Leitstrukturen zu ihren jeweiligen Zielstrukturen ein Problem dar [19]. Aufgrund dieser Nachteile sind phänotypische Screening Methoden in das Interesse der Wissenschaft gerückt, jedoch steht nach wie vor die Identifizierung der Zielstrukturen der Leitstrukturen aus.

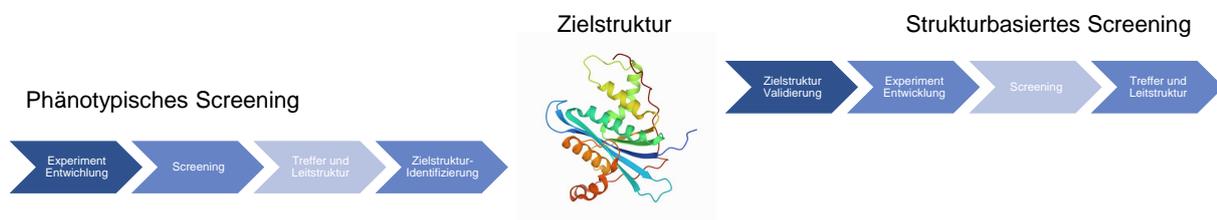


Abbildung 1.0.2: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Identifizierung neuer Zielstrukturen. Links: Phänotypisches Screening und rechts: strukturbasiertes Screening. Abbildung modifiziert nach [20].

Die Identifikation der Zielstruktur ist essentiell für die selektive Weiterentwicklung der Leitstrukturen, jedoch stellt diese eine große Herausforderung dar. Neben rund 20.000 verschiedenen Proteinen, die im humanen Organismus vorkommen [21], können auch Lipide, Kohlenhydrate oder Nukleinsäuren die Zielstruktur einer Leitstruktur darstellen. Der Einsatz modernster "Omic"-Strategien, wie Transkriptom-, Proteom-, Metabolom- oder Lipidomstudien, ermöglicht

die gezielte Identifikation von potentiellen Zielstrukturen [22–24]. Dabei häufig verwendete Methoden umfassen unter anderem i) die Sequenzierung resistenter Klone, um ein potentielles Zielgen mittels Transkriptomstudien zu identifizieren, ii) den Vergleich von Phänotypen zwischen behandelten und unbehandelten Zellen mittels Proteom-, Metabolom- oder Lipidomstudien oder iii) die *in silico* Vorhersage von speziellen Protein-Ligand Interaktionen [24–26].

Diese Dissertation behandelt die biologische Charakterisierung zweier Naturstoffe, dem Antibiotikum Cystobactamid und der antiviralen Substanz Labyrinthopeptin. Der Einsatz verschiedenster “Omic”-Strategien, wie Proteom- und Lipidomstudien, soll zum einen sekundäre Zielstrukturen und die Gyrase-Bindungsstelle der Cystobactamide aufklären und zum anderen soll der Einfluss der Lipidzusammensetzung der Dengue Virushülle auf die Labyrinthopeptin-Aktivität untersucht werden. Darüber hinaus soll der Einsatz von Photopharmakologie Aufschlüsse über die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Cystobactamide liefern.

Aufgrund der Diversität der Substanzen zur Behandlung von zum einen bakteriellen und zum anderen viralen Erregern wurde diese Dissertation in zwei Blöcke mit separater Einleitung und Material- und Methodenteil bzw. Ergebnisteil aufgeteilt. Eine gemeinsame Einleitung und ein gemeinsamer Ausblick bilden den Rahmen um die zwei Blöcke, die sich beide dem Oberthema ‘Wirkmechanismen von Naturstoff-basierten Antiinfektiva’ unterordnen.

Kapitel 2

Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Cystobactamid-basierten Sonden

2.1 Theoretische Grundlagen

2.1.1 DNA-Topoisomerase

DNA-Topoisomerasen sind Enzyme, die Reaktionen katalysieren, die reversible topologische Veränderungen in der DNA herbeiführen [27]. Beispielsweise sind sie in der Lage, die relaxierte und die superspiralisierte Form von DNA ineinander umzuwandeln oder Verkettungen, sogenannte Catenane, oder Knoten einzufügen [28,29]. DNA-Topoisomerasen sind aufgrund ihrer speziellen Funktionsweise essentielle Bestandteile der DNA Replikation, Transkription und Chromosomen-segregation und kommen daher in allen Zelltypen vor [30–32]. Auf Grundlage ihrer essentiellen Eigenschaften und ihres Wirkmechanismus (Abschnitt 2.1.1.1) stellen Topoisomerasen Schlüsselstrukturen für eine Reihe von Antibiotika oder Antikrebs-Medikamenten, dar [33]. Die DNA-Topoisomerasen lassen sich je nach ihrer Wirkungsweise in zwei Klassen unterteilen. Die Klasse I katalysiert Reaktionen, die einen vorübergehenden Bruch in einem der beiden DNA-Stränge hervorruft und bei Klasse II werden Brüche in beiden DNA-Strängen herbeigeführt [34]. Dabei können alle Topoisomerasen superspiralisierte DNA relaxieren, aber nur Gyrase kann auch unter ATP-Hydrolyse negative Superspiralen einführen [35,36]. Gyrase ist nur aktiv als Heterotetramer, der aus zwei verschiedenen Untereinheiten - Gyrase A (GyrA, 97 kDa) und Gyrase B (GyrB, 90 kDa) - besteht und sich als A_2B_2 Komplex zusammensetzt [37,38]. Die in dieser Arbeit verwendete Gyrase ist die am besten erforschte *Escherichia coli* Gyrase, deren dreidimensionale Struktur auf Grundlage von cryo-elektronenmikroskopischen Analysen in Abbildung 2.1.1 dargestellt ist.

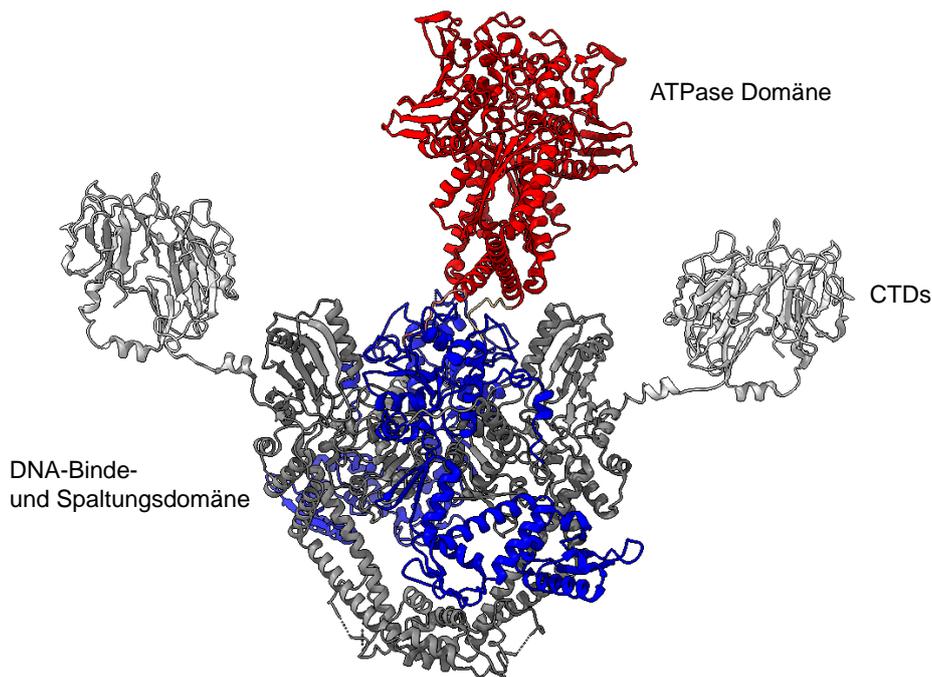


Abbildung 2.1.1: Darstellung der cryo-elektronenmikroskopischen Struktur der *E. coli* Gyrase als A₂B₂-Komplex. Rot: ATPase Domäne der GyrB, blau: DNA Binde- und Spaltungsdomäne der GyrB und grau: DNA Bindungs- und Spaltungsdomäne der GyrA, weiß: C-Terminale Domänen (CTD) der GyrA. Abbildung modifiziert nach [39].

Allgemein bindet die Gyrase A Untereinheit die DNA, und das im aktiven Zentrum vorkommende Tyrosin ist für die Spaltung der DNA verantwortlich (Abb. 2.1.1, grau). Die DNA-Bindung und Führung wird durch die C-terminalen Domänen gesteuert (Abb. 2.1.1, weiß). Die Untereinheit B enthält neben Teilen der DNA-Binde- und Spaltungsdomäne (Abb. 2.1.1, rot) auch das aktive Zentrum der ATPase-Aktivität (Abb. 2.1.1, blau) [39].

2.1.1.1 Katalytischer Mechanismus der Gyrase

Gyrase kommt ausschließlich in Bakterien, Archea und einigen Eukaryoten, wie Pflanzen [40] und plasmodischen Parasiten [41], vor. Der Wirkmechanismus von Gyrase wurde unter Verwendung verschiedenster Techniken aufgeklärt und ist in Abbildung 2.1.2 dargestellt [42].

Der Mechanismus der Gyrase umfasst die Spaltung der doppelsträngigen DNA und die Bildung einer Protein-mediatisierten DNA Öffnung (DNA-Gate), gefolgt von der Einführung eines weiteren DNA Stranges durch das Gate, Ligation des DNA Phosphodiester-Rückrades und Entlassung des DNA Stranges durch das C-Gate (Abb. 2.1.2). Im Folgenden ist dieser Mechanismus im Detail beschrieben.

Im Verlaufe des in Abbildung 2.1.2 dargestellten Mechanismus der Gyrase werden viele Konformationsänderungen im Protein, Bewegungen des DNA-Stranges und Öffnen und Schließen von Gates durchlaufen, die für die Wirkungsweise der Gyrase alle miteinander im Einklang sein müssen. Im ersten Schritt bindet die Gyrase das G-Segment der DNA an der Schnittstelle zwischen

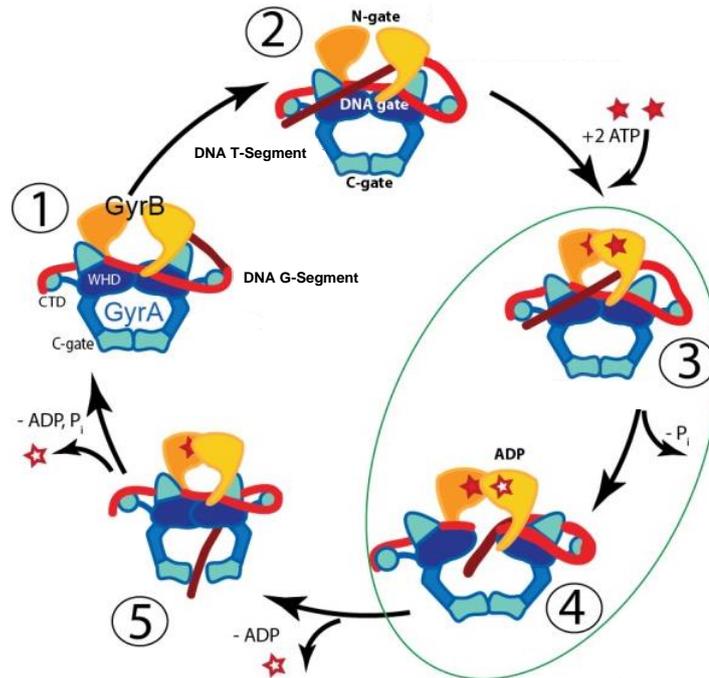


Abbildung 2.1.2: Darstellung des Wirkmechanismus von Gyrase. 1) Gyrase bindet G-Segment der DNA (rot) an der Schnittstelle von GyrA (blau) und GyrB (gelb), Bildung des DNA-Gates und an den CTDs können negative Superspiralen eingeführt werden, 2) DNA Segment wird zum N-Gate zwischen den beiden GyrB Untereinheiten navigiert, Bindung von 2 ATP führt dazu, dass 3) das N-Gate um das T-Segment schließt. In 4) wird das G-Segment durch Tyrosinreste von GyrA unter ATP Verbrauch gespalten und das DNA-Gate geöffnet, dieser Schritt ermöglicht die Wanderung des T-Segments 5) ADP wird abgespalten und das T-Segment entlassen, anschließend kehrt das Molekül unter ATP-Verbrauch wieder in den Ausgangszustand zurück. Abbildung modifiziert nach [42].

den Gyrase A und Gyrase B Untereinheiten und bildet somit das DNA Gate. In diesem Schritt ist die DNA um die C-terminalen Domänen (CTDs) geschlungen. Die CTDs in der DNA-Gyrase sind in der Lage negative Superspiralen in die DNA einzuführen. Im zweiten Schritt navigieren die CTDs das T-Segment der DNA, um in den Bereich zwischen den beiden GyrB Untereinheiten einzutreten. In diesem Bereich formt sich das N-Gate. Nachdem die GyrB Untereinheit zwei ATP Moleküle gebunden hat, schließt sich das N-Gate fest um das T-Segment. Im vierten Schritt wird das G-Segment durch die im aktiven Zentrum der GyrA Untereinheit befindlichen Tyrosine gespalten. Das hat die Bildung eines kovalenten Protein-DNA-Intermediats zur Folge und öffnet das DNA-Gate, um das T-Segment passieren zu lassen. In diesem Schritt wird ein ATP Molekül hydrolysiert und es verbleiben je ein ATP und ein ADP Molekül an der GyrB Untereinheit. Im letzten Schritt schließt das DNA-Gate nachdem das T-Segment es passiert hat, ADP wird abgespalten und das C-Gate öffnet sich, um das T-Segment der DNA zu entlassen. Durch Hydrolyse des zweiten ATPs wird das C-Gate geschlossen und das N-Gate geöffnet. Somit ist das Gyrase Molekül wieder im Grundzustand und bereit für einen weiteren Zyklus [42].

2.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1.1.2 Wirkungsorte bekannter Gyrase-Hemmer

Aufgrund ihrer essentiellen Funktion stellt die Gyrase eine attraktive Zielstruktur für Antibiotika dar [33]. Für die Inhibierung der Gyrase sind hauptsächlich zwei Mechanismen verantwortlich - zum einen die Inhibierung der enzymatischen Aktivität der Gyrase, sogenannte katalytische Inhibitoren und zum anderen die Stabilisierung des kovalenten Enzym-DNA-Komplexes, sogenannter Gyrase Gifte. Novobiocin stellt dabei einen katalytischen Inhibitor dar, indem es wie in Abbildung 2.1.3 dargestellt die ATPase Aktivität der Gyrase hemmt. Ein Beispiel für ein Gyrase Gift stellt Ciprofloxacin dar, das den Spaltungskomplex (Abb. 2.1.3) stabilisiert. Der Wirkmechanismus der Stabilisierung des Spaltungsproduktes wird als am effektivsten betrachtet [43,44].

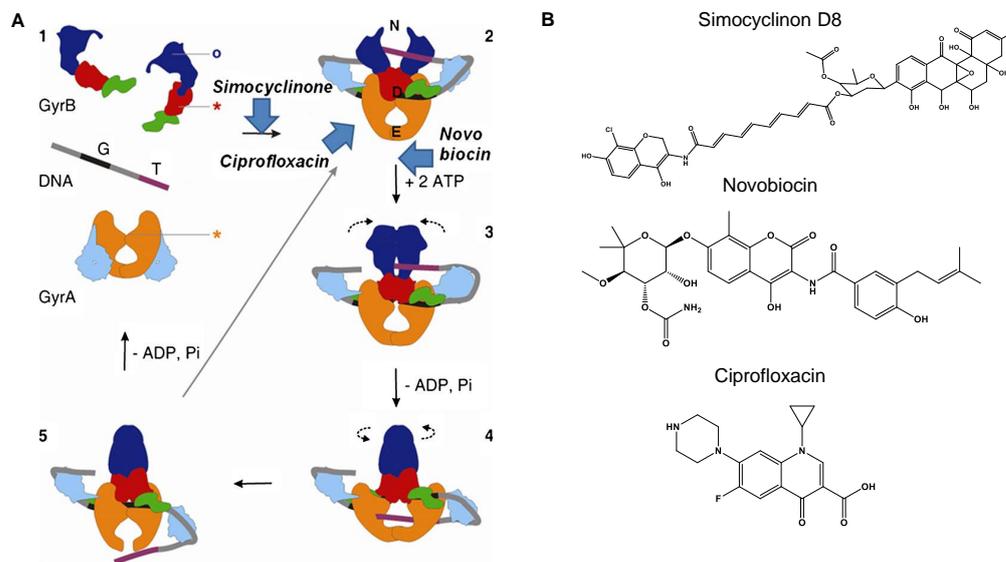


Abbildung 2.1.3: Darstellung des katalytischen Zyklus der Gyrase mit den Wirkungsorten der Gyrasehemmer. A) Darstellung der Wirkungsorte der Gyrasehemmer im katalytischen Zyklus der Gyrase, B) Molekülstrukturen von Simocyclinon D8, Novobiocin und Ciprofloxacin. Abbildung modifiziert nach [45].

Ciprofloxacin gehört der Molekülklasse der Quinolone an, die bei weitem die erfolgreichsten Gyrase-Hemmer darstellen. Die Quinolone lassen sich auf Nalidixinsäure, ein Naphthyridon, zurückführen, das durch Zufall als Nebenprodukt der Chloroquin-Synthese entdeckt wurde [46]. Die erste Generation der Quinolone zeigte nur eine relativ schwache antimikrobielle Aktivität, doch durch die Synthese von Fluorquinolonen und Verbesserung über mehrere Generationen konnten beispielsweise Substanzen, wie Norfloxacin und Ciprofloxacin (zweite Generation), Levofloxacin (dritte Generation) und Gemifloxacin (vierte Generation) entwickelt werden. Diese stellen alle potente Gyrase-Hemmer dar, die über klinische Studien die kommerzielle Anwendung erreicht haben [47–49]. Obwohl für Quinolone die primäre Zielstruktur in Gram-negativen Bakterien die Gyrase darstellt, kann in Gram-positiven Bakterien bevorzugt Topoisomerase IV gehemmt werden [50].

2.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Eine weitere Molekülklasse der Gyrase-Hemmer stellen die Aminocoumarine, wie das in Abbildung 2.1.3 dargestellte Molekül Novobiocin, dar. Coumarine sind Moleküle mit einem 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarin Ring. Novobiocin stellt dabei einen Naturstoff dar, der aus *Streptomyces* Spezies isoliert wurde. Auch wenn es sich bei Novobiocin um einen Naturstoff handelt, wurden diese Moleküle mittels genetischer Manipulation, "Metabolic Engineering" oder chemischer Synthese weiterentwickelt [51,52]. Novobiocin und daraus entstandene Derivate gehören zu den klassischen Aminocoumarinen und hemmen die ATPase Aktivität der Gyrase [53]. Darüber hinaus konnte Simocyclinon D8 aus *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 isoliert werden und weist zusätzlich zu der Aminocoumarin Untereinheit eine Angucyclinone Polyketid Gruppe auf [54], die die Bindung der DNA hemmen [55,56]. Im Gegensatz zu den Quinolonen zeigen Coumarine keine großen klinischen Erfolge, da unter anderem Simocyclinone zytotoxische Eigenschaften aufweisen [54,57,58].

Neben diesen beiden Hauptklassen der Gyrase-Hemmer gibt es auch weitere Naturstoffe, wie unter anderem Cyclothialidins (Inhibierung der ATPase Aktivität) [59–61] und Albicidin (Stabilisierung des Spaltungskomplexes) [62]. Darüber hinaus wurden mehrere synthetische Gyrase-Hemmer, wie GSK 299423 [63], Zoliflodacin [64] und duale ATP-kompetitive Inhibitoren von Tomašič *et al.* [65] entwickelt. Der Wirkmechanismus von Albicidin und potentielle Resistenzmechanismen sind im folgenden Abschnitt detailliert beschrieben.

2.1.2 Albicidin und bekannte Resistenzmechanismen

Albicidin ist ein Naturstoff, der aus dem pathogenen Bakterium *Xanthomonas albilineans*, das bei der Zuckerrohrpflanze sogenannte Blattstreifigkeit und das Ausbleichen der Blätter und damit Ernteaufwände verursachen kann [66], isoliert wurde. Das Ausbleichen der Blätter bildet Grundlage für die Namensgebung von Albicidin. Bereits in nanomolaren Konzentrationen zeigt Albicidin antibakterielle Aktivität gegen sowohl Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien. Die antibakterielle Aktivität resultiert aus der Inhibierung von Gyrase. Genauer gesagt stabilisiert Albicidin ähnlich, wie die Quinolone, den DNA-Gyrase-Spaltungskomplex [67]. Aufgrund der sehr geringen Expressionsmengen in dem natürlichen Produzenten *X. albilineans* hat die Aufklärung der Molekülstruktur 30 Jahre in Anspruch genommen [68]. Letztendlich gelang die Aufklärung der Struktur unter Verwendung eines heterologen Expressionsorganismus [69]. Die dabei mittels Massen- und Kernspinresonanz-Spektroskopie von Cociancich *et al.* identifizierte Struktur des Albicidins ist in Abbildung 2.1.4 dargestellt [68].

Die Struktur des Albicidins stellt ein Acylpentapeptid dar, das sich aus sechs Bausteinen zusammensetzt. Die am N-Terminus befindliche *para*-Hydroxycumarinsäure (A) weist zusätzlich in Position 2 des Michael-Akzeptorsystems eine Methylgruppe auf. Zwei aromatische *para*-Aminobenzoensäuren (B) und (D) bilden das Zentrum des Moleküls und sind über die Aminosäure β -L-Cyanoalanin (C) miteinander verbunden. Das am C-Terminus befindliche Dipeptid setzt sich aus zwei 4-Amino-2-hydroxy-3-methoxybenzoensäuren (E und F) zusammen [68]. Aufgrund der in *X. albilineans* nur sehr geringen exprimierten Konzentrationen des Albicidins haben Kretz *et al.* eine Totalsynthese mittels retrosynthetischer Zerlegung aus drei Grundbausteinen etabliert [14].

2.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

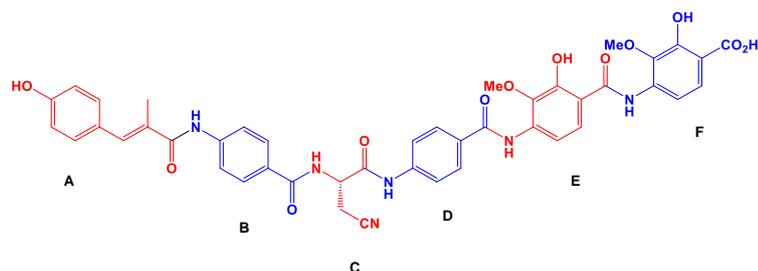


Abbildung 2.1.4: Darstellung der Molekülstruktur von Albicidin unter Markierung der einzelnen Bausteine A) *para*-Hydroxycumarinsäure, B und D) *para*-Aminobenzoesäuren, C) Aminosäure, β-*L*-Cyanoalanin, E und F) 4-Amino-2-hydroxy-3-methoxybenzoesäuren. Abbildung modifiziert nach [68].

Trotz seiner exzellenten antibakteriellen Eigenschaften haben manche Bakterien bereits Resistenzen gegenüber Albicidin ausgebildet. Beispielsweise produziert das Gram-negative Enterobakterium *Pantoea dispersa* ein Enzym mit dem Namen AlbD, das in der Lage ist, die toxische Aktivität des Albicidins gegenüber Zuckerrohrpflanzen aufzuheben und damit die Pathogenität des *X. albilineans* aufzuheben [70–72]. Nach der Etablierung der Totalsynthese von Albicidin ist es Vieweg *et al.* gelungen den Mechanismus hinter der Inaktivierung durch AlbD aufzuklären. Das Enzym AlbD wurde dafür rekombinant exprimiert und anschließend mit dem Albicidin inkubiert. Ein Agar-Diffusionsexperiment konnte die Inaktivierung der antibiotischen Aktivität in Anwesenheit von AlbD zeigen und massenspektrometrische Analysen demonstrierten die durch AlbD katalysierte Spaltung des Albicidins [73]. Die Spaltungsstelle und die dabei entstehenden Spaltungsprodukte sind in Abbildung 2.1.5 dargestellt.

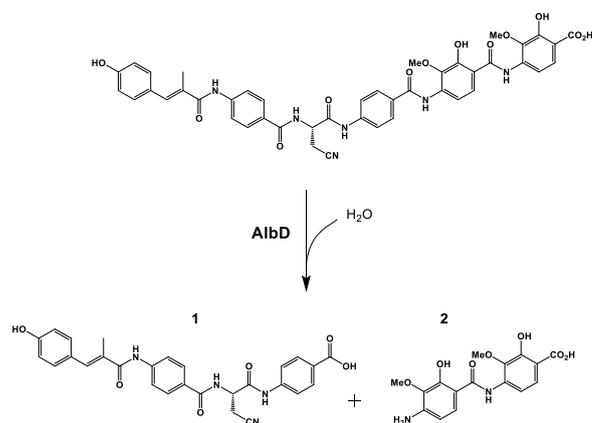


Abbildung 2.1.5: Darstellung des durch AlbD katalysierten Spaltungsmechanismus. Die dabei entstehenden Fragmente 1 und 2 mit den Fragmentmassen 512,2 g/mol für 1 und 348,1 g/mol für 2. Abbildung modifiziert nach [73].

2.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Die Spaltungsfragmente zeigen beide keine antibakterielle Aktivität. Durch die AlbD katalysierte Spaltung des Albicidins konnte somit die antibiotische Aktivität aufgehoben werden [73].

Auch das Gram-negative Bakterium *Klebsiella oxytoca* hat einen Mechanismus entwickelt Albicidin zu inaktivieren. Die Inaktivierung erfolgt in diesem Fall nicht durch Spaltung des Moleküls, sondern durch nicht-kovalentes Binden an das Protein Alba [74]. Auch wenn es sich um eine nicht-kovalente Bindung handelt, liegen die Bindungsaffinitäten jedoch im niedrigen nanomolaren Bereich [75]. Sikandar *et al.* haben die hoch-auflösende Kristallstruktur und den Wirkmechanismus von Alba aufgeklärt. Die Kristallstruktur des Co-Kristalls aus Alba und Albicidin zeigt, dass das Albicidin komplett von Alba umschlossen ist. Die zentrale Aminosäure des Albicidins, das Cyanoalanin, zyklisiert und bildet einen Fünfring. Darüber hinaus konnten starke hydrophobe Wechselwirkungen und die Ausbildung von Wasserstoff- und Salzbrücken an den Seitenketten beobachtet werden [76]. Durch die Bindung des Albicidins wird dessen antibakterielle Aktivität neutralisiert [75].

2.1.3 Cystobactamide - Isolierung und Totalsynthese

Durch immer stärkere Ausbildung von Resistenzen pathogener Bakterien gegen bereits zugelassene Antibiotika rückt die Notwendigkeit der Entdeckung und Weiterentwicklung neuer Antibiotika weiter in den Fokus der Forschung. Vor allem die Behandlung von Gram-negativen Bakterien, die eine zusätzliche Membran aufweisen, stellt eine besondere Herausforderung dar [77]. Aber auch antibiotikaresistente Gram-positive Bakterien, wie Methicillin Resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), sind eine große Bedrohung [78]. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem neuartigen Antibiotikum Cystobactamid, das antibakterielle Aktivität gegen einen Großteil der Mitglieder der ESKAPE-Pathogene, inklusive Gram-negative Bakterien, aufweist [79].

Die ersten Cystobactamide 919-1 und 919-2 wurden aus *Cystobacter* sp. Cbv34 isoliert. Die Strukturen dieser beiden Kandidaten, die mittels Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie aufgeklärt wurden, sind in Abbildung 2.1.6 dargestellt.

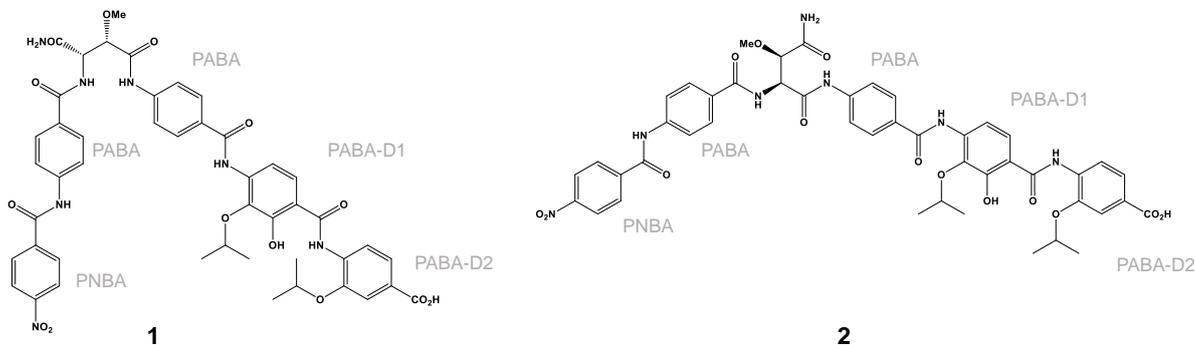


Abbildung 2.1.6: Darstellung der Molekülstruktur der Cystobactamide 919-1 (1) und 919-2 (2). Abbildung modifiziert nach [79].

Beide Cystobactamide bestehen, wie auch das Albicidin, aus fünf aromatischen Einheiten, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Bei den aromatischen Untereinheiten handelt es sich jeweils um eine N-terminale *para*-Nitrobenzoesäure (PNBA), zwei *para*-Aminobenzoensäuren

(PABA) und zwei derivatisierte PABA mit variierenden Oxidationsmustern (PABA-D1 und PABA-D2). Die beiden PABA-Untereinheiten sind bei 919-1 über ein Iso- β -methoxyasparagin und bei 919-2 über ein β -Methoxyasparagin miteinander verknüpft. Die Entdeckung der Cystobactamide erfolgte zeitgleich mit der der strukturell verwandten Albicidine (Abschnitt 2.1.1.2) [14, 79].

Die Analyse der antibakteriellen Aktivitäten durch Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) ergab speziell für 919-2 herausragende Aktivitäten gegen vier der fünf getesteten Stämme der ESKAPE Pathogene - *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* - mit MHK-Werten von 0,1 bis 0,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Diese Aktivitäten sind vergleichbar oder sogar teils besser als die von Ciprofloxacin. Lediglich die Aktivität gegenüber *Acinetobacter baumannii* mit einer MHK von 7,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ist noch verbesserungswürdig. Die ausbleibende zytotoxische Wirkung der Cystobactamide bis Konzentrationen von 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ist neben der antibakteriellen Aktivität ein weiteres vielversprechendes Merkmal. Baumann *et al.* konnten zeigen, dass die antibakterielle Aktivität der Cystobactamide aus der Hemmung der Gyrase oder Topoisomerase IV, mit IC_{50} -Werten für 919-2 von 0,26 μM bei Gyrase und 38 μM bei Topoisomerase IV, resultiert. Um die Interaktion der Cystobactamide mit Gyrase genauer zu betrachten wurden die MHK auf *E. coli*-Stämmen bestimmt, die eine für Quinolon-Resistenz bekannte GyrA Mutation in S83W aufweisen. In diesem Fall führt eine Mutation im Serin an der Stelle 83 in der Gyrase A Untereinheit zu einem Tryptophan zur Quinolon-Resistenz [80]. Bei dem *E. coli*-Stamm mit an dieser Stelle mutierter Gyrase A Untereinheit wurde eine Reduktion der antibakteriellen Aktivität von 919-2 um das 2-7 fache festgestellt. Dieses Phänomen lässt eine zu den Quinolonen überlappende aber nicht identische Bindestelle der Cystobactamide mit Gyrase vermuten [79].

Mittels Fermentation konnten viele weitere natürlich modifizierte Cystobactamide isoliert werden. Unter anderem das Cystobactamid 861-2, das eine noch stärkere antibakterielle Aktivität aufweist als das ursprüngliche 919-2. Der limitierende Faktor in der Fermentation ist die Zugänglichkeit der Naturstoffe. Um diesen Engpass zu umgehen und die Moleküle weiter zu modifizieren haben Hüttel und Testolin *et al.* eine Totalsynthese entwickelt. Dafür wurde 861-2 auf Grundlage retrosynthetischer Analysen in drei Fragmente zerlegt und in mehreren Schritten synthetisiert [15]. Darüber hinaus haben Testolin *et al.* die Molekülstruktur modifiziert, um noch bessere antibakterielle Eigenschaften gegen weitere Mitglieder der ESKAPE-Pathogene und multi-resistente Keime zu generieren [81].

2.1.4 ESKAPE-Pathogene

Die parallele Entstehung multi-resistenter Bakterien, die Resistenzen gegen mindestens drei Antibiotikaklassen aufweisen, und der Rückgang der Entwicklung neuer Antibiotika stellen einen beängstigenden Trend in der Bekämpfung bakterieller Infektionen dar [82,83]. Aus diesem Grund hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) antimikrobiell resistente (AMR) Pathogene als Bedrohung für die humane Gesundheit klassifiziert [84]. Diese AMR-Pathogene können als ESKAPE-Pathogene, gegen die die Entwicklung neuartiger Antibiotika besonders im Fokus steht, zusammengefasst werden. Die Buchstaben in ESKAPE stehen dabei für *Enterococcus faecium*, *Sta-*

2.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

phyllococcus aureus, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter* Spezies [78]. Unter den von ESKAPE Pathogenen ausgebildeten Antibiotika-Resistenzen sind unter anderem Resistenzen gegen Tetrazyklin, Fluoroquinolone und β -Lactam-Antibiotika [85,86].

In dieser Arbeit wurde *Escherichia coli* BW25113 (*E. coli* BW25113) als Gram-negatives Pathogen und *Staphylococcus aureus* Newman (*S. aureus* Newman) als Gram-positives Pathogen der ESKAPE-Pathogene genauer betrachtet. Im Folgenden sind die Eigenschaften der beiden hier verwendeten Pathogene genauer beschrieben.

Escherichia coli ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes, nicht-sporenbildendes Bakterium. Die systematische Einordnung von *E. coli* erfolgt in die Gattung *Escherichia*, die zu der Familie der Enterobakterien gehört und demnach einen Bestandteil der ESKAPE-Pathogene bildet. Die Benennung von *E. coli* erfolgte nach dem deutschen Kinderarzt Theodor Escherich, der diese Bakterien als erster beschrieb. Die 1 bis 2 μm großen stäbchenförmigen Bakterien besitzen Flagellen, mit denen sie sich in ihrem natürlichen Habitat dem Dünndarm und Dickdarm aktiv fortbewegen können [87–89]. Aufgrund der meist geringen Sauerstoffkonzentrationen im Darm kann *E. coli* neben Sauerstoff als Elektronenakzeptor auch Nitrat, Fumarat und Dimethylsulfoxid (DMSO) verwenden. Diese Eigenschaft wird auch als chemoorganotroph bezeichnet [90,91]. Unter normalen Umständen können die im Darm angesiedelten Bakterien friedlich mit dem menschlichen Wirt co-existieren. Wenn es jedoch zu einer Schwächung des Immunsystems kommt, können auch durch diese *E. coli*-Stämme Erkrankungen ausgelöst werden [92]. Neben den natürlich im Darm vorkommenden *E. coli*-Stämmen gibt es jedoch auch pathogene Stämme, wie beispielsweise enteropathogene oder enterohämorrhagische *E. coli*-Stämme, die bei einer Infektion des Menschen zu Diarrhö, Blasenentzündung oder Sepsis bzw. Meningitis führen können [93,94]. Der in dieser Arbeit verwendete Stamm *E. coli* BW25113 ist ein Derivat von *E. coli* K12 und damit ein nicht-infektiöser, weitverbreiteter Laborstamm, der im Labor von Barry L. Wanner entwickelt wurde [95].

Staphylococcus aureus wurde als Beispielorganismus für ein Gram-positives Bakterium der ESKAPE-Pathogene verwendet. Die kugelförmigen Bakterien wachsen meist in Traubenform und sind nicht in der Lage sich aktiv fortzubewegen. Ähnlich wie *E. coli* bildet auch *S. aureus* keine Sporen und kann chemoorganotroph wachsen. Systematisch lassen sich die 0,8 bis 1,2 μm großen Bakterien der Gattung *Staphylokokken* in die Familie der *Staphylococcaceae* einordnen. *S. aureus* kommt weit verbreitet in vielen Habitaten vor und ist dabei meist ein harmloser Besiedler der Haut oder von Schleimhäuten. Es gibt jedoch ähnlich wie bei *E. coli* auch hier pathogene Varianten, die Haut- und Weichgewebsentzündungen aber auch eine Lungen- oder Hirnhautentzündung oder gar Sepsis hervorrufen können [96]. Des Weiteren ist die Entstehung multiresistenter Varianten, wie Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), ein großes Problem und der Grund für die Aufnahme in die Liste der ESKAPE-Pathogene [84]. Der in dieser Arbeit verwendete *S. aureus* Newman wurde 1952 aus einem infizierten Menschen isoliert und seitdem aufgrund seiner stabilen Virulenz in vielen Tiermodellen zur Erforschung von Staphylokokken-Infektionen verwendet [97–99].

2.1.5 Photopharmakologie - Prinzip und Anwendung

Traditionelle Medikamente erzielen ihre Wirksamkeit indem sie spezifisch mit Zielstrukturen, wie Enzymen, Ionenkanälen oder Rezeptoren interagieren [100]. Bei der Wechselwirkung ist besonders die Selektivität der eingesetzten Moleküle zu deren Zielstruktur entscheidend um Nebenwirkungen zu minimieren und eine optimale Wirkungsweise zu gewährleisten [101]. Die gewünschte Selektivität kann dabei durch i) die Vermeidung von Kreuzreaktionen mit anderen Zielstrukturen, indem die jeweilige Zielstruktur möglichst organspezifisch ist oder krankheitsbedingt hochreguliert wird und ii) eine lokale und damit gezielte Verabreichung der Medikamente erzielt werden [102–104]. Jedoch sind diese Voraussetzungen meist schwer zu erfüllen, da viele Zielstrukturen im Körper weit verbreitet in vielen Organen vorkommen und sowohl im gesunden als auch im erkrankten Organismus präsent sind. Dadurch stellt die Selektivität von Medikamenten oft ein Problem dar [104]. Die Entwicklung neuer Methoden, um die Selektivität von Medikamenten zu erhöhen, indem diese beispielsweise erst am Wirkungsort aktiviert werden, rückt immer weiter in den Fokus der Medikamentenforschung und -entwicklung. Die Photopharmakologie bietet dabei eine innovative Möglichkeit, Off-Target-Effekte und Nebenwirkungen zu reduzieren, indem die Moleküle mittels Licht gezielt an- und ausgeschaltet werden können [105, 106]. Durch das An- und Ausschalten der Toxizität beziehungsweise der Aktivität solcher Substanzen können sowohl Nebenwirkungen vermindert, als auch die Auswirkungen auf die Umwelt reduziert werden. Die Aktivierung durch Licht kann dabei entweder außerhalb des Körpers (extrinsisch) oder innerhalb des Körpers (intrinsisch) direkt am Wirkungsort mittels beispielsweise fluoreszierender Verbindungen erfolgen. Die fluoreszierenden Verbindungen können dabei Förster-Resonanzenergietransfer-Paare (FRET-Paare) oder Fluoreszenzgelöschte Sondenmoleküle darstellen. Die allgemeinen Voraussetzungen für eine photopharmakologische Substanz sind dessen biologische Aktivität und der Einbau eines Photoschalters in das Molekül. Der Photoschalter ist eine chemische Gruppe, die durch Bestrahlung eine reversible Strukturveränderung im Molekül herbeiführt [107]. Diese Strukturveränderung und damit die generelle Funktionsweise von photopharmakologischen Substanzen ist in Abbildung 2.1.7 schematisch dargestellt.

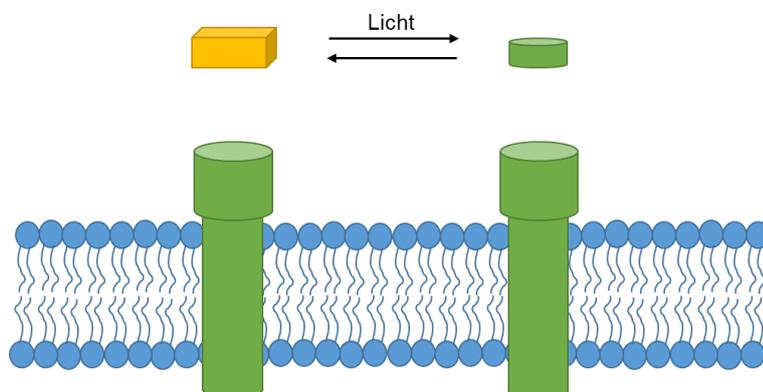


Abbildung 2.1.7: *Prinzip der Photopharmakologie (hier am Beispiel der Rezeptorinteraktion). Die Substanz verändert durch Anregung mit Licht ihre Struktur und passt erst im angeregten Zustand in den Rezeptor. Abbildung modifiziert nach [108].*

2.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Das Prinzip der Photopharmakologie und damit das spezifische An- und Ausschalten von Molekülen steht noch am Anfang der Entwicklung, und keines der entwickelten Moleküle hat den Schritt in klinische Studien gemeistert [108]. Jedoch versprechen diese Moleküle aufgrund ihrer durch Licht selektiven, reversiblen und vor allem kontrollierbaren Aktivierung und damit gezielten Ansteuerung der jeweiligen Zielstrukturen großes Potential. Der Ansatz der Photopharmakologie basiert auf bereits etablierten Methoden, wie die photodynamische Therapie zum Einsatz in der Gewebeablation [109–111] oder die Optogenetik zur lichtinduzierten Modulation des Aktivitätszustandes genetisch modifizierter Ionenkanäle [112], und konnte bereits großartige Durchbrüche erzielen. Die Durchbrüche wurden dabei in Forschungsansätzen basierend auf photokontrollierbarer Chemotherapie [113–115], Diabetesbehandlung [116] und antimikrobieller Wirkstoffe [117] erzielt. Die Anregung mit Licht ermöglicht eine präzise Dosierung mit variablen Intensitäten und Wellenlängen und birgt gleichzeitig die größte Herausforderung in der Photopharmakologie. Denn es stellt sich nach wie vor die Frage, wie die Photonen an den Wirkungsort gelangen. Während hochenergetische Photonen wie Röntgen- oder Gammastrahlung bereits in der Medizin erfolgreich für Bildgebungsverfahren eingesetzt werden, werden niederenergetische Photonen im sichtbaren Bereich meist von Geweben gestreut oder sogar absorbiert [118]. Darüber hinaus geht mit der Bestrahlung von beispielsweise ultravioletten Licht eine Zellschädigung einher [119]. Eine potentielle Lösung des Problems bieten die Erkenntnisse in der photodynamischen Therapie. Durch den Einsatz spezieller Licht emittierender Dioden (LEDs) oder Laser, Endoskope oder Computer gesteuerter Zuführungssysteme können die Photonen an den Wirkungsort gelangen. Darüber hinaus bietet vor allem Licht in dem Wellenlängenbereich von 650 bis 900 nm die Möglichkeit, besonders tief in Gewebe einzudringen, da in dem Bereich keine Absorption von Hämoglobin bei $\lambda < 650$ nm und Wasser bei $\lambda > 900$ nm zu befürchten ist [120, 121].

Für die Anwendbarkeit in der Antibiotikaentwicklung zeigen Velema *et al.* anhand eines auf Quinolon-Struktur basierenden Antibiotikums mit Azobenzene-Untereinheit, das Potential von Photoschaltern, da durch den Photoschalter im Molekül ein An- und Ausschalten der antimikrobiellen Aktivität generiert werden konnte [117]. In Abbildung 2.1.8 ist die Struktur eines Azobenzens und die Konfigurationsänderung durch Bestrahlung dargestellt.

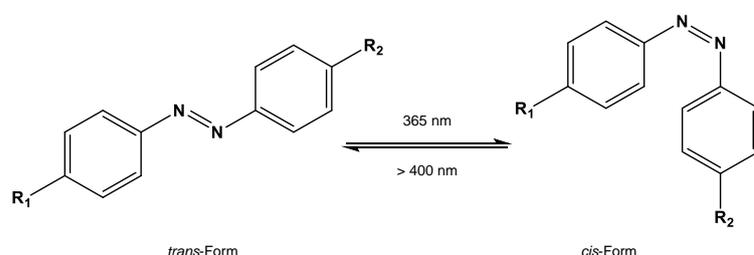


Abbildung 2.1.8: Molekülstruktur der Azobenzene und Darstellung der reversiblen Konfigurationsänderung durch UV/Vis. Abbildung modifiziert nach [122, 123].

Die Konfigurationsänderung der Azobenzene (Abb. 2.1.8) kann in einem UV/Vis-Spektrum dargestellt werden. Lerch *et al.* zeigen, dass die Absorptionseigenschaften des Moleküls abhängig von der Konfiguration sind. Die Grundform - auch als *trans*-Form bezeichnet - weist ein Absorptionsmaximum bei etwa 365 nm auf, während die Absorption bei 365 nm für die angeregte Form des Moleküls - auch *cis*-Form - weitestgehend auf null absinkt. Die *cis*-Form weist dafür ein neues lokales Absorptionsmaximum bei etwa 440 nm auf [122]. Neben der Ermittlung des Einflusses der Konfigurationsänderung auf die antibakterielle Aktivität stellt auch die kinetische Betrachtung dieser Moleküle ein spannendes Forschungsfeld dar. Mittels kinetischer Untersuchungen konnten Zhao *et al.* die Halbwertszeit bei 25 °C und die Aktivierungsenergien nach Arrhenius für unterschiedliche Temperaturbereiche für einen doppelten Photoschalter auf Azobenzene-Basis ermitteln [124]. Diese beiden Größen beschreiben die Stabilität des angeregten Zustandes, der *cis*-Form des Moleküls. Für die spätere Einsetzbarkeit ist es wichtig die Stabilität des angeregten Zustandes zu berücksichtigen, da zu geringe Halbwertszeiten dazu führen, dass die aktive Form des Moleküls zu wenig Zeit hat seine Wirkung auszuüben.

2.1.6 Chemische Proteomik

Die Decodierung des humanen Genoms im Jahre 2001 hat den Grundstein für die Analyse des Proteoms, das die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle beschreibt, gelegt [125]. Darüber hinaus hat die enorme Weiterentwicklung neuer Messinstrumente die Möglichkeit geschaffen, das komplexe Proteom massenspektrometrisch zu erschließen und diese Daten zur potentiellen Identifizierung neuer sogenannter krankheitsrelevanter Zielstrukturen in der Wirkstoffforschung einzusetzen. Um die Interaktion kleiner Moleküle mit deren Zielproteinen zu charakterisieren, können unter anderem die im nächsten Abschnitt beschriebenen Methoden des Aktivitäts-basierten Protein Profiling (ABPP) und des Affinitäts-basierten Protein Profiling (AfBPP) verwendet werden [126, 127].

2.1.6.1 Aktivitäts-basiertes Protein Profiling (ABPP) versus Affinitäts-basiertes Protein Profiling (AfBPP)

Die Menge an Proteinen in einer Zelle lässt sich nicht mit der Aktivität der jeweiligen Proteine in Verbindung setzen. Demnach generiert die quantitative Proteomanalyse nur begrenzt Informationen über die tatsächliche Proteinaktivität unter physiologischen Bedingungen. Die Grundsteine der Methode des Aktivitäts-basierten Protein Profiling wurden von Cravatt *et al.* gelegt, um die Limitierung der quantitativen Proteomanalyse zu überwinden [128–131]. Mit speziell kovalent bindenden Sonden kann eine universelle Detektion und Identifizierung biologisch aktiver Enzyme erzielt werden. Die Sonden setzen sich dabei aus einer reaktiven Gruppe, die beispielsweise kovalent an ein Cystein im aktiven Zentrum bindet, einem Linker und einer Reportergruppe zusammen. Die Reportergruppe kann für spezifische Visualisierung über eine Fluoreszenzmarkierung oder Affinitätsanreicherung in Form von beispielsweise Biotin dienen. Durch Bindung im aktiven Zentrum der Zielproteine wird gewährleistet, dass ausschließlich katalytisch aktive Proteine gelabelt werden [132]. Unter Verwendung dieser Methode wurden bereits viele verschiedene Enzymklassen, wie beispielsweise Hydrolasen und Proteasen untersucht [128, 133]. Die Charakterisierung vieler verschiedener Enzymklassen wird durch die Verwendung eines breiten Spektrums an Strukturen, die alle kovalent im aktiven Zentrum binden und somit als irreversible Inhibitoren

2.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

fungieren, ermöglicht [134–136]. Ein Beispiel für den Einsatz von ABPP in der Forschung zeigt die Untersuchung der Rolle von Serinproteasen in Krebszellen unter Verwendung eines Fluorophosphonates, das kovalent an einen nucleophilen Serin-Rest im aktiven Zentrum bindet [128]. Im Allgemeinen können diese Sonden eingesetzt werden, um ein globales Aktivitätsprofil von ähnlichen Enzymklassen zu erstellen. Das Sondendesign für die ABPP-Moleküle basiert meist auf Strukturen bekannter irreversibler Enzyminhibitoren [137]. Dabei werden als reaktive Gruppe meist milde Elektrophile, wie beispielsweise Epoxide (Abb. 2.1.9) verwendet, die durch Reaktion im aktiven Zentrum des Enzyms mit nucleophilen Aminosäureresten eine kovalente Bindung hervorrufen [135, 136]. Die bevorzugten Aminosäurereste hängen dabei von der gewählten reaktiven Gruppe ab. Beispielsweise binden Thiol-reaktive Gruppen wie Vinylsulfone kovalent an Cystein Proteasen, indem sie als Michael-Akzeptoren agieren [138].

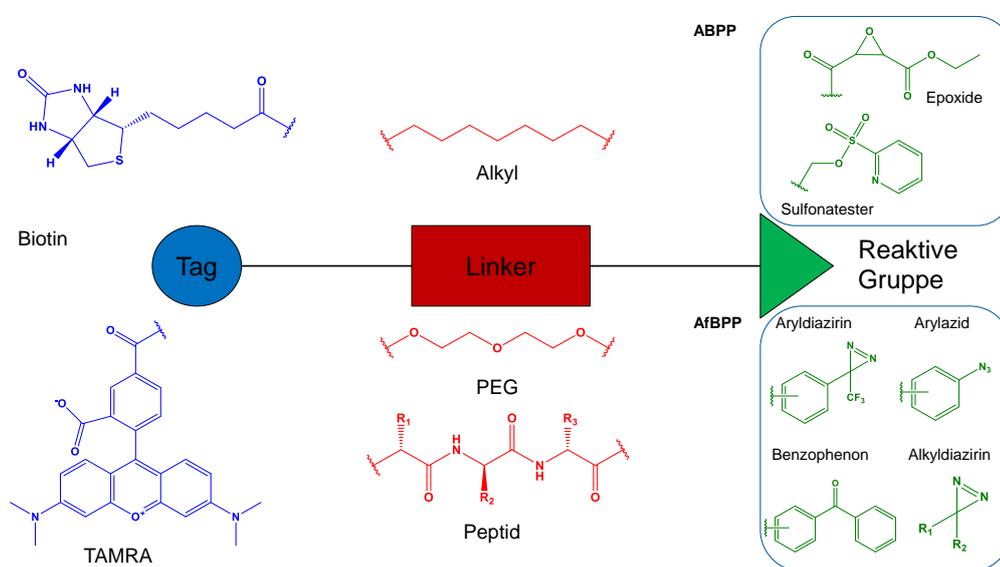


Abbildung 2.1.9: Darstellung des Sondendesigns für ABPP und AfBPP Experimente. Die Sonden setzen sich aus einer Reportergruppe, einem Linker und einer reaktiven Gruppe zusammen. Abbildung modifiziert nach [126, 127, 139].

Neben dem Aktivitäts-basierten Protein Profiling, das eine gewisse Vorkenntnis über die Interaktion mit dessen Zielstrukturen voraussetzt, nutzt das Affinitäts-basierte Protein Profiling die, wie der Name bereits impliziert, Affinität des Moleküls zu der jeweiligen Zielstruktur [140]. Eine kovalente Bindung kann in diesem Fall durch eine speziell im Molekül platzierte reaktive Gruppe (Abb. 2.1.9) herbeigeführt werden. Die Methode der Photoaffinitätsmarkierung (photoaffinity labelling, PAL) wurde in den frühen 60er Jahren entwickelt und dient zur Identifizierung von Bindungspartnern irreversibler Liganden [141]. Diese photoreaktiven Gruppen, wie Aryldiazirine, bilden durch Bestrahlung mit ultravioletten Licht unterschiedlicher Wellenlängen hoch reaktive Spezies, sogenannte Radikale wie Nitrene oder Carbene, aus. Die Radikale sind anschließend in der Lage eine kovalente Bindung zwischen dem Molekül und dem Zielprotein auszubilden. Ein prominenter Vertreter der photoreaktiven Gruppen sind die Arylazide (Abb. 2.1.10) [142]. Durch Bestrahlung mit kurzwelligem Licht (meist 250-350 nm) wird ein photochemischer Prozess initiiert, der zur Abspaltung von molekularem Stickstoff (N_2) führt. Bei diesem Prozess wird ein Nitren gebildet, das über eine Vielzahl an Reaktionen kovalent an Aminosäurereste binden kann. Demnach ist eine hohe Affinität und Selektivität des Moleküls zum Zielprotein die Voraussetzung

2.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

für eine erfolgreiche experimentelle Umsetzung. Neben den Aziden gehören auch Diazirine und Benzophenone zu den photoreaktiven Gruppen (Abb. 2.1.10). Alle drei Klassen haben ihre Vor- und Nachteile und müssen auf Basis der jeweiligen Fragestellung gewählt werden [139]. Speziell Aryldiazirine sind aufgrund ihrer geringen Größe und Anregung mit relativ langwelligem und damit unschädlicheren Licht in den Fokus der Chemischen Biologie gerückt [143].

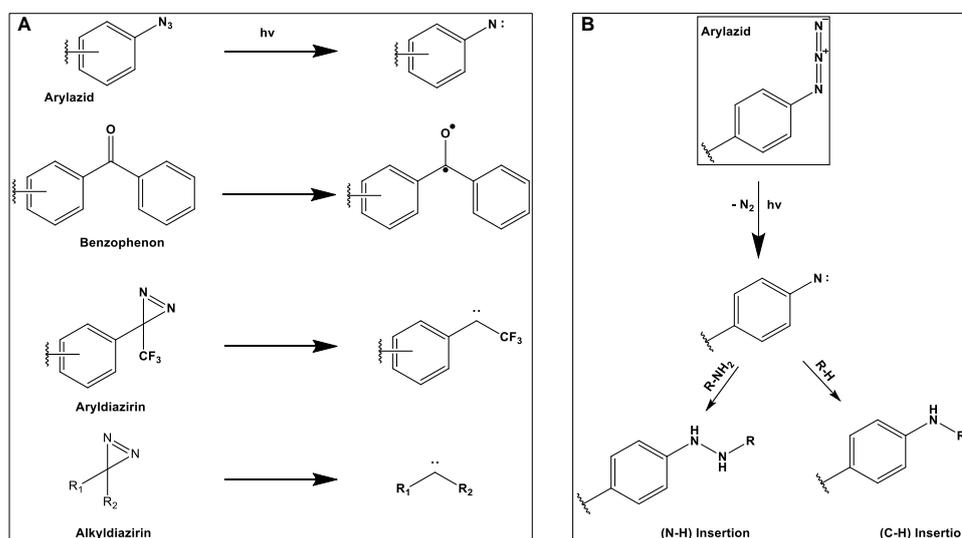


Abbildung 2.1.10: Prinzip der Photoaffinitätsmarkierung. A: Ausbildung der Radikale der photoaktiven Gruppen nach Bestrahlung mit Licht unterschiedlicher Wellenlängen. B: Ausbildung kovalenter Bindung durch Insertion eines Nitrens in C-H oder N-H Bindungen. Abbildung modifiziert nach [139].

Die reaktiven Gruppen werden für die Markierung von Proteinen entweder auf Affinitäts- oder auf Aktivitätsbasis verwendet. Zur spezifischen Anreicherung oder Fluoreszenzmarkierung der gelabelten Proteine werden weitere funktionelle Gruppen benötigt. Wie in Abbildung 2.1.9 dargestellt, besteht eine solche Sonde nicht nur aus der reaktiven Gruppe, sondern zusätzlich aus einem Linker und einer Reportereinheit [126, 127, 139].

Die Linker dienen dabei der räumlichen Trennung der reaktiven Gruppe im katalytischen Zentrum des Zielproteins und der Reportereinheit. Die räumliche Trennung minimiert eine sterische Hinderung, verursacht durch die Bindungstasche des Zielproteins und damit einhergehender Minderung der Affinität der Sonde. Als Linker können unter anderem Polyethylenglycol-, Alkyl- und verschiedenste Peptidketten verwendet werden. Der hydrophobe Alkyllinker bietet dabei den Vorteil der Steigerung der Membranpermeabilität der Sonde, jedoch kann es im Anreicherungsprozess zu unspezifischen Proteinbindungen und damit zur Erschwerung der Identifizierung tatsächlicher Interaktionspartner kommen. Hydrophile Linker, wie Polyethylenglycol, bilden dagegen weniger unspezifische Bindungen aus und erhöhen darüber hinaus die Löslichkeit der Sonden [144–146]. Nicht nur die Beschaffenheit, sondern auch die Länge des Linkers spielt eine essentielle Rolle speziell bei großen und komplexen Proteinen, denn ist dieser zu kurz, kann ein Ausbleiben der Interaktion zwischen beispielsweise Biotin und Avidin riskiert werden. Eine spezifische Anreicherung wäre in diesem Fall nicht mehr möglich [147]. Neben einfachen Linkern stellen spaltbare Linker eine weitere Möglichkeit zur Verbindung der reaktiven Gruppe mit der Reportereinheit

dar. Spaltbare Linker sind speziell in der Affinitätsanreicherung von Vorteil, da spezifisch angereicherte Proteine gezielt über spezielle Chemikalien, Licht oder Enzymverdau eluiert werden können [148].

Die bereits erwähnte Reportereinheit dient entweder der spezifischen Affinitätsanreicherung über Biotin oder einen FLAG-Tag oder der optischen Markierung über einen Fluoreszenzfarbstoff. Die Fluoreszenzmarkierung kann beispielsweise zur gelbasierten Visualisierung gelabelter Proteine oder Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden. Eine Markierung mittels Fluorophor wurde im Jahre 1999 von Liu *et al.* eingeführt und für die Visualisierung von Serinhydrolasen verwendet und stellt heutzutage eine standardisierte Methode in der chemischen Proteomik dar [128, 149, 150]. Dabei traditionell verwendete Fluorophore umfassen Fluorescein, Rhodamin, NBM (Nitrobenz-2-oxa-1,3-dazol) und Cyanine [151]. Neben der Visualisierung bietet die spezifische Affinitätsanreicherung eine weitere Möglichkeit gelabelte Proteine zu identifizieren. Durch eine kovalente Bindung oder eine starke Affinität an eine Matrix können durch die Sonde markierte Proteine immobilisiert werden. Für diese Immobilisierung nutzt man meist die starke Interaktion zwischen Biotin und Avidin bzw. Streptavidin mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 10^{-14} - 10^{-15} M$ [152].

2.1.6.2 Photoaffinitätsmarkierung zur Identifizierung der Bindungsstelle

Neben der Identifizierung potentieller Zielproteine von beispielsweise neu entdeckten Naturstoffen mit bisher unbekanntem Zielstrukturen können Photoaffinitätsmarkierungen auch für die Aufklärung der Bindungsstelle zu einem bereits bekannten Zielprotein verwendet werden. Dafür können die Effektormoleküle mittels Photoaffinitätsgruppen (Abb. 2.1.10) modifiziert werden. Durch Vorinkubation des Zielproteins mit dem Effektormolekül wird eine Anlagerung an das aktive Zentrum des Proteins gewährleistet und kann mittels UV-Bestrahlung kovalent im aktiven Zentrum gebunden werden. Die mit der Sonde interagierenden Peptide können nach enzymatischem Verdau massenspektrometrisch analysiert werden. Photoaffinitätsmarkierung zur Identifizierung der Bindungsstelle wurde bereits in vielen Fällen erfolgreich durchgeführt [139]. Beispielsweise haben Kashiwayama *et al.* Palmitinsäure mit einem Diazirin modifiziert und konnten die potentielle Substratbindungsstelle in aus der Ratte aufgereinigten Leberperoxisomen ermitteln [153]. Neben der Interaktion zwischen Substrat und Protein kann auch die Bindungsstelle in der Interaktion zwischen Inhibitor und Zielprotein bestimmt werden. Leach *et al.* haben mittels Photoaffinitätsmarkierung die Bindungsstelle des Antibiotikums Linezolid an die 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms aufgeklärt [154].

2.1.6.3 Klick-Reaktion - Bioorthogonale Ligationschemie

Wenn die Sonden-Zusammensetzung *in situ* also beispielsweise im Zellysat stattfinden soll, kann zuerst eine kovalente Bindung des Zielproteins durch entweder ein aktivitäts- oder ein affinitätsbasiertes Molekül herbeiführt werden. Anschließend kann das gelabelte Protein über bioorthogonale Ligationschemie, der sogenannten Klick-Reaktion, an ein Biotin oder ein Fluorophor gebunden werden. Der Ablauf einer solchen Klick-Reaktion ist in Abbildung 2.1.11 schematisch dargestellt und wird im folgenden genauer betrachtet.

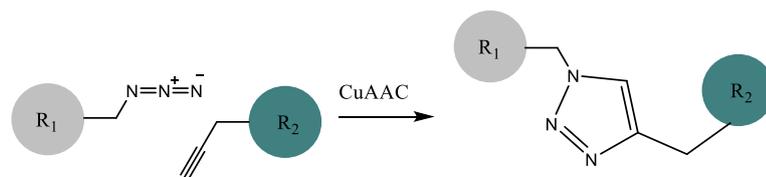


Abbildung 2.1.11: Prinzip der biorthogonalen Kupfer-katalysierten Klick-Reaktion unter Ausbildung eines 1,2,3-Triazols. Abbildung modifiziert nach [155].

Die Voraussetzungen für die Durchführung der Klick-Reaktion im biologischen System liegen in hoher Selektivität, Kompatibilität mit protischen Lösungsmitteln und der Orthogonalität zu natürlich vorkommenden funktionellen Gruppen. Eine Möglichkeit stellt die in Abbildung 2.1.11 dargestellte Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (CuAAC) dar. Die Grundsteine für diese Reaktion wurden bereits in den 1960er Jahren von Huisgen durch die Einführung der 1,3-dipolaren Cycloaddition gelegt. Diese Reaktion benötigte jedoch hohe Temperaturen, die den Einsatz in biologischen Systemen ausschließen [156]. Die Einführung der CuAAC durch Sharpless und Meddall ermöglichen durch Einsatz von Kupfer als Katalysator im Gegensatz zu hohen Temperaturen die Anwendung in biologischen Proben [157, 158]. Für die 1,3 dipolare Cycloaddition wird ein terminales Alkin und ein Azid benötigt, die in der Kupfer(I)-katalysierten Reaktion einen stabilen fünfgliedrigen Heterozyklus (1,2,3-Triazol) ausbilden. Die Verwendung von Kupfer(I) als Katalysator beschleunigt den Vorgang der Reaktion so stark, dass diese bereits bei Raumtemperatur innerhalb weniger Stunden stattfinden kann. Darüber hinaus zeigt die CuAAC eine außerordentliche Regioselektivität ohne Bildung von Nebenprodukten [155]. Durch die Durchführung einer nachträglichen Klick-Reaktion wird gewährleistet, dass die Interaktion der Sonde mit dem Zielprotein nicht durch einen sperrigen Linker und eine Reportereinheit beeinflusst wird.

2.1.6.4 Quantitative Proteomik

Die Weiterentwicklung von Massenspektrometern und die zusätzliche Kopplung der Separation via Flüssigchromatographie haben neue Möglichkeiten in der Proteomanalyse geschaffen. Gelbasierte Analysen sind meist limitiert in Bezug auf die Detektion von Proteinen mit geringer Abundanz in der Zelle. Darüberhinaus ist die exakte Identifizierung von Proteinen durch eine reine Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-Page) unmöglich - es kann lediglich eine ungefähre Aussage über die Größe des Proteins getroffen werden [159]. Sogenannte "Bottom-up" Analysen ermöglichen neben der genauen Identifizierung der Proteine auch die exakte Quantifizierung. Die Identifizierung erfolgt dabei über die Tandem-Massenspektren (MS/MS) der zum jeweiligen Protein gehörigen durch proteolytischen Verdau erhaltenen Peptide, die mit Datenbanken des jeweiligen Expressionsorganismus abgeglichen werden und somit die Identifizierung des dazugehörigen Proteins ermöglichen [160]. Für die Charakterisierung von spezifischen Zielstrukturen von beispielsweise Antibiotika ist die alleinige Identifizierung des jeweiligen Zielproteins meist ausreichend. Möchte man jedoch Proteininteraktionen, Expressionslevel oder posttranslationale Modifikationen betrachten, ist eine quantitative Analyse unumgänglich [161–163].

Massenspektrometrische Analysen sind primär jedoch nicht quantitativ, da die Peakintensität identifizierter Peptide stark von deren Ionisierungseigenschaften abhängt. Aus diesem Grund ist die Entwicklung experimenteller und bioinformatischer Ansätze zur Quantifizierung der massenspektrometrischen Daten essentiell [164]. Eine Möglichkeit zur Quantifizierung stellt die Markierung der Proteine mittels Isotopen wie ^{13}C und ^{15}N dar. Durch die Isotopenmarkierung wird über simultane LC/MS-Analyse die Möglichkeit eröffnet, die Peptidintensitäten im MS1-Spektrum relativ zu quantifizieren. Die dabei populärste Methode wurde 2002 von Mann *et al.* entwickelt und basiert auf der Anwesenheit von essentiellen Aminosäuren im Kulturmedium von Zellkulturen [165]. Die Methode wird als SILAC, aus dem Englischen stabile Isotopenmarkierung von Aminosäuren in Zellkulturen, bezeichnet [166]. Durch die parallele Kultivierung einer identischen Kultur einmal mit leichten Aminosäuren und einmal mit "schweren" Aminosäuren, wie ^{13}C Arginin oder ^{13}C , ^{15}N Lysin, wird eine Integration der schweren Aminosäuren in das Proteom nach 10 bis 15 Zellteilungen gewährleistet. Die Markierung von Lysin und Arginin stellt dabei sicher, dass jedes tryptische Peptid mindestens eine markierte Aminosäure enthält. Dabei führen die Markierungen zu einer Massenaddition von 6 Da für den Einbau von einem ^{13}C Arginin und 8 Da für ein ^{13}C , ^{15}N Lysin. Anschließend erfolgt die relative Quantifizierung über den Vergleich der Peptidintensitäten der leichten und schweren Variante [166, 167]. Nachteile der SILAC-Methode liegen in sehr hohen Kosten für Isotopen-markierte Aminosäuren und einem höheren zeitlichen Aufwand. Im Gegensatz zu der metabolischen Markierung über Isotope stellen chemische Markierungstechniken, wie iTRAQ (isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation) oder auch TMT (Tandem Mass Tag), eine weitere Möglichkeit zur relativen Quantifizierung dar. Die Markierung erfolgt nachträglich und dient nicht nur zur Quantifizierung, sondern kann auch zur Multiplexierung von Proben eingesetzt werden, wodurch die Messzeit drastisch reduziert werden kann [168, 169].

Markierungsbasierte Quantifizierung bringt immer den Nachteil mit sich, dass der Probe nachträglich etwas zugesetzt werden muss wodurch meist die Komplexität der MS-Spektren stark erhöht wird. Label freie Experimente dahingegen kommen ohne den Einsatz von Isotopen oder Tags aus und basieren meist auf bioinformatischen Analyseansätzen. Den Grundstein für label freie Quantifizierung haben Bodarenko und Wang gelegt, indem sie ein lineares Verhältnis zwischen der Proteinmenge und der (i) Peakfläche der jeweils detektierten Peptide und (ii) der Anzahl der aufgenommen Spektren definieren konnten. Der Vorteil label freier Quantifizierung liegt in der vereinfachten experimentellen Umsetzung, der hohen Sequenzabdeckung analysierter Proteine und der Analyse von theoretisch beliebig vielen Proben [170, 171]. Die massenspektrometrische Generierung der Rohdaten erfolgt meist mittels Time-of-Flight oder OrbiTrap Analysatoren [172]. Um qualitativ hochwertige Rohdaten für die label freie Quantifizierung zu generieren, muss je nach Anwendung eine Balance zwischen Massengenauigkeit, lückenloser Peptidsequenzierung mittels Tandem-Massenspektrometrie und Aufzeichnung einer Vielzahl an Spektren pro Peptid, um eine akkurate Quantifizierung über die Intensitäten zu gewährleisten, gefunden werden [173]. Allgemein profitieren label freie Quantifizierungen von ihrer geringeren Komplexität der Massenspektren und der höheren analytischen Tiefe. Deren Anwendung kann somit in der Analyse komplexer Proteinextrakte von Vorteil sein.

2.1.6.5 Techniken der chemischen Proteomik

Proteinextraktion und -isolation

Proteinextraktion und -isolierung kann aufgrund chemischer und physikalischer Interaktionen der Proteine untereinander oder mit anderen Zellbestandteilen erschwert werden. Vor allem die Analyse von Membranproteinen, die meist an Lipide gebunden und unlöslich sind, stellen eine große Herausforderung dar [174]. Aber auch Proteine, wie Transkriptionsfaktoren, die mit der DNA interagieren, können aufgrund der Bindung an DNA nicht detektiert werden. In diesem Fall ist eine Behandlung mit DNase durchzuführen, um die Proteine für Proteomanalysen zugänglich zu machen [175]. Je nach experimentellem Ansatz müssen spezielle Proteinextraktionsmethoden betrachtet werden, um beispielsweise Membranproteine massenspektrometrisch analysieren zu können.

Proteinabbau und -angleichung

Die größte Herausforderung in der Proteomanalyse liegt in der Dynamik der Proteine. Alle bisher etablierten Methoden sind von der Abundanz des jeweiligen Proteins abhängig. Um die dynamische Spanne der Proteinabundanz auszugleichen werden zwei verschiedene Ansätze gewählt i) selektiver Abbau von Proteinen mit hoher Abundanz oder ii) selektive Angleichung der Proteindynamik mittels Ligandsammlungen. Die Angleichung der Proteinabundanz kommt vor allem bei komplexen Proben, die nicht auf Modellorganismen basieren, wie beispielsweise klinische Proben, zum Einsatz [174].

Proteolytischer Verdau

Ein Proteinlysate ist ein hochkomplexes, heterogenes Gemisch mit unterschiedlichsten physikochemischen Eigenschaften. Der proteolytische Verdau der Protein in Peptide ist dabei von enormen Vorteil gegenüber der Analyse des intakten Proteins. Durch den Verdau der Proteine wird die Separationseffizienz in der Flüssigchromatographie erhöht, eine Reduktion des Molekulargewichts und eine Reduktion der Ladungszustände erzielt. Dadurch wird die Sensitivität der Messung stark erhöht [176–178]. Es gibt viele verschiedene Verdauungsenzyme, die zum Verdau von Proteinen zu Peptiden eingesetzt werden können. Diese Verdauungsenzyme unterscheiden sich dabei in der jeweiligen Amidbindung, die sie spalten [174]. Das am häufigsten verwendet Verdauungsenzym ist Trypsin und spaltet die C-terminale Bindung nach einen Arginin oder Lysin. In Tabelle 2.1.1 ist eine Übersicht über die prominentesten Verdauungsenzymen mit den dazugehörigen Schnittstellen dargestellt [179].

Auch wenn Trypsin als Goldstandard angesehen wird, bietet die Kombination mehrerer Verdauungsenzyme die Möglichkeit die Sequenzabdeckung und damit die eindeutige Identifizierung eines Proteins zu erhöhen [180, 181].

2.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Tabelle 2.1.1: Übersicht über proteolytische Verdauungsenzyme für die Preotomanalyse. Tabelle modifiziert nach [179].

Protease	Familie	Spaltungsstelle
ArgC	Cysteinprotease	C-terminal von R
ArgN	Metalloprotease	N-terminal von D
Chymotrypsin	Serinprotease	C-terminal von F, Y, L, W und M
GluC	Serinprotease	C-terminal von D
LysC	Serinprotease	C-terminal von K
LysN	Metalloprotease	N-terminal von K
Pepsin	Aspartische Protease	C-terminal von Y, F und W
Trypsin	Serinprotease	C-terminal von R und K
WaLP/MaLP	Serinprotease	C-terminal von aliphatischen Aminosäuren

Proteinseparation und -fraktionierung

Zur Separation von Proteinen wird nach wie vor eindimensionale oder zweidimensionale SDS-Page verwendet. Bei der eindimensionalen Trennung werden die Proteine lediglich nach ihrer Größe und bei der zweidimensionalen Separation zusätzlich nach deren Ladung getrennt [182, 183]. Die bei der Elektrophorese entstehenden Proteinbanden können ausgeschnitten und enzymatisch verdaut werden, um letztendlich die Peptide massenspektrometrisch zu analysieren [184]. Die Färbemethode der SDS-Gele spielt dabei eine entscheidende Rolle, denn nicht alle Methoden sind geeignet für anschließende massenspektrometrische Analysen. Zum Goldstandard zählt vor allem Coomassie Brilliant Blau, da es eine reversible Färbemethode darstellt und die Proteine nicht wie bei einer Silberfärbung fixiert werden. Die Silberfärbung ist zwar sensitiver aber die Aufbereitung der Proteine für die Massenspektrometrie deutlich aufwendiger [185]. Neben der gelbasierten Auftrennung von Proteingemischen ermöglicht die Kopplung von Nanoflussflüssigchromatographie mit hochauflösenden Massenspektrometern ausreichend Separation für die anschließende Identifizierung der Peptide [186]. Die gelfreie Analytik von Proteomen wird im folgenden Abschnitt genauer betrachtet.

Peptidionisierung, -auftrennung und -fraktionierung

Die Verwendung von Nanoflussflüssigchromatographie (nano-LC) dient zur Separation von Peptidgemischen, bevor diese im Massenspektrometer vermessen werden. Besonders die Entwicklung von Ultrahochdruckflüssigchromatographie (UHPLC) durch Jorgenson ermöglicht eine noch präzisere Auftrennung durch eine höhere Packungsdichte, die mit der Reduktion der Peakbreite einhergeht. Dadurch wird im späteren Verlauf der Analyse eine sensitivere, effizientere und reproduzierbare Identifizierung der Peptide gewährleistet [187, 188]. Für die Separation der Peptide werden überwiegend nano-LC-Säulen mit C18 oder HILIC (Hydrophile Interaktionschromatographie) als reverse Phase verwendet. Diese haben meist einen inneren Durchmesser von 50 bis 75 μm und eine Säulenlänge von etwa 150 mm. Die am häufigsten verwendete C18 Säule ist mit einem Silicagel gepackt, in dem C18-Ketten kovalent immobilisiert sind. Das Silicagel bildet die stationäre Phase der Säule [189–191]. Unter Einsatz einer nano-Ultrahochdruckflüssigchromatographie (UHPLC) Einheit können komplexe Peptidgemische je nach Interaktion mit der stationären Phase spezifisch aufgetrennt werden.

2.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Nach der Separation der Peptide können diese massenspektrometrisch vermessen werden. Ein Massenspektrometer setzt sich dabei aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator, der die Masse-zu-Ladungsverhältnisse (m/z) misst, und einem Detektor, der die Anzahl an Ionen mit einem bestimmten m/z detektiert, zusammen. Für die massenspektrometrische Analyse müssen die Peptide zunächst in die Gasphase überführt werden. Dieser Vorgang wird heutzutage meistens mittels zwei verschiedener Ionisierungsverfahren - ESI- oder MALDI - durchgeführt. Dabei steht ESI für Elektrospray-Ionisation und ermöglicht die Ionisierung aus der Flüssigphase und demnach eine Kopplung mit Flüssigchromatographie. MALDI beschreibt die Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung wobei die Analyten aus einer trockenen, kristallinen Matrix sublimiert und ionisiert werden. Für komplexe Proteingemische wird häufig ESI als Ionisierungsmethode angewandt und so auch in dieser Arbeit [192, 193]. Mittels ESI werden geladene Moleküle durch Anlegen einer Spannung von 3-5 kV aus der Flüssigphase in die Gasphase überführt und somit für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Zunächst werden die geladenen Moleküle in der Flüssigphase fein in geladene Tropfen zerstäubt, bei denen sich die positiven Ladungen an der Flüssigkeitsoberfläche anreichern. Durch Verdampfen des Lösungsmittels unter Stickstoffatmosphäre wird die Oberfläche der Tropfen graduell verkleinert. Das führt zu einer Erhöhung der Ladungsdichte an der Oberfläche, bis sich die gleich geladenen Moleküle so stark abstoßen, dass es zu einer Coulomb-Explosion und der Bildung freier Ionen in der Gasphase kommt [194]. Das verwendete Massenspektrometer TimsTOF Pro der Firma Bruker bietet optimale Bedingungen zur Analyse von Peptidgemischen und wurde bereits erfolgreich in der Proteomforschung eingesetzt [195, 196].

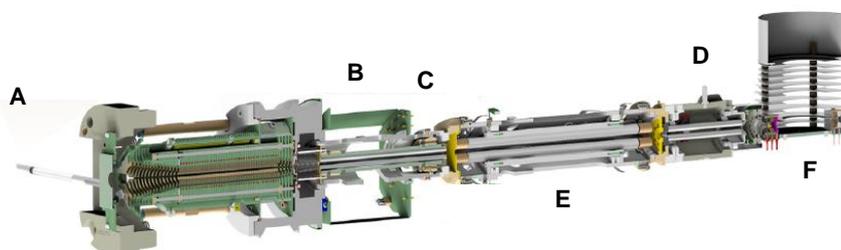


Abbildung 2.1.12: Schematische Darstellung des Aufbaus eines TIMS-qTOF Pro. A) Auslass der Ultrahochdruckflüssigchromatographie mit Elektrospray-Ionisation (ESI), B) dualer Trapped Ion Mobility Spectrometry (TIMS) Analysator, C) Iontentransfermultipol, D) Kollisionszelle, E) Quadrupol, F) Flugzeitanalysator (TOF) [197].

In Abbildung 2.1.12 ist der Aufbau des TimsTOF Pro von Bruker schematisch dargestellt. Das TimsTOF Pro ist ein Quadrupol “time-of-flight” (TOF) Massenspektrometer, das mit einem dualen “Trapped Ion Mobility Spectrometry” (TIMS) Analysator ausgestattet ist (Abb. 2.1.12). Der Einsatz von TIMS ist besonders vorteilhaft aufgrund der geringen Größe, geringen Spannungsanforderungen und hohen Effizienz in der Ionenverwertung, die einen weiteren Separationsschritt darstellt und das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich reduziert. Der duale TIMS Analysator (Abb. 2.1.12, B) dient der räumlichen Trennung von Ionenakkumulation und -trennung in zwei separaten Abschnitten des TIMS Tunnels, sodass diese Schritte parallel stattfinden können [198]. Durch diesen Prozess, der auch als “Parallel Accumulation Serial Fragmentation” (PASEF) bezeichnet wird, können bis zu 100% der eintretenden Ionen auch in das Massenspektrometer weitergeleitet werden. Durch graduelle Verringerung des elektrischen Potentials werden die Ionen über die

2.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

sogenannte TIMS Rampe entlassen [199], dabei verlassen Peptide mit geringerer Ionenmobilität das TIMS früher als Peptide mit einer hohen Ionenmobilität. Nach Verlassen des dualen TIMS Analysators werden die Ionen durch einen Ionentransfermultipol (Abb. 2.1.12, C) und einen Quadrupolmassenfilter (Abb. 2.1.12, E) geleitet, indem die Ionen im MS/MS Modus nach ihrer Masse separiert werden. In der Kollisionszelle (Abb. 2.1.12, D) werden die Ionen durch Anlegen einer Spannung beschleunigt. Durch Zusammenstöße mit einem Inertgas wie Argon oder Stickstoff fragmentieren die Ionen, die anschließend mittels Flugzeitanalysator (TOF für Time-of-flight, Abb. 2.1.12, F) nochmals nach m/z -Verhältnis aufgetrennt und letztendlich am Detektor detektiert werden [200].

Allgemein dient die vorgeschaltete Flüssigchromatographie der primären Auftrennung der Peptide nach ihrer Hydrophilie. Anschließend dient die massenspektrometrische Analyse der exakten Charakterisierung der Peptide, sodass die ermittelten Rohdaten später mittels Datenbankabgleich dem jeweiligen Peptid zugeordnet werden können.

Arbeitsablauf einer Proteomanalyse

In Abbildung 2.1.13 ist ein klassischer Ablauf der Proteomanalyse von spezifisch angereicherten Proteinen dargestellt.

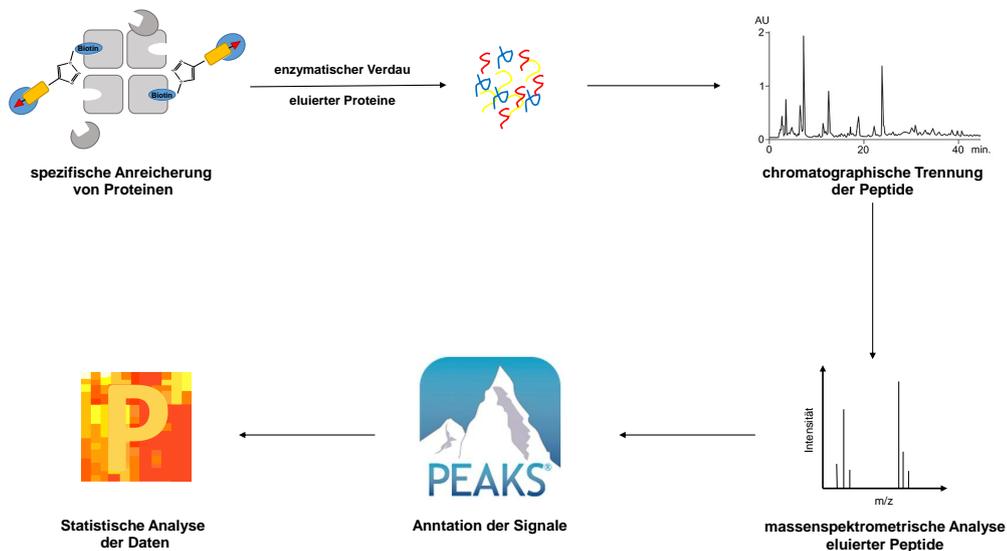


Abbildung 2.1.13: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs einer Proteomanalyse von spezifisch angereicherten Proteinen.

Zuerst werden Proteine spezifisch mit einer Sonde markiert. Dieser Vorgang kann unter anderem in der intakten Zelle oder im Zelllysat stattfinden. Wenn die Proteine in der ganzen Zelle markiert wurden, müssen diese zunächst lysiert werden, um die Proteine für die spezifische Anreicherung zugänglich zu machen (Schritt 1). Nach der spezifischen Anreicherung markierter Proteine werden diese proteolytisch in Peptide verdaut. Dafür können verschiedenste Verdauungsenzyme zum Einsatz kommen. Anschließend wird das Peptidgemisch chromatographisch aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Die dabei generierten Rohdaten werden mit

2.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

einer zum verwendeten Organismus passenden Datenbank abgeglichen, um Peptide bzw. Proteine spezifisch zu identifizieren. Die Datenanalyse kann mittels verschiedener Programme wie beispielsweise PEAKS oder MaxQuant durchgeführt werden. Anschließend können die analysierten Daten beispielsweise unter Verwendung des Programms Perseus statistisch ausgewertet werden, um spezifisch angereicherte Proteine zu identifizieren.

2.2 Zielsetzung

ESKAPE-Pathogene stellen eine große Herausforderung in der Antibiotika-Forschung und Entwicklung dar. Cystobactamide, die von Baumann *et. al* entdeckt wurden, weisen enormes antibiotisches Potential auf, da antibakterielle Aktivität gegen viele Mitglieder der ESKAPE Pathogene gezeigt werden konnten. In diesem Teil der Dissertation soll der Wirkmechanismus der Cystobactamide genauer betrachtet werden. Der Einsatz von photopharmakologisch modifizierten Sonden dient dem Nachweis, ob die Konfigurationsänderung im Molekül von *trans* nach *cis* Auswirkungen auf die antibakterielle Aktivität zeigt und ein An- und Ausschalten der biologischen Aktivität ermöglicht wird. Darüber hinaus soll der Effekt der Konfigurationsänderung gegenüber potentieller Resistenzmechanismen betrachtet werden. Obwohl Gyrase und Topoisomerase IV bereits als Zielstrukturen der Cystobactamide identifiziert werden konnten, lässt eine teilweise auftretende Diskrepanz zwischen der antibakteriellen Aktivität und der enzymatischen Inhibierung weitere sekundäre Zielstrukturen vermuten. Darüber hinaus ist die Bindungsstelle der Cystobactamide an Gyrase bisher unbekannt. Zur Aufklärung von sekundären Zielproteinen und der Gyrase-Bindungsstelle sollen speziell modifizierte Sonden verwendet werden, die sowohl die kovalente Bindung der Cystobactamide an Zielproteine als auch die spezifische Anreicherung ermöglichen. Die gelabelte Gyrase oder spezifisch angereicherte Proteine sollen mittels chemischer Proteomstudien analysiert werden und zur Aufklärung sekundärer Zielstrukturen sowie der Gyrase-Bindungsstelle dienen.

2.3 Material und Methoden

2.3.1 Chemikalien, Medienzusammensetzung und Bakterienstämme

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich, Carl-Roth, Merck, Fisher Scientific oder Avanti Polar Lipids bezogen. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer sind in den jeweiligen Abschnitten genauer beschrieben.

Die verwendeten Cystobactamide und das Albicidin wurden von entweder Giambatista Testolin (Albicidin, photoschaltende Cystobactamide), Antje Ritter (photoschaltende Cystobactamide) oder Daniel Kohnhäuser (Cystobactamide zur Affinitätsanreicherung) synthetisiert.

Die verwendeten Enzyme AlbD und AlbA wurden rekombinant hergestellt. Das AlbD wurde von Dr. Joop van den Heuvel und das AlbA von Dr. Asfandyar Sikandar zur Verfügung gestellt.

Die in dieser Arbeit zur Kultivierung von Bakterien verwendeten Kultivierungsmedien sind in Tabelle 2.3.1 zusammengefasst. Zur Herstellung von Festmedien wurden den jeweiligen Flüssigmedien Agar-Agar (Sigma Aldrich) in einer Konzentration von 15 g/L hinzugesetzt.

Tabelle 2.3.1: *Zusammensetzung der verwendeten Kultivierungsmedien.*

Medium	Bestandteile
Lysogeny Broth Medium (LB)	10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 16 g/l Pepton
Mueller Hinton Broth (MH)	17,5 g/l Casein Hydrolysat, 2 g/l Rindfleischextrakt, 1,5 g/l Stärke

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme mit den dazugehörigen Genotypen und Herkünften sind in Tabelle 2.3.2 aufgelistet.

Tabelle 2.3.2: *Auflistung der verwendeten Bakterienstämme mit den dazugehörigen Genotypen und Herkünften.*

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> BW25113	Wildtyp	DSM 27469
<i>Staphylococcus aureus</i> Newman	Wildtyp	ATCC 25904

2.3.2 Bestimmung der optischen Dichte (OD)

Für die Bestimmung der Zelldichte einer bakteriellen Kultur wurde die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm verwendet. Als Referenzwert wurde die Absorption des jeweils verwendeten Kultivierungsmedium bestimmt. Die optische Dichte korreliert dabei mit der Zelldichte, indem bei einer hohen optischen Dichte eine hohe Zelldichte erwartet wird. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde ein Photometer von Eppendorf (Modell: BioPhotometer 6131 Spectrometer) verwendet.

2.3. MATERIAL UND METHODEN

2.3.3 Antimikrobieller Test

Ein antimikrobieller Test wurde durchgeführt, um die minimale Hemmkonzentration der jeweiligen modifizierten Cystobactamide auf *Escherichia coli* BW25113 oder *Staphylococcus aureus* Newman zu bestimmen.

Für beide Stämme wurde aus einer Glycerinkultur eine Kultur in 20 ml Müller-Hinton Medium angesetzt und über Nacht bei 37°C und 150 UpM (HT Multitron, Infors) inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Zwischenkultur in 20 ml Müller-Hinton-Medium mit einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,1$ angesetzt und bis $OD_{600} = 0,5$ unter gleichen Bedingungen, wie die Übernachtskultur, wachsen gelassen. Für den antimikrobiellen Test wurde die Bakteriensuspension anschließend auf $OD_{600} = 0,01$ eingestellt.

Die zu testenden Substanzen wurden in einer Stammlösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml in DMSO verwendet und auf einer separaten Mikrotiterplatte in Dreierschritten verdünnt. Von den jeweiligen Verdünnungen wurden 1,98 μ l in Triplikaten in eine weitere Mikrotiterplatte überführt und mit 148 μ l der Bakteriensuspension oder Medium resuspendiert. Das Plattenschema ist in Tabelle 2.3.3 dargestellt.

Tabelle 2.3.3: Plattenschema für einen antimikrobiellen Test

Konz. ng/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Medium												
B													
C	6400	2133,3	711,1	237,0	79,0	26,3	8,8	2,9	1,0	0,3	0,1	DMSO	<i>E. coli</i>
D													
E													
F	6400	2133,3	711,1	237,0	79,0	26,3	8,8	2,9	1,0	0,3	0,1	DMSO	<i>S. aureus</i>
G													
H	Medium												

Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht statisch bei 37°C inkubiert und nach 18 h mit dem PowerWave XS (BioTek) das bakterielle Wachstum bei OD_{600} vermessen. Die sich draus ergebenden Absorptionen wurden um die Eigenabsorption des Mediums korrigiert, gemittelt und gegen den Logarithmus der dazugehörigen Konzentration des Inhibitors aufgetragen. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) konnte anschließend mittels nicht linearer Regression (Gombertz-Plot) unter Verwendung von GraphPad Prism 9 ermittelt werden.

2.3.4 Enzymatischer Gyrase Test

Gyrase stellt ein bereits identifiziertes Zielprotein der Cystobactamide dar [15]. Der inhibitorische Effekt kann mittels eines enzymatischen Tests nachgewiesen werden. Dazu wurde rekombinante Gyrase aus *E. coli* verwendet, die nicht inhibiert relaxierte DNA durch Einführen von Doppelstrangbrüchen in die superspiralisierte Form der Plasmid-DNA überführt. Liegt jedoch eine Inhibition vor, wird dieser Prozess teilweise oder gar komplett unterbunden. Die verwendete rekombinante Gyrase wurde von Inspiralis bezogen und wurde laut Herstellerangaben nach dem Protokoll von Grimshaw und Maxwell exprimiert [201].

2.3. MATERIAL UND METHODEN

Die dafür notwendige puC 19 Plasmid-DNA wurde aus *E. coli* gewonnen und mittels Kit zur Aufreinigung von Plasmid-DNA von Qiagen nach Herstellerangaben isoliert. Nach der Aufreinigung wurde die DNA mittels Topoisomerase I linearisiert und auf eine Konzentration von 50 ng/ μ l eingestellt, damit sie als Substrat für die Gyrase eingesetzt werden konnte.

Die Cystobactamid-Sonden wurden aus einer Stocklösung mit einer Konzentration von 0,75 mM in DMSO zuerst 1:1 in deionisiertem Wasser (MiliQ) verdünnt, um die DMSO Konzentration zu reduzieren, da dieses bereits einen inhibitorischen Effekt auf die enzymatische Aktivität der Gyrase aufweist. Aus dieser verdünnten Stocklösung wurde eine Verdünnungsreihe in MiliQ angesetzt, um finale Konzentrationen von 25 - 0,03 μ M zu erreichen. Aus jeder Verdünnungsstufe wurde 1 μ l in 11 μ l eines Gyrase-Gemisches, bestehend aus 0,125 μ l rekombinanter Gyrase (Inspiralis, UK), 3 μ l 5 x Reaktionspuffer (Inspiralis, UK) und 7,8 μ l MiliQ transferiert und durchmischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25 ng linearer Plasmid-DNA. Nach erneutem Durchmischen wurde die enzymatische Reaktion für 0,5 h bei 37°C inkubiert und durch 10-minütiges Erhitzen auf 60°C abgestoppt. Jede Probe wurde mit 3 μ l 6 x DNA Ladepuffer (Thermo Scientific) versetzt und auf ein 0,8% Agarose-Gel aufgetragen. Das Gel wurde für 30 min bei 100 V entwickelt und anschließend in einer 0,1 μ g/ml Ethidiumbromid Lösung für 5 min inkubiert. Zur Visualisierung mittels ultraviolettem Licht wurde das Geldokumentationssystem ChemiDoc von BioRad verwendet. In Abbildung 2.3.1 ist ein beispielhaftes Gelbild eines enzymatischen Gyrase Tests dargestellt. Daraus kann unter Verwendung der zum ChemiDoc-System dazugehörigen Software das Gel densitometrisch analysiert und mit nicht-linearer Kurvenanpassung der IC₅₀-Wert bestimmt werden. Der IC₅₀-Wert beschreibt die Konzentration des Inhibitors, bei der die Enzymaktivität 50% der maximalen Aktivität beträgt.

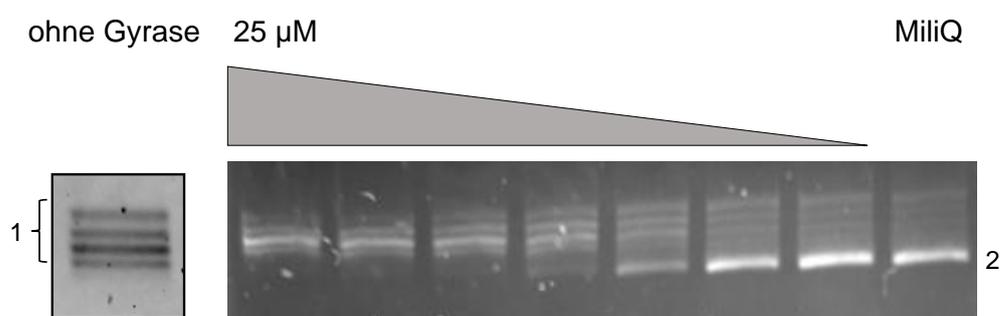


Abbildung 2.3.1: Links: Darstellung linearisierter DNA vor der Inkubation mit Gyrase. Rechts: Beispiel Gelbild für einen Gyrase Test mit einem Konzentrationsverlauf von 25 μ M bis 0,03 μ M des Cystobactamids und MiliQ als Negativkontrolle. 1) linearisierte Form der DNA, 2) superspiralisierte Form der DNA.

2.3.5 Cystobactamide mit einem Photoschalter

In diesem Kapitel wird die Charakterisierung von Cystobactamiden mit einer oder mehreren photoaktiven Gruppen, die unter Lichteinwirkung eine Konfigurationsänderung im Molekül herbeiführen, beschrieben. Die zur biologischen und physikochemischen Charakterisierung dieser Moleküle verwendeten Methoden sind in den folgenden Abschnitten aufgeführt.

2.3.5.1 Kinetische Charakterisierung der Moleküle

Die kinetische Charakterisierung wurde in Anlehnung an die Charakterisierung von Azobenzendimeren, die von Zhao *et al.* beschrieben wurden [124], durchgeführt. Die Messung der UV/Vis-Spektren erfolgte unter Verwendung des Powerwave XS Reader von BioTek mit der Take3-Platte. Der Vorteil dieser Platte ist, dass nur ein sehr geringes Volumen von 2 μl für die Messung benötigt wird. Die Moleküle wurden auf eine Konzentration von 0,5 mM in DMSO verdünnt und je 2 μl des Moleküls und DMSO auf die Platte gegeben. DMSO wurde verwendet, um den Blindwert, also die Eigenabsorption des Lösungsmittels, zu bestimmen und später von dem eigentlichen UV/Vis-Spektrum abzuziehen. Das UV/Vis-Spektrum der Moleküle wurde über einen Bereich von 250 bis 600 nm in 2 nm Schritten für sowohl den Grundzustand als auch den photostationären Zustand (engl. photo-stationary state, PSS) des jeweiligen Moleküls aufgenommen. Der photostationäre Zustand beschreibt dabei den Gleichgewichtszustand der *trans* und *cis*-Konfiguration eines Photoschalters, der durch Bestrahlung einer bestimmten Wellenlänge erreicht werden kann.

Die UV/Vis-Spektren wurden verwendet, um die Konfigurationsänderung im Molekül nach Bestrahlung mit einer bestimmten Wellenlänge zu charakterisieren. Ein Beispiel ist in Abbildung 2.3.2 dargestellt.

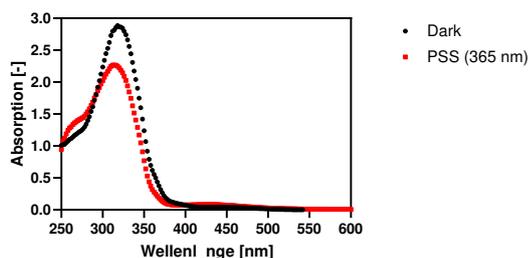


Abbildung 2.3.2: Darstellung der UV/Vis-Spektren eines Cystobactamids mit einem Photoschalter im Grundzustand (Dark) und im angeregten, sogenannten photo-stationären Zustand, nach einstündiger Bestrahlung mit 365 nm (PSS (365 nm)).

Bei der Konfigurationsänderung handelt es sich um einen reversiblen Zustand und das Molekül fällt über die Zeit wieder in den Grundzustand zurück. Dieser Prozess ist temperaturabhängig und kann auch anhand der Änderung im UV/Vis-Spektrum charakterisiert werden. Nach Aufnahme der UV/Vis-Spektren der einzelnen Verbindungen im Grundzustand und im photostationären Zustand wurde eine Wellenlänge ausgewählt, die sich zwischen den Spektren stark unterscheidet und für die Bestimmung der Kinetik des Übergangs vom photostationären in den Grundzustand verwendet werden konnte. Die Wellenlänge mit dem größten Unterschied kann zwischen den Molekülen variieren, als Beispiel wurde für die N-terminalen Azobenzene 324 nm verwendet. Um die Aktivierungsenergie und die Halbwertszeit des Prozesses von dem photostationären zurück in den Grundzustand zu bestimmen, wurde die Absorption bei, im Beispiel der Azobenzene, 324 nm über einen gewissen Zeitraum bei Temperaturen von 30-50°C in 5°C-Schritten gemessen. Die Messdauer und das Messintervall hing dabei von der Temperatur ab. Denn je schneller der Grundzustand erreicht wurde, desto früher konnte die Messung beendet werden, aber desto wichtiger war es auch, dass das Messintervall möglichst klein gewählt wurde, um wichtige Messwerte nicht zu verpassen. Unter Annahme, dass es sich bei dem Prozess vom photostationären in den

2.3. MATERIAL UND METHODEN

Grundzustand um eine Reaktion erster Ordnung handelt, konnte aus den UV/Vis-Spektren anschließend die Geschwindigkeitskonstante k nach Gleichung 2.1 für die jeweiligen Temperaturen bestimmt werden.

$$c = c_0 \cdot e^{-kt} \rightarrow \ln(c) = \ln(c_0) - k \cdot t \quad (2.1)$$

In Anlehnung an Zhao *et al.* wurden für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten zunächst die Absorptionen in fiktive Konzentrationen umgerechnet. Dabei wird davon ausgegangen, dass der Gleichgewichtswert, der dem Grundzustand entspricht, den höchstmöglichen Anteil der *trans*-Konfiguration enthält. Dieser Zustand wird mit 1 oder 100% gleichgesetzt. Der durch Bestrahlung erreichte photostationäre Zustand enthält den niedrigst möglichen Anteil der *trans*-Konfiguration und wird somit mit 0 oder 0% gleichgesetzt. Relativ zu der daraus berechneten Verteilung konnten dann die Konzentrationen bestimmt und für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten angewandt werden. Die detaillierte Vorgehensweise zur Berechnung der Konzentrationen ist im Anhang dargestellt (Abschnitt 4). Für die Bestimmung von k wurde ausschließlich der lineare Verlauf der Absorptionskurve verwendet. Ein Beispiel ist in Abbildung dargestellt.

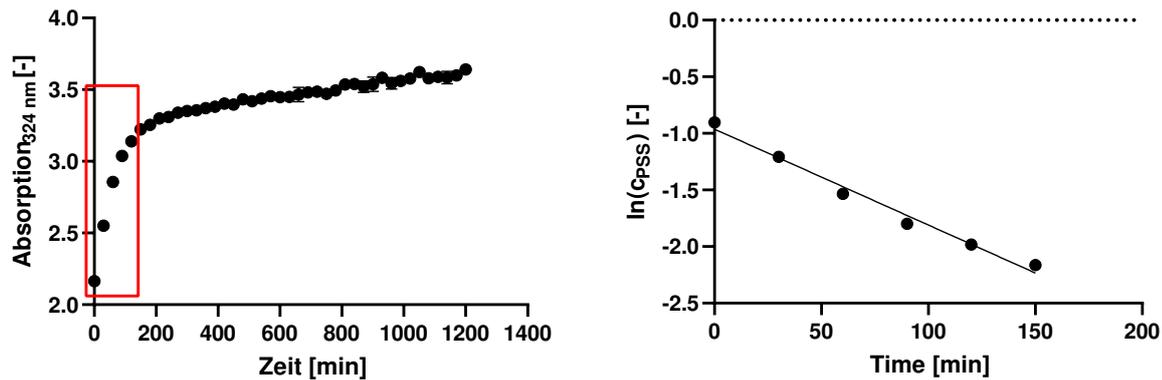


Abbildung 2.3.3: Darstellung der Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k . Links: Verlauf der Absorption bei 324 nm über die Zeit, Rechts: der natürliche Logarithmus der Konzentration des photostationären Zustandes im linearen Verlauf der Absorptionskurve (hier in rot markiert) gegen die Zeit.

Aus der negativen Steigung des rechten Graphen in Abbildung 2.3.3 kann die Geschwindigkeitskonstante k berechnet werden. Nach diesem Vorgehen wurde für jede gemessene Temperatur eine Geschwindigkeitskonstante berechnet. Aus fünf Messwerten wurde die Aktivierungsenergie E_A nach Arrhenius bestimmt. Die Arrhenius-Gleichung beschreibt allgemein die Temperaturabhängigkeit einer Reaktion und ist in Gleichung 2.2 dargestellt. Sie setzt sich aus den Größen der Reaktionsgeschwindigkeit k , A dem Produkt aus der Stoßzahl und dem Orientierungsfaktor, der Aktivierungsenergie E_A , der universellen Gaskonstanten R und der Temperatur T in Kelvin zusammen.

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{R \cdot T}} \rightarrow \ln(k) = \ln(A) - \frac{E_A}{R \cdot T} \quad (2.2)$$

Nach Linearisierung der Arrhenius-Gleichung 2.2 lässt sich bei einer Auftragung des natürlichen Logarithmus der Reaktionsgeschwindigkeit k gegen die inverse Temperatur $1/T$ aus der Steigung die Aktivierungsenergie berechnen. Die Reaktionsgeschwindigkeit kann jedoch nicht nur zur Er-

2.3. MATERIAL UND METHODEN

mittlung der Aktivierungsenergie verwendet werden, sondern aus ihr ergibt sich nach Gleichung 2.3 auch die zu der jeweiligen Temperatur dazugehörige Halbwertszeit $t_{1/2}$.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (2.3)$$

Neben Verwendung von UV/Vis-Spektren zur Charakterisierung von Photoschaltern beschreiben Cvrtila *et al.* eine weitere Möglichkeit unter Verwendung einer Messung über Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC/MS) [202]. Die verschiedenen Isomere weisen unterschiedliche Affinitäten zu der stationären Phase der HPLC-Säule und damit unterschiedliche Retentionszeiten auf. Damit kann die relative Menge der Isomere über eine Integration der Peakintegrale des Chromatogramms bestimmt werden. Demnach kann mit dieser Methode die Effektivität des Schalters festgestellt werden. Als Beispiel ist in Abbildung 2.3.4 das UV-Chromatogramm eines Cystobactamids mit Photoschalter im Grundzustand und das des gleichen Moleküls im photostationären Zustand nach Anregung mit 365 nm dargestellt. Die Moleküle wurden mittels UV-Detektor detektiert.

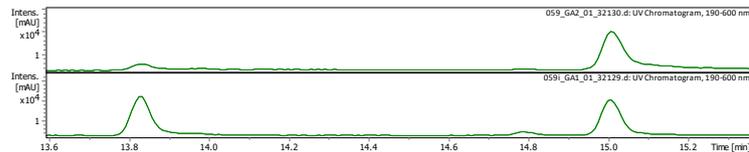


Abbildung 2.3.4: Darstellung des HPLC Laufs mit UV-Detektor eines Cystobactamids mit Photoschalter im Grundzustand (oben) und im photostationären Zustand (unten).

Für die LC/MS/MS Analyse der Proben wurden je 3 μl pro Probe injiziert. Es wurde eine "Ultra High Performance Flüssigchromatographie" UHPLC (Bruker, Modell: Dionex Ultimate 3000) mit einer C18-Säule von Phenomenex (Modell: Kinetex 1,7 $\mu\text{C}18$ 150 x 2,1 mm) verwendet. Zur Affinitäts-basierten Auftrennung der Probenbestandteile wurde ein linearer Gradient mit einer Flussrate von 300 $\mu\text{l}/\text{min}$ gefahren. Die mobile Phase setzte sich aus A) Wasser + 0,1% Ameisensäure und B) Acetonitril + 0,1% Ameisensäure zusammen und der Gradient ist in Abbildung 2.3.5 dargestellt. Die Temperatur des Säulenofens betrug 40°C.

Zeit [min]	Anteil B [%]
0	1
2	1
20	100
25	100
30	1

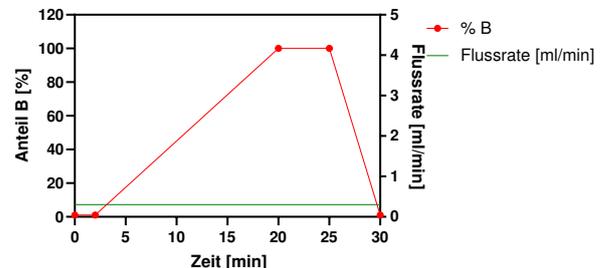


Abbildung 2.3.5: UHPLC-Gradient der mobilen Phase zur Auftrennung der Probenbestandteile zur Charakterisierung der Photoschalter.

Die Massenspektren wurden mit einem "Quadropol Time of Flight" Massenspektrometer von Bruker (Modell: Bruker Daltonics maXis HD QTof) vermessen. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektrospray-Ionisation und die Proben wurden in einem Massenbereich von m/z 50-1500 und bei einer Scan-Frequenz von 4 Hz analysiert. Für dieses Experiment wurde ausschließlich im po-

2.3. MATERIAL UND METHODEN

sitiven Modus gemessen. Die bei der Messung entstandenen Daten wurden mittels DataAnalysis 5.1 ausgewertet.

Für das Herbeiführen der Konfigurationsänderung wurden die Cystobactamide mit einer LED (Sahlmann Photochemical Solution, Modell: 3x Nichia NCSU276A) mit einer Wellenlänge von 365 nm mit einer Intensität von 780 mW für 1 h bestrahlt. Die Cystobactamide wurden in eine Mikrotiterplatte überführt und in eine Styropor-Box platziert. Die Styropor-Box hatte eine Aussparung im Deckel in der die LED platziert wurde, sodass der Abstand zwischen LED und Probe für jedes Experiment etwa 15 cm betrug.

2.3.5.2 Antimikrobieller Test

Die Testung auf antimikrobielle Aktivität der unterschiedlichen Formen der Photoschalter wurde wie in Abschnitt 2.3.3 durchgeführt, mit dem Unterschied, dass jeweils der Grundzustand als auch der angeregte Zustand der Substanz eingesetzt wurde. Zur Generierung des angeregten Zustand wurde die 0,5 mg/ml Stocklösung für eine Stunde bei 365 nm bestrahlt und anschließend parallel zu der nicht bestrahlten Variante verdünnt und mit *E. coli* BW25113 für 18 h bei 37°C inkubiert.

2.3.5.3 Enzymatischer Gyrase Test

Die Wirkung der Cystobactamide mit einem Photoschalter auf deren primäres Zielprotein Gyrase wurde in einem enzymatischen Experiment, wie bereits in Abschnitt 2.3.4 beschrieben, getestet. Es wurden sowohl Moleküle im Grundzustand, als auch im angeregten Zustand nach Bestrahlung für 1 h bei 365 nm getestet.

2.3.5.4 Enzymatischer AlbD Test

AlbD ist ein Enzym, das von dem Gram-negativem Bakterium *Pantoea dispersa* exprimiert wird und in Albicidin zwischen Ring C und D die Amidbindung spaltet, um damit das Antibiotikum zu inaktivieren [73]. Cystobactamide weisen eine ähnlich Struktur wie Albicidin auf und werden demnach auch von AlbD zwischen Ring C und D gespalten. Die Konfigurationsänderung des Moleküls durch den Photoschalter kann eine Möglichkeit darstellen, der Spaltung durch AlbD zu entkommen. Um das herauszufinden wurde ein AlbD Test wie von Testolin *et al.* beschrieben durchgeführt [81].

Es wurden 24 μ M des rekombinant hergestellten AlbD mit 12 μ M der jeweiligen Substanz in 0,2 M Phosphatpuffer für 0,5 h bei 28°C inkubiert. Parallel wurde jeweils ein Ansatz ohne Enzym als Stabilitätskontrolle und zusätzlich eine Positivkontrolle mit Albicidin durchgeführt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Enzym durch Zugabe von 350 μ l Methanol und 20 minütiger Zentrifugation (Centrifuge 5424 R, Eppendorf) bei 20.000 x g gefällt. Anschließend wurden 250 μ l des Überstandes abgenommen und in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator, Eppendorf) aufkonzentriert. Das Konzentrat wurde in 100 μ l Methanol aufgenommen und massenspektrometrisch vermessen. Die massenspektrometrische Messung erfolgte nach der bereits in Abschnitt 2.3.5.1 beschriebenen Methode.

2.3.5.5 Enzymatischer AlbA Test

Eine weitere Möglichkeit der Charakterisierung der Cystobactamide stellt der enzymatische AlbA Test dar. AlbA ist ein Enzym, das von dem Gram-negativen Bakterium *Klebsiella oxytoca* exprimiert wird und Albicidin komplexiert und somit dessen Wirkung neutralisiert. Auch CNDM-861, ein Standard Cystobactamid, wird von AlbA komplexiert [76]. Durch die Konfigurationsänderung der photoaktiven Cystobactamide besteht die Möglichkeit, die Interaktion mit AlbA zu stören und somit die Komplexierung zu verhindern.

Zur Bestimmung der AlbA Aktivität wurde ein Agar-Diffusions-Experiment, angelehnt an Rostock *et al.* durchgeführt [75]. Für die Durchführung wurde in einem 15 μl Ansatz 40 μM AlbA mit 40 μM des Cystobactamids oder Albicidin als Positivkontrolle für 20 min in PBS (engl. phosphate buffer saline, 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,4) bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert - jeweils im Grundzustand und nach Bestrahlung mit 365 nm für eine Stunde im photostationären Zustand. In der Zwischenzeit wurden 100 μl *E. coli* BW25113-Suspension mit $OD_{600} = 0,5$ auf LB-Agar Platten ausgestrichen. Die *E. coli* Suspension wurde aus einer Übernachtskultur zunächst auf $OD_{600} = 0,1$ in frischem LB-Medium verdünnt und bis $OD_{600} = 0,5$ bei 37°C und 150 UpM (HT Multitron Infors) wachsen gelassen. Nach der Vorinkubation mit AlbA wurden die Cystobactamide und das Albicidin auf die Agarplatte gegeben, getrocknet und über Nacht statisch bei 37°C und 70% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Durchmesser der Hemmhöfe bestimmt. Der Durchmesser des Hemmhofs spiegelt die antibakterielle Aktivität des Antibiotikums wider.

2.3.6 Affinitätsanreicherung von potentiellen Zielproteinen in bakteriellem Lysat

Für die Identifizierung von potentiellen sekundären Zielstrukturen der Cystobactamide wurde eine modifizierte Sonde verwendet, die ein Diazirin und ein Alkin im Molekül aufwies. Das Diazirin diente der Ausbildung einer kovalenten Bindung zur Zielstruktur. Dabei wurde durch Bestrahlung mit ultravioletttem Licht molekularer Stickstoff freigesetzt und das dabei entstandene Carben bindet kovalent an das Zielprotein. Des Weiteren war eine Alkinfunktion enthalten, die für die Klick-Reaktion mit einem Biotinazid benötigt wurde, um eine spezifische Anreicherung über Streptavidin Beads zu ermöglichen. Im Folgenden ist der experimentelle Ablauf eines solchen Experiments im Detail beschrieben. Als Startpunkt für die Entwicklung des optimalen experimentellen Ablaufs dieses Experiments wurde ein Standardprotokoll der Gruppe von Prof. Dr. Stephan A. Sieber verwendet [203].

2.3.6.1 Bestimmung der Wachstumskurven von *E. coli* BW25113 und *S. aureus* Newman

Die Bakterienernte zur Lysatherstellung für die Affinitätsanreicherung von potentiellen Zielstrukturen sollte eine Stunde nach Eintreten der stationären Phase durchgeführt werden. Dafür wurde zunächst jeweils eine Wachstumskurve für das Gram-negative Bakterium *E. coli* BW25113 und das Gram-positive Bakterium *S. aureus* Newman aufgenommen, um den Zeitpunkt des Eintritts

2.3. MATERIAL UND METHODEN

in die stationäre Phase zu bestimmen.

Aus einer Glycerinkultur wurden je eine Übernachtskultur von *E. coli* BW25113 und *S. aureus* Newman in 20 ml LB-Medium angesetzt und für etwa 18 h bei 37°C und 150 UpM (HT Multitron, Infors) inkubiert. Die Übernachtskultur wurde anschließend in 100 ml frischen LB-Medium auf $OD_{600} = 0,1$ eingestellt und das Wachstum der Bakterien jede Stunde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm dokumentiert. Die optische Dichte wurde graphisch gegen die Zeit aufgetragen, um die charakteristischen Phasen bakteriellen Wachstums und den Zeitpunkt des Eintretens der stationären Phase zu bestimmen.

2.3.6.2 Lysatherstellung

Für die Lysatherstellung wurde zunächst aus einer Glycerinkultur jeweils eine Übernachtskultur für *E. coli* BW25113 und *S. aureus* Newman in 20 ml LB-Medium angesetzt und bei 37°C und 150 UpM (HT Multitron, Infors) über Nacht inkubiert. Von diesen 20 ml Übernachtskultur wurden 10 ml in 90 ml frisches LB-Medium überführt und bis zum Eintreten der stationären Phase plus 1 h bei 37°C und 150 UpM (HT Multitron, Infors) kultiviert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Bakteriensuspension durch 10-minütige Zentrifugation (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) bei 5000 UpM und 4°C geerntet und einmal mit 50 ml PBS gewaschen. Die geernteten Zellen wurden in PBS auf $OD_{600} = 40$ eingestellt und jeweils 300 μ l in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach einem weiteren 10-minütigen Zentrifugationsschritt (Centrifuge 5424 R, Eppendorf) bei 5000 UpM und 4°C und Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schock-gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Zu Beginn eines jeweiligen Experiments wurden die eingefrorenen Zellpellets auf Eis aufgetaut und anschließend in 100 μ l Kaliumphosphatpuffer aufgenommen. Die Zellyse wurde durch Sonifizieren - zweimal je 1 kJ mit Kühlpausen auf Eis - realisiert (Sonoplus mini20, Bandelin).

2.3.6.3 Inkubation, Klick-Reaktion und Streptavidin-Anreicherung

Nach der Freisetzung der Proteine durch die Zellyse konnte die gezielte Anreicherung von Proteinen mit Hilfe von Biotin und Streptavidin durchgeführt werden. Dieser Teil des Experiments ist in Abbildung 2.3.6 durch zwei verschiedene Ansätze schematisch dargestellt.

Für Ansatz 1 wurden 300 μ l des Zellysates für 1 h bei Raumtemperatur und 400 UpM mit 50 μ M des Cystobactamids oder DMSO als Negativkontrolle inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine Mikrotiterplatte überführt und für 30 min auf Eis mit UV-Licht (Sahlmann Photochemical Solutions, Modell: 3x Nichia NCSU276A, 365 nm, 100% Intensität) bestrahlt, um eine kovalente Bindung mittels des Diazirins herbeizuführen. Die markierten Proteine wurden über eine Klick-Reaktion nach Presolski *et al.* an Biotin (Biotin-PEG4-Azid, Jena Bioscience) allein oder an einen trifunktionalen Linker mit Biotin zur spezifischen Anreicherung und einem Fluorophor (TAMRA) (5/6-TAMRA-Azid-Biotin, Jena Bioscience) zur Visualisierung gekoppelt. Die Strukturen der Reportereinheiten sind in Abbildung 2.3.7 dargestellt.

Für die Durchführung der Klick-Reaktion wurde zuerst das Biotin-Azid bzw. der trifunktionale Linker dem Gemisch im Überschuss mit einer Konzentration von 0,14 mM hinzugefügt, gefolgt

2.3. MATERIAL UND METHODEN

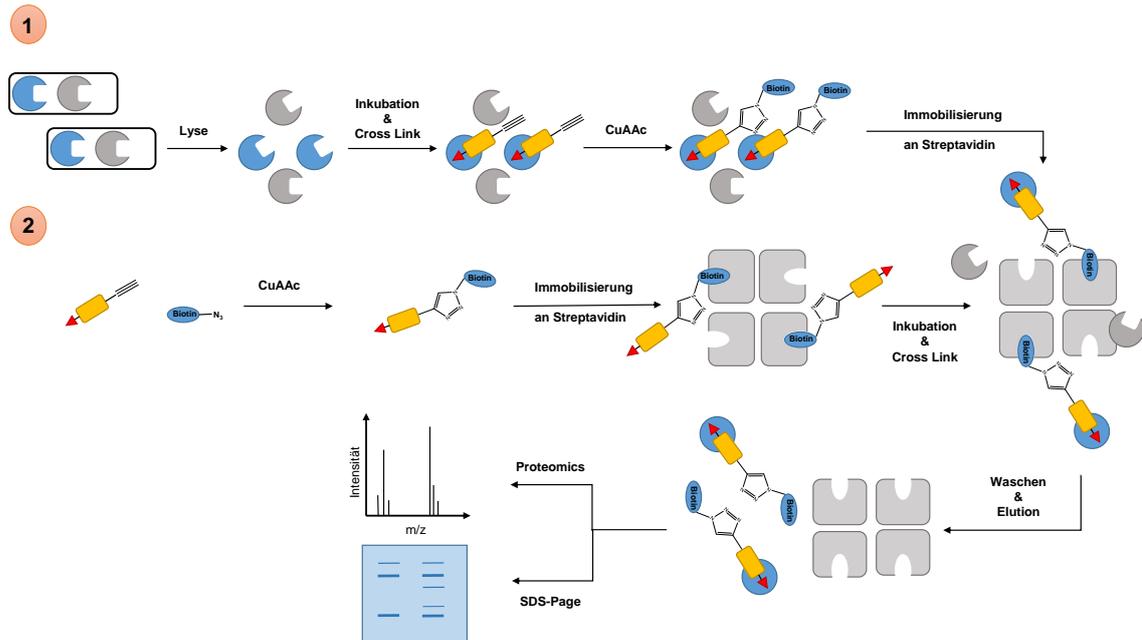


Abbildung 2.3.6: Gezielte Anreicherung von Proteinen mit Hilfe von Biotin und Streptavidin. 1) Nach der Zellyse wurde das Proteom mit dem Inhibitor inkubiert und durch eine Vernetzung kovalent gebunden, durch eine Klick-Reaktion wurde Biotin gebunden und kann anschließend zur Immobilisierung an Streptavidin verwendet werden. Durch mehrere Waschschrte wurden ungebundene Proteine entfernt und anschließend die gebundenen Proteine eluiert. Die eluierten Proteine konnten dann mittels SDS-Page visualisiert oder für die LC/MS/MS Analytik weiter aufbereitet werden. 2) Zeigt einen ähnlichen experimentellen Ablauf mit dem Unterschied, dass der Inhibitor vor der Inkubation mit dem Zellysats an Biotin geklickt und an Streptavidin immobilisiert wurde.

von einer Mischung aus Kupfersulfat als Katalysator (0,21 mM) und Tris(3-hydroxypropyltriazolymethyl)amin (THPTA) als Ligand (1 mM), 5 mM Aminoguanidin und 5 mM Natriumascorbat. Die Reaktion wurde für 1 h unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur und 700 μ M inkubiert [204]. Nach der Klick-Reaktion wurden die an Biotin gekoppelten Proteine mittels Streptavidin-Glaskugeln (GE Healthcare Life Sciences) angereichert. Vor der Anreicherung wurden die Streptavidin-Glaskugeln dreimal mit je 1 ml 0,4% SDS in PBS gewaschen, um Ethanol, in dem diese gelagert waren, zu entfernen. Das Reaktionsgemisch wurde zusammen mit 400 μ l 0,4% SDS in PBS auf die Streptavidin-Glaskugeln aufgetragen und für 1 h in einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Streptavidin-Anreicherung wurden unspezifische Binder mittels sieben Waschschrten mit je 1 ml in der folgenden Reihenfolge, dreimal 0,4% SDS in PBS, zweimal 6 M Urea in Wasser und zweimal PBS, entfernt. Anschließend wurden spezifisch angereicherte Proteine durch Zugabe von 50 μ l 2% SDS in Wasser und 6-minütige Inkubation bei 96°C für die weitere Vorbereitung für LC/MS/MS basierte Proteomstudien eluiert. Für eine Evaluation der spezifischen Anreicherung mittels SDS-Page wurden die Proben mit 50 μ l 2-fach Ladepuffer (aus 5-fach Ladepuffer mit Wasser verdünnt, Zusammensetzung in Tabelle 2.3.4) bei ebenfalls 96°C für 6 min aufgeköcht und anschließend 20 μ l auf ein 10%-iges SDS-Gel aufgetragen.

Für den zweiten Ansatz zur spezifischen Anreicherung von sekundären Zielstrukturen wurde das Cystobactamid zunächst wie oben beschrieben in Kaliumphosphatpuffer in Abwesenheit von Proteinen an Biotin bzw. den trifunktionalen Linker geklickt und anschließend an den bereits

2.3. MATERIAL UND METHODEN

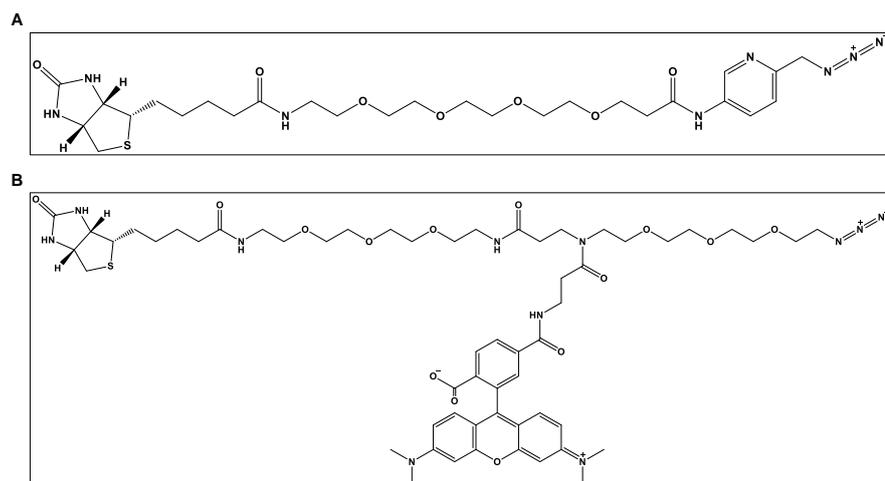


Abbildung 2.3.7: Strukturen der verwendeten Reportereinheiten zur spezifischen Anreicherung von Proteinen: A) Biotin-PEG₄-Azid und B) trifunktionaler Linker (5/6-TAMRA-Azid-Biotin).

gewaschenen Streptavidin-Glaskugeln für 1 h im Überkopfschüttler immobilisiert. Anschließend wurde das Lysat zu den Streptavidin-Glaskugeln hinzugegeben und eine weitere Stunde im Überkopfschüttler inkubiert. Zur Herbeiführung der kovalenten Bindung des Cystobactamid-Biotin-Streptavidin-Komplexes an das Zielprotein wurde dieser in eine Mikrotiterplatte transferiert und für 30 min auf Eis mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm angeregt. Alle weiteren Schritte zur Entfernung der unspezifischen Binder und Elution der spezifisch angereicherten Proteine wurden wie oben bereits beschrieben durchgeführt.

2.3.6.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Für die visuelle Evaluierung der mittels trifunktionalem Linker spezifisch angereicherten Proteine wurde eine sogenannte SDS-Page durchgeführt. Mittels SDS-Page werden die Proteine auf Grundlage ihres Molekulargewichts voneinander getrennt und können somit optisch besser visualisiert und später dem Molekulargewicht in kDa zugeordnet werden. Zur Herstellung eines 10%-igen SDS-Gels wurde das in Tabelle 2.3.4 dargestellte Pipettierschema verwendet, wobei die Substanzen Tetramethylethylendiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS) zum Starten der Polymerisierungs-Reaktion als letztes zugegeben wurden.

Tabelle 2.3.4: Zusammensetzung des SDS-Ladepuffers (links) und Pipettierschema zur Herstellung eines 10%-igen SDS-Gels der Dicke 1 mm.

5 x Ladepuffer	%	Trenngel	Sammelgel
		10	5
10% SDS	ddH ₂ O	4,2 ml	2,9 ml
500 mM DTT	Rotiphorese Gel 30	3,3 ml	0,85 ml
50% Glycerol	1,5 M Tris pH 8,6	2,5 ml	-
250 mM Tris-HCl	0,5 M Tris pH 6,8	-	1,25 ml
0,5% Bromphenolblau	20% SDS	50 μ l	25 μ l
pH 6,8	TEMED	15 μ l	7,5 μ l
	10% APS	75 μ l	37,5 μ l

2.3. MATERIAL UND METHODEN

Zu dem Trenngel wurde zusätzlich 2,2,2-Trichlorethanol (1:100) zur späteren Visualisierung hinzugegeben. Trichlorethanol ist ein fluoreszierender Farbstoff und bindet nach Bestrahlung mit UV-Licht kovalent an Tryptophan im Protein [205]. Die auspolymerisierten Gele wurden in eine mit 1-fach Lauffpuffer (3% (w/v) Tris, 14,4% (w/v) Glycin, 1% (w/v) SDS) befüllten Gelkammer (BioRad) platziert und mit 20 μ l Probe beziehungsweise 4 μ l Proteinmarker (AmershamTM ECLTM RainbowTM Marker - Full range, GE Healthcare) beladen. Der Proteinmarker wurde verwendet, um später die entstandenen Banden ihrem jeweiligen Molekulargewicht zuzuordnen. Durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 10 min wurde gewährleistet, dass sich eine gerade Lauffront bildete und das Sammelgel passiert war. Anschließend wurde die Spannung für 1 h auf 180 V erhöht. Nach vollständiger Entwicklung des Gels wurde dieses aus der Gelkammer entfernt und konnte mittels ChemiDocTM (BioRad) unter Verwendung der StainFree Gel Einstellung mit 45 s Aktivierung visualisiert werden. Für Fluoreszenz-markierte Proteine wurde der TyphoonTM FLA 9500 (GE Healthcare) zur Visualisierung verwendet.

2.3.6.5 Vorbereitung der Proteine nach dem sp3 Protokoll für LC/MS/MS basierte Proteomstudien

Die von den Streptavidin-Glaskugeln mit 2% SDS eluierten Proteine mussten zunächst von Detergens befreit werden, bevor sie mit Trypsin verdaut werden konnten. Der Ablauf der Proteinaufbereitung für die LC/MS/MS Analyse ist in Figur 2.3.8 schematisch dargestellt und wurde nach Hughes *et al.* durchgeführt [206].

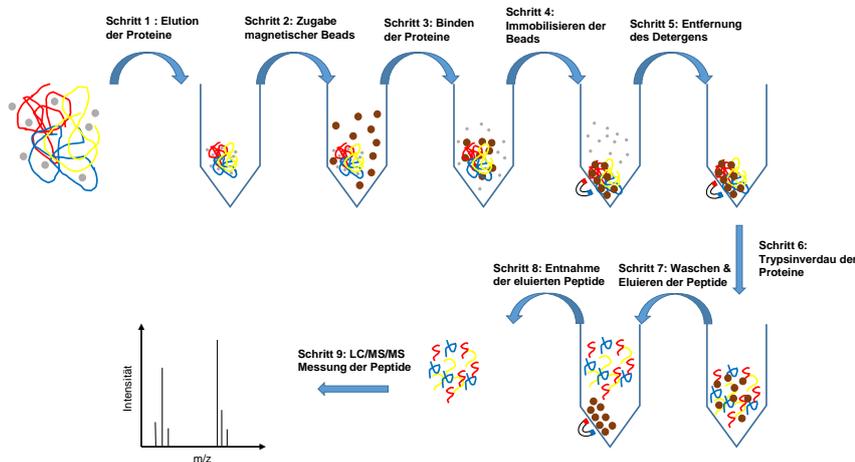


Abbildung 2.3.8: Proteinaufarbeitung nach sp3 Protokoll für die LC/MS/MS Analyse. 1) Elution der Proteine von den Streptavidin-Glaskugeln, 2+3) Zugabe und Binden der Proteine an magnetische Glaskugeln, 4+5) durch Immobilisieren der Glaskugeln kann das Detergenz entfernt werden, 6) Proteinverdau mit Trypsin, 7+8) waschen und eluieren der Peptide, 9) LC/MS/MS Messung der Peptide.

Als erstes wurden die Proteine für 1 h mit 50 mM Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP, 10 v/v%) bei 55°C und 700 UpM reduziert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur für 10 min mit 100 mM Methylmethylthiomethylsulfoxid (MMTS, 5 v/v%) bei 700 UpM alkyliert (Thermo-

2.3. MATERIAL UND METHODEN

Mixer C, Eppendorf). Anschließend folgte die Zugabe von 200 μl Acetonitril und magnetischen Glaskugeln, die die Proteine bei Raumtemperatur und 1000 UpM (ThermoMixer C, Eppendorf) über Nacht binden. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 5000 UpM (Centrifuge 5424 R, Eppendorf), um die magnetischen Glaskugeln schneller zu sedimentieren, wurden diese Hilfe eines Magneten immobilisiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurden erneut magnetische, proteinbindende Glaskugeln hinzugegeben, um verbliebene Proteine zu binden, die zurückgebliebenen Glaskugeln wurden in 300 μl Ethanol aufgenommen und alle Proben für zwei Tage bei 4°C statisch inkubiert. Nach der Immobilisierung der Peptide, wurde das verbliebene SDS über zwei Waschschrte mit je 300 μl Ethanol und einen Waschrst mit 300 μl Acetonitril entfernt. Anschließend wurden die Glaskugeln bei Raumtemperatur getrocknet. Für den Trypsinverdau der Proteine wurden die magnetischen Glaskugeln in 50 μl Triethylammoniumbicarbonat-Puffer (TEAB-Puffer, pH 8) aufgenommen und 2 μl einer 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Trypsinlösung (Promega) hinzugegeben. Der enzymatische Verdau der Proteine wurde über Nacht bei 37°C und 1000 UpM (ThermoMixer C, Eppendorf) inkubiert. Durch Zugabe von 1000 μl Acetonitril wurden die Peptide über Nacht bei Raumtemperatur und 1000 UpM (ThermoMixer C, Eppendorf) an die Glaskugeln gebunden. Nach der Immobilisierung der Peptide an die Glaskugeln, wurden diese zweimal mit je 200 μl Acetonitril gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Durch Zugabe von erst 20 μl 2% DMSO und danach 20 μl Wasser wurden die Peptide von den magnetischen Glaskugeln eluiert. Die eluierten Peptide wurden in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei 25°C in einem Vakuumkonzentrator (Concentrator, Eppendorf) eingengt. Die Peptide können bis zur Messung bei -80°C gelagert werden.

2.3.6.6 Charakterisierung der Peptide mittels LC/MS/MS Analytik

Für die Analyse der Proben wurden Evotips für das nano-HPLC EvosepOne System (Evosep) verwendet. Die Evotips, die eine C18 Vorsäule darstellen, wurden als erstes mit Acetonitril befeuchtet und mit 1-Propanol konditioniert. Die Peptide wurden in 20 μl 0,1% Ameisensäure in Wasser aufgenommen, durch 10-minütiger Bestrahlung mit Ultraschall in Lösung gebracht und in einer Ultrazentrifuge bei 50.000 UpM (Optima XE, Beckman Coulter) und 20°C für 20 min von nicht löslichen Bestandteilen getrennt. Nach Equilibrierung der Evotips mit 0,1% Ameisensäure in Wasser, wurden die jeweiligen Proben aufgetragen. Vor der Messung der Proben mittels EvosepOne in Kombination mit dem Massenspektrometer timsTOFTM Pro (Bruker Daltonik GmbH) wurden die Tips einmal gewaschen und noch einmal mit 0,1% Ameisensäure in Wasser befeuchtet. Der Aufbau der Messapparatur ist in Abbildung 2.3.9 dargestellt.

Das EvosepOne System bestand aus vier verschiedenen Niederdruckpumpen A, B, C, und D, die einen Gradienten mit einer Gesamtlänge von 21 min generieren. Zu Beginn der Messung startete das EvoSepOne System mit der Aufnahme eines Einweg-Evotips und platzierte diesen in Reihe mit dem Lösungsmittelfluss am Mischungskreuz A/B/C/D. Durch einen primären Gradienten, der von den Pumpen A (Wasser mit 0,1% Ameisensäure) und B (Acetonitril) gesteuert wurde, wurden die gewünschten Peptide durch steigende Konzentration des Eluenten B eluiert. Der Acetonitrilanteil im ersten Gradienten betrug nicht mehr als 35%, um zu verhindern, dass mit den gewünschten Peptiden auch Polymere oder Lipide mit eluiert wurden. Der Gradient mit den eluierten Peptiden wurde durch Pumpen C und D in einer sogenannten Lagerschleife

2.3. MATERIAL UND METHODEN

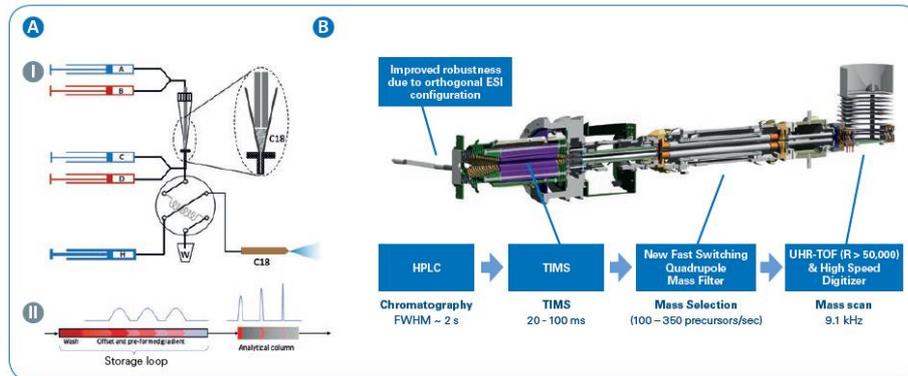


Abbildung 2.3.9: Schematischer Aufbau der Messapparatur für die Proteomanalyse. A) zeigt den Aufbau des EvosepOne Systems mit den 4 dargestellten Pumpen A/B/C/D und der Lagererschleife für die eluierten Zielproteine. Die Niederdruckpumpen A (Wasser mit 0,1% Ameisensäure) und B (Acetonitril) sorgen für die Elution der Peptide bei steigender Konzentration des Eluenten B. Die Niederdruckpumpen C und D fördern die eluierten Peptide in die Lagererschleife. Danach erfolgt die weitere Auftrennung der eluierten Peptide durch eine kurze C18-Säule. B) Aufbau des timsTOFTM Pro (Bruker Daltonik GmbH) mit Elektrospray-Ionisation, zusätzliche Trennung über “Trapped Ion Mobility Spectroscopy” (TIMS), Quadrupol Massenfilter und “Ultra-high-resolution time-of flight” (UHR-TOF) Detektor [207].

umgeleitet, bevor die Peptide ein weiteres mal über eine 8 cm lange C18-Säule (50 cm x 75 μm , 1,9 μm , Dr. Maisch) aufgetrennt wurden. Anschließend folgte die Messung im Massenspektrometer timsTOFTM Pro, in dem die Peptide durch Elektrospray-Ionisation ionisiert wurden. Eine zusätzliche Auftrennung wurde durch “Trapped Ion Mobility Spectroscopy” (TIMS) erzielt. Die Messung erfolgte im sogenannten positiven “Parallel Accumulation Serial Fragmentation”, kurz PASEF, Modus und die Ionen wurden mittels “Ultra-high-resolution time-of flight” (UHR-TOF) Detektor in einem Massenbereich von m/z 100 bis 1700 detektiert. Weitere Parameter sind in Tabelle 2.3.5 dargestellt.

Tabelle 2.3.5: Einstellung des Massenspektrometers Bruker TimsTOFPro unter Verwendung einer Bruker Methode für Proteomics.

Parameter	Einheit
Kapillarspannung	2000 V
Zerstäubendruck	2,0 bar
Trockentemperatur	220°C
Trockengas	10 l/min
Anzahl an PASEF MSMS Messungen	4
Totale Zykluszeit	100 ms
Ionenmobilität	1/K0 gemessen von 0,6 bis 1,6 ($V \cdot S/cm^2$)

2.3. MATERIAL UND METHODEN

2.3.6.7 Annotation der Peptide mittels PEAKS Xpro und statistische Auswertung mittels Perseus

Zur Auswertung der Rohdaten wurde die Software PEAKS Version Xpro verwendet. Die Rohdaten wurden mit den in Tabelle 2.3.6 aufgelisteten Parametern analysiert. Zur Annotation der Proteine wurde entweder eine Uniprot-Datenbank für *E. coli* BW25113 (Proteom-ID: UP000029103) oder *S. aureus* Newmann (Proteom-ID: UP000006386) verwendet.

Tabelle 2.3.6: Parameter zur Annotation der Proteine unter Verwendung der Software PEAKS XPro.

Parameter	Einheit
Massenfehlertoleranz des Ausgangsions	20,0 ppm
Massenfehlertoleranz der Fragmentmasse	0,03 Da
Vorläufermasse Suchmodus	monoisotopisch
Verdauungsenzym	Trypsin
Max. verfehlte Spaltungen	1
Verdauungsmodus	Spezifisch
Feste Modifikationen	Beta-methylthiolation von Cystein + 45,99
Variable Modifikationen	Oxidation von Methionin + 15,99

Die annotierten Proteine wurden in einem .txt Datenformat exportiert und in die frei verfügbare Software Perseus importiert. Zunächst wurden alle Intensitäten \log_2 -transformiert und in zwei Gruppen - DMSO und Cystobactamid - unterteilt. Um Proteine zu eliminieren, die nur vereinzelt detektiert wurden, wurden alle Einträge gelöscht die nicht mindestens dreimal in mindestens einer der definierten Gruppen vorkommen. Fehlende Werte wurden durch eine Konstante ersetzt und ein zweiseitiger t-Test mit einem p-Wert von 0,05 durchgeführt. Als Referenz wurden dabei die DMSO Proben verwendet, da nach spezifisch angereicherten Proteinen in der behandelten Probe gesucht wurde. Die dabei kalkulierten $-\log_{10}$ (p-Werte) wurden gegen den Unterschied zwischen DK501 und DMSO als \log_2 (DK501/DMSO) aufgetragen und in einem Volcano-Plot dargestellt.

2.3.6.8 Aufreinigung von Pyruvat-Dehydrogenase aus *S. aureus* Newman und Nachweis enzymatischer Aktivität

Zur Gewinnung der Pyruvat-Dehydrogenase aus *S. aureus* Newman, durchgeführt nach Birkenstock *et al.* [208], wurde zunächst eine 200 ml Übernachtskultur in LB-Medium angesetzt und für 18 h bei 37°C und 150 UpM (HT Multitron, Infors) inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 UpM für 10 min pelletiert und anschließend in einer Konzentration von 2 ml/g Zellen in 50 mM 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS Puffer) mit pH 7,4 resuspendiert. Zu 2250 μ l dieser Suspension wurden 705 μ l Lysostaphin (0,025 mg/ml) und 30 μ l DNase I (10 mg/ml) hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C wurden 400 mg Glaskugeln hinzugegeben und die Zellen in viermal 20 s Intervallen mit 30 s Kühlpausen auf Eis in einem Homogenisator (Precellys, Bertin Instruments) lysiert. Durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 14.000 UpM wurden Zelltrümmer abgetrennt. Der steril filtrierte Überstand wurde auf vier Ultrazentrifugationsröhrchen aufgeteilt und für 1 h bei 50.000 UpM und 4°C zentrifugiert (Optima XE, Beckman Coulter). Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet für 1,5 h auf Eis gelagert. Die pelletierten Proteine wurden in 800 μ l 50 mM MOPS Puf-

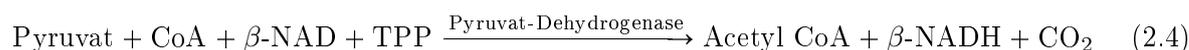
2.3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.3.7: Zusammensetzung der Reaktionsmischung für den Nachweis der PDH-Aktivität.

	Volumen [μ l]
150 mM MOPS HCl Puffer pH 7,4	50
12 mM Magnesiumchlorid	2,5
0,6 mM Kalziumchlorid	2,5
18 mM Thiaminpyrophosphat (TPP)	2,5
0,72 mM Coenzyme A (CoA)	25
20 mM β -Nicotinamidadeninucleotid (β -NAD)	15
15,6 mM L-Cystein	25
Wasser	15

fer pH 7,4 aufgenommen und bis zum Nachweis der enzymatischen Aktivität bei -80°C gelagert.

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität der aufgereinigten Pyruvat-Dehydrogenase wurde der Umsatz von β -NAD zu β -NADH durch Messung der Absorption bei 340 nm bestimmt. Die zugrunde liegende Reaktionsgleichung ist in Gleichung 2.4 dargestellt.



Die aufgereinigte Pyruvat-Dehydrogenase wurde im Volumenverhältnis 1:2 in 50 mM MOPS Puffer verdünnt und $2,5 \mu\text{l}$ zu der in Tabelle 2.3.7 dargestellten Reaktionsmischung hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde in eine Mikrotiterplatte überführt und mit unterschiedlichen Konzentrationen des Cystobactamids oder DMSO als Negativkontrolle behandelt. Zuerst wurde die Absorption bei 340 nm (BioTek, PowerWaver XS) und einer Temperatur von 30°C equilibriert bevor durch Zugabe von $10 \mu\text{l}$ einer 75 mM Pyruvat-Lösung die enzymatische Reaktion initiiert wurde. Die Absorption bei 340 nm wurde über einen Zeitraum von 5 min alle 10 s gemessen und für die Kalkulation der enzymatischen Aktivität nach Gleichung 2.5 verwendet.

$$\text{Units/ml Enzym} = \frac{(\Delta A_{340\text{nm}}/\text{min Test} - \Delta A_{340\text{nm}}/\text{min Blank}) \cdot VF \cdot 0,1}{6,22 \cdot 0,0025} \quad (2.5)$$

Die Enzymaktivität berechnet sich aus den Differenzen der Absorption pro min bei 340 nm der Test-Probe mit Enzym und der Blank-Probe ohne Enzym. VF stellt den Verdünnungsfaktor der Enzymlösung dar und beträgt in diesem Fall 2. 0,1 steht für das Gesamtvolumen in ml, 6,22 ist der Extinktionskoeffizient von β -NAD bei einer Wellenlänge von 340 nm und 0,0025 das Volumen der zugegebenen Enzymlösung. Zur Ermittlung des Einflusses des Cystobactamids auf die Enzymaktivität wurde die Verbindung in unterschiedlichen Konzentration zugefügt und das Experiment wie beschrieben durchgeführt.

2.3.6.9 Trypsinverdau von Gelbanden nach Coomassie-Färbung

Zur Anfärbung der Proteine in einem SDS-Gel wurde Coomassie-Blau (Coomassie Brilliant Blue R-250, Biorad) verwendet. Die Gele wurden über Nacht in der Färbelösung angefärbt und anschließend in Wasser für 1 h gewaschen. Die Proteinbanden wurden durch Komplexbildung des Farbstoffs mit basischen Aminosäuren wie Lysin, Histidin, Tyrosin und Arginin blau gefärbt [209] und können anschließend für massenspektrometrische Analysen ausgeschnitten, zerkleinert und

2.3. MATERIAL UND METHODEN

mit Trypsin verdaut werden. In diesem Abschnitt ist der experimentelle Ablauf in Anlehnung an Shevchenko *et al.* beschrieben [210].

Nach Ausschneiden und feiner Zerkleinerung der Gelbanden wurden diese zunächst für 20 min mit 500 μl 100 mM Ammoniumkarbonat gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und nochmals 150 μl 100 mM NH_4HCO_3 zugegeben. Die Proteine wurden in Anwesenheit von 50 mM TCEP (10 v/v%) bei 55°C reduziert (ThermoMixer C, Eppendorf) und nach Abkühlen auf Raumtemperatur durch 100 mM MMTS (5 v/v%) für 10 min alkyliert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Gelstück durch Zugabe von 500 μl Acetonitril:100 mM Ammoniumkarbonat (50:50) für 20 min gewaschen. Die Waschlösung wurde verworfen und die Gelstücke durch 50 μl Acetonitril geschrumpft. Nach 15 min wurde der Überstand verworfen und die Gelstücke in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator, Eppendorf) getrocknet. Durch Zugabe von 10 μl 25 mM Ammoniumkarbonat konnten die Gelstücke wieder aufquellen und der tryptische Verdau wurde durch 0,2 μg Trypsin (Promega) eingeleitet. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C und 350 UpM (ThermoMixer C, Eppendorf) wurden die Peptide in ein Ultrazentrifugationsröhrchen (UZ-Röhrchen) überführt. Verbliebene Peptide wurden durch zweifache Zugabe von 50 μl 60% Acetonitril/0,1% Ameisensäure für 20 min und einmalig 25 μl Acetonitril extrahiert und im UZ-Röhrchen gesammelt. Anschließend wurden die extrahierten Peptide in einem Vakuumkonzentrator (Concentrator, Eppendorf) eingengt und wie in Abschnitt 2.3.6.6 und 2.3.6.7 massenspektrometrisch vermessen und anschließend annotiert.

2.3.7 Charakterisierung der Bindungsstelle von Cystobactamiden an Gyrase mittels Photoaffinitätsmarkierung (PAL)

E. coli Gyrase stellt neben der Topoisomerase IV die primäre Zielstruktur der Cystobactamide dar [15], doch die Bindungsstelle ist bisher noch unbekannt. Im Folgenden wird die Vorgehensweise für ein PAL-Experiment beschrieben.

2.3.7.1 Inkubation, Bestrahlung und enzymatischer Verdau

Cystobactamide sind keine kovalenten Inhibitoren, doch mittels einer photoreaktiven Gruppe, hier ein Azid oder Diazirin, wurde eine kovalente Bindung nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 340 nm bzw. 365 nm zur Zielstruktur ausgebildet. Zunächst wurden 20 μl *E. coli* Gyrase von Inspiralis mit 1 μl linearer DNA (25 ng/ μl), 4,24 μl des Cystobactamids (1 mg/ml) oder DMSO als Negativkontrolle in 24,76 μl Kaliumphosphatpuffer gemischt und für 30 min bei 37°C statisch inkubiert (ThermoMixer C, Eppendorf). Anschließend wurden die 50 μl auf eine Mikrotiterplatte überführt und für 1 h bei 340 nm bzw. 365 nm auf Eis bestrahlt. Zur Vorbereitung für den enzymatischen Verdau wurden die Proben für 1 h bei 56°C und 700 UpM mit 50 mM TCEP (10 v/v%) reduziert und nach Abkühlung auf Raumtemperatur für 30 min bei 700 UpM mit 100 mM MMTS (5 v/v%) alkyliert (ThermoMixer C, Eppendorf). Der enzymatische Verdau wurde mit entweder Trypsin, GluC oder Chymotrypsin (Promega) in TEAB Puffer (pH 8) bei 37°C über Nacht durchgeführt (ThermoMixer C, Eppendorf). Nach dem Verdau wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator, Eppendorf) eingengt. Bis zur Analyse der Proben wurden diese bei -80°C gelagert. Für die Messung wurden die Peptide in 20 μl Wasser mit 0,1% Ameisensäure aufgenommen und im Ultraschallbad für 10 min resuspendiert. Nach

2.3. MATERIAL UND METHODEN

einem 20 minütigen Ultrazentrifugationsschritt (Optima XE, Beckman Coulter) bei 50.000 UpM und 20°C konnte der Überstand massenspektrometrisch vermessen werden.

2.3.7.2 Charakterisierung der Peptide mittels LC/MS/MS

Die Peptide der Gyrase wurden mit dem nano-HPLC EvosepOne System gekoppelt an das Massenspektrometer timsTOFTMPro (Bruker Daltonik GmbH) vermessen. Der genaue Ablauf wurde bereits in Abschnitt 2.3.6.6 beschrieben.

2.3.7.3 Annotation der Peptide und Analyse der Daten

Die Analyse der Rohdaten erfolgte mittels der Software PEAKS Version Xpro, indem die Rohdaten importiert und anschließend unter Verwendung der Parameter in Tabelle 2.3.6 ausgewertet wurden. Mit der Ausnahme, dass als Massenfehlertoleranz für das Ausgangsion 30,0 ppm gewählt wurde. Darüber hinaus wurde eine zusätzliche variable Modifikation mit eingepflegt. Diese Modifikation entspricht der Masse des Cystobactamids nach Abspaltung von Stickstoff und kann an jeder beliebigen Aminosäure vorgefunden werden. Zur Annotation der Peptide wurde das *E. coli* BW25113 Proteom verwendet.

Die modifizierten Bereiche wurden anschließend in der 3D Struktur der *E. coli* Gyrase markiert und mit bereits für Quinolon-Resistenzen bekannten Aminosäuren verglichen. Für die Darstellung und Markierung der 3D Struktur wurde die Software ChimeraX 1.1 und ein PDB Export der DNA-Gyrase verwendet (PDB Nr. 6krv und 6rkw).

2.4 Ergebnisse und Diskussion

2.4.1 Charakterisierung von Cystobactamiden mit einem Photoschalter im Molekül

Zur Charakterisierung der Cystobactamide mit einem Photoschalter im Moleküle können mehrere Parameter betrachtet werden. Zum einen bieten kinetische Daten Informationen über die Stabilität solcher Moleküle. Zum anderen kann über biologisch basierte Experimente ermittelt werden, in wie weit sich die Konfigurationsänderung im Molekül auf dessen biologische Aktivität auswirkt. Im Folgenden sind die Ergebnisse für die kinetische und biologische Charakterisierung eines N-terminalen (GT4-059), eines C-terminalen (GT4-181) und eines doppelten Photoschalters (AR446) gezeigt.

2.4.1.1 Kinetische Charakterisierung - UV/Vis-Spektren, Aktivierungsenergie und Halbwertszeit

Zur Aufklärung der optischen Aktivität von Molekülen mit einem Photoschalter wurden UV/Vis-Spektren einer 0,5 mM Lösung in DMSO aufgenommen. In Abbildung 2.4.1 sind die UV/Vis-Spektren der drei Photoschalter im photostationären und Grundzustand mit den dazugehörigen Strukturformeln dargestellt.

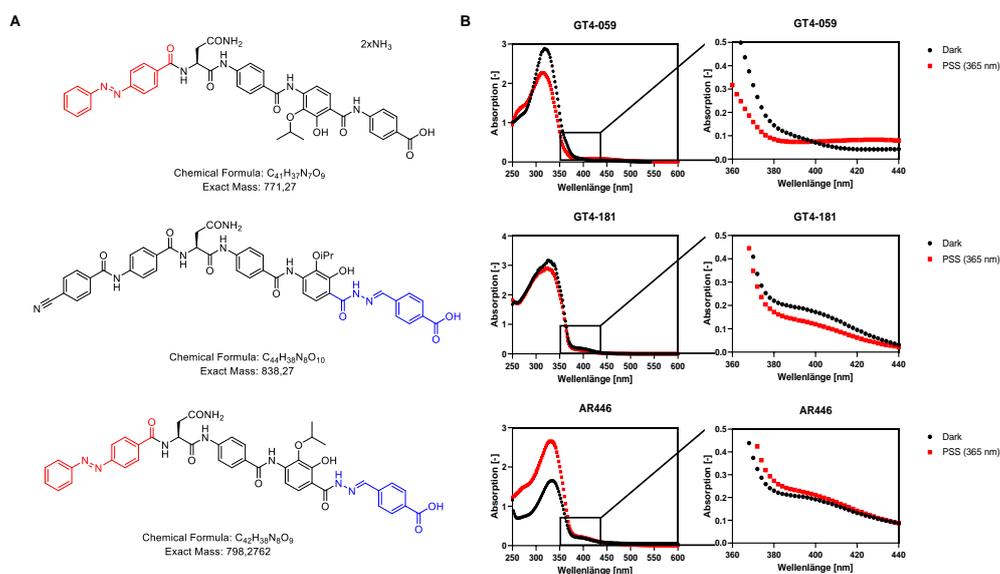


Abbildung 2.4.1: A) Chemische Strukturen der Photoschalter von oben nach unten: N-terminal GT4-059, C-terminal GT4-181 und doppelt AR446, B) UV/Vis-Spektren der 3 Kandidaten einmal im Grundzustand (Dark) und im photostationären Zustand nach Bestrahlung mit 365 nm für 1 h (PSS, 365).

Die UV/Vis-Spektren (Abb. 2.4.1) im Grundzustand sind für alle drei Kandidaten sehr ähnlich - sie weisen eine maximale Absorption bei etwa 324 nm auf. Zusätzlich kann in den Spektren zu dem C-terminalen und dem doppelten Photoschalter ein weiteres lokales Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 400 nm beobachtet werden. Dieses lokale Absorptionsmaximum scheint charakteristisch für die C-terminale Modifikation zu sein, da es bei dem N-terminalen Schalter nicht auftaucht. Betrachtet man die UV/Vis-Spektren des photostationären Zustandes nach Bestrahlung mit 365 nm für 1 h wird deutlich, dass sich hauptsächlich die Absorption bei

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

324 nm verändert und der restliche Verlauf der Kurve überwiegend gleich bleibt. Bei der N- und C-terminalen Modifikation wird eine Reduktion der Absorption bei 324 nm um 0,7 bei GT4-059 bzw. um 0,2 bei GT4-181 beobachtet, wobei bei dem Molekül mit doppelter Modifikation die Absorption bei 324 nm um 1 ansteigt. Durch Aufnahme der UV/Vis-Spektren im Grund- und angeregten Zustand konnte die Konfigurationsänderung und damit einhergehende Änderung in der optischen Eigenschaft des Moleküls nachgewiesen werden. Lerch *et al.* zeigen, dass bei Azobenzenen durch Anregung mit Licht die Absorption bei 365 nm auf null absinkt [122]. Auch wenn sowohl in GT4-059 als auch in dem doppelten Schalter AR446 das Azobenzen als photoaktive Gruppe vorkommt, ist eine so starke Abnahme in der Absorption bei 365 nm nicht zu beobachten. Eine mögliche Erklärung könnte dabei eine nicht vollständige Umwandlung von der *trans* in die *cis* Form sein. Um den Einfluss der Anregung mit UV-Licht auf die Konfigurationsverteilung des Moleküls zu charakterisieren stellt die Analyse via LC/MS im Grund- und photostationären Zustand eine gute Möglichkeit dar. Die Chromatogramme der drei Kandidaten sind in Abbildung 2.4.2 dargestellt. Die Verteilung auf die beiden Zustände lässt sich durch Integration der Peakflächen berechnen und ergibt sich zu den in Tabelle 2.4.1 dargestellten Prozenten.

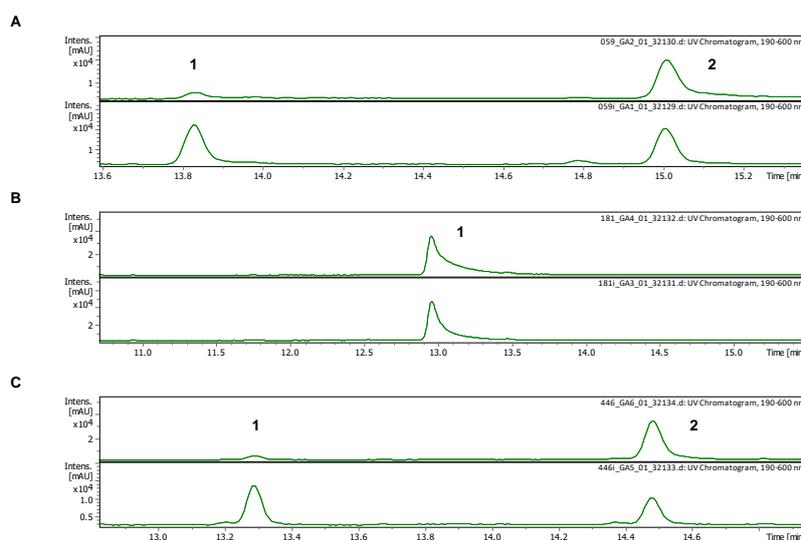


Abbildung 2.4.2: UV-Chromatogramme von GT4-059, GT4-181 und AR446 im Grund- und photostationären Zustand. A) GT4-059, B) GT4-181 und C) AR446 mit jeweils dem Grundzustand oben und dem angeregten Zustand darunter. Peak 1 beschreibt die *cis* und Peak 2 die *trans*-Form des jeweiligen Moleküls.

Tabelle 2.4.1: Verteilung der *cis* und *trans*-Form im Grund- und photostationären Zustand für die drei Photoschalter GT4-059, GT4-181 und AR446.

		<i>cis</i> [%]	<i>trans</i> [%]
GT4-059	Grundzustand	11,9	88,1
	PSS (365 nm)	51,9	48,1
GT4-181	Grundzustand	0	100
	PSS (365 nm)	0	100
AR446	Grundzustand	7,4	92,6
	PSS (365 nm)	57,8	42,2

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Identifizierung der Konfigurationen der jeweiligen Peaks im Chromatogramm wurden von Giambattista Testolin mittels NMR-Spektroskopie ermittelt. Der Peak mit kürzerer Retentionszeit spiegelt die Population der *cis*-Konfiguration und der Peak mit längerer Retentionszeit die der *trans*-Konfiguration wieder. Auf Grundlage der LC/MS Messung kann für GT4-181 kein Unterschied zwischen dem Grund- und dem angeregten Zustand ermittelt werden (Abb. 2.4.2, Tab. 2.4.1). Im UV/Vis-Spektrum lässt sich jedoch eine Reduktion der Absorption bei 324 nm um 0,2 durch Anregung des Moleküls detektieren (Abb. 2.4.1). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnten ähnliche Wechselwirkungen mit der stationären Phase der Flüssigchromatographie-Säule sein. In dem Fall des C-terminalen Schalters scheint die Konfigurationsänderung die Polarität des Moleküls nicht stark zu beeinflussen, weshalb beide Formen - *trans* und *cis* - zur gleichen Zeit eluiert werden. Für die anderen beiden Photoschalter sind jedoch eindeutige Unterschiede zwischen Grund- und photostationären Zustand zu erkennen. Jedoch liegen die beiden Moleküle auch im Grundzustand nicht zu 100% in der *trans*-Form vor. Bei GT4-059 sind bereits 11,9% und bei AR446 7,4% der *cis*-Form vorhanden. Durch Anregung verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung der *cis*-Form zu 51,9% bei GT4-059 und zu 57,8% bei AR446. Ein hundertprozentiges Schalten kann jedoch nicht erzielt werden. Es wird lediglich ein in Richtung der *cis*-Form verschobenes Gleichgewicht beobachtet. Dieses Phänomen muss auch später in der Validierung der biologischen Experimente in Betracht gezogen werden, denn exakte Aussagen über die einzelnen Formen können nur dann getroffen werden, wenn diese in reiner Form vorliegen. Darüber hinaus erklärt das ausschließliche Vorkommen einer Mischpopulation der *cis*- und *trans*-Form sowohl im angeregten als auch im Grundzustand die nicht signifikante Abnahme der Absorption bei 365 nm im Vergleich zu Lerch *et al.* [122].

Im Folgenden wird der Unterschied in der Absorption bei einer Wellenlänge von 324 nm zwischen dem Grund- und dem photostationären Zustand verwendet, um kinetische Daten, wie die Aktivierungsenergie und Halbwertszeiten, zu bestimmen. Hierfür wird wie in Abschnitt 2.3.5.1 das Molekül durch Bestrahlung mit 365 nm für eine Stunde von dem Grund- in den photostationären Zustand überführt und anschließend die Absorption bei 324 nm bei unterschiedlichen Temperaturen von 30 bis 50°C vermessen. Unter der Annahme, dass die Rückreaktion von dem photostationären Zustand in den Grundzustand eine Reaktion erster Ordnung ist, konnten Geschwindigkeitskonstanten für die unterschiedlichen Temperaturen bestimmt und letztendlich zur Bestimmung der Aktivierungsenergie unter Verwendung der Arrhenius-Gleichung eingesetzt werden. In Abbildung 2.4.3 ist beispielhaft die Ermittlung der Aktivierungsenergie für GT4-059 dargestellt.

Die Absorption bei 324 nm über die Zeit bei unterschiedlichen Temperaturen wurde verwendet, um die dazugehörige Geschwindigkeitskonstante zu berechnen. Dafür wurde der natürliche Logarithmus der Konzentration des photostationären Zustandes, die wie in Abschnitt 2.3.5.1 beschrieben kalkuliert wurden, gegen die Zeit aufgetragen und aus der Steigung lässt sich, wie in Abbildung 2.4.3 dargestellt, die Geschwindigkeitskonstante k mit einem Wert von $k_{40^\circ C} = 3,1 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ bestimmen. Aus den unterschiedlichen Geschwindigkeitskonstanten kann letztendlich die Aktivierungsenergie durch Auftragung von $\ln(k)$ gegen die inverse Temperatur in K ermittelt werden und ergibt sich für GT4-059 zu 118,95 kJ/mol. In Tabelle 2.4.2 sind die kinetischen Daten für den N-terminalen, den C-terminalen und den doppelten Photoschalter zusammengefasst.

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

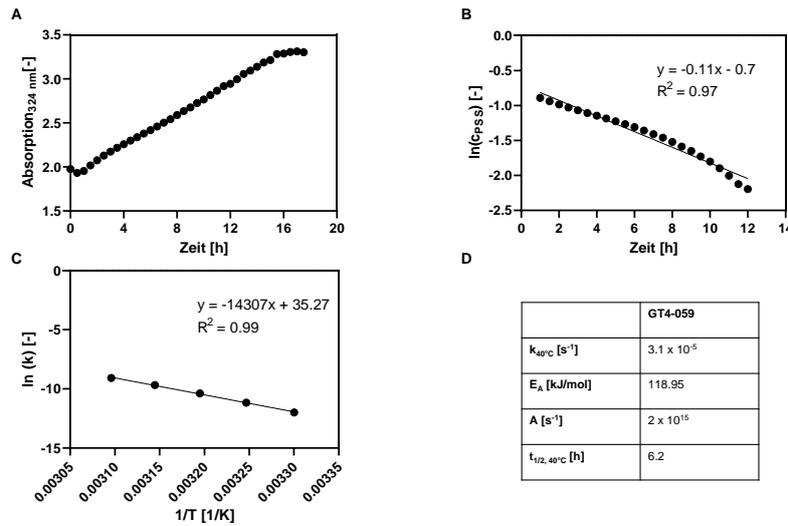


Abbildung 2.4.3: Beispielhafte Darstellung der Ermittlung der Aktivierungsenergie für GT4-059. A) Messung der Absorption bei 324 nm über die Zeit bei 40°C, B) Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten bei 40°C aus der Steigung durch Auftragung des natürlichen Logarithmus der Konzentration des photostationären Zustandes gegen die Zeit, C) Bestimmung der Aktivierungsenergie durch Auftragung des natürlichen Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten gegen das inverse der dazugehörigen Temperaturen - die Steigung ergibt die Aktivierungsenergie und der y-Achsenabschnitt den Faktor A.

Für alle drei Kandidaten wird deutlich, dass mit steigender Temperatur die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion von dem photostationären zurück in den Grundzustand zunimmt (Tab. 2.4.2). Dieses Phänomen lässt sich durch die Temperaturabhängigkeit einer Reaktion erklären. Mit steigender Temperatur nehmen die möglichen Molekülzusammenstöße und Molekülschwingungen zu, sodass der stabilere Grundzustand schneller erreicht wird [211]. Aus allen fünf Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen Moleküle lässt sich nach Arrhenius die Aktivierungsenergie E_A und der Faktor A berechnen. Sowohl die Aktivierungsenergie als auch A liegen in einem ähnlichen Bereich für alle drei Moleküle. Zhao *et al.* beschreiben die kinetischen Daten für Azobenzene mit einer Aktivierungsenergie von $E_A = 64 - 108 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ und A von $A = 5, 8 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ [124]. Daraus wird deutlich, dass diese Parameter molekülspezifisch sind und die Ähnlichkeit der Werte für die drei Photoschalter daher rührt, dass sie trotz unterschiedlicher Modifikationen grundsätzlich eine sehr ähnliche Molekülstruktur aufweisen. Die Halbwertszeiten leiten sich aus den jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten her und nehmen mit steigender Temperatur ab. Alle in Tabelle 2.4.2 dargestellten Größen sind miteinander verknüpft, denn durch steigende Geschwindigkeitskonstante sinkt die Halbwertszeit der dazugehörigen Temperatur und die Geschwindigkeitskonstante ist wiederum abhängig von der Aktivierungsenergie und dem Faktor A. Bei dem Vergleich von GT4-059 und GT4-181 wird deutlich, dass die erhöhten Halbwertszeiten für GT4-059 durch die um den Faktor 1,3 höhere Aktivierungsenergie zu erklären sind. AR446 weist ebenfalls eine niedrigere Aktivierungsenergie im Vergleich zu GT4-059 auf. Dieses Phänomen steht jedoch im Widerspruch mit den stark erhöhten Halbwertszeiten. Der Anstieg in den Halbwertszeiten trotz reduzierter Aktivierungsenergie, kann in diesem Fall durch den um Faktor 5,5 niedrigeren A-Wert, der sich aus der Stoßzahl und dem Orientierungsfaktor zusammensetzt, erklärt werden. Durch einen kleinen A-Wert reduziert sich die Geschwindigkeits-

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 2.4.2: Zusammenfassung der kinetischen Daten für GT4-059, GT4-181 und AR446.

	GT4-059	GT4-181	AR446
$k_{30^\circ C} [s^{-1}]$	$6,2 \cdot 10^{-6}$	$9,8 \cdot 10^{-6}$	$2,6 \cdot 10^{-6}$
$k_{35^\circ C} [s^{-1}]$	$1,4 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$
$k_{40^\circ C} [s^{-1}]$	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$2,4 \cdot 10^{-5}$
$k_{45^\circ C} [s^{-1}]$	$6,2 \cdot 10^{-5}$	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$3,4 \cdot 10^{-5}$
$k_{50^\circ C} [s^{-1}]$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$5,3 \cdot 10^{-5}$
$E_A [kJ \cdot mol^{-1}]$	118,95	105,69	115,88
A [s^{-1}]	$2,1 \cdot 10^{15}$	$5,5 \cdot 10^{13}$	$3,8 \cdot 10^{14}$
$t_{\frac{1}{2},30^\circ C} [h]$	43,1	19,6	74,0
$t_{\frac{1}{2},35^\circ C} [h]$	13,8	3,9	14,8
$t_{\frac{1}{2},40^\circ C} [h]$	6,2	1,2	8,1
$t_{\frac{1}{2},45^\circ C} [h]$	3,1	0,6	5,7
$t_{\frac{1}{2},50^\circ C} [h]$	1,8	0,6	3,6

konstante resultierend in einer höheren Halbwertszeit.

Zusätzlich zu kinetischen Daten zur Charakterisierung der Stabilität der Moleküle, gibt es bei Molekülen mit einem Photoschalter die Möglichkeit diese nicht nur mit Licht in den angeregten Zustand zu überführen, sondern unter Verwendung einer anderen Wellenlänge auch wieder zurück in den Grundzustand [212]. Für die Anregung wurde wie bereits beschrieben Licht der Wellenlänge 365 nm verwendet und für die Rückführung in den Grundzustand 450 nm. Die Wahl der Wellenlänge von 450 nm zur Rückführung in den Grundzustand resultiert aus dem UV/Vis-Spektrum von AR446. Neben dem Absorptionsmaximum bei etwa 350 nm weist AR446 ein lokales Maximum bei etwa 400 nm auf. Nach Knie *et al.* bietet dieses zweite lokale Absorptionsmaximum die Möglichkeit der Rückführung in den Grundzustand [213]. Dieser Wechsel zwischen dem angeregten und dem Grundzustand kann lediglich für den doppelten Photoschalter beobachtet werden, da hier der größte Unterschied im UV/Vis-Spektrum durch Bestrahlung entsteht. In Abbildung 2.4.4 sind links die UV/Vis-Spektren für AR446 nach Bestrahlung mit 365 nm und anschließend mit 450 nm (die verfügbare LED, die der Wellenlänge 400 nm am nächsten kommt) und rechts das Hin- und Herschalten zwischen den beiden Zuständen dargestellt.

In dem rechten Graphen (Abb. 2.4.4) wurde abwechselnd für 10 min mit 365 nm und anschließend mit 450 nm angeregt und jeweils die Absorption bei 350 nm bestimmt. Durch Bestrahlung mit 365 nm sinkt die Absorption bei 350 nm von etwa 1,8 auf etwa 1,2 ab und steigt durch Anregung mit 450 nm wieder auf etwa 1,6 an. Über die fünf dargestellten Intervalle ist dieses Phänomen zu beobachten - jedoch mit einem leichten Negativtrend. Der Grundzustand wird nicht mehr zu 100% erreicht, dafür nimmt aber auch die Absorption im angeregten Zustand stetig ab. Dieses Phänomen lässt eine fortschreitende Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der *cis*-Form von AR446 vermuten. Die Differenz zwischen den beiden Zuständen bleibt mit einem Wert von 0,4 überwiegend konstant. Mit dem Experiment konnte gezeigt werden, dass es möglich ist durch Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 450 nm das Molekül zurück in den Grundzustand zu überführen und damit die ursprüngliche Konfiguration wieder herzustellen. Somit kann ein An- und Ausschalten des Moleküls erzielt werden. Wenn beispielsweise die angeregte Form des Mole-

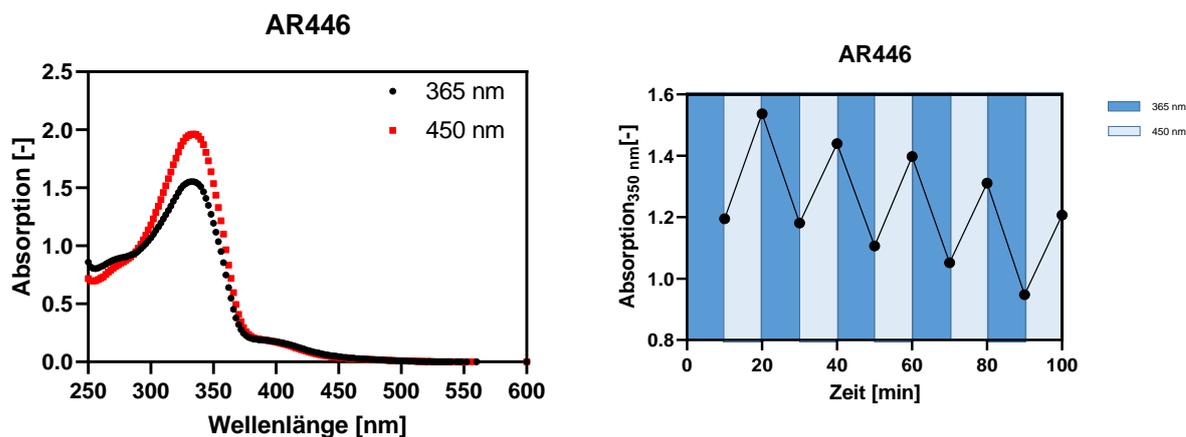


Abbildung 2.4.4: Wechselschalten des doppelten Photoschalter AR446 mit 365 nm und 450 nm. Links: UV/Vis-Spektren für AR446 nach Anregung mit 365 nm und anschließend mit 450 nm. Rechts: Absorption bei 350 nm nach den 10 minütigen Bestrahlungen mit Licht der Wellenlängen 365 nm und 450 nm im Wechsel.

küls eine deutlich höhere antibakterielle Aktivität aufweist, kann das Molekül nach Behandlung der Infektion durch Bestrahlung mit 450 nm wieder ausgeschaltet werden. Somit könnte man vermeiden biologisch aktive Antibiotika in die Umwelt freizusetzen und mögliche Resistenzen zu generieren. Im folgenden Abschnitt wird die Auswirkung der Konfigurationsänderung auf die biologische Aktivität genauer betrachtet.

2.4.1.2 Biologische Charakterisierung - antibakterielle Aktivität und Resistenzmechanismen

Zur Aufklärung des Einflusses der Konfigurationsänderung im Molekül auf die biologische Aktivität wurden mehrere Parameter betrachtet - zum einen die Auswirkung auf die antibakterielle Aktivität und enzymatische Gyrase-Hemmung und zum anderen die Auswirkung auf bekannte Resistenzmechanismen.

Zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität wurde die minimale Hemmkonzentration nach Abschnitt 2.3.3 ermittelt und der Einfluss auf die enzymatische Aktivität wurde über einen Gyrase Test nach Abschnitt 2.3.4 charakterisiert. Um den Einfluss der Konfigurationsänderung der Cystobactamide mit einem Photoschalter zu bestimmen, wurden die beiden Experimente jeweils für das Molekül im Grund- und im photostationären Zustand durchgeführt. In Tabelle 2.4.3 sind die jeweiligen Parameter dargestellt.

Tabelle 2.4.3: Charakterisierung der antibakteriellen Aktivität von Cystobactamiden mit einem Photoschalter. Darstellung der minimalen Hemmkonzentration und der enzymatischen Gyrase-Hemmung für Moleküle im Grund- und photostationären Zustand und dem jeweiligen Änderungsfaktor zwischen den beiden Zuständen auf Basis des Grundzustandes.

	MHK [$\mu\text{g/ml}$]			Gyrase IC ₅₀ [μM]		
	Grundzustand	PSS (365 nm)	Faktor	Grundzustand	PSS (365 nm)	Faktor
GT4-059	0,19	0,05	- 3,6	6,10	3,40	- 1,8
GT4-181	0,24	0,24	1,0	1,98	1,45	- 1,4
AR446	2,42	3,82	+ 1,6	1,51	1,19	- 1,3

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Durch die Konfigurationsänderung im Molekül soll ein An- und Ausschalten der Aktivität erzielt werden. Dieser Effekt kann bei keinem der drei Kandidaten beobachtet werden (Tab. 2.4.3). Jedoch wird ein Unterschied in der biologischen Aktivität deutlich. Beispielsweise sinkt für den N-terminalen Photoschalter in GT4-059 die MHK um 3,6 nach Anregung in den photostationären Zustand im Vergleich zum Grundzustand. Bei dem C-terminalen Photoschalter zeigt die Konfigurationsänderung keinen Einfluss auf die minimale Hemmkonzentration, aber im enzymatischen Gyrase Test ist die angeregte Form um das 1,4-fache aktiver als die Grundform. Allgemein ist für N- und C-terminale Photoschalter die angeregte Form aktiver als die Grundform, und das sowohl in Bezug auf die minimale Hemmkonzentration als auch auf den Gyrase IC₅₀-Wert. Bei dem doppelten Photoschalter ist jedoch die MHK der Grundform um den Faktor 1,6 höher als die der angeregten Form. Im Gyrase Test wird jedoch wieder der gleiche Trend, wie bei den einfachen Photoschaltern, deutlich. Diese Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, dass die angeregte Form von AR446 eine geringere Membranpermeabilität aufweist und demnach die Gyrase als Zielstruktur vermindert erreicht. Dieses Phänomen wurde vor allem bei Modifikationen des E-Rings bereits von Testolin *et al.* beobachtet [81]. Die Konfigurationsänderung im Molekül zeigt einen Effekt auf die biologische Aktivität der Moleküle, indem meist der photostationäre Zustand sowohl in der MHK als auch auf enzymatischer Ebene aktiver ist, dennoch bleibt der gewünschte Effekt des An- und Ausschaltens des Moleküls aus.

Resistenzmechanismen stellen häufig ein Problem bei der Wirksamkeit von Antibiotika dar und eine Konfigurationsänderung im Molekül kann ein Weg sein, eine mögliche Resistenz zu umgehen. Für Albicidin, dessen Struktur stark der der Cystobactamide ähnelt, bekannte Resistenzmechanismen sind zum einen die Spaltung durch das Enzym AlbD und zum anderen die Neutralisierung durch das Enzym AlbA. Um herauszufinden inwieweit die Konfigurationsänderung einen Einfluss auf die Resistenzmechanismen hat, wurden für AlbD wie in Abschnitt 2.3.5.4 mittels LC/MS die Spaltungsprodukte identifiziert und für AlbA nach Abschnitt 2.3.5.5 ein Agar-Diffusionsexperiment durchgeführt. Die Ergebnisse des AlbD Experiments sind in Abbildung 2.4.5 zusammengefasst.

AlbD spaltet die Peptidbindung zwischen Ring C und D mit den jeweiligen Spaltungsprodukten 2 und 3 (Abb. 2.4.5, links). Um herauszufinden ob die jeweiligen Moleküle durch AlbD gespalten werden, wurden sie jeweils mit und als Stabilitätskontrolle ohne Enzym für 30 min bei 28°C inkubiert und letztendlich mittels LC/MS analysiert. Die Chromatogramme sind in Abbildung 2.4.5 dargestellt und zeigen sowohl für die Moleküle im Grund- als auch im photostationären Zustand Spaltungsprodukte in der Anwesenheit von AlbD. Die Stabilität der Moleküle bei 28°C über einen Zeitraum von 30 min war gewährleistet, da ohne Zugabe des Enzyms lediglich die Ausgangsmasse der Moleküle detektiert wurde. Um die Auswirkung der Konfigurationsänderung besser beurteilen zu können, wurden die Peakflächen integriert und die beiden Zustände miteinander verglichen. Die integrierten relativen Peakflächen sind in Tabelle 2.4.4 aufgelistet. Dabei stellt die Summe aller Peaks eine relative Peakfläche von 100% dar. Die Peakflächen der Spaltungsprodukte werden addiert und als eine relative Peakfläche der Spaltungsprodukte dargestellt.

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

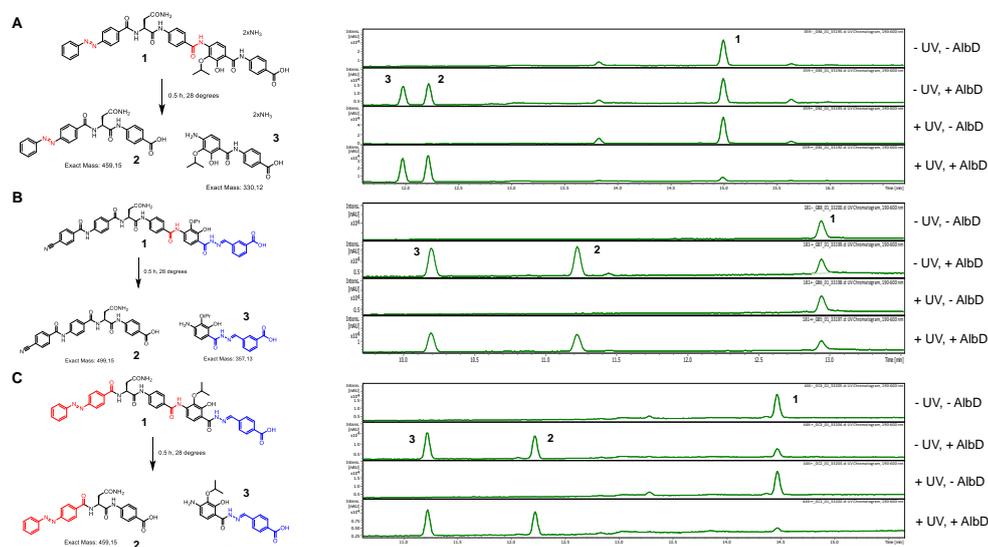


Abbildung 2.4.5: Ergebnisse des AlbD-Spaltungsexperiments für je einen N-, C- und doppelten Photoschalter. Links: Darstellung der Spaltungsprodukte von A) GT4-059, B) GT4-181 und C) AR446, Rechts: Darstellung der UV-Spur der Flüssigchromatographie. Das ungespaltene Molekül ist jeweils als 1 und die jeweiligen Spaltungsprodukte als 2 bzw. 3 gekennzeichnet.

Tabelle 2.4.4: Peakflächen der Spaltungsprodukte und des ungespalteten Moleküls in Anwesenheit (+ AlbD) und Abwesenheit (- AlbD) von AlbD und jeweils im Grund- (- UV) und angeregten Zustand (+ UV).

		Spaltungsprodukte [%]	ungespaltenes Molekül [%]
GT4-059	- UV, - AlbD	0	100
	- UV, + AlbD	60	40
	+ UV, - AlbD	0	100
	+ UV, + AlbD	97	3
GT4-181	- UV, - AlbD	0	100
	- UV, + AlbD	79	21
	+ UV, - AlbD	0	100
	+ UV, + AlbD	77	23
AR446	- UV, - AlbD	0	100
	- UV, + AlbD	86	14
	+ UV, - AlbD	0	100
	+ UV, + AlbD	91	9

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Betrachtet man die Chromatogramme scheint die Konfigurationsänderung keinen starken Einfluss auf die Aktivität von AlbD zu haben. Vergleicht man jedoch die Peakflächen der jeweiligen Bedingungen wird deutlich, dass vor allem für den N-terminalen Photoschalter GT4-059 die Grundform deutlich resistenter gegenüber der Spaltung von AlbD zu sein scheint. Es bleiben 40% ungespalten und bei dem photostationären Zustand lediglich 3%. Bei den anderen beiden Kandidaten lässt sich kein Effekt auf die Spaltung von AlbD durch die Konfigurationsänderung beobachten.

Zusätzlich zur Spaltung von AlbD stellt die Neutralisation von AlbA einen möglichen Resistenzmechanismus dar. Das Agar-Diffusionsexperiment wurde für beide Zustände der Photoschalter und jeweils in An- und Abwesenheit von AlbA nach Abschnitt 2.3.5.5 durchgeführt. In Abbildung 2.4.6 sind eine beispielhafte Agarplatte für GT4-059 gezeigt und die Durchmesser der Hemmhöfe in cm tabellarisch zusammengefasst.

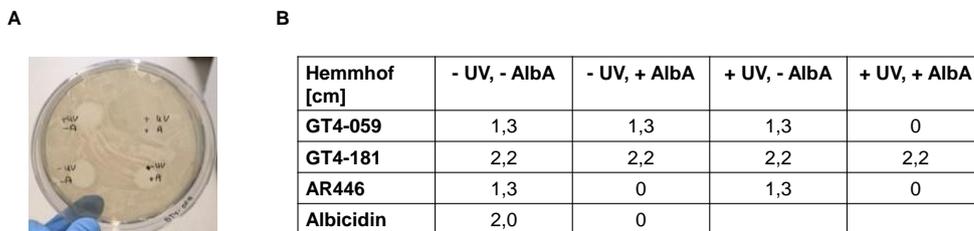


Abbildung 2.4.6: Zusammenfassung der Ergebnisse des AlbA Agar-Diffusionsexperiments. A: Beispielhafte Agarplatte mit den jeweiligen Hemmhöfen für GT4-059. B: Tabellarische Darstellung der Hemmhöfe (\varnothing in cm) in An- und Abwesenheit von AlbA und jeweils im Grund- und angeregten Zustand.

Um sicherzustellen, dass das Protein AlbA enzymatisch aktiv ist, wurde das Experiment parallel mit Albicidin durchgeführt und zeigt, dass in Anwesenheit von AlbA die antibiotische Wirkung von Albicidin neutralisiert wird und in Abwesenheit sich ein Hemmhof mit einem Durchmesser von 2 cm bildet (Abb. 2.4.6). Das Cystobactamid mit dem C-terminalen Schalter wird weder in der Grund- noch in der angeregten Form von AlbA neutralisiert. Auch bei dem Doppelschalter ist kein Unterschied zwischen den beiden Formen zu erkennen - es werden beide Formen durch Zugabe von AlbA neutralisiert und verlieren ihre antibiotische Aktivität. Bei dem N-terminalen Schalter wird jedoch ein signifikanter Unterschied deutlich. Die angeregte Form wird von AlbA neutralisiert wohingegen die Grundform auch in Anwesenheit von AlbA unveränderte Aktivität mit einem Hemmhof von 1,3 aufweist. Im Falle des N-terminalen Schalters wird deutlich, dass die Konfigurationsänderung im Molekül nach Bestrahlung mit UV-Licht dazu führt, dass AlbA in der Lage ist das Cystobactamid zu binden und damit zu neutralisieren. Vergleicht man GT4-059 mit der Struktur des Albicidins wird deutlich, dass durch die Konfigurationsänderung von *trans* nach *cis* sich die Strukturen stärker ähneln. Daraus ließe sich schlussfolgern, dass GT4-059 in der *cis*-Form besser in die Bindungstasche von AlbA passt und demnach eher neutralisiert wird.

Sowohl im AlbA als auch im AlbD Experiment zeigt sich die Grundform des N-terminalen Photoschalters als stabiler gegenüber den beiden Resistenzmechanismen. Durch Änderung der Konfiguration von *trans* zu *cis* wird GT4-059 sowohl leichter von AlbD gespalten als auch durch

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

AlbA neutralisiert. In diesem Falle könnte die Grundform in die angeregte Form von GT4-059 überführt werden, um das Antibiotikum durch Zugabe der jeweiligen Enzyme zu inaktivieren.

In diesem Kapitel wurden Cystobactamide mit einem oder mehreren Photoschaltern im Molekül auf ihre kinetischen und biologischen Eigenschaften charakterisiert. Die Konfigurationsänderung der Photoschalter nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 365 nm konnte mit Hilfe von UV/Vis-Spektren und LC/MS-Messungen gezeigt werden. Die LC/MS-basierten Messungen zeigten, dass sowohl im Grund- als auch im photostationären Zustand ein Gleichgewicht zwischen der *trans*- und der *cis*-Konfiguration besteht. Dieses Gleichgewicht wird durch Anregung mit 365 nm in Richtung der *cis*-Konfiguration verschoben. Die kinetischen Experimente zeigten vergleichbare Aktivierungsenergien für alle drei Kandidaten und spiegeln somit die Molekülspezifität dieser Größe wider. Die biologischen Charakterisierungen ergaben für GT4-059 eine um Faktor 3,6 erhöhte minimale Hemmkonzentration einhergehend mit einer 1,4-fachen Reduktion der Gyrase-Aktivität für die angeregte Form des Moleküls. Darüber hinaus konnte bei Betrachtung der Resistenzmechanismen festgestellt werden, dass die angeregte Form von GT4-059 sowohl stärker durch AlbD gespalten als auch durch AlbA neutralisiert wird. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Konfigurationsänderung von GT4-059 zu einer verbesserten Interaktion mit den jeweiligen Bindungstaschen von AlbD und AlbA führt. Dieser Effekt könnte für die gezielte Inaktivierung des Cystobactamids ausgenutzt werden.

2.4.2 Identifizierung sekundärer Zielstrukturen der Cystobactamide

Die Frage nach potentiellen sekundären Zielstrukturen oder gar einer neuen primären Zielstruktur resultiert aus der teilweise auftretenden Diskrepanz zwischen der minimalen Hemmkonzentration und den IC_{50} -Werten im Gyrase Test. Zum Beispiel zeigen manche Cystobactamide starkes antibakterielles Potential auf Grundlage der MHK aber nur geringe Aktivität im enzymatischen Gyrase Tests. Ein Beispiel hierfür stellt das Cystobactamid 26 aus Testolin *et al.* dar [81]. Aus diesem Grund wurden Cystobactamide speziell modifiziert, um eine spezifische Anreicherung von potentiellen sekundären Zielstrukturen zu erzielen. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Analyse von spezifisch angereicherten Proteinen mittels SDS-Page und Proteomstudien dargestellt.

2.4.2.1 Bestimmung der Wachstumskurven von *E. coli* BW25113 und *S. aureus* Newman

Die Aufnahme einer Wachstumskurve wurde durchgeführt, um den Eintrittszeitpunkt in die stationäre Phase und damit den Erntezeitpunkt für die Lysatherstellung zu bestimmen. Die Wachstumskurven für *E. coli* BW25113 und *S. aureus* Newman wurden, wie in Abschnitt 2.3.6.1 beschrieben, aufgenommen und sind in Abbildung 2.4.7 dargestellt.

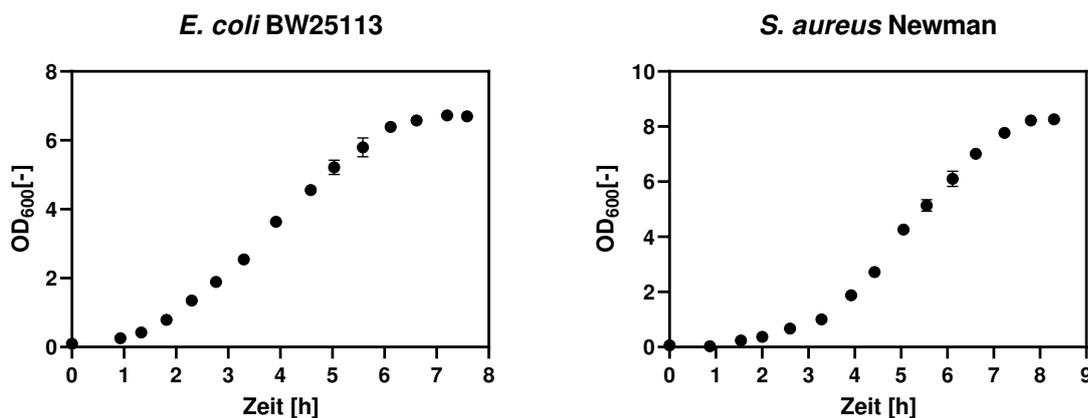


Abbildung 2.4.7: Wachstumskurven für *E. coli* BW25113 und *S. aureus* Newman in LB-Medium.

Durch Auftragung der optischen Dichte bei 600 nm gegen die Zeit werden die charakteristischen Phasen bakteriellen Wachstums sichtbar. Nach einer kurzen Lag-Phase wachsen die Bakterien exponentiell, bevor sie in die stationäre Phase übergehen. Die stationäre Phase ist bei *E. coli* BW25113 nach etwa 6 Stunden und bei *S. aureus* Newman nach etwa 8 Stunden erreicht. Daraus lassen sich die Erntezeitpunkte zu 7 h für *E. coli* BW25113 bzw. zu 9 h für *S. aureus* Newman bestimmen und werden im folgenden für die Lysatherstellung verwendet.

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.4.2.2 Validierung der für die spezifische Anreicherung modifizierten Cystobactamide

Durch das Einführen von Modifikationen in das Cystobactamid kann dessen antibakterielle Aktivität beeinflusst werden. Um zu gewährleisten, dass das Cystobactamid DK501 trotz Einführen eines Diazirins und eines Alkins seine antibakterielle Aktivität behält und damit als Molekül für die spezifische Anreicherung von Zielstrukturen verwendet werden kann, wurde die minimale Hemmkonzentration in *E. coli* BW25113 und *S. aureus* Newman nach Abschnitt 2.3.3 bestimmt. Das Konzentrations-abhängige Wachstum der Bakterien und daraus kalkulierten minimalen Hemmkonzentrationen sind in Abbildung 2.4.8 dargestellt.

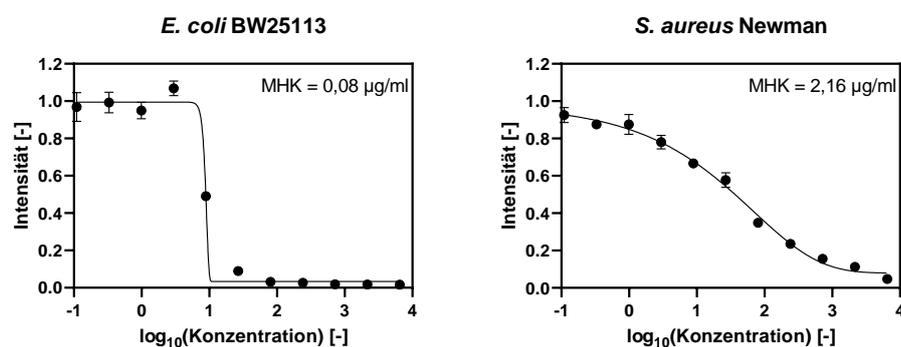


Abbildung 2.4.8: Darstellung des Konzentrations-abhängigen Wachstums von *E. coli* BW25113 und *S. aureus* Newman in Anwesenheit von DK501 und der daraus resultierenden minimalen Hemmkonzentrationen.

Durch Anpassen der konzentrationsabhängigen Intensitäten mit einer Gombertz-Gleichung konnten die minimalen Hemmkonzentrationen zu 0,08 µg/ml für *E. coli* BW25113 und zu 2,16 µg/ml für *S. aureus* Newman bestimmt werden. Für *E. coli* BW25113 ist die MHK für DK501 um das 11-fache niedriger als für den Naturstoff 919-2 mit einer MHK von 0,9 µg/ml [79]. Demnach stellt das Einführen eines Diazirins und Alkins in das Cystobactamid keinen Nachteil in der antibakteriellen Aktivität gegenüber *E. coli* BW25113 dar. Im Gegenteil wird die antibakterielle Aktivität sogar erhöht. Im Gegensatz dazu führen die Modifikationen im Cystobactamid zu einem Anstieg in der MHK gegenüber *S. aureus* Newman um den Faktor 20 im Vergleich zu dem Naturstoff 919-2 [79]. Allgemein bleibt die antibakterielle Aktivität jedoch bei beiden Bakterienstämmen erhalten und die Modifikationen führen nicht zur Inaktivierung des Cystobactamids. DK501 kann somit als potentielles Molekül zur spezifischen Anreicherung von Zielproteinen aus *E. coli* BW25113 und *S. aureus* Newman verwendet werden.

2.4.2.3 Optimierung der Klick-Reaktion

Die Klick-Reaktion des Cystobactamids an Biotin zur spezifischen Anreicherung gebundener Proteine über Streptavidin wurde zunächst nach einem Protokoll von Hoegel *et al.* durchgeführt. Zur Initiierung der Klick-Reaktion wurden zu 12 µM des Cystobactamids 0,06 mM Biotin-Azid, 0,3 mM 2-(4-((Bis((1-(tert-butyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl)amino)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetic acid (BTAA) als Ligand, 1,04 mM TCEP als Reduktionsmittel und 1 mM Kupfersulfat als Katalysator hinzugeben und für 1 h im Dunkeln unter leichtem Schüt-

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

teln inkubiert. Unter Verwendung dieser Klick-Reaktion wurden jedoch weder Gyrase noch andere Proteine reproduzierbar angereichert. Um der Ursache auf den Grund zu gehen, wurde das Gemisch der Klick-Reaktion massenspektrometrisch vermessen. Das geklickte Produkt aus Biotin und dem Cystobactamid konnte nicht detektiert werden. Demnach ist eine unter den Bedingungen nicht eintretende Klick-Reaktion der Grund für die nicht-spezifische und damit nicht-reproduzierbare Anreicherung von Proteinen in den vorangegangenen Experimenten. Für die Optimierung der Klick-Reaktion wurden mehrere Parameter betrachtet: Erhöhung der Konzentration des Cystobactamids, Verwendung eines anderen Liganden und Reduktionsmittels. Nach mehreren Versuchen konnte letztendlich in Anlehnung an die von Presolski *et al.* in Abschnitt 2.3.6 beschriebene Klick-Reaktion [204] das geklickte Produkt von DK501 und Biotin-PEG4-Azid massenspektrometrisch detektiert werden. In Abbildung 2.4.9 sind die “Extracted Ion” Chromatogramme für Biotin, DK501, THPTA und des geklickten Produkts der Klick-Reaktion in An- und Abwesenheit von DK501 jeweils zu Zeitpunkt 0, nach 1 h und nach 24 h Inkubation dargestellt.

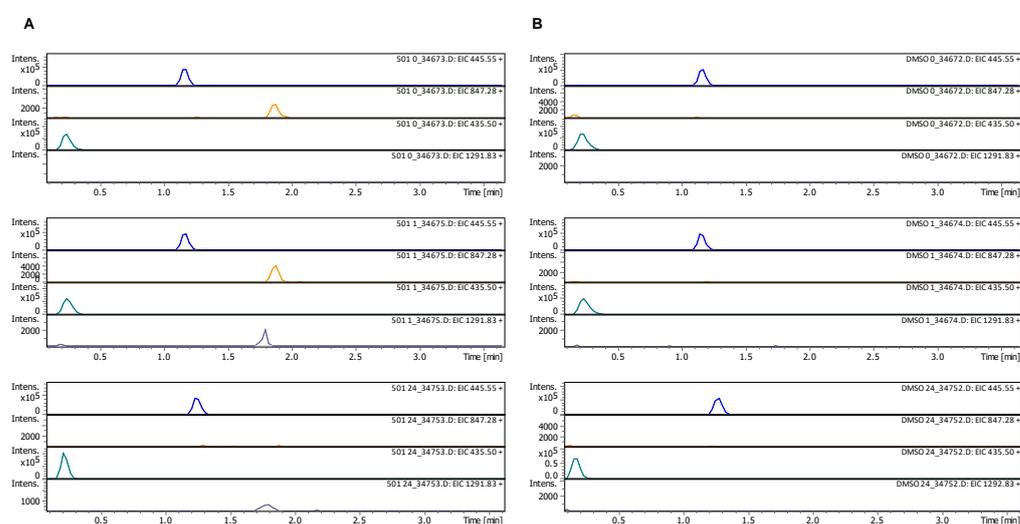


Abbildung 2.4.9: *Extracted Ion Chromatogramme der optimierten Klick-Reaktion für A) DK501 und B) DMSO jeweils zum Zeitpunkt 0 (oben) und nach einer Stunde (Mitte) und nach 24 h Inkubation (unten). Die jeweiligen “Extracted Ion” Chromatogramme zeigen: 1. Biotin (m/z 445,55), 2. DK501 (m/z 847,28), 3. THPTA (m/z 435,50) und 4. das geklickte Produkt (m/z 1291,83).*

Zum Startzeitpunkt kann weder in der DMSO noch in der DK501 Probe das geklickte Produkt mit einem Masse zu Ladungsverhältnis von 1291,83 Da detektiert werden. Doch nach einer Stunde Inkubation konnte das geklickte Produkt gemessen werden (Abb. 2.4.9). Es wird jedoch auch nach wie vor das Cystobactamid detektiert, das nicht zu 100% abreagiert ist. Nach 24 h kann das Cystobactamid allein nicht mehr detektiert werden, jedoch hat auch die Peakfläche des geklickten Produktes über 24 h nicht weiter zugenommen. Die längere Inkubationszeit führt demnach nicht zu einem höheren Umsatz sondern womöglich eher zum Abbau von sowohl DK501 als auch des bereits geklickten Produktes. Der Ligand THPTA mit einem Masse zu Ladungsverhältnis von 435,50 Da ist an der Klick-Reaktion beteiligt, wird jedoch nicht umgesetzt und wird demnach in allen Proben zu jedem Zeitpunkt in vergleichbarer Intensität detektiert.

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Trotz des Ausbleibens eines hundertprozentigen Umsatz von DK501 und dem Biotinazid zu dem Cystobactamid-Biotin-Komplex war jedoch die Detektion des geklickten Produkts bereits ein großer Fortschritt. Im Folgenden wird dieser Ansatz der Klick-Reaktion verwendet, um das Cystobactamid kovalent an Biotin-PEG4-Azid zu binden und es somit für die spezifische Affinitätsanreicherung von potentiellen Zielstrukturen zu verwenden.

2.4.2.4 Massenspektrometrische Proteomstudien mit DK501 auf *E. coli* BW25113 und *S. aureus* Newman Lysat

Die spezifische Anreicherung und Identifizierung von potentiellen sekundären Zielstrukturen in *E. coli* BW25113 und *S. aureus* Newman wurde nach Abschnitt 2.3.6 durchgeführt. Zur gelbasierten Visualisierung wurde ein trifunktionaler Linker mit Biotin und einem Fluorophor an das Cystobactamid geklickt und für die spezifische Anreicherung verwendet. Die dabei entstandenen Fluoreszenz-Bilder sind in Abbildung 2.4.10 dargestellt.

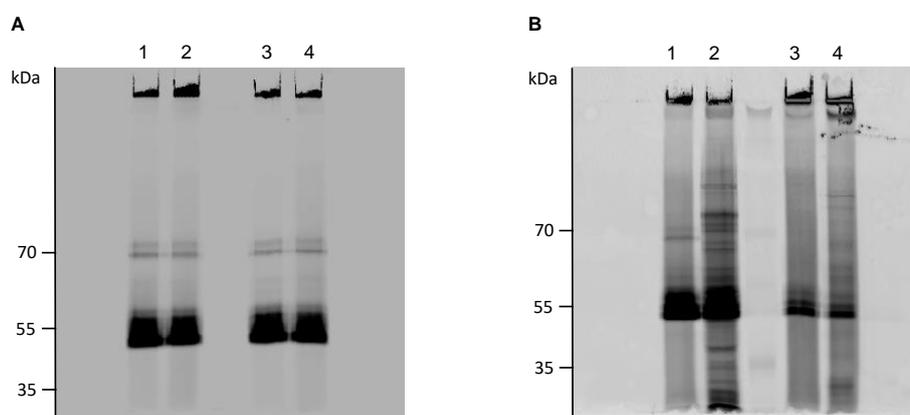


Abbildung 2.4.10: Darstellung der Fluoreszenz-Gelbilder spezifisch angereicherter Proteine unter Verwendung eines trifunktionalen Linkers. A) Klick-Reaktion nach Vernetzung im Lysat und B) Inkubation des Lysates mit dem bereits an Biotin geklickten Cystobactamid. Jeweils 1) DMSO *E. coli* BW25113, 2) DK501 *E. coli* BW25113 3) DMSO *S. aureus* Newman und 4) DK501 *S. aureus* Newman.

Gelbild A zeigt die angereicherten Proteine nach Klick-Reaktion im Lysat für *E. coli* BW25113 links und *S. aureus* Newman rechts mit jeweils erst der Negativkontrolle mit DMSO und als zweite Spur die Probe mit DK501 (Abb. 2.4.10). Es lassen sich in allen vier Spuren deutliche Banden bei etwa 70 und 50 kDa erkennen, und das sowohl in den jeweiligen Negativkontrollen als auch in den Proben. Daraus lässt sich schließen, dass in diesem Falle auch Proteine angereichert wurden, die nicht durch Vernetzung mit DK501 und anschließender Klick-Reaktion an Biotin spezifisch für die Anreicherung markiert wurden. Eine mögliche Erklärung für das Vorkommen von Banden in sowohl der Negativkontrolle als auch in der Probe ist eine unspezifische Bindung von Biotin an beliebige Proteine auch ohne das Vorhandensein des Cystobactamids und somit einer unspezifischen Anreicherung von Proteinen, die nicht auf DK501 zurückzuführen sind. Eine weitere Möglichkeit stellt das natürliche Vorkommen von biotinylierten Proteinen in beispiels-

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

weise *E. coli* dar. *E. coli* ist in der Lage ein Protein zu biotinylieren - Biotincarboxylase (EC: 6.4.1.2) mit einem Molekulargewicht von 49 kDa. Biotincarboxylase ist eine Komponente des Acetyl-CoA-Carboxylase-Komplexes und katalysiert die Carboxylierung des Transportproteins gefolgt von dem Transcarboxylase-Transfer der Carbonyl-Gruppe bei der Malonyl-CoA entsteht. Dieses Molekulargewicht würde mit der in allen Proben vorkommenden Bande bei 50 kDa übereinstimmen und würde die Präsenz der Bande auch in Abwesenheit von DK501 erklären [214]. Die Abwesenheit von Banden, die ausschließlich in der DK501 Probe vorkommen, muss nicht zwangsläufig bedeuten, dass keine Proteine spezifisch angereichert wurden. Denn möglicherweise sind die angereicherten Proteine lediglich in einer sehr niedrigen Konzentration vorhanden und können somit nicht detektiert werden. Das Detektionslimit von TAMRA markierten Proteinen liegt bei etwa 1-130 ng pro Bande [215] was schon sehr sensitiv ist. Jedoch ist eine massenspektrometrische Vermessung der Proteine mit einer Detektionsrate von 1948 Proteinen pro 50 ng Protein [207] weitaus sensitiver.

Auf Gelbild B sind die angereicherten Proteine des Experiments mit vorangegangener Klick-Reaktion und Immobilisierung an Streptavidin und anschließender Inkubation und Vernetzung im Lysat dargestellt. Die vier Spuren zeigen jeweils die Negativkontrolle mit DMSO und die Probe mit DK501 für *E. coli* BW25113 links und *S. aureus* Newman rechts. Im Gegensatz zu Gelbild A sind hier deutliche Unterschiede sowohl für *E. coli* BW25113 als auch *S. aureus* Newman zwischen den jeweiligen Negativkontrollen und Proben zu erkennen. Die Banden in den Negativkontrollen sind nach wie vor zu erkennen, jedoch gibt es auch einige Banden, die ausschließlich in der Probe vorkommen, aber nicht in der Negativkontrolle und demnach auf spezifische Anreicherung durch das Cystobactamid zurückzuführen sind.

Mit beiden methodischen Ansätzen wurden neue Proben für LC/MS/MS basierte Proteomstudien generiert, massenspektrometrisch vermessen und statistisch analysiert. Bei den massenspektrometrischen Analysen konnten je nach Experiment 80-370 verschiedene Proteine detektiert werden. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind in Form von Volcano-Plots in Abbildung 2.4.11 für *E. coli* BW25113 (A-D) und für *S. aureus* Newman (E-H) dargestellt.

In allen Ansätzen, sowohl durch Klick-Reaktion im Lysat als auch durch vorgeschaltete Klick-Reaktion und anschließender Inkubation im Lysat, konnten viele Proteine detektiert werden. Durch Auftragung der $-\log_{10}(\text{p-Werte})$ gegen die Differenz zwischen DK501 und DMSO als $\log_2(\text{DK501/DMSO})$ wird in allen Fällen die Struktur eines Volcano-Plots sichtbar. Dabei sind die durch das Cystobactamid spezifisch angereicherten Proteine rechts und die durch DMSO angereicherten Proteine links dargestellt. Es konnten sowohl für *E. coli* BW25113 als auch *S. aureus* Newman unter Verwendung beider Anreicherungsverfahren einige Proteine statistisch signifikant mit einem p-Wert kleiner 0,05 und $\log_2(\text{DK501/DMSO})$ größer 2 angereichert werden. Diese Proteine sind jeweils in den Graphen in dem oberen abgetrennten rechten Bereich der Graphen dargestellt. In Tabelle 2.4.5 sind die jeweils drei am stärksten angereicherten Proteine der jeweiligen Experimente zusammengefasst.

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

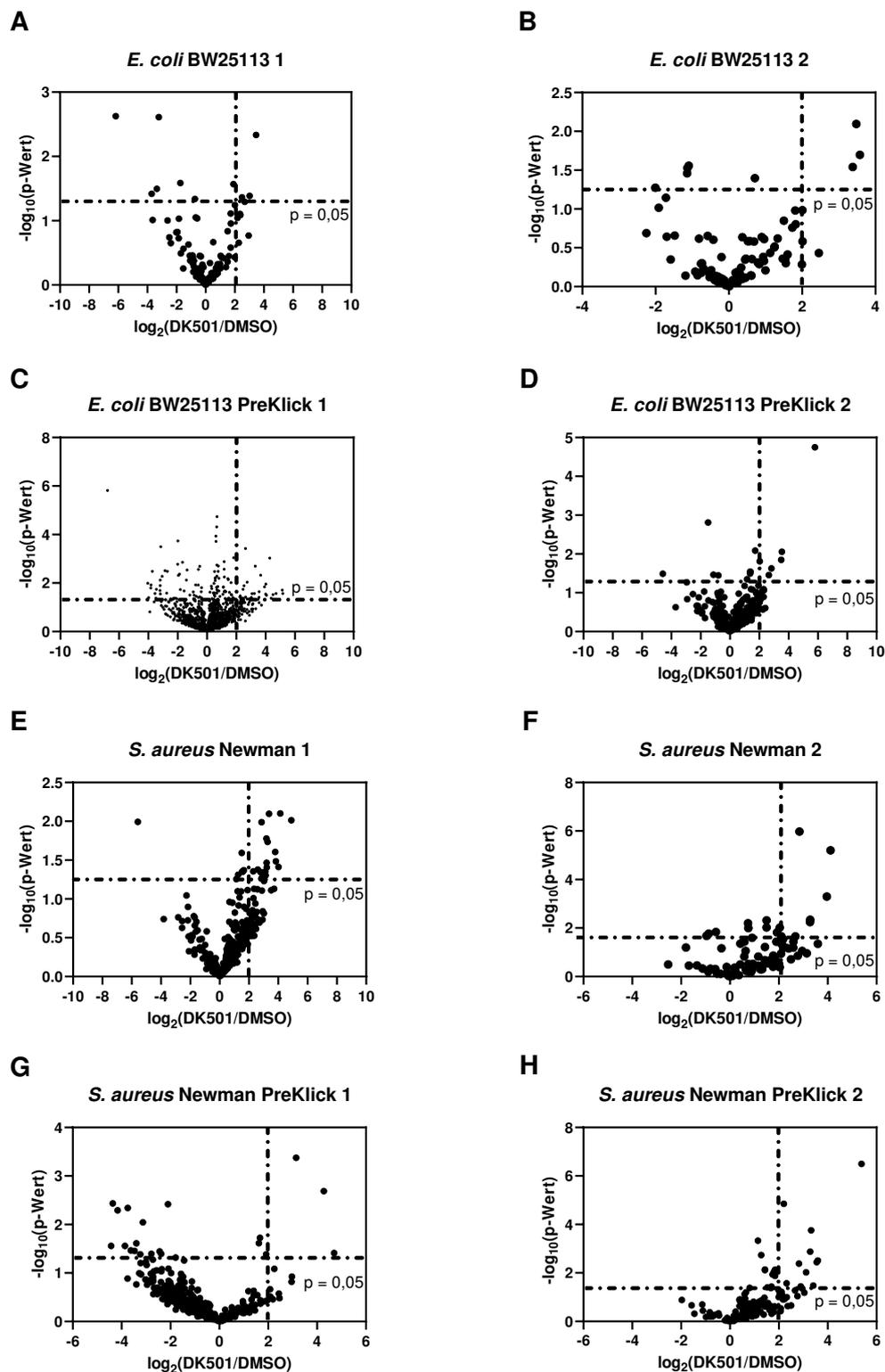


Abbildung 2.4.11: Darstellung der Volcano-Plots aller LC/MS/MS basierter Proteomstudien mit *E. coli* BW25113 (A-D) und *S. aureus* Newman (E-H) ($n=5$ je Kondition). Für *E. coli* BW25113 A+B) Replikate mit Durchführung der Klick-Reaktion im Lysat und C+D) Replikate mit Durchführung der Klick-Reaktion in Puffer und anschließender Inkubation im Lysat. Für *S. aureus* Newman E+F) Replikate mit Durchführung der Klick-Reaktion im Lysat und G+H) Replikate mit Durchführung der Klick-Reaktion in Puffer und anschließender Inkubation im Lysat. Spezifisch angereicherte Proteine mit $p < 0,05$ und $\log_2(\text{DMSO}/\text{DK501}) > 2$ sind jeweils oben rechts dargestellt.

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 2.4.5: Zusammenfassung der jeweils drei am stärksten signifikant angereicherten Proteinen in allen acht Experimenten.

Experiment	Protein	$-\log_{10}(\text{p-Wert})$	$\log_2(\text{DK501/DMSO})$
A	Inhibitor of vertebrate lysozyme	2,37	5,46
	Aerobic respiration control protein ArcA	2,11	3,91
	D-galactose binding periplasmic protein	1,39	3,02
B	D-galactose-binding periplasmic protein	1,78	5,08
	Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP(+)] GabD	1,44	4,88
	50S ribosomal protein L2	1,67	3,98
C	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase D	1,66	6,38
	PTS system N-acetylglucosamin specific EIICBA component	1,59	5,94
	Small conductance mechanosensitive channel	3,11	5,88
D	Quinone oxidoreductase 2	3,97	7,80
	Intermembrane phospholipid transport system binding protein MlaC	2,24	5,54
	Magnesium transport protein CorA	1,96	4,99
E	Peptidase M20/M25/M40 family protein	2,20	6,10
	Secretory antigen SsaA	1,95	5,04
	50S ribosomal protein L10	1,59	4,69
	Pyruvat dehydrogenase E1 component α subunit	0,84	3,54
F	30S ribosomal protein S5	6,52	6,12
	30S ribosomal protein S4	3,02	5,57
	50S ribosomal protein L18	2,38	4,88
	Pyruvat dehydrogenase E1 component α subunit	1,43	2,60
G	30S ribosomal protein S2	1,39	5,60
	Proline dipeptidase	2,67	5,48
	Uncharacterized protein NWMN_0155	4,56	4,64
H	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase aaa	7,79	7,89
	1.4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA-synthase	3,54	6,62
	Thioredoxin	5,53	5,83
	Pyruvat dehydrogenase E1 component β subunit	1,86	4,05

Allgemein wird deutlich, dass weder Gyrase noch Topoisomerase IV in keinem der Experimente signifikant angereichert und auch nur in den Experimenten C/D überhaupt detektiert wurden und das obwohl diese beiden Proteine bereits validierte Zielstrukturen der Cystobactamide darstellen. Die Abwesenheit von Gyrase und Topoisomerase IV stellen die eigentliche Anwendbarkeit dieser Methoden zur spezifischen Anreicherung von Zielstrukturen der Cystobactamide in Frage. Allerdings sind Gyrase und Topoisomerase IV beides Enzyme, die nur in sehr geringer Menge in der Zelle vorkommen (nur etwa 600 Gyrase-Moleküle pro Zelle [216]) und demnach möglicherweise im Vergleich zu Proteinen mit einer hohen Abundanz in der Zelle nur schwer anzureichern sind. Darüber hinaus sind Gyrase und Topoisomerase IV beides DNA bindende Moleküle, deren massenspektrometrische Erfassung durch die Bindung an DNA erschwert wird. Eine vorangehende Behandlung mit DNase zum Abbau der DNA könnte dieses Problem möglicherweise lösen [175]. Für *E. coli* BW25113 konnte die Untereinheit Gyrase A in dem Ansatz mit der vorangegangenen Klick-Reaktion (C/D) dennoch detektiert werden und war sogar in den Proben mit DK501 leicht angereichert (C: $-\log_{10}(\text{p-Wert}) = 1,33$ und $\log_2(\text{DK501/DMSO}) = 0,34$, D: $-\log_{10}(\text{p-Wert}) = 0,63$ und $\log_2(\text{DK501/DMSO}) = 2,71$). Betrachtet man jedoch die anderen angereicherten Proteine kristallisiert sich für *E. coli* BW25113 (A-D) kein allgemeiner Trend heraus, da bei jedem

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

der vier Experimente neue Proteine angereichert vorkommen. Für *S. aureus* Newman konnte dahingegen ein Protein identifiziert werden, das in drei der vier Experimente signifikant angereichert wurde. Bei dem Protein handelt es sich um sowohl die α als auch die β Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase E1 Komponente.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse einschätzen zu können wurden sowohl die Abundanzen der identifizierten Proteine der jeweiligen Proben pro Experiment als auch die Abundanzen der Wiederholungsexperimente gegeneinander aufgetragen. In Abbildung 2.4.12 ist jeweils ein Beispiel für die Abundanz innerhalb eines Experiments im Lysat für *E. coli* BW25113 (A) und *S. aureus* Newman (B) und zwischen den Wiederholungsexperimenten für *E. coli* BW25113 (C) und *S. aureus* Newman (D) dargestellt.

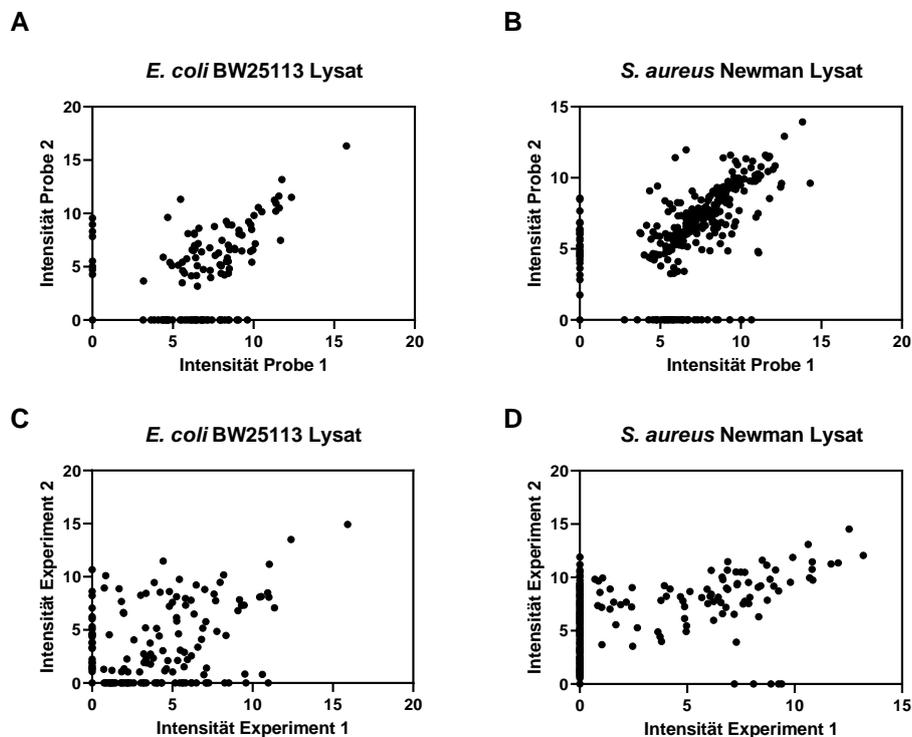


Abbildung 2.4.12: Darstellung der Abundanzen der identifizierten Proteine innerhalb eines Experiments (A für *E. coli* Bw25113 und B für *S. aureus* Newman) und zwischen den Wiederholungsexperimenten (C für *E. coli* Bw25113 und D für *S. aureus* Newman).

Die Graphen A und B zeigen eine gute Reproduzierbarkeit zwischen den Proben innerhalb eines Experimentes. Lediglich einige Proteine, die durch Punkte auf den Achsen dargestellt sind, werden ausschließlich in einer der Proben detektiert, doch allgemein lässt sich ein linearer Zusammenhang erkennen. Bei dem Vergleich der Wiederholungsexperimente werden viele Proteine ausschließlich in einer der beiden Proben detektiert. Darüber hinaus ist ein linearer Zusammenhang der beiden Experimente kaum erkennbar. Die geringe Reproduzierbarkeit lässt sich möglicherweise auf unspezifische durch die Vernetzung herbeigeführte Bindungen des Cystobactamids an Proteine, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in ausreichender Nähe zu dem Molekül befanden und somit markiert wurden, erklären. Auch die allgemeine sehr hohe Protein-

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

bindung der Cystobactamide kann die mangelnde Reproduzierbarkeit der Experimente erklären. Darüber hinaus wurde bei der Klick-Reaktion, wie in Abschnitt 2.4.2.3 beschrieben, kein 100%-iger Umsatz erreicht und demnach wurden vor allem bei der Klick-Reaktion im Lysat potentielle Kandidaten durch Ausbleiben der Markierung mit Biotin nicht spezifisch angereichert. Trotz geringer Reproduzierbarkeit der Wiederholungsexperimente konnte eine potentielle sekundäre Zielstruktur in *S. aureus* Newman identifiziert werden.

Um die Pyruvatdehydrogenase als potentielles sekundäres Zielprotein in *S. aureus* Newman zu validieren, wurde der Einfluss von DK501 auf die enzymatische Aktivität der aus *S. aureus* Newman aufgereinigten Pyruvatdehydrogenase (PDH) bestimmt. Die Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt dargestellt.

2.4.2.5 Validierung potentieller sekundärer Zielstrukturen

Eine Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase konnte für *S. aureus* Newman als potentielle sekundäre Zielstruktur auf Grundlage der in Abschnitt 2.4.2.4 aufgeführten Ergebnisse identifiziert werden. Zur Validierung der Pyruvatdehydrogenase als potentielles Zielprotein der Cystobactamide wurde diese zunächst aus *S. aureus* Newman nach Abschnitt 2.3.6.8 aufgereinigt. Anschließend wurde die enzymatische Aktivität in An- und Abwesenheit von DK501 bestimmt. In Abbildung 2.4.13 ist neben einem Gelbild des aufgereinigten *S. aureus* Newman-Lysats, einem Beispiel der Bestimmung der Enzymaktivität durch Messung des Umsatzes von β -NAD zu β -NADH auch eine tabellarische Zusammenfassung der Enzymaktivitäten dargestellt.

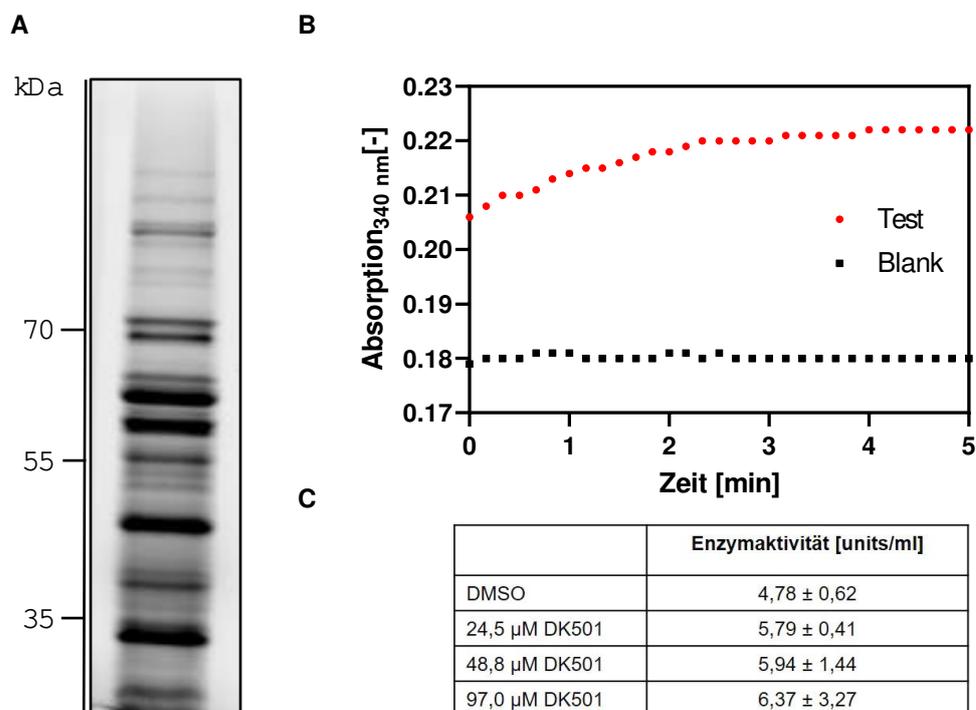


Abbildung 2.4.13: Darstellung des Gelbildes des aufgereinigten Lysates (A), der enzymatischen Aktivität von PDH ohne Inhibitor (B) und einer tabellarischen Zusammenfassung der Enzymaktivitäten mit steigender Konzentration von DK501 in Doppelbestimmung (C).

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Auch nach Durchführung der Aufreinigung zur Gewinnung der Pyruvatdehydrogenase aus *S. aureus* Newman nach Abschnitt 2.3.6.8 handelt es sich nicht um das reine Enzym, sondern lediglich um ein aufgereinigtes Lysat. Die Bestandteile des PDH-Komplexes lassen sich jedoch als potentielle Banden bei 41,4 kDa für PDH Komponente E1 Untereinheit α , bei 35,2 kDa für die Untereinheit β und bei 46 kDa für die Dihydrolipoyl-Transacetylase Komponente erkennen (Abb. 2.4.13, A). Mit diesem aufgereinigten Lysat wurde anschließend die enzymatische Aktivität des PDH-Komplexes bestimmt (Abb. 2.4.13, B). Die Absorption bei 340 nm wurde verwendet, um die Zunahme an β -NADH durch Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und somit die Enzymaktivität zu bestimmen. Während die Absorption bei 340 nm in Anwesenheit der Pyruvatdehydrogenase zunimmt, bleibt die Absorption des Blanks konstant. Aus der ansteigenden Absorption wurde letztendlich die Enzymaktivität nach Gleichung 2.5 berechnet und ist in An- und Abwesenheit von DK501 tabellarisch in Duplikaten in Abbildung 2.4.13, C dargestellt. Dabei ergibt sich für das reine Enzym eine Aktivität von 4,78 units/ml. Durch Zugabe von DK501 wird nicht, wie von einem Inhibitor potentiell erwartet, die Enzymaktivität reduziert, sondern ein Anstieg in der Aktivität um den Faktor 1,2 bis 1,3 kann beobachtet werden. Das heißt, der gewünschte Effekt der Inhibition des PDH-Komplexes konnte nicht gezeigt werden, dennoch scheint DK501 in irgendeiner Form mit dem PDH-Komplex zu interagieren. Um dies zu prüfen, wurde DK501 mit dem aufgereinigten Lysat inkubiert, über Vernetzung kovalent gebunden, mit einem Fluorophor über Klick-Reaktion markiert und anschließend mittels SDS-Page visualisiert. In Abbildung 2.4.14 sind die Gelbilder der Gesamtproteinfärbung mittels Coomassie (links) und der mit Fluorophor markierten Proteine (rechts, gleiche Spur wie 2/3) dargestellt.

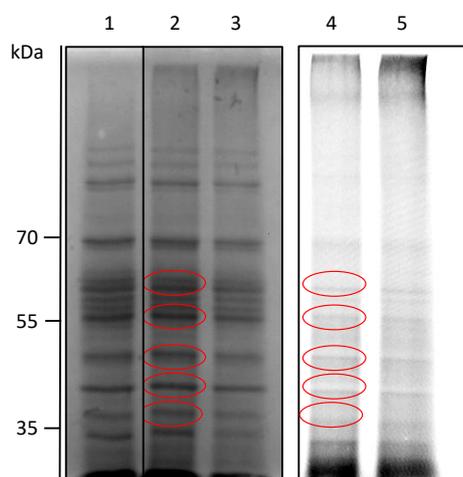


Abbildung 2.4.14: Darstellung der Gelbilder nach Gesamtproteinfärbung mit Coomassie (links) und durch Fluorophor markierte Proteine (rechts). In der Gesamtproteinfärbung der Inkubation des aufgerinigten Lysates mit 1) DMSO, 2) DK501 3) DK501 und die Spuren 4/5 stellen die Spuren wie 2/3 dar, jedoch nach Visualisierung der Fluorophor-markierten Proteine. Spuren 2/3 bzw. 4/5 stellen identische Replikate dar.

Durch In-Gel-Fluoreszenz konnten Banden detektiert werden, die durch Markierung mit dem Cytoctamid entstanden sind (Abb. 2.4.14). Eine hier detektierte Bande impliziert demnach eine Interaktion mit dem Protein und ist durch eine rote Umrandung markiert. Durch anschließende

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Färbung des Gesamtproteins auf dem Gel konnten die Banden sichtbar gemacht und die rot umkreisten Banden für den tryptischen Verdau ausgeschnitten werden. Der In-Gel-Verdau wurde nach Abschnitt 2.3.6.9 durchgeführt und nach massenspektrometrischer Analyse und Annotation der Proteine wurden die in Tabelle 2.4.6 aufgelisteten Proteine für die jeweiligen Banden (von oben nach unten 1-5 nummeriert) identifiziert.

Tabelle 2.4.6: Zusammenfassung der annotierten Proteine der Banden 1-5 aus Abbildung 2.4.14.

	Protein	Größe [kDa]	Abdeckung [%]
1	Formate-tetrahydrofolate ligase	59,9	87
2	ATP synthase subunit β	51,4	85
3	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit α	41,4	86
4	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit β	35,2	85
5	HPr kinase/phosphorylase	34,5	85

Für die Banden 3 und 4 konnten beiden Untereinheiten der E1 Komponente des PDH-Komplexes mit sehr hoher Sequenzabdeckung annotiert werden. Die Identifizierung der Untereinheiten und das auftretende Signal in dem Fluoreszenz-Gel sind zusammen starke Indizien dafür, dass das Cystobactamid an den PDH-Komplex bindet. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass DK501 mit dem PDH-Komplex interagiert, jedoch ohne dessen enzymatische Funktion stark zu beeinflussen. Die Markierung der 3 weiteren Proteine durch DK501 kann durch die sehr hohe Proteinbindung der Cystobactamide erklärt werden.

Schlussfolgernd konnte Pyruvatdehydrogenase nicht als sekundäres Zielprotein identifiziert werden, da keine inhibitorische Wirkung messbar war. Lediglich eine Interaktion zwischen dem Cystobactamid und dem PDH-Komplex konnte mittels Fluorophor-Markierung und Massenspektrometrie-basierten Proteomstudien festgestellt werden.

2.4.3 Charakterisierung der Gyrase-Bindungsstelle von Cystobactamiden unter Verwendung von Photoaffinitätsmarkierung (Photoaffinity Labeling, PAL)

Gyrase wurde bereits als Zielstruktur der Cystobactamide identifiziert, doch die genaue Bindungsstelle ist noch unbekannt. Zur Aufklärung der Interaktionspartner - also der exakten Aminosäuren - von der Gyrase mit den Cystobactamiden wurde eine Photoaffinitätsmarkierungsmethode (PAL) nach Abschnitt 2.3.7 verwendet. Da es sich bei Cystobactamiden um nicht-kovalente Inhibitoren handelt, wurde eine photoaktive Gruppe, ein Diazirin oder ein Azid, in des Molekül eingebaut. Durch UV-Bestrahlung wird Stickstoff freigesetzt und es entsteht entweder ein Carben (Diazirin) oder ein Nitren (Azid). Sowohl Carbene als auch Nitrene sind hoch reaktiv und binden kovalent an naheliegende C-H und N-H Bindungen. Durch Vorinkubation der Cystobactamide mit Gyrase wird gewährleistet, dass sich das Cystobactamid an die Bindungsstelle annähert, bevor die Vernetzung herbeigeführt wird. Die gelabelte Gyrase wurde mit Trypsin, GluC und Chymotrypsin verdaut und mittels LC/MS/MS charakterisiert.

2.4.3.1 Vorexperiment: Nachweis der Gyrase Aktivität und der Effektivität der Vernetzung

Zu Beginn der PAL Experimente wurde die Tauglichkeit der Verbindungen für eine solche Anwendung überprüft. Die inhibitorische Aktivität des Moleküls auf Gyrase muss weiterhin gewährleistet sein und die Modifikation muss ihren gewünschten Effekt erfüllen und kovalent an die Gyrase binden. Die Ermittlung der inhibitorischen Gyrase Aktivität wurde nach Abschnitt 2.3.4 durchgeführt. Für den Nachweis der erfolgreichen kovalenten Bindung wurde die rekombinante Gyrase ($0,7 \mu\text{M}$) mit dem Cystobactamid ($100 \mu\text{M}$) inkubiert und die Vernetzung wurde wie in Abschnitt 2.3.7 beschrieben herbeigeführt. Anschließend wurde nach Abschnitt 2.3.6 ein Fluorophor mittels Klick-Reaktion kovalent an den Gyrase-Cystobactamid-Komplex gebunden und mittels 10%-iger SDS-Page visualisiert.

Abbildung 2.4.15 zeigt, dass trotz der Modifikationen im Molekül die inhibitorische Gyrase Aktivität erhalten bleibt. Dabei scheint das Azid vorteilhafter für die Aktivität zu sein als das Diazirin, denn der IC_{50} -Wert von DK352 liegt bei $0.44 \mu\text{M}$ und der von DK501 nur bei $2.72 \mu\text{M}$. Beide Moleküle weisen jedoch nach wie vor inhibitorische Aktivität auf und sind demnach gute Kandidaten für PAL-Experimente. Die Gewährleistung der kovalenten Bindung des Cystobactamids ($100 \mu\text{M}$) an Gyrase ($0,7 \mu\text{M}$) nach Anregung der photoaktiven Gruppe mit 365 nm für das Diazirin und 340 nm für das Azid ist in Abbildung 2.4.16 gezeigt. In der Negativkontrolle, also in Abwesenheit des Cystobactamids, werden keine Banden sichtbar, doch sowohl DK352 als auch DK501 binden mittels photoaktiver Gruppe kovalent an sowohl Gyrase A als auch B. Diese Bindung konnte mittels Klick-Reaktion an ein Fluorophor visualisiert werden. Beide Ergebnisse qualifizieren die Verbindungen für die Photoaffinitätsmarkierung zur Charakterisierung der Gyrase-Bindungsstelle.

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

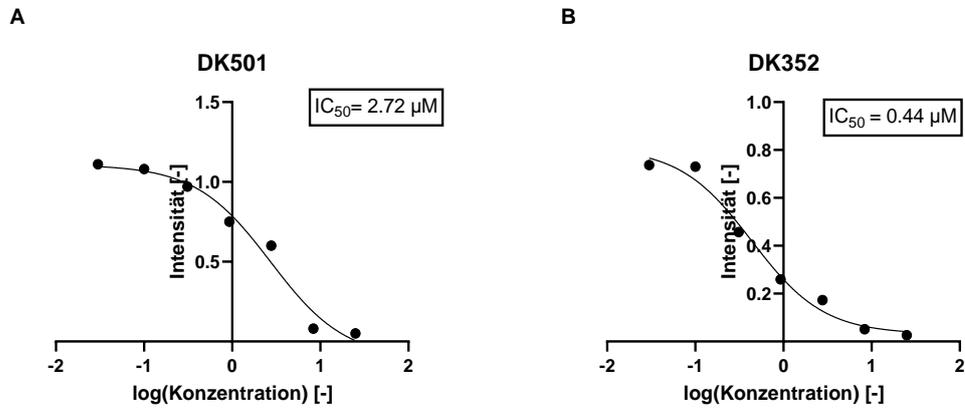


Abbildung 2.4.15: Ergebnisse des enzymatischen Gyrase Tests durch Auftragung der Intensität der DNA in superspiralierter Form gegen \log_{10} -Konzentration des Inhibitors in μM . A: DK501 mit einem Diazirin und B: DK352 mit einem Azid.

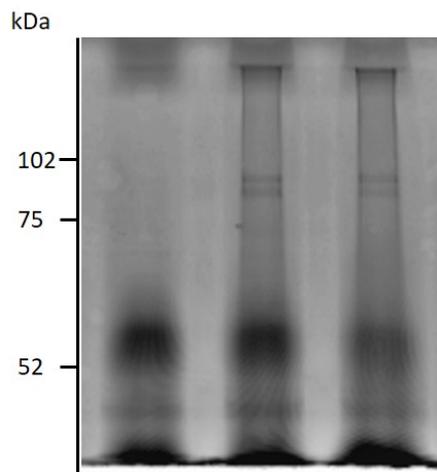


Abbildung 2.4.16: Darstellung der SDS-Page des Gyrase-Cystobactamid-Komplexes, das kovalent an einen Fluorophor geklickt wurde. Banden von links nach rechts: 1. Negativkontrolle mit DMSO, 2. DK352, 3. DK501. Das Gel wurde mittels Fluoreszenz-Gel-Reader TyphoonTM FLA 9500 (GE Healthcare) visualisiert.

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2.4.3.2 Vorexperiment: Ermittlung der charakteristischen Fragmentierungsmuster der Cystobactamide DK501 und DK352

Zur Validierung der automatisch annotierten Modifikationen wurden die Cystobactamide individuell massenspektrometrisch vermessen, um das Fragmentierungsmuster im MS2 Spektrum vorhersagen zu können. In den Abbildungen 2.4.17 und 2.4.18 sind die Fragmentierungsmuster der Cystobactamids DK501 (Abb. 2.4.17) und DK352 (Abb. 2.4.18) dargestellt, charakteristische Fragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet und stellen C-terminale Abspaltungen durch beispielsweise Ring D und E mit einem Masse zu Ladungsverhältnis von 313,118 dar. Das Auftreten der Fragmentionen der Verbindung mit nur geringen Abweichungen zur exakten Masse diente als ein Merkmal zur Bestätigung der Annotation. Als weiteres Kriterium wurde nach Peptidmassen abzüglich der Fragmentmassen gesucht. Bei Erfüllen einer oder mehrerer Kriterien wurde die Annotation als richtig anerkannt und eine mögliche Aminosäure, die an der Bindung beteiligt ist definiert.

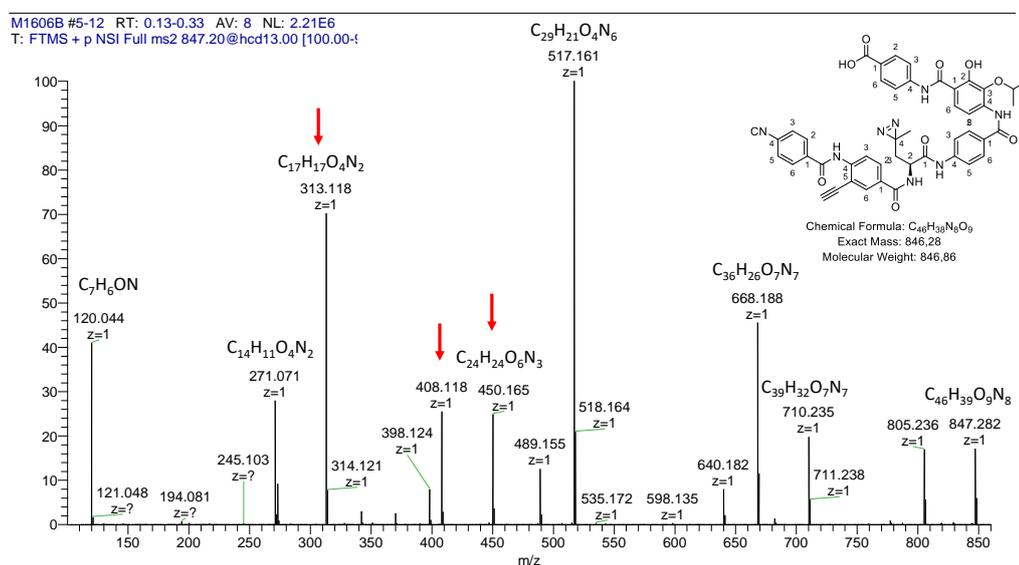


Abbildung 2.4.17: Fragmentierungsmuster des Cystobactamids DK501 im MS2 Spektrum. Charakteristische Fragmente sind jeweils mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Von links nach rechts 1) Abspaltung von Ring D und E, 2) Abspaltung von Ring C, D und E und zusätzlich Isopropyl, 3) Abspaltung von Ring C, D und E.

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

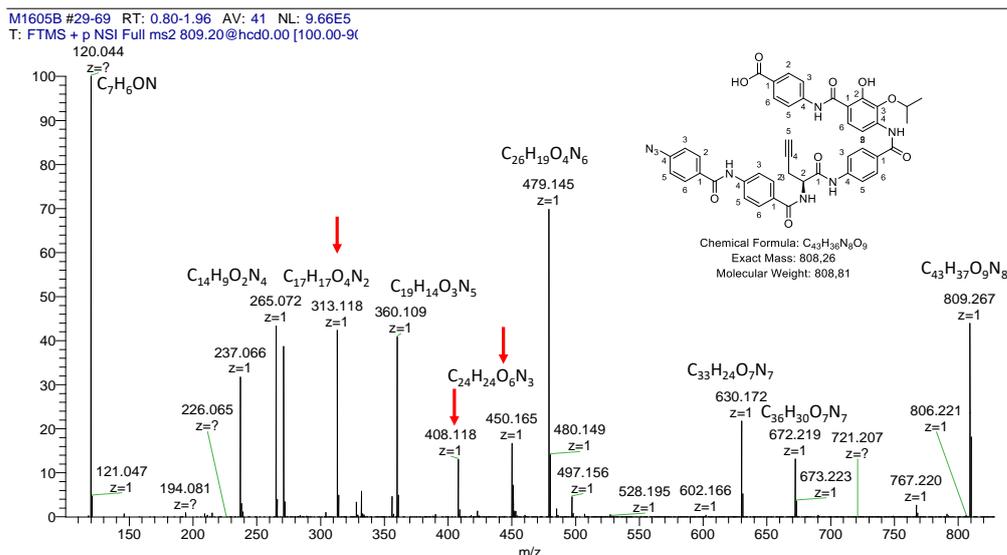


Abbildung 2.4.18: Fragmentierungsmuster des Cystobactamids DK352 im MS2 Spektrum. Charakteristische Fragmente sind jeweils mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Von links nach rechts 1) Abspaltung von Ring D und E, 2) Abspaltung von Ring C, D und E und zusätzlich Isopropyl, 3) Abspaltung von Ring C, D und E.

2.4.3.3 Photoaffinitätsmarkierung in Kombination mit Proteomstudien zur Charakterisierung der Bindungsstelle

Für die Charakterisierung der Bindungsstelle von Cystobactamiden an Gyrase ist es zunächst erforderlich, die Gyrase - sowohl GyrA als auch GyrB - mit einer hohen Sequenzabdeckung zu identifizieren. Hierfür wurde die Gyrase wie in Abschnitt 2.3.7 beschrieben mit DK501 bzw. DK352 gelabelt und anschließend in parallelen Experimenten mit Trypsin, GluC oder Chymotrypsin verdaut. Die Peptide wurden massenspektrometrisch vermessen und mit PEAKS Xpro unter Verwendung des *E. coli* BW25113 Proteoms annotiert. Eine Zusammenfassung aller annotierten Peptide und damit der gesamten Sequenzabdeckung von GyrA und GyrB ist in Abbildung 2.4.19 für DK501 beispielhaft dargestellt.

Durch den Einsatz von 20 μ l kommerzieller Gyrase von Inspiralis und Injektion von zwei Drittel der Probe konnte mit allen drei Verdauungsenzymen zusammen eine Sequenzabdeckung von 99,2% für GyrA und 99,6% für GyrB für DK501 erzielt werden. Auch unter Verwendung von DK352 wurde eine sehr hohe Sequenzabdeckung von 99,5% für GyrA und 99,6% für GyrB erreicht. Zusätzlich zur allgemeinen Identifizierung charakteristischer Peptide der *E. coli* Gyrase und den klassischen Modifikationen, wie Oxidation von Methionin und β -Methylierung von Cystein, wurde die Addition des Cystobactamids - 818,27 Da für DK501 und 780,25 Da für DK352 - als variable Modifikation an jede beliebige Aminosäure in die automatische Annotation der Peptide mit einprogrammiert. Die Darstellungsweise der Ergebnisse in der PEAKS Xpro Software nach Annotation der Peptide ist in Abbildung 2.4.20 beispielhaft für DK501 in Gyrase B (Bereich von Aminosäure 721-800) dargestellt.

Alle identifizierten potentiell modifizierten Aminosäuren in GyrA und GyrB wurden auf ihre Richtigkeit geprüft, indem eine Qualitätskontrolle der Annotation durchgeführt wurde. Dafür

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

GyrA 99,2 %					GyrB 99,6 %				
10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
MSDLAREITP	VNIEEELKSS	YLDYAMSVIV	GRALPDVRDG	LKPVHRRVLY	MSNSYDSSSI	KVLKGLDAVR	KRPGMYIGDT	DDGTGLHHMV	FEVVDNAIDE
60	70	80	90	100	60	70	80	90	100
AMNVLGNDWN	KAYKKSARVV	GDVIGKYHPH	GDSAVYDTIV	RMAQPFSRLY	ALAGHCKEII	VTIHADNSVS	VQDDGRGIPT	GIHPEEGVSA	AEVIMTVLHA
110	120	130	140	150	110	120	130	140	150
MLVDGQGNFG	SIDGDSAAAM	RYTEIRLAKI	AHELMADLEK	ETVDFVDNYD	GGKFPDDNSYK	VSGGLHGVGV	SVVNALSQL	ELVLIQREGKI	HRQIYEHGVP
160	170	180	190	200	160	170	180	190	200
GTEKIPDVMF	TKIPNLVNG	SSGIAVGMAT	NIPPHNLTEV	INGCLAYIDD	QAPLAVTGET	EKTGTWRFW	PSLETFINVT	EFEYEILAKR	LRELSFLNSG
210	220	230	240	250	210	220	230	240	250
EDISIEGLME	HIPGDPFPTA	AIINGRRGIE	EAYRTGRGKV	YIRARAEVIV	VSIRLRDKRD	GKEDHPHYEG	GIKAPVBYLN	KNKTFIHPNI	FYPSTKDGII
260	270	280	290	300	260	270	280	290	300
DAKTGREITII	VHEIPYQVKN	ARLIEKIAEL	VKEKRVEGIS	ALRDESDKDG	GVEVALQWND	GFQENIYCFE	NNIPQRDGT	HLAGFRAAMT	RTLNAVMDKE
310	320	330	340	350	310	320	330	340	350
MRIVIEVKRD	AVGEVVLNLL	YSQTLQVVSF	GIMVALVHGG	QPKIMNLKDI	GYSKKAKVSA	TGDDAREGLI	AVVSVKVPDP	KFSSQTKDKL	VSSEKSAVE
360	370	380	390	400	360	370	380	390	400
IAAFVRRHRE	VVTRRTIFEL	RKARDRAHIL	EALAVALANI	DPITIELIRHA	QQMNELLAEY	LLENPTDAKI	VVGKIIDAAR	AREAARRARE	MTRRKGALDL
410	420	430	440	450	410	420	430	440	450
PTPAEAKTAL	VANPWQLGNV	AAMLERAGDD	AARPEWLEPE	FGVRDGLYYL	AGLPGKLADC	QERDPALSEL	YLVEGDSAGG	SAKQGRNRKN	QAILPLKGI
460	470	480	490	500	460	470	480	490	500
TEQQAQAILD	LRLQKLTGLE	HEKLLDEYKE	LLDQIAELLR	ILGSADRLME	LNVEKARFDK	MLSSQEVATL	ITALGCGIGR	DEYNPDKRLY	HSIIMTDAD
510	520	530	540	550	510	520	530	540	550
VIREEELVLR	EQFGDKRRTTE	ITANSADINL	EDLITQEDVV	VTLSHQGYYK	VDGSHIRTL	LTFYRQMPPE	IVERGHVYIA	QPPLYKVKGG	KQEYQIKDDE
560	570	580	590	600	560	570	580	590	600
YQPLSEYEAQ	RRGGKGSAA	RIKEEDFIDR	LLVANTHDHI	LCFSSRGRVY	AMDQYQISIA	LDGATLHINA	SAPALAGEAL	EKLVSEYNAT	QKMINRERR
610	620	630	640	650	610	620	630	640	650
SMKVYQLPEA	TRGARGRPV	NLLPLEQDER	ITAILPVTFF	EEGVKVFMAT	YPKAMLELI	YQPTLLEADL	SDEQTVTRWV	NALVSELNDK	EQHGSQWKFP
660	670	680	690	700	660	670	680	690	700
ANGTVKKTVL	TEFNRLRTAG	KVAIKLVGDG	ELIGVDLTSG	EDEVMLFSAE	VHTNAEQNLF	EPIVVRVTRHG	VDTDVPDLDE	FITGGEYRRI	CTLGEKLRGL
710	720	730	740	750	710	720	730	740	750
GKVVRFKSS	VRAMGCNTTC	VRGIRLEGDD	KVVSILIVPRG	DGAILLATQN	LEEDAFIERG	ERRQPVASFE	QALDWLVKES	RRGLSIQRYK	GLGEMNPEQL
760	770	780	790	800	760	770	780	790	800
GYKRTAVAE	YPTKSRATKG	VISIKVTERN	GLVVGAVQVD	DCDQIMMID	WETTMDEPESR	RMLRVTVKDA	IAADQLFTTL	MGDVAEPRRA	FIEENALKAA
810	820	830	840	850	810	820	830	840	850
AGTLVTRTVS	EISIVGRNTQ	GVILIRTAED	ENNVGLQRVA	EPVDEEDLDT					
860	870								
IDGSAAEAGD	EIAPEVDVDD	EPEEE							

Abbildung 2.4.19: Sequenzabdeckung von GyrA (links) und GyrB (rechts) nach Verdau mit Trypsin, GluC und Chymotrypsin. Rot markierte Aminosäuren wurden in keinem der identifizierten Peptide der drei Verdauungsenzyme detektiert.

wurden die Spektren auf Vorkommen von charakteristischen Fragmenten des Cystobactamids (Abb. 2.4.17 für DK501, Abb. 2.4.18 DK352) im MS2 Spektrum oder nach Signalen, die beispielsweise die Masse des Gesamtpeptids nach Abspaltung eines charakteristischen Fragments darstellen, geprüft. Die Qualitätskontrolle ist im folgenden an einem Peptid aus Gyrase B (Abb. 2.4.20, rot umrandet) nach Trypsinverdau und Vernetzung mit DK501 beispielhaft dargestellt. Das Peptid trägt die potentielle Modifikation am Leucin mittig im Peptid (kleiner Buchstabe) und das MS2 Spektrum zur Identifizierung ist in Abbildung 2.4.21 dargestellt.

Zur Validierung der Annotation der einzelnen Aminosäuren des in Abbildung 2.4.21 dargestellten Peptids wurden die Abweichungen der exakten Massen im Verhältnis zu den tatsächlich detektierten Massen der Peptidfragmente in ppm betrachtet. Des Weiteren wurden die Rohdaten in DataAnalysis 5.2 dahingehend betrachtet, ob die für das Cystobactamid charakteristischen Fragmentmassen detektiert wurden und wenn ja mit welcher ppm-Abweichung zur tatsächlichen Masse. Für das in Abbildung 2.4.21 dargestellte Peptid ergaben sich folgende Werte, die in Tabelle 2.4.7 zusammengefasst sind.

Das Peptid VTVKDAIAADQLFTTImGDAVEPR, das die potentielle Modifikation des Cystobactamids am Leucin trägt, wurde mit einem Score von 36,78 annotiert. Es konnten alle drei charakteristischen Fragmentationen des Cystobactamids mit relativ hoher Genauigkeit - ppm-Abweichung von etwa -12 - detektiert werden (Tab. 2.4.7). In dem MS2-Spektrum ist ein sehr intensives Signal zu erkennen, das aber keinem Fragment des Petides zugeordnet werden konnte. Das Masse zu Ladungsverhältnis des Signals hat einen Wert von 3065,47 und wurde mit einer Intensität von 93,7% detektiert. Addiert man 330,134 hinzu, gelangt man zur Ausgangsmasse des Peptids mit der Modifikation des Cystobactamids. Das Signal entsteht also dadurch, dass von

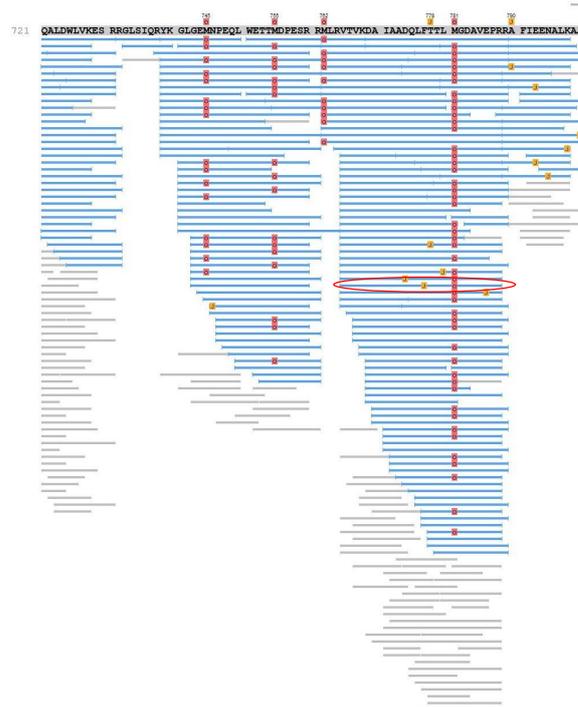


Abbildung 2.4.20: Beispielhafte Darstellung der Annotation der verschiedenen Peptide in GyrB Aminosäure 721 bis 800 nach Trypsinverdau, die mittels automatischer Auswertung mit PEAKS Xpro identifiziert wurden. Die blauen Balken zeigen ein eindeutig identifiziertes Peptid mit einem Score höher als 15, graue Balken mit Score unter 15. Rotes O markiert die Oxidation von Methionin und gelbes J die Modifikation durch das Cystobactamid DK501. Roter Kreis: Verwendung dieses Peptids zur Darstellung des Ablaufs der Auswertung.

dem Peptid das Fragment DE (m/z 312,12) des Cystobactamids plus Wasser abgespalten wurde und stellt somit eine weitere Validierung der Richtigkeit der Annotation dar. Dieses Vorgehen wurde für die Validierung aller potentiell modifizierten Peptide, sowohl durch DK501 als auch durch DK352, angewandt. In Tabelle 2.4.8 und 2.4.9 sind alle durch Qualitätskontrolle validierten Modifikationen mit dem dazugehörigen Score, den gefundenen Fragmentionen und den Peptidionen abzüglich eines Fragments für DK501 (Tab. 2.4.8) und für DK352 (Tab. 2.4.9) dargestellt.

Allgemein wird deutlich, dass die modifizierten Peptide vermehrt am Beginn von GyrA oder am Ende der Aminosäurekette von GyrB zu finden sind (Tab. 2.4.8 und Tab. 2.4.9). Die identifizierten Peptide für DK501 wurden überwiegend mit einem deutlich höheren Score identifiziert. Demnach kann von einer höheren Wahrscheinlichkeit der richtigen Annotation ausgegangen werden. Des Weiteren wurden bei der Modifikation durch DK501 vermehrt Peptidmassen detektiert, die durch Abspaltung eines Cystobactamid-Fragments entstanden sind. Solche Peptidmassen konnten unter Einsatz von DK352 nur 2 mal identifiziert werden. Jedoch konnten bei fast allen durch DK352 modifizierten Peptiden minimal zwei meist sogar alle drei charakteristischen Fragmentmassen des Cystobactamids detektiert werden.

Zur Veranschaulichung der in Tabelle 2.4.8 und 2.4.9 aufgelisteten modifizierten Peptide wurden diese in der Cryo-Elektronenmikroskopischen Struktur (Cryo-EM Struktur) von *E. coli* Gyrase 6rkv farblich markiert (Abb. 2.4.22).

2.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

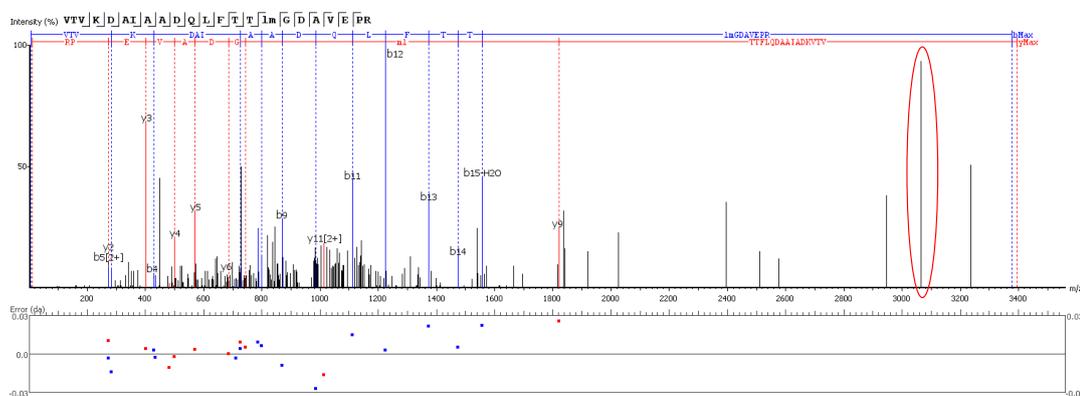


Abbildung 2.4.21: MS2 Spektrum zur Identifizierung des GyrB Peptids VTVKDAIAAD-QLFTTlmGDAV nach Vernetzung mit DK501 und Trypsinverdau. Kleiner Buchstabe beschreibt modifizierte Aminosäure - entweder durch Oxidation bei Methionin oder durch das Cystobactamid bei Leucin. Rote Markierungen weisen auf y-Fragmente vom C-Terminus. Blaue Markierungen weisen auf b-Fragmente vom N-Terminus. Eingekreistes Signal stellt die Masse des Peptids abzüglich CD-Fragments von DK501.

Tabelle 2.4.7: ppm-Abweichung der detektierten Fragmentmassen im Verhältnis zur exakten Masse.

y-Fragmente		b-Fragmente		Cystobactamid-Fragmente	
Fragment	ppm	Fragment	ppm	Fragment	ppm
y2	-14,35	b3	-51,73	CD	-12,56
y3	10,65	b4	7,70	CDE	-11,58
y4	-4,64	b7	5,96	CDE - Isopropyl	-11,91
y5	6,73	b8	8,10		
y6	-0,36	b9	-10,81		
y7	6,98	b10	-27,90		
y9	14,07	b11	13,61		
		b12	2,59		
		b13	15,74		
		b14	3,56		
		b15	14,43		

Tabelle 2.4.8: Zusammenfassung aller modifizierter Peptide der PAL Experimente mit DK501, in denen bei der Validierung Fragmentationen des Cystobactamids oder Peptidmassen minus der charakteristischen Fragmente gefunden wurden.

Enzym	Gyrase	Peptid	Score	AS	Cystobactamid Fragment	ppm	Peptid - Fragment	ppm
Trypsin	GyrA	EITPVNIEEELk	39,02	7-18	DE	-13,36	- DE	1,93
					CDE	-17,67		
	GyrB	VTVKDAIAADQLFTTLMGDAVePR	51,07	774-797	DE	-2,98	- CDE	-8,51
					CDE	-6,52		
					CDE-Isopropyl	-5,38		
		VTVKDAIAADQLFTTIMGDAVEPR	36,78	774-797	DE	-12,56	- DE	5,51
					CDE	-11,58		
					CDE-Isopropyl	-11,91		
aFIEENALK	28,38	799-804	DE	-11,88	- DE	11,99		
IYQPtLTEADLSDEQTVTR	26,48	619-637	CDE-Isopropyl	8,42	- CDE	5,29	5,48	
GluC	GyrA	IPYQVNkARLIEKIAE	21,51	271-286	DE	-20,86	/	/
					CDE	2,86		
	GyrB	NALKAANIDi	37,28	804-813	DE	-12,56	- DE	2,53
					CDE	-5,36	- CDE	6,61
					CDE-Isopropyl	-12,65		
Chymotrypsin	GyrB	AVTGETeKTGTM	17,29	164-175	DE	-14,16	- DE	4,32
					CDE	-2,25		
					CDE-Isopropyl	-15,83		

Tabelle 2.4.9: Zusammenfassung aller modifizierter Peptide der PAL Experimente mit DK352, in denen bei der Validierung Fragmentationen des Cystobactamids oder Peptidmassen minus der charakteristischen Fragmente gefunden wurden.

Enzym	Gyrase	Peptid	Score	AS	Cystobactamid Fragment	ppm	Peptid Fragment	ppm
Trypsin	GyrB	rLrELSFLNSGV SIR	39,33	190-204	DE	14,27	/	/
					CDE	-5,05		
					CDE-Isopropyl	6,42		
		WVNALVSeLNDEK	8,05	629-640	DE	6,29	/	/
					CDE	-9,80		
					CDE-Isopropyl	5,73		
		GISIQRYK	5,50	732-739	DE	-40,97	-DE	-5,91
					CDE	19,74		
					CDE-Isopropyl	17,24		
GluC	GyrA	QDERITaILP	11,47	627-636	DE	-4,25	/	/
					CDE	5,08		
					CDE-Isopropyl	-15,10		
		EIRLAKIAHE	5,39	124-133	DE	-40,02	/	/
					CDE	-13,80		
					CDE-Isopropyl	0,83		
	GyrB	RRqPVASFE	20,11	712-720	CDE	7,75	/	/
					CDE-Isopropyl	11,85		
					CDE	-16,24		
QTVTRWVNALv	11,50	625-635	CDE-Isopropyl	-26,61	-DE	-6,97		

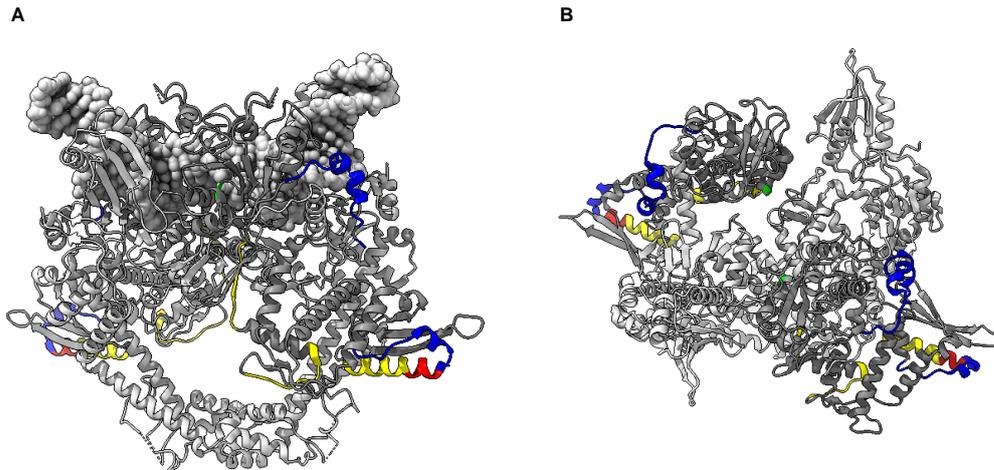


Abbildung 2.4.22: Darstellung der Cryo-EM Struktur von *E. coli* Gyrase 6rkv (DNA-Bindungs- und spaltungsstelle des A_2B_2 Komplexes) mit den durch DK501 (blau) und DK352 (gelb) modifizierten Peptiden. Rot: ein Peptid markiert, dass zu Teilen durch beide Moleküle markiert wurde. Grün: bekannte Aminosäuren in denen Mutationen Fluoroquinolon-Resistenzen hervorrufen (GyrA S83W, D426N) Rechts ist die Gyrase zusammen mit einer doppelsträngigen DNA und links die Draufsicht in die DNA-Bindungstasche dargestellt. Jeweils GyrA in hellgrau und GyrB in dunkelgrau. Die doppelsträngige DNA ist in weißen Kugeln dargestellt.

Die Cyro-EM Struktur 6rkv stellt ausschließlich die DNA-Bindungs- und -spaltungstelle der Gyrase dar. Die potentiell entweder durch DK501 (blau) oder DK352 (gelb) modifizierten Peptide verteilen sich wider Erwarten über einen Großteil des Moleküls. Vor allem die markierten Peptide die außerhalb und damit weiter von der DNA entfernt liegen, können dadurch markiert worden sein, dass das Cystobactamid im 140-fachen Überschuss dazugegeben wurde und demnach nicht alle Moleküle das aktive Zentrum und damit ihre finale Bindungsstelle erreicht haben. Das rot markierte Peptid zeigt einen Abschnitt in der Aminosäuresequenz von Gyrase B, der von sowohl DK501 als auch DK352 modifiziert wurde. Da dieser Bereich jedoch so weit von der DNA-Bindestelle entfernt liegt, ist es eher unwahrscheinlich, dass die Cystobactamid-Bindestelle in dem Bereich liegt. Für die gelb markierten Peptide, also mit DK352 modifizierten Peptide, gibt es zusätzlich zu den Peptiden außen am Molekül auch Modifikationen, die in der Nähe der DNA-Bindestelle liegen und somit eher als potentielle Bindungsstelle in Frage kommen. Zusätzlich ist im rechten Bild der Abbildung 2.4.22 eine Draufsicht auf die DNA-Bindungsstelle der Gyrase dargestellt. Die in grün markierte Aminosäure zeigt die Aminosäure, die hauptsächlich bei Fluoroquinolonen wie Ciprofloaxcin die Bindungsstelle widerspiegelt. Dabei sorgt beispielsweise in GyrA an der Stelle 83 ein Austausch von Serin zu Tryptophan und in GyrB an der Stelle 426 ein Austausch von Asparaginsäure zu Asparagin jeweils für eine Quinolon-Resistenz [217,218]. Neben der DNA-Bindungs- und Spaltungsstelle weist die DNA-Gyrase zusätzlich eine ATPase Domäne auf. Diese ist jedoch in der 3D-Struktur 6rkv nicht mit berücksichtigt und wird noch einmal gesondert über die Cyro-EM-Struktur 6rkw zusammen mit der DNA-Bindungsstelle in Abbildung 2.4.23 mit den modifizierten Peptiden durch DK501 in blau und durch DK352 in gelb dargestellt.

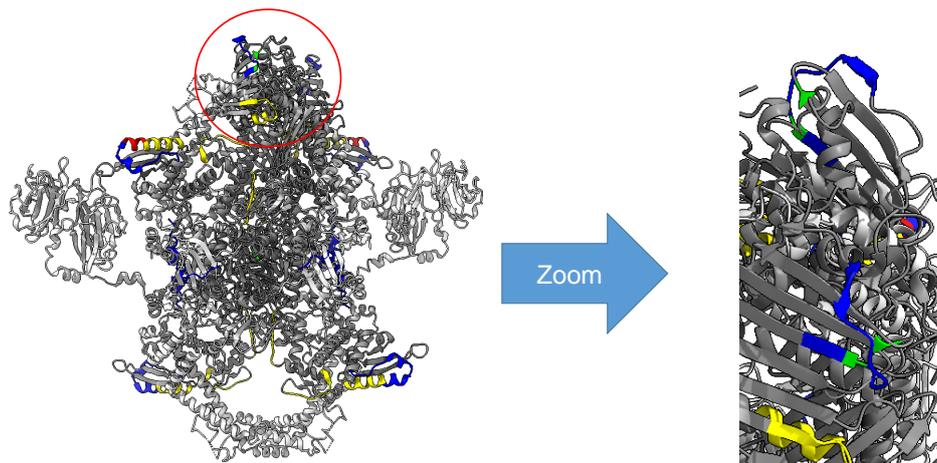


Abbildung 2.4.23: Darstellung der Cryo-EM Struktur von *E. coli* Gyrase 6rkw (DNA-Bindungsstelle und ATPase Domäne des A₂B₂ Komplexes) mit den durch DK501 (blau) und DK352 (gelb) modifizierten Peptiden. Grün: bekannte Aminosäuren in denen Mutationen Aminocoumarin-Resistenzen hervorrufen (*GyrB* G164V und R138C/H/S). Links ist die Übersicht über den Gyrase A und B Komplex und rechts eine Vergrößerung des eingekreisten Ausschnitts dargestellt. In beiden Abbildungen ist *GyrA* hellgrau und *GyrB* dunkelgrau angefärbt.

In dieser Darstellungsweise der 3D-Struktur von Gyrase wird zusätzlich die ATP-Bindungsstelle betrachtet und auch in diesem Bereich konnten potentielle Modifikationen durch DK501 (blau) und DK352 (gelb) identifiziert werden. Die in grün markierten Aminosäuren wurden durch Conferes und Maxwell als Interaktionspartner des Antibiotikums Coumarin beschrieben [219]. Denn durch Austauschen von R138C/H/S oder von G164V konnte zum einen eine Coumarin-Resistenz und zum Anderen eine Abnahme in sowohl der Superspiralisierungs- als auch in der ATPase-Aktivität beobachtet werden. In einem der durch DK501 modifizierten Peptide wurde exakt dieser Bereich detektiert. Daraus ließe sich schließen, dass die Cystobactamide eine ähnlich Funktionsweise wie die Coumarine aufweisen und somit sowohl die Superspiralisierungs- als auch die ATPase-Aktivität der Gyrase hemmen.

2.5 Zusammenfassung und Ausblick

Cystobactamide sind Naturstoffe, die antibakterielle Aktivität gegenüber vielen Mitgliedern der ESKAPE-Pathogene zeigen. Die antibakterielle Aktivität beruht auf der Inhibierung von Gyrase oder Topoisomerase IV.

In dieser Dissertation wurden Cystobactamide mit einem Photoschalter im Molekül biologisch und kinetisch genauer betrachtet. Der Photoschalter kann durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht eine Konfigurationsänderung im Molekül von *trans* zu *cis* herbeiführen. Die Konfigurationsänderung konnte sowohl für den N-, den C-terminalen und den Doppelschalter anhand einer Änderung im UV/Vis-Spektrum gezeigt werden. Darüber hinaus kann die Konfigurationsänderung die Polarität des Moleküls verändern und somit zu einem unterschiedlichen Laufverhalten in der Flüssigchromatographie führen. Die Flüssigchromatographie ermöglicht die genaue Bestimmung der Verteilung zwischen den beiden Zuständen. Für keines der Moleküle konnte eine 100%-ige Konfigurationsänderung erzielt werden. Sowohl im Grund- als auch im angeregten Zustand handelt es sich um ein Gleichgewicht zwischen der *trans*- und der *cis*-Form. Dieses Gleichgewicht verschiebt sich durch Anregung mit Licht in Richtung der *cis*-Form. Die Stabilität der Moleküle im angeregten Zustand wurde über Bestimmung der Aktivierungsenergie und der Halbwertszeiten bei verschiedenen Temperaturen charakterisiert. Die Aktivierungsenergien aller drei Moleküle liegen nah beieinander und untermauern somit die Molekülspezifität dieser Größe. Neben der kinetischen Betrachtung wurde die Auswirkung der Konfigurationsänderung auf die biologische Aktivität betrachtet. In sowohl der minimalen Hemmkonzentration als auch in der enzymatischen Gyrase-Inhibierung weisen die angeregten Moleküle eine um maximal Faktor 3,6 erhöhte Aktivität im Vergleich zum Grundzustand auf. Der gewünschte Effekt des An- und Ausschaltens der biologischen Aktivität bleibt jedoch aus. Betrachtet man durch die Enzyme AlbD und AlbA herbeigeführte Resistenzmechanismen, zeigt sich für den N-terminalen Photoschalter ein deutlicher Unterschied zwischen dem Grundzustand und der angeregten Form. Für beide Enzyme ist der Grundzustand nicht zugänglich, das heißt, GT4-059 wird weder durch AlbD gespalten noch durch AlbA neutralisiert. In diesem Fall kann durch Anregung des Moleküls eine Inaktivierung durch AlbA und AlbD herbeigeführt werden. Zukünftig müsste die Molekülstruktur weiter optimiert werden, um eine 100%-ige Konfigurationsänderung zu erzielen. Wenn durch den Schalter das Molekül ausschließlich in der *cis*-Form vorliegen würde, ließen sich klarere Aussagen über die resultierende biologische Aktivität treffen. Zusätzlich wäre das Ziel des An- und Ausschaltens der biologischen Aktivität aufgrund der Konfigurationsänderung erstrebenswert.

Neben der Charakterisierung von Cystobactamiden mit einem Photoschalter wurden chemoproteomische Methoden angewandt, um sekundäre Zielstrukturen spezifisch anzureichern und zu identifizieren oder die Gyrase-Bindungsstelle zu charakterisieren. Für die Identifizierung von potentiellen sekundären Zielstrukturen wurde das Cystobactamid mit einem Diazirin und einem Alkin modifiziert. Über das Diazirin konnte das Molekül kovalent an das Zielprotein gebunden und über das Alkin an Biotin geklickt werden. Biotin wurde anschließend zur spezifischen Anreicherung der gelabelten Proteine verwendet. Nach Optimierung der Klick-Reaktion des Cystobactamids an das Biotin konnten sowohl für *E. coli* BW25113 als auch für *S. aureus* Newman Proteine spezifisch angereichert werden. Bei Verwendung der pre-Klick Variante konnte

2.5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

für *E. coli* BW25113 die Untereinheit A der Gyrase spezifisch doch nicht statistisch signifikant angereichert werden. Bei den statistisch signifikant angereicherten Proteinen mit einem p-Wert kleiner 0,05 konnten starke Schwankungen und nur eine geringe Reproduzierbarkeit beobachtet werden. Lediglich für *S. aureus* Newman konnte die Komponente E1 der Pyruvatdehydrogenase reproduzierbar angereichert werden. In einem enzymatischen Validierungsexperiment wurde im aufgereinigten *S. aureus* Newman-Lysat die PDH-Aktivität in An- und Abwesenheit des Inhibitors bestimmt. Durch Zugabe von DK501 konnte ein leichter Anstieg in der enzymatischen Aktivität beobachtet werden. Durch Inkubation und Vernetzung von DK501 im aufgereinigten *S. aureus* Newman-Lysat und anschließender Klick-Reaktion mit einem Fluorophor konnte mittels SDS-Page und LC/MS/MS-Analyse ausgeschnittener Banden gezeigt werden, dass DK501 an die Komponente E1 der PDH bindet. DK501 interagiert mit der PDH ohne dessen enzymatische Aktivität stark zu beeinflussen. Demnach stellt *S. aureus*-PDH kein sekundäres Zielprotein der Cystobactamide dar. Für folgende Experimente müsste die Klick-Reaktion noch weiter optimiert werden, oder gar ein Biotin-gelabeltes Cystobactamid zur spezifischen Anreicherung synthetisiert werden. Ein Biotin-gelabeltes Cystobactamid birgt einerseits die Gefahr der Inaktivierung der antibakteriellen Aktivität, jedoch wenn dieses Risiko durch Bestimmung der MHK ausgeschlossen werden kann, bietet diese Sonde großes Potential zur spezifischen Anreicherung von Zielproteinen. In diesem Fall würde das Risiko einer nur mäßig funktionierenden Klick-Reaktion umgangen werden. Um zusätzlich die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass Gyrase oder Topoisomerase IV als Zielstrukturen zur Validierung des experimentellen Ablaufs detektiert werden, könnten die Proben zuvor mit DNase behandelt werden. Durch die Behandlung mit DNase werden DNA-bindende Proteine wie Gyrase besser für die massenspektrometrische Analyse zugänglich gemacht.

Die Bindungsstelle der Cystobactamide an *E. coli* Gyrase, dem bereits bekannten Zielprotein, konnte unter Einsatz zweier Sonden mit Photoaffinitätsgruppen und massenspektrometrischer Analyse vorausgesagt werden. Für die Photoaffinitätsmarkierung wurde bei DK501 ein Diazirin in der Mitte des Moleküls und bei DK352 ein Azid am N-Terminus eingebaut. Durch Bestrahlung mit Licht konnte das Cystobactamid kovalent an die *E. coli* Gyrase gebunden werden. Durch den Einsatz von drei verschiedenen Verdauungsenzymen konnte eine Sequenzabdeckung von über 99% erzielt werden. Die automatisch als modifiziert annotierten Peptiden wurden manuell validiert und anschließend in die 3D Struktur der *E. coli* Gyrase modelliert. Die modifizierten Peptide sind weit von der DNA-Bindungstasche und der bekannten Fluoroquinolon-Bindungsstelle entfernt. Betrachtet man jedoch die ATPase Untereinheit der *E. coli* Gyrase wird eine Überlappung mit einer bekannten Coumarin-Bindungsstelle deutlich. Coumarine hemmen die ATPase-Aktivität der Gyrase und aufgrund der Überlappung lässt sich ein ähnlicher Mechanismus für die Cystobactamide postulieren. Zur weiteren Validierung der in dieser Arbeit identifizierten Bindungsstelle könnten die identifizierten modifizierten Aminosäuren in GyrB gerichtet mutiert werden. Beim Ausbleiben oder Verminderung der enzymatischen Inhibierung der *E. coli* Gyrase durch das Cystobactamid, kann diese Aminosäure als Bindungsstelle der Cystobactimide definiert werden. Darüber hinaus können Kompetitionsexperimente mit einem Cystobactamid ohne Photoaffinitätsgruppe Aufschluss über die Selektivität der Sonde geben.

2.5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit postulierten Bindungsstelle zeigten Baumann *et al.* in einem enzymatischen Gyrase-Experiment die Verminderung der inhibitorischen Aktivität der Cystobactamide auf Gyrase mit zwei modifizierten Aminosäuren in GyrA (S83 und D87) [79]. Diese Ergebnisse sagen demnach eine Bindungsstelle der Cystobactamide in GyrA vorher. Beide experimentellen Ansätze bieten die Möglichkeit die Bindungsstelle von Cystobactamiden an Gyrase vorherzusagen. Eine eindeutige Klärung der Bindungsstelle der Cystobactamide - ob an GyrA oder GyrB oder eine Kombination aus beiden - kann mittels Röntgenstrukturanalyse oder Cryo-Elektronenmikroskopie ermöglicht werden.

Kapitel 3

Lipidome Studien von Dengue Viren

3.1 Theoretische Grundlagen

3.1.1 Dengue Virus

Dengue Virus (DENV) ist ein umhüllter positiv-strängiger RNA Virus, das zu der Familie der *Flaviviridae* gehört [220]. Die Familie der *Flaviviridae* setzt sich aus drei Gattungen zusammen - *Flavivirus*, *Pestivirus* und *Hepacivirus*. Die Gattung der *Flaviviren* umfasst mehr als 70 verschiedene Kandidaten, neben Dengue Virus (DENV) auch Tick-borne Enzephalitis Virus (TBEV), West Nil Virus (WNV) und Gelbfieber Virus (YFV) [221, 222]. Der Name *Flavivirus* ist auf das lateinische Wort *flavus* - gelb - zurückzuführen und entstand durch die charakteristische Gelbsucht, die durch das Gelbfieber Virus verursacht wird. Die Übertragung von *Flaviviren* erfolgt hauptsächlich über Anthropoden. Die Viren können bei humanen Infektionen meist Symptome von mildem Fieber bis hin zu tödlicher Enzephalitis oder hämorrhagischen Fieber verursachen. Dengue Virus wird ausschließlich über Mosquitos übertragen und ist in der Gattung der *Flaviviren* verantwortlich für die höchsten Erkrankungs- und Todeszahlen [223] mit der WHO zufolge 390 Millionen Fällen pro Jahr. Unter diesen 390 Millionen registrierten DENV-Infektionen müssen etwa 96 Millionen klinisch behandelt werden [224]. Die schweren DENV-Infektionsverläufe sind meist mit einer Zweitinfektion mit einem anderen Serotypen assoziiert, da es hier zu einer Antikörper-abhängenden Verstärkung der Infektion kommen kann [225]. Im Allgemeinen sind weltweit etwa 3,9 Milliarden Menschen in 129 Ländern dem Risiko einer DENV Infektion ausgesetzt [226].

Im Jahre 2015 wurde das von Sanofi Pasteur entwickelte DENV Vakzin Dengvaxia[®] zugelassen und seitdem in etwa 20 Ländern eingesetzt. Der Nachteil dieser Immunisierung zeigt sich jedoch bei Patienten, die zum Zeitpunkt der Impfung seronegativ waren, also noch von keinem der vier DENV Serotypen infiziert waren, da diese bei einer anschließenden Infektionen einem höheren Risiko eines schweren Verlaufes ausgesetzt sind im Vergleich zu nicht geimpften Personen. Demnach kann das Vakzin nur verabreicht werden, wenn die Person nachweislich bereits einmal mit einem der vier Serotypen infiziert war. Neben der eingeschränkten Einsetzbarkeit des Impfstoffes stellt die Abwesenheit von Medikamenten, um eine DENV-Infektion zu behandeln, ein weiteres Problem dar [225] und zeigt somit die dringende Notwendigkeit, neue Wirkstoffe zu finden und zu charakterisieren.

3.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1.1.1 Aufbau

Die Struktur von Dengue Viren wurde mittels Cryo-Elektronenmikroskopie und Kristallografie aufgeklärt und zeigt eine ikosaedrische Organisation der Virushülle mit einem sphärischen Nukleokapsid [227] (Abb. 3.1.1).

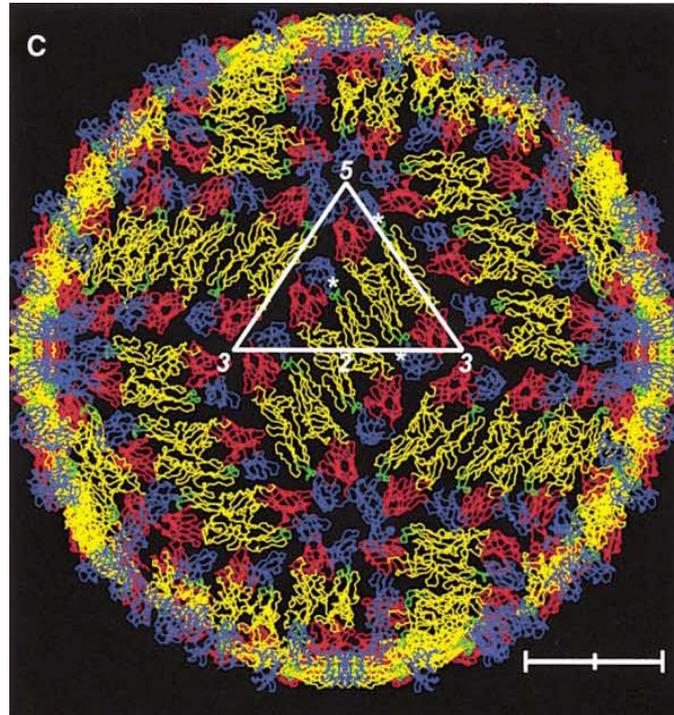


Abbildung 3.1.1: Darstellung der cyro-Elektronenmikroskopischen Aufnahme eines Dengue Virus Partikels. Abbildung modifiziert nach [227].

Ausgereifte Virionen haben etwa eine Größe von 50 nm im Durchmesser und das durch das Kapsidprotein gebildete Nukleokapsid umschließt die genetische Information, die sich ausschließlich aus einem einzelnen positiv-strängigen RNA Genom mit einer Größe von 10,7 kb zusammensetzt. Das Genom setzt sich aus einem offenen Leseraster zusammen, das für ein einziges Polyprotein codiert. Neben drei Strukturproteinen, dem Membranprotein (M), dem Kapsidprotein (C) und dem Hüllprotein (E), die für den Aufbau des Viruspartikels verantwortlich sind, codiert das Genom zusätzlich für sieben nicht-Strukturproteine, die essentiell für die Virusreplikation sind. Das Nukleokapsid ist von einer wirtszellspezifischen Lipidschicht umhüllt, in die das Membran- und das Hüllprotein eingebettet sind [222, 228].

3.1.1.2 Lebenszyklus

Dengue Viren können im Menschen viele verschiedene Zellen, unter anderem Leber- oder Nierenzellen, infizieren doch primär werden Leukozyten, wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, einschließlich Langerhans-Zellen, infiziert [229, 230]. In deren natürlichem Wirt, den Mosquitos, wird zuerst der Mitteldarm infiziert und anschließend breitet sich die Infektion auf weitere Körperorgane der Mosquitos aus [231]. Die Fähigkeit von Dengue Viren so viele verschiedene Zelltypen zu infizieren impliziert, dass der Virus an ein weitverbreitetes Oberflächenprotein bindet oder mit vielen verschiedenen Rezeptoren interagieren muss. In den letzten 20

3.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Jahren wurden mehrere Proteine identifiziert, die am Zelleintritt beteiligt sind. Bei den dabei für DENV identifizierten Proteinen handelt es sich unter anderem um eine Interaktion mit dem Hitze-Schock-Protein 70 (Hsp70) oder 90 (Hsp90) [232] oder mit Heparansulfat [233]. Zur Visualisierung des Lebenszyklus von DENV ist dieser in Abbildung 3.1.2 schematisch dargestellt.

Der Lebenszyklus beginnt mit dem Zelleintritt, für den DENV den Mechanismus der Clathrin-vermittelten Endozytose nutzt. Einzelpartikel-Tracking-Ansätze haben dabei gezeigt, dass DENV Partikel auf der Zelloberfläche landen und sich über diffusives Verhalten zu bereits bestehenden Clathrin-überzogenen Vertiefungen bewegen [234].

Dieses Verhalten legt nahe, dass DENV sich über die Zelloberfläche bewegt und dabei über verschiedene Rezeptoren rollt oder sich als Virus-Rezeptor-Komplex bewegt. Nach der Initiierung werden die Partikel zu Rab5-positiven, nicht ausgereiften Endosomen transportiert, die anschließend zu Rab7-positiven Endosomen ausreifen und der Viruspartikel tritt in die Wirtszelle ein [234]. Stiasny *et al.* postulieren für TBEV, dass die saure Umgebung des Endosoms eine Dissoziation des E-Protein-Homodimers herbeiführt. Dabei wird die Domäne II und das hydrophobe Fusionspeptid des E-Proteins nach außen gerichtet und damit freigelegt. Das E-Protein kann dadurch in die Zielmembran hereinragen. Diese Verankerung begünstigt die Bildung von E-Protein-Trimeren. Anschließend wird angenommen, dass sich die Domäne III des E-Proteins in eine Haarnadel-Struktur zurückfaltet. Der Prozess des Zurückfaltens zwingt die Wirtszellmembran und Virusmembran sich zueinander zu bewegen und somit möglicherweise zu fusionieren [235].

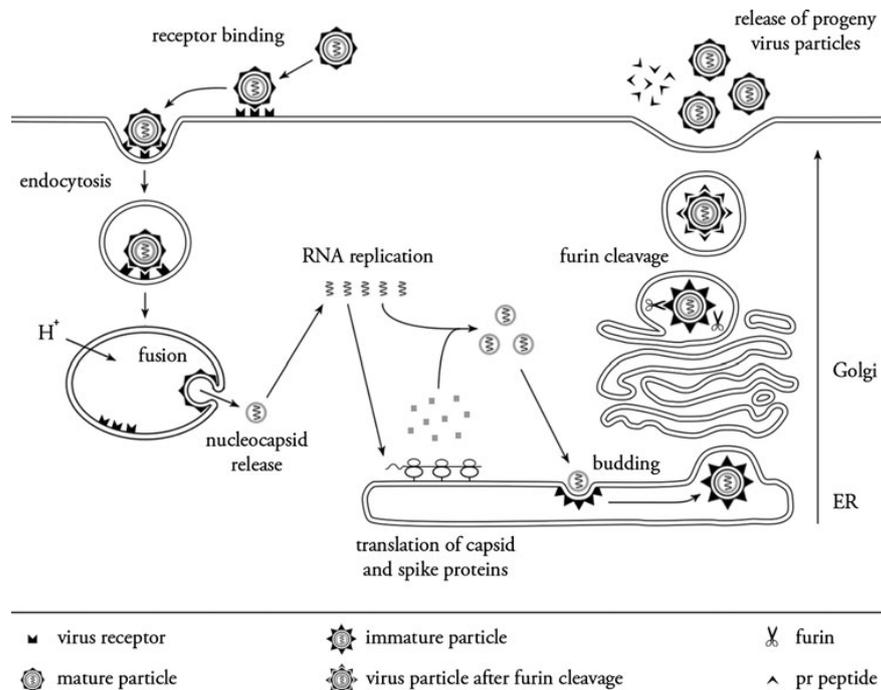


Abbildung 3.1.2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von Dengue Viren [236].

Nach der Membranfusion wird das Nukleokapsid in das Zytoplasma entlassen, wo das Kapsid-Protein und die RNA sich voneinander trennen. Anschließend beginnt die Translation der RNA zu einem einzigen Polyprotein an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) [237]. Das Polyprotein wird durch Wirtszellproteasen und Proteasen viraler Herkunft co- und post-translational modifiziert, sodass die drei Strukturproteine - E, prM und C - und sieben nicht-Strukturproteine (NS) - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B und NS5 - entstehen. Das E-Protein wird am N-Terminus glykosyliert, um die richtige Proteinfaltung zu gewährleisten [222, 238]. Nach der Proteintranslation und der Proteinfaltung, sowohl der Struktur- als auch der nicht-Strukturproteine, leiten die NS die Replikation des viralen Genoms ein [237]. Die dabei neu entstandene virale RNA wird daraufhin durch das C-Protein, dass das Nukleokapsid formt, eingepackt. Das prM und das E-Protein formen Heterodimere, die in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums ausgerichtet sind und assoziieren anschließend in Trimere. Diese oligomeren Interaktionen führen vermutlich zu einem gebogenen Oberflächengitter welches zum Virusauschleusungsprozess, dem sogenannten "Budding" beiträgt [227, 239]. Die dabei entstehenden Viruspartikel sind noch nicht vollständig ausgereift. Sie enthalten pro Viruspartikel 180 prM/E Heterodimere, die in Form von 60 Spikes vertikal von der Virusoberfläche weg zeigen [240]. Die anschließende Reifung der Viruspartikel findet im Laufe des sekretorischen Weges aus der Zelle statt. Zuerst leitet der leicht saure pH-Wert im trans-Golgi-Netzwerk die Dissoziation des prM/E Heterodimers ein. Das führt dazu, dass 90 Dimere flach auf der Oberfläche aufliegen. Diese Neuordnung der Glykoproteine aktiviert die zelluläre Endoprotease Furin, um prM zu spalten und somit Membran-assoziiertes M und pr Peptid zu generieren. Yu *et al.* konnten dabei zeigen, dass das pr Peptid mit dem Virion assoziiert bleibt, bis der Virus in das extrazelluläre Milieu sekretiert wird [241]. Sowohl prM als auch das pr Peptid agieren vermutlich als Chaperone und sind dafür verantwortlich das E-Protein während des sekretorischen Weges zu stabilisieren. Durch Abspaltung des pr Peptids werden ausgereifte Viruspartikel generiert, die zu diesem Zeitpunkt auch infektiös sind [241, 242]. Reife, infektiöse Viruspartikel werden anschließend durch Exozytose aus der Wirtszelle freigesetzt [220].

3.1.2 Das Lantipeptid Labyrinthopeptin

Labyrinthopeptine beschreiben eine im Jahre 2010 von Meindl *et al.* entdeckte Klasse carbacyclischer Lantibiotika [243]. Der Grund für die Einordnung der Labyrinthopeptine in die Lantibiotika ist die Gemeinsamkeit der proteinogenen Aminosäure Lanthionin, die für die Stabilität der Peptid-Konformation verantwortlich ist. Bei den Lantibiotika handelt es sich um ribosomal synthetisierte Peptide, die hauptsächlich aus Bakterien, Laktobazillen oder Aktinomyzeten isoliert werden konnten [244–247]. Der populärste Vertreter der Lantibiotika Nisin bindet an Lipid-II und wird bereits seit 51 Jahren als Konservierungsmittel von Nahrung verwendet [248]. Neben dem Einsatz in der Lebensmittelindustrie fokussiert sich das Anwendungsgebiet der Lantibiotika hauptsächlich auf den Einsatz als Antiinfektiva. Beispielsweise kann Duramycin (Moli1901) zur Behandlung von zystischer Fibrose verwendet werden und konnte bis in die klinische Phase II vordringen [249].

3.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

3.1.2.1 Isolierung und Struktur

Labyrinthopeptine weisen eine neuartige carbacyclische und posttranslational modifizierte Aminosäure, das sogenannte Labionin, auf. Die Isolierung erfolgte aus einem Kulturextrakt des Aktinomyzeten *Actinomadura namibiensis* DSM 6313 [250, 251], der antivirale Aktivität gegen Herpes-Simplex-Viren aufwies. Nach der Isolierung über chromatographische Säulen wurde das Molekulargewicht massenspektrometrisch zu 1922,6872 Da mit einer Summenformel von $C_{85}H_{110}N_{20}O_{24}S_4$ bestimmt. Mittels klassischer Methoden, wie der Aminosäureanalyse und der Messung eines 1H -NMRs, konnte die Molekülstruktur des Labyrinthopeptins nicht aufgeklärt werden. Erst durch Anwendung von Röntgenstrukturanalyse konnten die bisher aufgenommenen Daten gedeutet und die Struktur mit einer Auflösung von 0,1 Å ermittelt werden. Die Molekülstruktur des Labyrinthopeptins weist einige einzigartige Eigenschaften auf und ist in Abbildung 3.1.3 dargestellt. Der Name Labyrinthopeptin resultiert aus der labyrinthartigen Struktur des Moleküls [243].

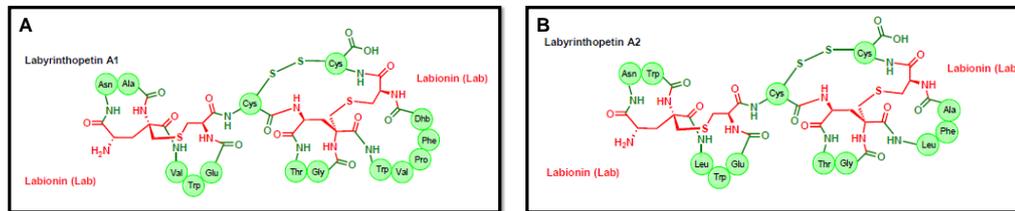


Abbildung 3.1.3: Darstellung der Molekülstruktur von A) Labyrinthopeptin A1 und B) Labyrinthopeptin A2. Struktur des Labionin in rot und proteinogene Aminosäuren in grün. Abbildung modifiziert nach Meindl et al. [243].

Labyrinthopeptin besteht aus hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren und lässt sich in zwei Nonapeptide zerlegen. Diese Nonapeptide, die C-terminal jeweils ein Cystein enthalten, setzen sich jeweils aus einem Tetrapeptid (Ring A) und einem Pentapeptid (Ring B) zusammen, die sich ein quartäres α C-Atom teilen (Abb. 3.1.3). Darüber hinaus sind die Cysteine in der Lage Disulfidbrücken auszubilden. Diese Eigenschaft kommt nur selten bei den Lantibiotika vor [252]. Das Labionin, eine Aminosäure mit quartärem α C-Atom, (Abb. 3.1.3, rot) bildet eine carbacyclische Seitenkettenverknüpfung aus und damit eine Struktur, die so noch nicht in Proteinen und Peptiden detektiert wurde.

Das biosynthetische Gencluster (lab), das für das Labyrinthopeptin codiert, hat eine Größe von 6,4 kb und codiert für 5 Gene. Dabei codieren labA2 für Labyrinthopeptin A2 und labA1/A3 für Labyrinthopeptin A1. Labyrinthopeptin A1 wird erst zu späteren Kultivierungszeitpunkten detektiert und liegt zuvor als Labyrinthopeptin A3 mit einem zusätzlichem Asparagin am N-terminus vor [243].

3.1.2.2 Wirkungsspektrum und Wirkmechanismus - Labyrinthopeptin bindet an Phosphatidylethanolamin (PE)

Häufig wird bei der Entwicklung von antiviralen Substanzen der Ansatz der direkt wirkenden antiviralen Substanzen verwendet, bei dem eine oder zur Resistenzvermeidung mehrere Verbindungen entwickelt werden, die spezifisch virale Proteine oder das virale Genom des jeweiligen Vi-

3.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

rus adressieren. Dieser Ansatz folgt nach dem Prinzip “many drugs one bug”. Im Gegensatz dazu liefert die Entdeckung einer Substanz mit einem weiten Wirkungsspektrum die Möglichkeit, nach dem Prinzip “one drug, many bugs”, mit einer Substanz viele verschiedene Viren zu behandeln. Diese Methode hat den Vorteil der Simplizität der Behandlung und der Vermeidung potentieller Nebenwirkungen von mehreren Substanzen untereinander [253–256]. Labyrinthopeptin lässt sich in der Klasse der “one drug, many bugs” der antiviralen Substanzen einordnen, da es ein großes Wirkungsspektrum gegen umhüllte Viren, wie DENV, ZIKV, WNV, humane Immundefizienz-Viren (HIV) oder Herpes-Simplex-Viren (HSV) zeigt [257].

Prochnow *et al.* konnten in zellbasierten Infektionsmodellen für Labyrinthopeptin A1 (LabyA1) einen IC_{50} -Wert im Bereich von 1,6-2,0 μM und für Labyrinthopeptin A2 (LabyA2) von 3,3-9,6 μM bestimmen. Dabei ergaben sich für DENV infizierte humane Hepatomazellen IC_{50} -Werte von 1,8 μM für LabyA1 und von 8,0 μM für LabyA2. Darüber hinaus zeigen LabyA1 und LabyA2 in einem äquimolaren Verhältnis einen synergistischen Effekt, resultierend in gesteigerter antiviraler Aktivität. Auch bei den höchsten Konzentrationen konnten keine zytotoxischen Effekte detektiert werden. Sowohl das große Wirkungsspektrum als auch die nicht vorhandene Zytotoxizität qualifizieren Labyrinthopeptin als potente antivirale Substanz zur Behandlung umhüllter Viren [257].

Um den Wirkungsmechanismus der Labyrinthopeptide herauszufinden, verwendeten Prochnow *et al.* DENV und ZIKV als Modellorganismen. Mittels Variation der Zeit der Zugabe von Labyrinthopeptin zu dem Infektionsgeschehen konnte festgestellt werden, dass Labyrinthopeptin den Viruseintritt in die Zelle verhindert, indem es mit dem Viruspartikel interagiert. Demnach muss zum einen das Zielmolekül der Labyrinthopeptide ein Bestandteil des Virus sein und zum anderen eine Struktur, die alle umhüllten Viren gemeinsam haben. Durch Immobilisieren von unterschiedlichen Lipidklassen in einer Mikrotiterplatte, Inkubation mit Labyrinthopeptin und anschließende Klick-Reaktion an Biotin konnte gebundenes Labyrinthopeptin mittels Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase katalysierten Farbreaktion detektiert werden. Dieses Experiment zeigte, dass Labyrinthopeptin an Phosphatidylethanolamin (PE) bindet. Die Bindung an PE führt zu einer Perforation der Membran und damit zur Lyse des Viruspartikels [257].

3.1.3 Lipidomstudien

Lipide haben eine essentielle Rolle in biologischen Prozessen. Sie sind der Hauptbestandteil von Zellmembranen und bieten aufgrund der hydrophoben Matrix eine Möglichkeit zur Separation von Zellbestandteilen. Darüber hinaus sind Transmembranproteine durch die Matrix der Zellmembran umschlossen und dessen Funktion ist gewährleistet. Neben der Abgrenzung und Einbettung von Membranproteinen dienen Lipide auch als Energiespeicher für biologische Prozesse [258]. Aufgrund der essentiellen Aufgabe von Lipiden ist es nicht verwunderlich, dass mehr und mehr Krankheiten, wie Diabetes, Krebs oder Schlaganfälle, mit Lipiden assoziiert werden [259, 260]. Die Charakterisierung von Lipiden rückt demnach nach und nach in den Fokus der Forschung und bildet das neue Feld Lipidomics [261].

3.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Die Mehrheit aller Lipide setzt sich strukturell aus zwei Bestandteilen zusammen - einem stark hydrophoben/unpolaren und einem hydrophilen/polaren Teil. Da die meisten Lipide sowohl einen hydrophoben als auch hydrophilen Bestandteil in ihrer Molekülstruktur aufweisen, sind sie amphiphil. Ausnahmen dieser Regel bilden Triacylglycerole (TAG), Cholesterin oder Cholesterinester, die hauptsächlich eine hydrophobe Struktur, mit der Ausnahme von Hydroxy- oder Carbonylgruppen, aufweisen. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften sind Lipide meist nur in unpolaren Lösungsmitteln aber nicht in Wasser löslich [261]. Die Klassifizierung von Lipiden kann durch mehrere Parameter entschieden werden. Die dabei betrachteten Parameter sind i) Löslichkeit der Lipide zur Einstufung in polare oder unpolare Lipide, ii) chromatographische Separation zur Definition von simplen und komplexen Lipiden, iii) funktionelle Eigenschaften, wie Membranlipide, Energielipide oder bioaktive Lipide und iv) chemische Struktur der Lipide. Die Einordnung nach der chemischen Struktur der Lipide bietet dabei die detaillierteste Klassifizierung und dient der Einteilung der Lipide auf Basis charakteristischer Strukturmerkmale, wie beispielsweise der Kopfgruppe, in sogenannte Lipidklassen. In Abbildung 3.1.4 ist eine Übersicht über die prominentesten Lipidklassen dargestellt.

	Phosphatidylcholin (PC)		Sphingomyelin (SM)
	Phosphatidylethanolamin (PE)		Cholesterolester
	Phosphatidylserin (PS)		Cholesterin
	Phosphatidylglycerol (PG)		Monoacylglycerol (MAG)
	Phosphatidylinositol (PI)		Diacylglycerol (DAG)
	Phosphatidsäure (PA)		Triacylglycerol (TAG)

Abbildung 3.1.4: Übersicht über die prominentesten Lipidklassen mit Darstellung der jeweiligen charakteristischen Strukturbausteine. R_1 und R_2 repräsentieren jeweils die Fettsäureketten. Abbildung modifiziert nach [261].

Die Lipidklassen können zusätzlich in übergreifende Kategorien eingeteilt werden. Die Einteilung in acht Kategorien - Fettsäuren, Glycerollipide, Glycerolphospholipide, Sphingolipide, Sterole, Lipopolysaccharide und Polyketide - erfolgte dabei durch das Lipid Maps Konsortium [262]. Die Glycerolphospholipide zeichnen sich durch eine oder mehrere Phosphat-Gruppen im Molekül aus und bekannte Vertreter sind Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) (Abb. 3.1.4). Sie bilden essentielle Bestandteile in Zellmembranen. Durch Entfernen der Phosphat-Gruppe entsteht die Kategorie der Glycerollipide mit Mono-, Di- und Triacylglycerol als Beispiele (Abb. 3.1.4). Das Sphingolipid Sphingomyelin kann sowohl PE als auch PC als Kopfgruppe tragen und zeichnet sich durch die für Sphingolipide charakteristische Amidbindung mit gekoppeltem Fettsäurerest aus [261]. Letztendlich gehören Cholesterin und Cholesterolester zu der Kategorie der Sterole und zeichnen sich durch ihre Kernstruktur, die

3.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

aus fünf fusionierten Ringen besteht, aus [262]. Neben den Glycerolphospholipiden und Sphingomylinen bildet auch Cholesterin einen wichtigen Bestandteil in humanen Zellmembranen [263].

Die Gesamtheit aller Lipide einer Zelle, eines Organs oder eines ganzen Organismus wird als Lipidom [264] und die dazugehörige analytische Erfassung des Lipidoms wird in Analogie zu anderen "Omic"-Strategien als Lipidomics bezeichnet. Das Ziel von Lipidomics ist zum einen die Identifizierung von Lipiden, deren Klasse und exakte Kettenlänge, und zum anderen die Quantifizierung der identifizierten Lipide. Der aktuelle Forschungsfokus liegt vor allem in der Identifizierung von neuen Lipidklassen, der Entwicklung neuer quantitativer Methoden, um selbst attomolare Lipidkonzentration detektieren zu können und dem Vergleich des Lipidoms zwischen krank und gesund zur Identifizierung von potentiellen Biomarkern [265].

Um die Gesamtheit aller Lipide einer Zelle oder eines Organismus, das Lipidom, zu studieren, wird Massenspektrometrie als Analysemethode verwendet. Zunächst müssen die Lipide jedoch aus ihrer natürlichen Umgebung isoliert werden, um sie für die massenspektrometrische Analyse zugänglich zu machen. Die dafür verwendeten Methoden basieren auf der Chloroform/Methanol Extraktion von Folch oder der modifizierten Variante von Bligh & Dyer [266,267]. Für die anschließende Vermessung gibt es zwei verschiedene Herangehensweisen, zum einen können die Lipidextrakte vor der massenspektrometrischen Analyse chromatographisch via UHPLC getrennt und zum anderen kann die Methode der Direktinjektion ohne vorherige Separation verwendet werden.

Die chromatographische Trennung der Lipidextrakte kann ähnlich wie bei Peptidextrakten durch den Einsatz einer UHPLC gewährleistet werden. Für die Separation kann neben einer C18-Säule zusätzlich eine C8-Säule mit Octylsilan-Ketten in der stationären Phase verwendet werden [268]. Nach der Separation der Lipide können diese massenspektrometrisch mittels TimsTOF Pro von Bruker vermessen werden. Diese Analysemethode, die bereits in Abschnitt 2.1.6 genauer betrachtet wurde, bietet eine hervorragende Möglichkeit für die ungezielte Charakterisierung von Lipidextrakten und wurde bereits erfolgreich in verschiedenen Forschungsansätzen angewandt [269,270].

Bei der gezielten Charakterisierung von Lipidextrakten kann eine weniger komplexe Messmethode ohne vorherige flüssigchromatographische Separation verwendet werden. Diese Methode wird auch als "shotgun lipidomics" bezeichnet und beschreibt die direkte Injektion in ein ESI-Massenspektrometer. Der Einsatz von ESI in der Lipidom-Forschung wurde als erstes 1994 von Han und Gross beschrieben [271]. Die Methode der Direktinjektion beruht auf der Bildung von charakteristischen Fragmenten eines jeweiligen Lipids und wurde zuerst von Liebisch *et al.* in den 1990er Jahren angewandt. Sie gehört auch heute noch zur Standardmethode für die Charakterisierung humaner Lipidklassen [272,273]. Es wird eine HPLC zur Führung des Lipidextraktes jedoch ohne chromatographische Trennsäule verwendet. Die HPLC wird dann mit einem ESI Massenspektrometer gekoppelt, das mit einem Triple-Quadropol ausgestattet ist. Die Identifizierung der jeweiligen Lipide erfolgt über die Ausgangsmasse und spezielle Fragmentierungsmuster, wie die charakteristische Abspaltung der Kopfgruppen der jeweiligen Lipidklassen oder "neutral losses" [274].

3.2 Zielsetzung

DENV Infektionen werden ausschließlich symptomatisch behandelt, da kein Medikament zur Bekämpfung von DENV Infektionen erhältlich ist. Der Naturstoff Labyrinthopeptin zeigt antivirale Aktivität gegen viele umhüllte Viren, unter anderem auch gegen DENV, ohne dabei zytotoxische Nebenwirkungen aufzuweisen. Prochnow *et al.* konnten zeigen, dass Labyrinthopeptin an Phosphatidylethanolamin in der Virushülle bindet und somit den Virus lysiert [257]. In diesem Teil der Disseration soll die Viruspropagierung und -aufreinigung optimiert werden, um das Lipidom von aufgereinigten Dengue Virus Partikeln zu charakterisieren. Anschließend soll die Modifikation des Viruslipidoms zeigen, ob und wenn ja inwieweit die Lipidzusammensetzung der Virushülle einen Einfluss auf die Labyrinthopeptin-Aktivität hat.

3.3 Material und Methoden

3.3.1 Zellkultur - Aussäen, Zellpflege und Aufbewahrung

Für diesen Teil der Arbeit wurden drei verschiedene adherente Zelllinien für unterschiedliche Experimente verwendet. Für die Propagierung der Dengue Viren wurden Insektenzellen *Aedes albopictus* C6/36 (ATCC[©] CRL-1660TM) genutzt, da sie den natürlichen Wirt darstellen und somit hohe Virustiter zu erwarten sind. Für die Bestimmung der Anzahl an Viruspartikel nach der Propagierung wurden Leberzellen aus Affen, sogenannte Vero B4 (DSMZ Nr.: ACC 33) Zellen, verwendet. Für die Bestimmung der Infektiosität der Viren und der Auswirkung eines potentiellen Inhibitors kam eine humane Leberzelllinie, sogenannte Huh7.5.1 Zellen, zum Einsatz. Die Huh7.5.1 wurden von Andrea Kröger (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Alle verwendeten Medien und Zusätze waren von gibco (Thermo Fisher Scientific, Deutschland).

3.3.1.1 *Aedes albopictus* C6/36

Die Insektenzellen wurden in Dublecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% "fetal bovine serum" (FBS) und 1-fach nicht-essentiellen Aminosäuren bei 28°C und 5% CO₂ kultiviert. Zur Zellerhaltung wurden die C6/36 Zellen einmal pro Woche 1:50 in einer neuen Zellkulturflasche verdünnt. Dafür wurde zuerst das alte Medium abgenommen und die Zellen mit 2 x PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit Trypsin Express für 15 min bei 28°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend zum Abstoppen der Reaktion in Medium aufgenommen und entsprechend verdünnt. Zur Aufbewahrung der Zellen wurden diese in normalem Zellkulturmedium mit Zusatz von 5% DMSO aufgenommen, je 1 ml auf Cryo-Röhrchen aufgeteilt, schock-gefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3.1.2 Vero B4 Zellen

Die Affenleberzellen wurden in DMEM mit 10% FBS bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Zur Zellerhaltung wurden die Vero B4 Zellen einmal pro Woche 1:50 in einer neuen Zellkulturflasche verdünnt. Dafür wurde zuerst das alte Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit Trypsin Express für 5 min bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert und anschließend zum Abstoppen der Reaktion in Medium aufgenommen und entsprechend verdünnt. Zur Aufbewahrung der Zellen wurden diese nicht in normalem Medium sondern in 70% DMEM, 20% FBS und 10% DMSO aufgenommen, je 1 ml auf Cryo-Röhrchen aufgeteilt, schock-gefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3.1.3 Huh7.5.1 Zellen

Die humanen Leberzellen wurden in DMEM mit 10% FBS bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Zur Zellerhaltung wurden die Huh7.5.1 Zellen einmal pro Woche 1:20 in einer neuen Zellkulturflasche verdünnt. Dafür wurde zuerst das alte Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese mit Trypsin Express für 5 min bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert und anschließend zum Abstoppen der Reaktion in Medium aufgenommen und entsprechend verdünnt. Zur Aufbewahrung der Zellen wurden diese nicht nicht normalem Medium

3.3. MATERIAL UND METHODEN

sondern in 70% DMEM, 20% FBS und 10% DMSO aufgenommen, je 1 ml auf Cryo-Röhrchen aufgeteilt, schock-gefroren und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

3.3.2 Dengue-Virus

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem Dengue Serotyp 2 Virus gearbeitet. Alle folgenden Experimente wurden mit dem an Labormaßstab angepassten Neu-Guinea C (NGC) Wildtyp (WT) Stamm mit der GenBank Nr. KM204118.1 in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 durchgeführt. Dieser Virus wurde von V. Deubel (Institut Pasteur, Paris, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

3.3.3 Viruspropagierung in C6/36 Zellen und Aufreinigung

Für die Viruspropagierung wurden die Insektenzellen, sogenannten C6/36 Zellen, verwendet, da sie die höchsten Virustiter ergaben und sehr robust waren. 48 h vor der Infektion wurden $4,8 \cdot 10^7$ Zellen in eine T300 Zellkulturflasche in 60 ml Medium ausgesät. Um möglichst hohe Virustiter zu erreichen wurden Infektionstemperatur, Multiplizität der Infektion (MOI) und Tag der Ernte angepasst. Letztendlich wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS mit einem MOI von 0.1 infiziert, indem $96 \mu\text{l}$ eines $5,0 \cdot 10^7$ pfu/ml Virusstocks in 12 ml DMEM auf den Zellrasen gegeben wurden. Um eine gleichmäßige Infektion zu gewährleisten, wurde für eine Stunde bei 33°C und 5% CO_2 alle 15 min der Flüssigkeitsfilm bewegt. Anschließend wurden 48 ml Infektionsmedium (DMEM, 2% FBS, einfach nicht-essentielle Aminosäuren, 25 mM HEPES) hinzugegeben und die infizierten Zellen zur Viruspropagierung fünf Tage bei 33°C und 5% CO_2 inkubiert. Der Überstand, der den propagierten Virus enthält, wurde nach Abnahme von dem Zellrasen für 10 min bei $1000 \times g$ zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf), um grobe Zellbestandteile zu entfernen. Für die weitere Aufreinigung und Aufkonzentrierung wurde eine zweistufige Saccharose-Zentrifugation durchgeführt. Dafür wurden 30 ml der Virussuspension mit 8 ml 30% Saccharose-Lösung unterschichtet und bei $130.000 \times g$ in einer Ultrazentrifuge (Optima XE, Beckman Coulter) für 3,5 h zentrifugiert. Durch diese Zentrifugation pelletieren die Viruspartikel durch die Saccharose-Lösung, während andere Mediumbestandteile zurückgehalten werden. Der pelletierte Virus wurde anschließend in $500 \mu\text{l}$ HNE-Puffer (5 mM HEPES, 150 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 7,4) resuspendiert und nochmals wie oben beschrieben über eine Saccharose-Zentrifugation aufgereinigt. Das resuspendierte Pellet enthält den aufgereinigten und aufkonzentrierten Virus, der anschließend für eine Lipidextraktion oder weitere Experimente verwendet werden kann.

3.3.4 Viruspropagierung in Huh7.5.1 Zellen

Zur Herstellung von Viren unterschiedlicher Wirtszellen wurden zusätzlich zu den Insektenzellen auch humane Leberzellen verwendet. Dafür wurden 24 h vor der Infektion je $1,64 \cdot 10^7$ Huh7.5.1 in zwei T175 Zellkulturflaschen in 30 ml DMEM mit 10% FBS ausgesät und bei 37°C und 10% CO_2 inkubiert. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen mit einem MOI von 0,5 infiziert, indem $164 \mu\text{l}$ eines DENV Stocks mit einem Titer von $5 \cdot 10^7$ pfu/ml mit 7 ml DMEM gemischt und auf die Zellen gegeben wurden. Die Zugabe von 23 ml Infektionsmedium (DMEM + 2% FBS) erfolgte nach einer Infektionsdauer von 2 h bei 37°C und 10% CO_2 . Nach 48 h wurde der Virus

3.3. MATERIAL UND METHODEN

wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben mittels 2-facher Saccharose-Zentrifugation aufgereinigt.

3.3.5 Western-Blot zur Identifizierung des Dengue E-Proteins

Für die Optimierung der Viruspropagierung und Aufreinigung wurden für die jeweiligen Bedingungen/Aufreinigungsschritte 40 μl Probe genommen, mit 10 μl 5-fach SDS-Probenpuffer (Tab. 2.3.4) versetzt und für 10 min bei 96°C aufgeköcht und damit inaktiviert. Die Proben konnten somit aus dem BSL-3 Labor ausgeschleust und auf eine 10%-iges SDS-Page (Herstellung nach Tab. 2.3.4) aufgetragen werden. Die SDS-Page wurde nach der Anleitung in Abschnitt 2.3.6.4 durchgeführt.

Für den Western-Blot wurde das Sammelgel entfernt und das Gel in Wasser gewaschen. Der Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (GE Healthcare) erfolgte durch ein Biometra Fastblot-System (Analytik Jena). Die PVDF Membran wurde mit Methanol aktiviert und zusammen mit zwei Whatmanpapieren auf die Anodenplatte der Apparatur Luftblasen-frei platziert. Sowohl die Whatmanpapiere als auch die Membran wurden zuvor in 1-fach Blotpuffer (25 mM Tris pH 8,3, 192 mM Glycin, 20% Methanol) getränkt. Auf die Membran wurde das SDS-Gel und zwei weitere Whatmanpapiere gelegt und Luftblasen entfernt. Für den Proteintransfer wurde die Apparatur mit der im Deckel befindlichen Kathode verschlossen und für 75 min bei 200 mA betrieben. Während des Blotting-Prozesses wurden die Proteine von dem SDS-Gel auf die PVDF Membran übertragen und konnten anschließend mittels Antikörpern spezifisch visualisiert werden. Dafür wurde zuerst die Membran in 5% Milchpulver in PBS-T (0,1% Tween) geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Der erste Antikörper, der spezifisch an das E-Protein des Dengue-Virus (Dengue Virus Type 2 Envelope Polyclonal Antibody, Invitrogen) bindet, wurde in 5% Milchpulver in PBS-T 1:5000 verdünnt und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T wurde der zweite Antikörper (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, Invitrogen), der spezifisch an den ersten Antikörper bindet, 1:2500 in 5% Milchpulver in PBS-T verdünnt und für 1 h ebenfalls mit der Membran inkubiert. Zusätzlich enthält der zweite Antikörper eine Merretichperoxidase, die zur Visualisierung dient. Anschließend wurde die Membran nochmals dreimal mit PBS-T gewaschen. Zur Visualisierung der markierten Proteine wurde ClarityTM Western Enhanced Chemiluminescence (ECL) Substrat von BioRad verwendet. Es wurden die zwei im Kit enthaltenen Lösungen (Clarity Western Peroxide Reagenz, Clarity Western Lumi-nol/Enhancer Reagenz) 1:1 miteinander vermischt und auf die PVDF Membran gegeben. Die auf der Membran befindlichen Proteine konnten instantan unter Verwendung des ChemiDoc-Systems (Biorad) visualisiert werden.

3.3.6 Quantifizierung des Virustiters (Plaque Assay)

Die Quantifizierung des Virustiters wurde in Anlehnung an Medina *et al.* durchgeführt [275]. In einer 12-well Zellkulturplatte wurden pro Vertiefung $2,5 \cdot 10^5$ Vero B4 Zellen in 1,5 ml Medium ausgesät und für 24 h bei 37°C und 10% CO₂ bis zu einer Konfluenz von 80-90% inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in das BSL3-Labor transportiert und 500 μl des Mediums abgenommen. Parallel wurde eine Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor je 1:10) in PBS des zu testenden Virusstocks vorbereitet. Von den jeweiligen Verdünnungsstufen wurden 100 μl in Dop-

3.3. MATERIAL UND METHODEN

pelbestimmung auf die Zellen gegeben, sodass ein Bereich von 10^{-4} bis 10^{-9} abgedeckt wurde. Nach 24 stündiger Infektion der Zellen bei 37°C und 10% CO_2 wurde der Überstand abgenommen und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde ein Gemisch aus 3 ml 2%-iger aufgekochter Agarose und 12 ml Infektionsmedium (2% FBS in DMEM) auf die Zellen gegeben, sodass eine weitere Infektion von weiteren weiter entfernten Zellen vermieden wird. Nachdem die Zellen für fünf Tage bei 37°C und 10% CO_2 inkubiert wurden, wurden die Zellen mit 5 mg/ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in PBS für 3 h bei 37°C und 10% CO_2 gefärbt. MTT färbt lebendige Zellen schwarz und tote Zellen werden nicht angefärbt. Ein heller Punkt weist demnach auf die Abwesenheit des Zellrasens hin und dieser sogenannte "Plaque" resultiert aus der Infektion von einem Viruspartikel. Je nach Verdünnungsstufe kann somit der Virustiter in sogenannten "Plaque forming units" pro ml bestimmt werden.

3.3.7 Konzentrationsabhängiger Inhibitionstest

Zur Charakterisierung potentieller antiviraler Substanzen kann ein konzentrationsabhängiger Inhibitionstest nach Prochnow *et al.* durchgeführt werden [257]. In dieser Arbeit wurde er dazu verwendet die Aktivität von Labyrinthopeptin auf Dengue-Viren zu bestimmen und einen möglichen Effekt des Phosphatidylethanolamin-Gehalts im Virus auf die Labyrinthopeptin-Aktivität zu charakterisieren.

Als Wirtszelle wurde die humane Leberzelllinie Huh7.5.1 verwendet. 30.000 Huh7.5.1 Zellen in $100\ \mu\text{l}$ wurden pro Vertiefung in eine schwarze Mikrotiterplatte mit transparentem Boden ausgesät und für 24 h bei 37°C und 10% CO_2 inkubiert. Die Labyrinthopeptine A1, A2 und ein Gemisch aus A1 und A2 wurden seriell in Infektionsmedium (DMEM mit 2% FBS) verdünnt. Dabei wurde eine Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS verwendet und mit einem Verdünnungsfaktor 1:3 verdünnt, sodass die finalen Konzentrationen im Bereich $0,21 - 50\ \mu\text{g/ml}$ lagen. Im BSL-3 Labor wurde das Zellkulturmedium von dem Zellrasen in der Mikrotiterplatte abgenommen und $40\ \mu\text{l}$ der verdünnten Labyrinthopeptin-Lösungen in Doppelbestimmung hinzugegeben. Die Zellen wurden für 30 min bei 37°C und 10% CO_2 inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Virus mit einem MOI von 0,5 in $20\ \mu\text{l}$ Infektionsmedium, mit Ausnahme einiger Wells, die als nicht-infizierte Negativkontrolle dienten. Nach der Absorption des Virus für 2 h bei Raumtemperatur, wurde die virale Suspension abgenommen, der Zellrasen mit PBS gewaschen und $100\ \mu\text{l}$ Infektionsmedium zugegeben. Die Zellen wurden für 46 h bei 37°C und 10% CO_2 inkubiert und anschließend wurde die Vitalität der Zellen bestimmt.

Die Zellviabilität wurde indirekt über das ATP-Level bestimmt, indem das *CellTitre Glo[®] 2.0* Reagenz von Promega (Madison, USA) verwendet wurde. Dieses Reagenz enthält Luciferin und Luciferase, die die Oxidation von Luciferin in Anwesenheit von ATP und Sauerstoff katalysiert. Die Bildung des Oxyluciferin kann als Lumineszenzsignal detektiert werden. Je vitaler die Zellen sind, desto höher ist das Lumineszenz-Signal. Die Reagenzien zur Bestimmung der Zellvitalität wurden nach 46 h im Verhältnis von 1:1 zu dem Medium dazugegeben, und nach einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde das Lumineszenz-Signal mit einem Mikrotiterplatten-Reader (Synergy H3, BioTek) ausgelesen. Das Lumineszenz-Signal wurde verwendet um den Anteil an infizierten Zellen zu bestimmen und gegen die zur Basis 10

logarithmierte Inhibitor-Konzentration aufgetragen. Der IC_{50} -Wert konnte mittels nicht-linearer Regression in GraphPad Prism 9 ermittelt werden.

3.3.8 Lipidextraktion für massenspektrometrische Analyse

Um die Lipide analysieren zu können, wurden diese zunächst aus den nicht-infizierten Wirtszellen, den infizierten Wirtszellen und dem aufgereinigten Virus nach der Methode von Bligh & Digher extrahiert [267]. Für die Zellextrakte wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber von der Oberfläche gelöst. Die Zellen wurden in 10 ml PBS resuspendiert, in ein 15 ml Röhrchen überführt und anschließend bei 800 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde noch dreimal mit je 10 ml PBS gewaschen, bevor das Gewicht des Zellpellets für die Berechnung der genauen Mengen Methanol und Chloroform für die Extraktion bestimmt wurde. Als Beispiel wurden zu 1 g Zellen, die zu 80% aus Wasser bestehen, 2 ml Methanol und 1 ml Chloroform zugegeben, um ein Verhältnis von 0,8/2/1 (Wasser/Methanol/Chloroform) zu generieren. Das Gemisch wurde im Ultraschallbad für 2 min homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 1 ml Chloroform und ein weiterer Homogenisationsschritt im Ultraschallbad für 30 s. Zuletzt wurde 1 ml destilliertes Wasser zugefügt und das Gemisch mit einem finalen Verhältnis von 1,8/2/2 (Wasser/Methanol/Chloroform) nochmals für 30 s homogenisiert. Um die polare Phase von der unpolaren Phase zu trennen, wurden die Röhrchen auf Eis für etwa 10 min gelagert. Die unpolare untere Phase, die aus Chloroform besteht und die extrahierten Lipide enthält, wurde vorsichtig abgenommen und in ein Glasgefäß überführt. Die Extrakte wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt. Für die Lipidextraktion des aufgereinigten Virus wurde ähnlich verfahren, mit dem Unterschied, dass der aufkonzentrierte Virus in 500 μl HNE-Puffer aufgenommen und somit davon ausgegangen wurde, dass es sich um 100% wässrige Lösung handelt. Dementsprechend wurden die Volumina zur Extraktion angepasst, sodass am Ende ein Verhältnis von 1,8/2/2 (Wasser/Methanol/Chloroform) entstanden ist. Auch hier wurde nach der Extraktion die untere unpolare Phase vorsichtig abgenommen, in ein Glasgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

3.3.9 Gezielte massenspektrometrische Analyse

Für die gezielte LC/MS/MS Analyse wurden die jeweiligen Proben 1:100 (Zellextrakte) beziehungsweise 1:10 (Virusextrakte) in Biocrates Puffer (290 ml Methanol und 10 ml aus einer Ampulle des Biocrates Kits MxP[®] Quant 500) verdünnt. Zu 45 μl der verdünnten Proben wurden 5 μl eines internen Standards von Avanti Polar Lipids (SPLASH[®] LIPIDOMIX[®] Mass Spec Standard) zugegeben. Die finalen Konzentrationen des internen Standards sind in Tabelle 3.3.1 dargestellt und wurden später für die Quantifizierung der Lipide verwendet.

Die verdünnten Proben plus internen Standard wurden in einer Vakuumzentrifuge eingengt, anschließend in 50 μl Biocrates Puffer aufgenommen und im Ultraschallbad resuspendiert. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 20.000 x g (Centrifuge 5425 R, Eppendorf) wurden die Proben für die Messung in Glasgefäße mit Septum überführt. Die Messung der Proben wurde an einer QTrap von Sciex, die auf einer Triple Quadropol Technologie basiert, durch Direktinjektion durchgeführt. Es wurden pro Probe 20 μl injiziert und direkt über eine Kapillare in das Massenspektrometer mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ gefördert. Das verwendete Laufmittel war Biocra-

3.3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3.3.1: Zusammensetzung des internen Standards SPLASH[®] LIPIDOMIX[®] Mass Spec Standard.

Bestandteil	Finale Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Exakte Masse
15:0-18:1 (d7) PC	16,07	752,6061
18:1 (d7) LysoPC	2,55	528,3921
15:0-18:1 (d7) PE	0,57	710,5591
18:1 (d7) LysoPE	0,53	486,3451
15:0-18:1 (d7) PG	2,91	741,5537
15:0-18:1 (d7) PI	0,91	829,5698
15:0-18:1 (d7) PS	0,42	754,5490
15:0-18:1 (d7)-15:0 TAG	5,73	811,7646
15:0-18:1 (d7) DAG	0,94	587,5506
18:1 (d7) MAG	0,20	363,3366
18:1 (d7) Chol Ester	35,61	657,6461
d18:1-18:1 (d7) SM	3,09	737,6397
15:0-18:1 (d7) PA	0,74	667,5181
Cholesterol d7	9,84	393,3988

tes Puffer und die Spritze wurde mit ACN/MeOH/iPrOH/H₂O/FA (25%/25%/25%/25%/0,25%) gespült. Jeder Übergang, das bedeutet jedes Lipid, wurde für 20 ms gemessen. Eine tabellarische Zusammenfassung über alle 47 Lipide für C6/36 Zellen und 125 Lipide für Huh7.5.1 ist im Anhang aufgeführt. Darüber hinaus sind im Anhang tabellarisch alle Übergänge inklusive der nicht-detektierten Lipide dargestellt. Die Proben wurden mittels Elektrospray-Ionisation ionisiert und mittels Ionenfalle je nach Masse detektiert. Für die gezielte Messung war es Voraussetzung, dass nur zuvor festgesetzte Massen gemessen werden und nicht der gesamte Massenbereich. Für die Entwicklung der Methode wurde jeweils ein Zellextrakt der nicht-infizierten Wirtszelle verwendet. Dieser Extrakt wurde anhand je einer Massenliste pro Kopfgruppe der Phospholipide und Sphingomyelin, die die gängigsten Fettsäureketten umfasst, vermessen. Die detektierten Lipide wurden in einer neuen Massenliste zusammengefasst und für die Messung aller Proben, die aus den jeweiligen Wirtszellen resultierten, angewandt. Die Datenanalyse der Spektren erfolgte unter Verwendung der Analyst Software. Zur Quantifizierung der jeweiligen Lipide wurde je ein interner Standard pro Kopfgruppe verwendet. Ein beispielhaftes Messergebnis des PC Standards ist in Abbildung 3.3.1 dargestellt.

Die Flächen unter den jeweiligen Kurven wurden verwendet, um die Lipide zu quantifizieren. Die Fläche unter der Kurve wurde mit der bekannten Konzentration des Standards ins Verhältnis gesetzt und auf die anderen Lipide der gleichen Klasse übertragen. Die Intensitäten der einzelnen Replikate wurden statistisch ausgewertet, indem sie zunächst \log_2 transformiert, in Gruppen eingeteilt (Wirtszelle, infizierte Wirtszelle und aufgereingter Virus), fehlende Werte durch eine Konstante ersetzt und anschließend die Unterschiede zur Wirtszelle als entweder $\log_2(\text{DENV}/\text{Wirtszelle})$ oder $\log_2(\text{infizierte Wirtszelle}/\text{Wirtszelle})$ berechnet wurden.

3.3. MATERIAL UND METHODEN

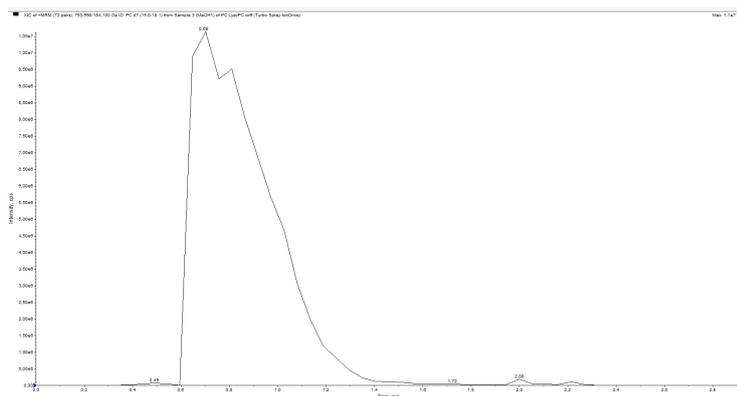


Abbildung 3.3.1: Spektrum des Standards PC d7 aufgenommen durch Direktinjektion an der QTrap von Sciex.

3.3.10 Globale LC/MS/MS Analyse

Die globale LC/MS/MS Analyse wurde angewandt, um die gezielte Messung zu erweitern und detektierte Lipide zu bestätigen.

3.3.10.1 Methode

Die Proben wurden ähnlich wie bei der gezielten Messung vorbereitet, mit dem Unterschied, dass die Virusextrakte unverdünnt und die Zellextrakte 1:10 verdünnt in der Vakuumzentrifuge eingengt und anschließend in 80 μl ACN/H₂O/iPrOH 1:1:2 + 0,1% HCOOH aufgenommen wurden. Der interne Standard wurde weiterhin wie in 3.3.9 im Verhältnis 1:10 hinzugegeben. Zur Vorbereitung für die Analyse wurden die resuspendierten Lipide bei 20.000 x g für 5 min (Centrifuge 5425 R, Eppendorf) zentrifugiert und in ein Glasgefäß mit Septum überführt. Für die Messung der Lipide wurde das Massenspektrometer Bruker TimsTOFPro verwendet, das mit einer Flüssigchromatographie UHPLC Elute von Bruker gekoppelt war. Die UHPLC diente der Auftrennung der Lipide je nach Affinität zur stationären Phase der Triart 1,9 μm C18 12 nm, 100 x 2,1 mm Säule von YMC. Die Temperatur des Säulenofens betrug 55°C und die mobile Phase setzte sich aus A) Acetonitril/Wasser (60/40; v/v) mit 10 mM Ammoniumacetat and 0,1% Ameisensäure und B) Isopropanol/Acetonitril (90/10; v/v) mit 10 mM Ammoniumacetat and 0,1% Ameisensäure zusammen. Der Gradient, dargestellt in Abbildung 3.3.2, wurde mit einer Flussrate von 400 $\mu\text{l}/\text{min}$ gefahren.

Zeit [min]	Anteil B [%]
0	40
2	43
2,1	50
12	54
12,1	70
18	99
18,1	40
22	40

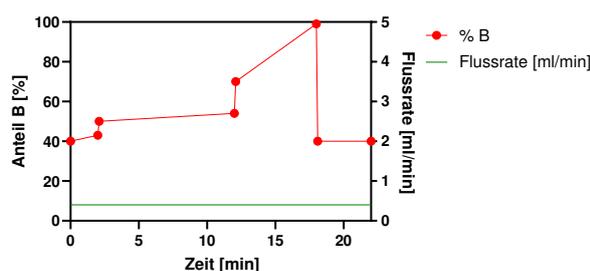


Abbildung 3.3.2: UHPLC-Gradient der mobilen Phase während der ungezielten LC/MS/MS Analyse zur Auftrennung der Lipide.

3.3. MATERIAL UND METHODEN

Die Einstellungen des Massenspektrometers wurden wie folgt vorgenommen. Zur internen Kalibrierung des Massenspektrometers und zur initialen Kalibrierung der Ionenmobilität wurde ein Tune-Mix zwischen 18 und 18,3 min zugeführt. Mittels der Software DataAnalysis 5.2 (Bruker) wurde anschließend die Kalibrierung vorgenommen. Die Proben wurden sowohl positiv als auch negativ im PASEF Modus vermessen. Die Lipide wurden durch Elektrospray-Ionisation unter Verwendung der Apollo II Elektrospray Quelle ionisiert und in einem Massenbereich von m/z 100-1350 vermessen. Weitere Einstellungen der Bruker Methode für Lipidomics sind in Tabelle 3.3.2 zusammengefasst.

Tabelle 3.3.2: *Einstellungen des Massenspektrometers Bruker TimsTOFPro unter Verwendung einer Bruker Methode für Lipidomics.*

Parameter	Einheit
Kapillarspannung	4500 V
Zerstäubendruck	2,0 bar
Trockentemperatur	220°C
Trockengas	10 l/min
Anzahl an PASEF MSMS Messungen	2
Totale Zykluszeit	0,32 s
Ionenmobilität	1/K0 gemessen von 0,55 bis 1,9 ($V \cdot S/cm^2$)

3.3.10.2 Datenanalyse

Nach der internen Kalibrierung unter Verwendung von DataAnalysis 5.2 wurden die Rohdaten in Metaboscape (Bruker) importiert. Metaboscape wurde zum einen zur Identifizierung der “Features” und später zum Sichten der analysierten Daten für die Qualitätskontrolle der Annotation verwendet. Die Annotation der “Features” wurde unter Verwendung von SimLipid[®] als Datenbank durchgeführt.

Der Import der Daten in Metaboscape startete mit der Erstellung einer neuen sogenannten “Bucket table”, die für jede Polarität - positiv oder negativ - separat erstellt werden musste. Als erstes folgte die Auswahl der Messmethode, in diesem Fall T-ReX 4D (LC-TIMS-QTOF). Anschließend wurden die Rohdaten der zu analysierenden Proben ausgewählt und hochgeladen. In diesem Schritt ist es wichtig, Gruppen für die jeweiligen Replikate zu identifizieren, die später in der Analyse zusammen ausgewertet werden sollen. Für die Auswahl der Peaks, die als “Features” identifiziert werden sollten, wurde eine minimale Intensität von 800 Zählern und eine minimale Signallänge von 7 Spektren ausgewählt. Des Weiteren wurde eine minimale Präsenz des jeweiligen “Features” in mindestens 2/3 der Proben definiert. Für die initiale Kalibrierung des Massenspektrometers wurde sowohl eine “Lock Mass” Kalibrierung mit einem Masse zu Landungsverhältnis (m/z) von 622,028960 im Positiven und 556,001951 im Negativen, als auch ein Tune-Mix, der zwischen 18,0 und 18,3 min des Gradienten zugeführt wurde, verwendet. Die m/z -Verhältnisse des Tune-Mix sind in Tabelle 3.3.3 dargestellt.

3.3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3.3.3: *Zusammensetzung des Tune-Mix zur initialen Kalibrierung des Massenspektrometers.*

Positiv		Negativ:	
	m/z		m/z
	118,086255		112,985587
	322,048121		301,998139
	622,028960		601,978977
	922,009798		1033,988109
	1221,990630		133,968947
	1521,971475		1633,949786
	1821,952313		1933,930624
	2121,933152		2233,911463
	2421,913990		2533,892301
	2712,894829		2833,873139

Als nächstes wurden die Parameter für die Kalibrierung der Ionenmobilität festgelegt. Auch hier wird der oben genannte Tune-Mix, der zwischen 18,0 und 18,3 min des Gradienten zugeführt wird, verwendet. Die detektierten m/z-Werte und ccs-Werte sind in Tabelle 3.3.4 dargestellt.

Tabelle 3.3.4: *Gemessene Parameter des Tune-Mix zur Kalibrierung der Ionenmobilität.*

Positiv:				Negativ:			
	m/z	css	Ladung		m/z	css	Ladung
	322,048123	152,8	1		112,985587	108,23	-1
	622,028961	201,6	1		301,998139	140,04	-1
	922,009799	241,8	1		601,978977	180,77	-1

Im nächsten Schritt wurden die Zeitspanne (0,4 - 18 min) und die Massenspanne (m/z 100-1350) definiert, in der “Features” mit einer “Extracted Ion Correlation” (EIC) von 0,8 identifiziert werden sollten. Die somit identifizierten “Features” wurden anschließend als mgf-Format für die SimLipid[®] Annotation exportiert. In SimLipid[®] wurde zunächst ein neues Projekt erstellt und anschließend die mgf-Datei von Metaboscape importiert. Nachdem alle detektierten “Features” in die Software hochgeladen wurden, konnten die Daten durch eine Hochdurchsatz-Lipid-Suche analysiert werden. Um die Lipide zu annotieren wurde zunächst die Polarität, eine tolerierte Massenabweichung von 10 ppm und häufig vorkommende Ionen, wie beispielsweise [M+H] oder [M+Na], definiert. Es wurden alle Lipide aus der SimLipid[®] Datenbank für die Annotation ausgewählt. Nachdem alle Parameter definiert wurden, konnte die Suche gestartet werden und die Ergebnisse der Hochdurchsatz-Lipid-Suche als Report exportiert werden. Anschließend wurde die Annotation der “Features” mit SimLipid[®] wieder in Metaboscape importiert. Die Qualität der Annotation wurde durch grüne Boxen, mit einer m/z-Abweichung von 3 mDa, und graue Boxen, mit einer m/z-Abweichung von 5 mDa, dargestellt. Um darüber hinaus die Qualität der Annotation zu kontrollieren, wurde jedes annotierte Lipid manuell geprüft. Für die manuelle Qualitätskontrolle wurde nach charakteristischen Fragmenten der Lipidklassen gesucht. Diese charakteristischen Fragmente der detektierten Lipidklassen sind in Tabelle 3.3.5 für die jeweiligen Lipidklassen und die jeweilige Polarität dargestellt. Für die Di- und Triglyceride wurde Lipid Maps verwendet, um die Fragmentierung der Lipide vorherzusagen.

3.3. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3.3.5: *Verwendete charakteristische Fragmente der einzelnen Lipidklassen für die manuelle Qualitätskontrolle. KG steht für Kopfgruppe und NL für Neutral Loss.*

Lipidklasse	Positiv	Negativ
PC	184,0733 (KG)	nicht detektiert
PE	141,0191 (NL)	196,0380 (NL)
LysoPE	141,0191 (NL)	196,0380 (NL)
PI	260,0225 (NL)	241,0119
SM	184,0733 (KG)	60,0211 (NL)

Die Intensitäten der einzelnen Replikate wurden unter Verwendung des internen Standards in Konzentration umgerechnet und statistisch ausgewertet, indem sie zunächst \log_2 transformiert, in Gruppen eingeteilt (Wirtszelle, infizierte Wirtszelle und aufgereingter Virus), fehlende Werte durch eine Konstante ersetzt und anschließend die Unterschiede zur Wirtszelle als entweder $\log_2(\text{DENV}/\text{Wirtszelle})$ oder $\log_2(\text{infizierte Wirtszelle}/\text{Wirtszelle})$ berechnet.

3.4 Ergebnisse und Diskussion

3.4.1 Optimierung der Viruspropagierung in Insektenzellen C6/36 und der Virusaufreinigung

Um für die Lipidextraktion möglichst hohe Viruskonzentrationen in reiner Form zu erzielen wurde die Viruspropagierung und -aufreinigung optimiert. Für die Optimierung der Viruspropagierung wurden die Kultivierungsparameter Temperatur, Multiplizität der Infektion und Tag der Virusernte nach Infektion betrachtet. Es wurden 48 h vor der Infektion $1,2 \cdot 10^7$ Zellen in einer T75 Zellkulturflasche ausgesät und nach der Infektion wurde pro Probenahme $40 \mu\text{l}$ entnommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und $10 \mu\text{l}$ 5 x SDS-Ladepuffer hinzugeben. In Abbildung 3.4.1 sind die Gelbilder (SDS-Page) und die dazugehörigen Western-Blots mit Markierung des DENV E-Proteins der Optimierungsversuche dargestellt. Der Western-Blot wurde zur eindeutigen Identifizierung des Virus verwendet.

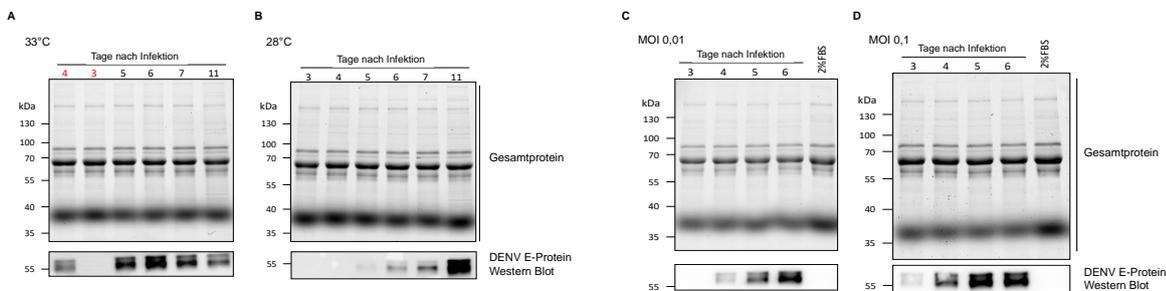


Abbildung 3.4.1: Optimierung der Viruspropagierung. A+B: Variation der Temperatur während der Virusproduktion von 33°C (A) und 28°C (B) (Normale Kultivierungstemperatur der Insektenzellen). C+D: Variation der Multiplizität der Infektion von 0,01 (C) und 0,1 (D). Jeweils oben die Darstellung des Gesamtproteins (SDS-Page) und unten des Western Blots mit Antikörper gegen DENV E-Protein.

Die Temperaturabhängigkeit der Viruspropagierung ist in Abbildung 3.4.1 links dargestellt und zeigt jeweils das Gesamtproteingel und den Western-Blot für 33°C (A) und für 28°C (B). Für die normale Zellhaltung werden die Insektenzellen bei 28°C und 10% CO_2 inkubiert, weshalb auch diese Temperatur für die Infektion verwendet wurde. In der Literatur wurde von Medina *et al.* jedoch 33°C und 10% CO_2 für die Infektion von Insektenzellen mit DENV angegeben [275]. Die Zellen wurden jeweils mit einem MOI von 0,01 an Tag 0 infiziert und bei den jeweiligen Temperaturen inkubiert. Die Proben wurden nach 3, 4, 5, 6, 7 und 11 Tagen genommen und mittels SDS-Page und Western-Blot analysiert. Für beide Temperaturen lässt sich kein Unterschied der unterschiedlichen Probenahmen im Gesamtproteingel feststellen. Es sind viele Banden zu erkennen, die zu allen Probenahmezeitpunkten gleich sind. Diese Banden resultieren vor allem aus Mediumbestandteilen wie FBS. Im rechten Teil der Abbildung ist in einer Spur ausschließlich 2% FBS aufgetragen und zeigt die gleiche Proteinverteilung wie zu den Probenahmezeitpunkten. Das bestätigt, dass die in allen Proben vorkommenden Proteine aus dem FBS als Mediumzugabe resultieren und nicht auf den propagierten Dengue-Virus zurückzuführen sind. Im Western-Blot, der spezifisch das E-Protein des DENV markiert, lässt sich jedoch ein klarer Effekt der Probenahmezeitpunkte und der Temperatur erkennen. Bei 28°C steigt die Viruskonzentration stetig

3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

mit der Anzahl der Tage nach Infektion, bis an Tag 11 die höchste Viruslast detektiert wurde. Jedoch war nach elf Tagen Infektion der Zellrasen schon zum Teil zerstört. Für die Inkubationstemperatur von 33°C ist die maximale Viruskonzentration bereits nach fünf beziehungsweise sechs Tagen nach Infektion erreicht und scheint danach wieder abzunehmen. Die Abnahme der Viruslast kann durch den lytischen Lebenszyklus des Virus oder die geringe Stabilität des Virus bei 33°C erklärt werden. Um höchst mögliche Viruskonzentrationen in kurzer Zeit zu erzielen wurde als Infektionstemperatur 33°C gewählt, vor allem weil die Zellen nach fünf bis sechs Tagen deutlich vitaler aussahen als nach elf Tagen.

Auf der rechten Seite in Abbildung 3.4.1 ist die Abhängigkeit der Viruskonzentration von der initialen Multiplizität der Infektion dargestellt. Die Insektenzellen wurden jeweils mit einem MOI von 0,01 (C) oder 0,1 (D) infiziert und für drei bis sechs Tage bei 33°C und 10% CO₂ inkubiert. In dem Gesamtproteingel ist nach wie vor kein Unterschied zu erkennen, jedoch wurde diesmal auch 2% FBS als Negativkontrolle mit aufgetragen und ergibt, genau wie bereits beschrieben, das gleiche Muster wie die genommenen Proben. Im Western-Blot stellt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den verschiedenen MOI heraus. Bei einem MOI von 0,01 ist eine steigende Viruskonzentration mit einem Maximum nach sechs Tagen zu erkennen. Der Anstieg ist jedoch deutlich langsamer als bei einem MOI von 0,1. Bei einem MOI von 0,1 kann bereits nach drei Tagen eine geringe Viruskonzentration detektiert werden und es scheint nach fünf Tagen eine Sättigung erreicht zu sein.

Auf Grundlage der vorangegangenen Optimierungsexperimente wurden für die folgenden Viruspropagierungen die Insektenzellen mit einem MOI von 0,1 infiziert und für fünf Tage bei 33°C inkubiert.

Nach fünf Tagen wurde die Virussuspension nach dem Protokoll in Abschnitt 3.3.3 über eine zweifache Saccharose-Zentrifugation aufgereinigt und aufkonzentriert. In Abbildung 3.4.2 ist das Gesamtproteingel der einzelnen Schritte der Aufreinigung dargestellt.

Wie auch auf den bereits gezeigten Gelen zur Optimierung der Viruspropagierung (Abb.3.4.1) zeigten sich hier große Verunreinigungen in der Virussuspension, die hauptsächlich durch das im Medium vorhandene FBS verursacht werden. Im Laufe der Aufreinigung sollen diese Bestandteile entfernt werden. Auch nach einer normalen Zentrifugation bei 1000 x g (Spur 2), die zur Abtrennung größerer Partikel dient, ist auf dem Proteingel keine Verbesserung zu erkennen. In Spur 4 ist das resuspendierte Pellet der ersten Saccharose-Zentrifugation aufgetragen. Es sind nur noch wenige Banden und vor allem eine prominente Bande bei 55 kDa zu erkennen. Durch die zweite Saccharose-Zentrifugation (resuspendiertes Pellet, Bande 6) wurden auch die letzten Verunreinigungen abgetrennt - es ist nur noch eine Hauptbande bei 55 kDa zu erkennen. Die Größe des DENV E-Proteins beträgt 55 kDa und die Viruskonzentration ist nach der Aufreinigung so hoch, dass sie bereits im SDS-Gel sichtbar wird und kein noch sensitiver Western-Blot benötigt wird. Mit dieser Aufreinigungsmethode konnten hoch reine und stark aufkonzentrierte Viruspartikel generiert werden, die im Folgenden für die Lipidextraktion verwendet werden können.

3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

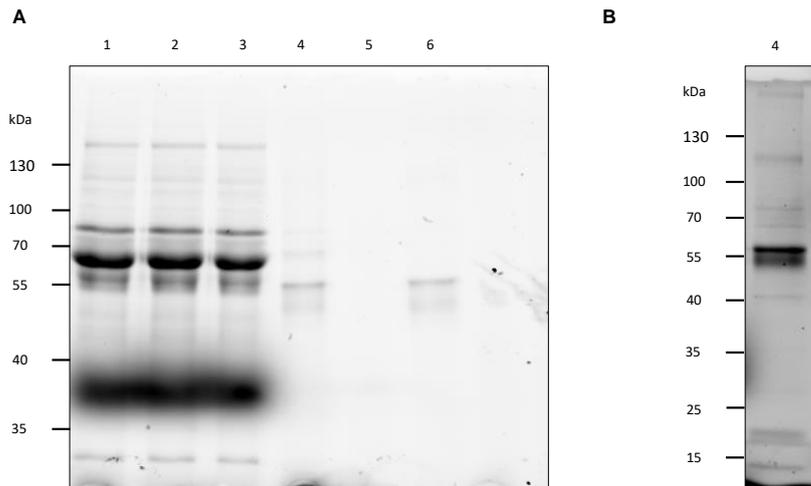


Abbildung 3.4.2: A: SDS-Page der verschiedenen Aufreinigungsschritte der Virussuspension 5 Tage nach Infektion mittels 2-facher Saccharose-Zentrifugation. 1) Überstand nach 5-tägiger Infektion von Insektenzellen, 2) Überstand nach Abtrennung der Zellbestandteile und anderen großen Partikel durch Zentrifugation, 3) Überstand nach erster Saccharose-Zentrifugation, 4) resuspendiertes Pellet nach erster Saccharose-Zentrifugation, 5) Überstand nach zweiter Saccharose-Zentrifugation und 6) resuspendiertes Pellet nach zweiter Saccharose-Zentrifugation, B: Auftragung des resuspendierten Pellets der ersten Saccharose-Zentrifugation (Spur 4 in A) auf ein 12,5%-iges SDS-Gel.

Das E-Protein konnte nach der Aufreinigung mittels Saccharose-Zentrifugation bereits in einem 10%-igen SDS-Gel visualisiert werden. Die anderen Strukturproteine von DENV sind mit Molekulargewichten von 10 kDa für das C-Protein und 19 kDa für das prM-Protein jedoch zu klein für die Visualisierung mit einem 10%-igen SDS-Gel. Durch Erhöhung des Acrylamid-Anteils auf 12,5% und erneute Auftragung der Probe des resuspendierten Pellets nach der ersten Saccharose-Zentrifugation werden auch das C- und prM-Protein sichtbar. Die Banden für das C- und das prM-Protein sind jedoch deutlich schwächer als die des E-Proteins und das obwohl alle drei Proteine in ähnlicher Abundanz im Viruspartikel vorkommen (180 E-Proteine, 180 prM-Proteine und 200 C-Proteine) [276,277]. Möglicherweise weist das E-Protein eine höhere Stabilität in den verwendeten Lösungen auf, sodass Teile der C- und M-Proteine bereits degradiert sind und nicht mehr mittels SDS-Page dargestellt werden können. Darüber hinaus ist die Visualisierung kleiner Proteine mittels SDS-Page oftmals schwierig. Eine weitere Erhöhung des Acrylamid-Anteils könnte möglicherweise zu einer genaueren Darstellung beitragen.

3.4.2 Gezielte LC/MS/MS basierte Lipidomstudien

Für die gezielten LC/MS/MS basierten Lipidom-Studien wurden sowohl Insekten- als auch humane Leberzellen als Wirtszelle für die Viruspropagierung verwendet, um den Einfluss der Wirtszelle auf das Viruslipidom zu charakterisieren. Nach Entwicklung der optimalen Viruspropagierung und Aufreinigung über eine zweifache Saccharose-Zentrifugation in Insektenzellen und humanen Hepatomazellen wurden die Lipide aus der Wirtszelle, der infizierten Zelle und dem aufgereinigten Virus nach Bligh & Dyer extrahiert. Die extrahierten Lipide wurden anschließend wie in Abschnitt 3.3.9 beschrieben vermessen und analysiert.

3.4.2.1 Charakterisierung des Lipidoms von C6/36 Zellen, infizierten C6/36 Zellen und in C6/36 propagierten DENV

DENV wurde in C6/36 Zellen propagiert und vor der Lipidextraktion wurde ein Plaque Assay durchgeführt, um den Virustiter zu bestimmen und zu zeigen, dass es sich nach wie vor um einen infektiösen Virus handelt. Im Plaque Assay ergab sich nach zweifacher Saccharose-Zentrifugation ein Virustiter von $6 \cdot 10^5$ pfu/ml.

Mit der gezielten LC/MS/MS Messung der Insektenzelllipidextrakte konnten 47 Lipide in vier verschiedenen Klassen - LysoPC, PC, PE und SM - detektiert werden. In den Phospholipid-Klassen PI und PS konnten keine Lipide im C6/36 Extrakt detektiert werden und weitere Klassen wurden in der gezielten massenspektrometrischen Messung nicht betrachtet. Ein interner Standard mit je einem Kandidaten pro Kopfgruppe wurde verwendet, um die Lipide anhand der Flächen unter den Kurven zu quantifizieren. In Tabelle 3.4.1 ist allgemein ein Überblick über die Verteilung innerhalb der vier Lipidklassen in der Wirtszelle und der jeweilige Grad der Änderung im Lipidom der infizierten Zelle und dem aufgereinigten Virus im Vergleich zur Wirtszelle dargestellt.

Tabelle 3.4.1: Tabellarische Darstellung der Lipidanteile für C6/36 Zellen in den vier Lipidklassen und der jeweilige Grad der Änderung im Lipidom der infizierten C6/36 Zellen und dem aufgereinigten Virus im Vergleich zur Wirtszelle.

	Anteil[%]		
	C6/36	Änderungsfaktor im Vergleich zu C6/36	
		Infizierte C6/36	DENV (aus C6/36)
LysoPC	0,05	+ 5,40	+ 10,40
PC	28,52	- 1,02	+ 1,06
PE	50,52	+ 1,06	- 1,42
SM	20,91	- 1,14	+ 1,61

Das mittels gezielter massenspektrometrischer Methode bestimmte Lipidom der Insektenzellen, die als Wirtszelle dienen, setzt sich aus 0,1% LysoPC, 28,5% PC, 20,9% SM und 50,5% PE zusammen (Tab. 3.4.1). Die dargestellten Anteile wurden über die aus den Intensitäten unter Verwendung des internen Standards berechneten Konzentrationen für jede Lipidklasse im Verhältnis zu der Summe aller Lipidklassen berechnet. In der Literatur beschriebene Lipidomzusammensetzungen von C6/36 geben ein ähnliches Muster wieder. Beispielsweise zeigen Perera *et al.* die Verteilung des C6/36 Lipidom auf sieben Lipidklassen mit 39,2% PC, 31,2% PE, 0,8% PS,

3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

18,5% SM, 5,3% Ceramide, 0,8% Lysophospholipide und 4% Ceramid-Phosphatidylethanolamin (CER-PE) [278]. Mit der hier angewendeten Methode konnten ausschließlich Lipide in den drei Phospholipid-Klassen LysoPC, PC und PE und Sphingomyelin detektiert werden, weshalb die Verteilung leicht abweicht. Der aufgereingte Virus und die infizierte Wirtszelle weisen ein verändertes Lipidom im Vergleich zu der nicht-infizierten Wirtszelle auf. Vor allem der LysoPC-Gehalt ist sowohl in infizierten C6/36 Zellen um das 5,4-fache als auch in dem aufgereinigten DENV sogar um das 10,4-fache erhöht. Während der Phosphatidylcholin-Anteil überwiegend unverändert bleibt, ist der Phosphatidylethanolamin-Anteil in DENV um das 1,42-fache reduziert im Vergleich zur nicht-infizierten Wirtszelle. In der Klasse der Sphingomyeline kann eine 1,14-fache Reduktion in den infizierten Zellen und eine 1,61-fache Steigerung im aufgereinigten Virus beobachtet werden.

Die Unterschiede des DENV Lipidom im Vergleich zur Wirtszelle können zum einen durch den natürlichen Lebenszyklus von DENV erklärt werden(3.1.1.2). Das Virus erhält seine Membran beim Abdocken aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) der Wirtszelle und trägt demnach einen Teil des Wirtzelllipidoms in sich. Das dargestellte Lipidom der Wirtszelle und der infizierten Wirtszelle spiegelt die Summe aller in der Zelle vorkommenden Membranen und somit daraus extrahierten Lipide wider und nicht ausschließlich die des endoplasmatischen Retikulums. Zum anderen können die Abweichungen der Lipidzusammensetzungen des aufgereinigten Virus und den infizierten C6/36 Zellen im Vergleich zu den nicht-infizierten Wirtszelle implizieren, dass die Infektion mit DENV die Lipidzusammensetzung der Wirtszelle beeinflusst. Ivanova *et al.* beschreiben einen starken Anstieg des PE-Gehaltes einhergehend mit der Reduktion des PC-Anteils herbeigeführt durch eine Influenza-Infektion [279]. Die Infektion von C6/36 Zellen mit DENV scheint jedoch eher einen Einfluss auf die Klasse der LysoPCs und Sphingomyeline zu zeigen. Dieser Effekt konnte bereits von Perera *et al.* beobachtet werden [278].

In Abbildung 3.4.3 ist sowohl die Übersicht über die in Tabelle 3.4.1 dargestellte Lipidverteilung als Balkendiagramm, als auch alle 47 detektierten Lipide in Relation zu dem Wirtzelllipidom in Form einer Heatmap dargestellt. Für die Darstellung der einzelnen Lipide wurden die Anteile ($n=2$) \log_2 -transformiert und die Unterschiede zur Wirtszelle als entweder $\log_2(\text{DENV (aus C6/36)}/\text{C6/36})$ oder $\log_2(\text{infizierte C6/36}/\text{C6/36})$ berechnet.

Die graphische Darstellung der prozentualen Anteile zeigt noch einmal deutlicher die bereits beschriebene 1,61-fache Erhöhung der Sphingomyeline und die 1,42-fache Reduktion der Phosphatidylethanolamine im Virus im Vergleich zur nicht-infizierten Wirtszelle. Darüber hinaus kann auch der signifikante Anstieg des LysoPC-Anteils im aufgereinigten Virus und der infizierten Wirtszelle im Vergleich zu nicht-infizierten C6/36 Zellen verdeutlicht werden. Betrachtet man die Verteilung der Lipidanteile im Detail (Abb. 3.4.3, rechts) wird deutlich, dass vor allem die kürzerkettigen Lipide runterreguliert sind und die längerkettigen vermehrt in DENV(aus C6/36) und infizierten C6/36-Zellen im Vergleich zur nicht-infizierten Wirtszelle vorkommen. Darüber hinaus wird deutlich, dass nicht alle Lipide einer Klasse zu dieser Veränderung beitragen, sondern nur bestimmte Kandidaten reguliert zu sein scheinen. Beispielsweise trägt vor allem PE38:5 zu der 1,42-fachen Reduktion des PE-Gehalts in DENV im Vergleich zu nicht-infizierten C3/36

3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

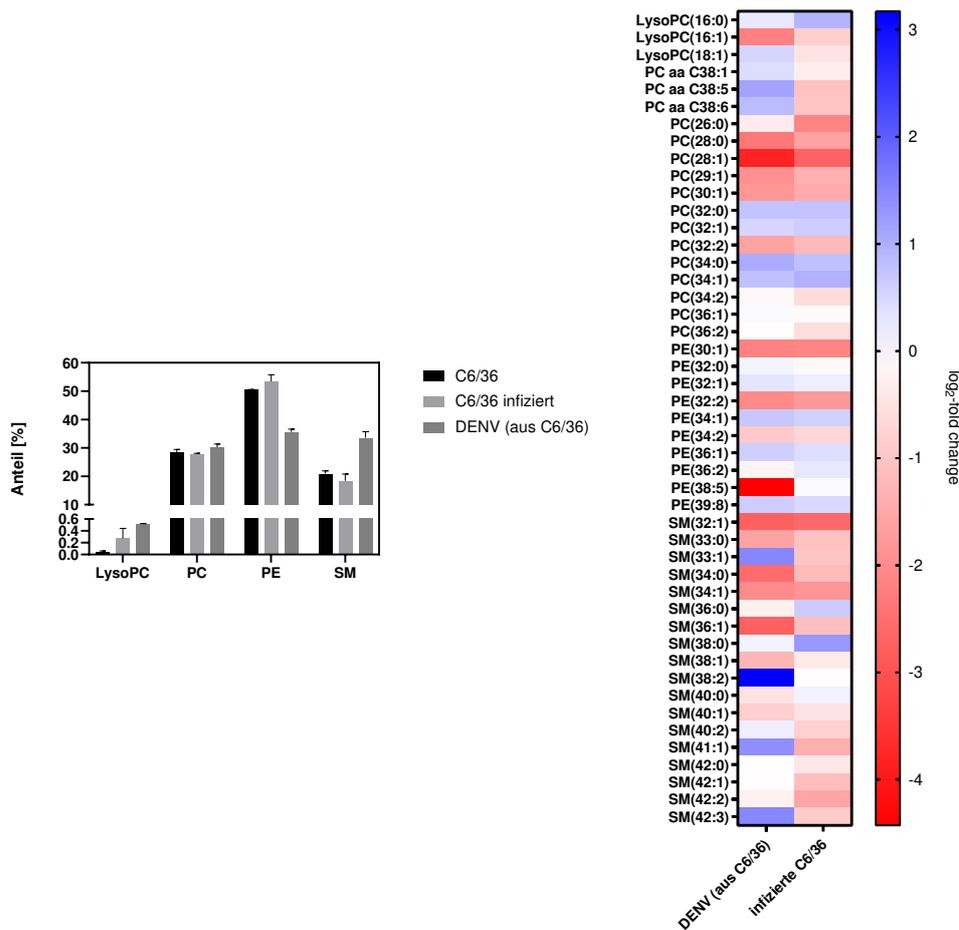


Abbildung 3.4.3: Balkendiagramm des C6/36 Lipidoms als Übersicht und Heatmap der detaillierten Darstellung aller Lipide. Links: Prozentuale Anteile der einzelnen Lipid-Klassen als Balkendiagramm. Darstellung der Verteilungen in C6/36 Zellen, infizierten C6/36 und in aufgereinigten in C6/36 Zellen propagiertem Virus. Rechts: Darstellung der einzelnen Lipidanteile, die \log_2 -transformiert wurden und der Unterschied zu nicht-infizierten C6/36 Zellen als entweder $\log_2(\text{DENV (aus C6/36)}/\text{C6/36})$ oder $\log_2(\text{infizierte C6/36}/\text{C6/36})$ berechnet wurde. Die Farbskala zeigt im Vergleich zu nicht infizierten C6/36 Zellen in blau erhöhte und in rot reduzierte Lipide. Die Lipide wurden wie folgt benannt: Kettenlänge : Anzahl der ungesättigten Bindungen.

Zellen bei. Die 1,61-fache Erhöhung des Sphingomyelin-Gehaltes in DENV wird hauptsächlich durch SM38:2, SM41:1 und SM42:3 hervorgerufen. Diese Beobachtung wird durch die Auftragung der Abundanzen der jeweiligen Lipide in der dazugehörigen Lipidklasse für C6/36 Zellen, infizierte C6/36 Zellen und aus C6/36 Zellen propagierten DENV nochmals verdeutlicht (Abb. 3.4.4). Darüber hinaus wird deutlich, dass beispielsweise der signifikante Unterschied in PE38:5 zwischen C6/36 Zellen und draus propagierten DENV daraus resultiert, dass PE38:5 in DENV nicht detektiert werden konnte. Die ausbleibende Detektion von PE38:5 kann sowohl auf die Abwesenheit dieses Lipides als auch minimale Konzentrationen unterhalb des Detektionslimits zurückzuführen sein. Das gleiche gilt für PC29:1 und SM33:0. Eine ähnliche Regulation speziell dieser Lipide mit gleichen Kettenlängen aber unterschiedlichen Sättigungen konnte bereits von Perera *et al.* beobachtet werden. Durch die Infektion von C6/36 Zellen wurde eine signifikante Erhöhung in PE38:1, SM42:1, SM42:2, LysoPC18:1, Lyso PC16:0 und LysoPC16:1 detektiert. Die hier dargestellten Ergebnisse sind konsistent mit den Beobachtungen von Perera *et al.*.

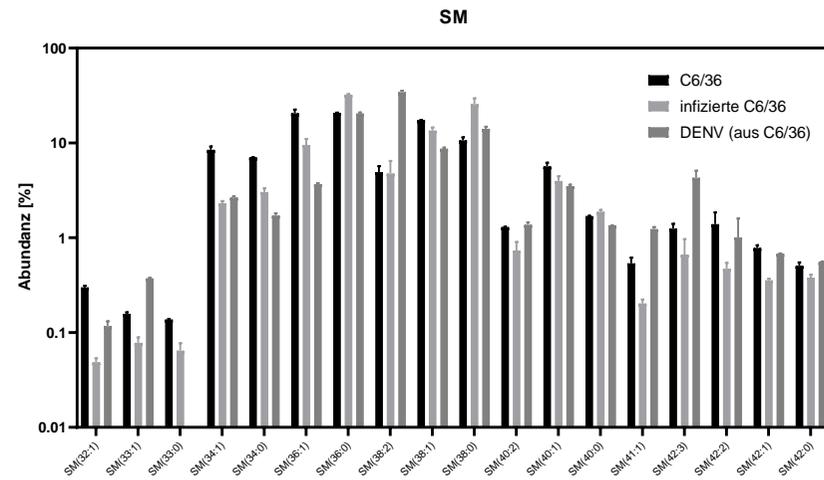
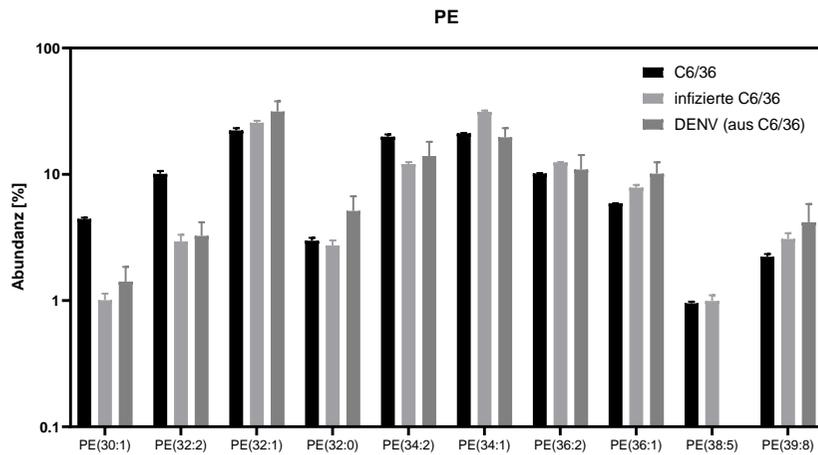
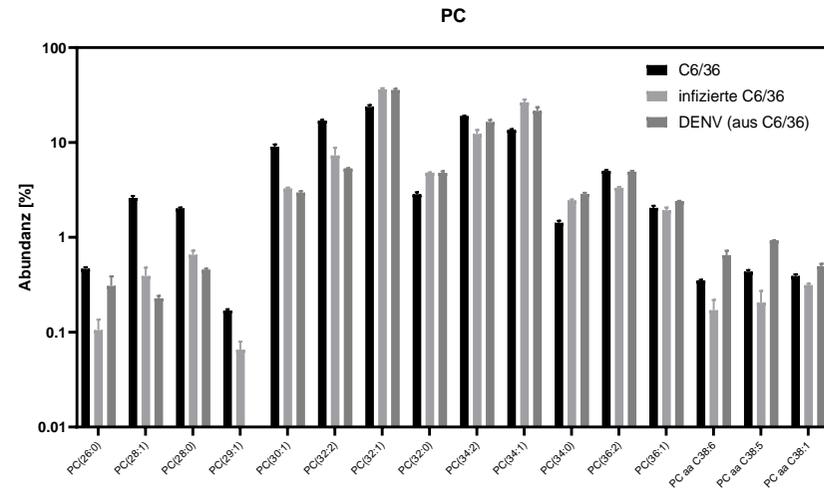
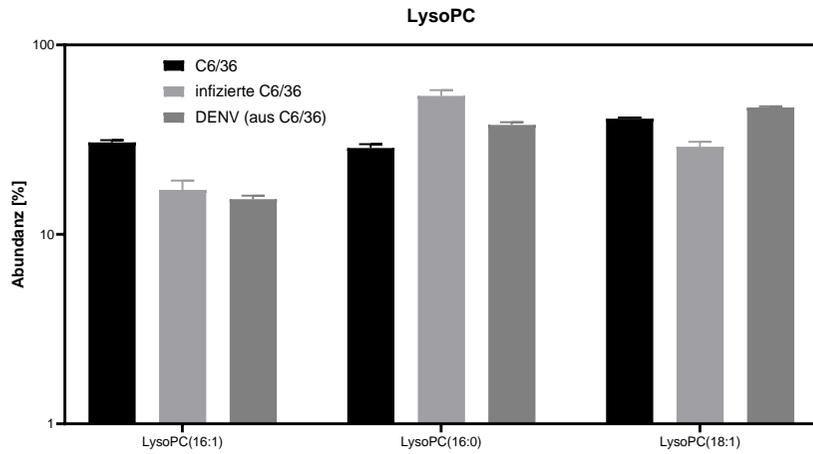
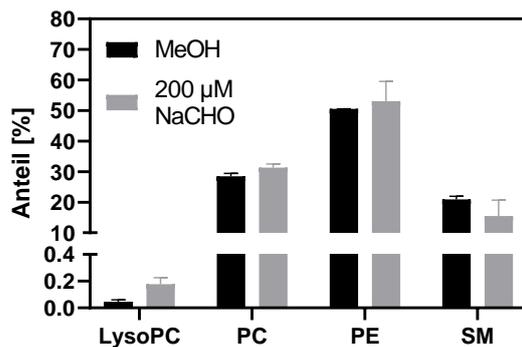


Abbildung 3.4.4: Auftragung der Abundanzen der jeweiligen Lipide in der dazugehörigen Lipidklasse für C6/36 Zellen, infizierte C6/36 Zellen und aus C6/36 Zellen propagierten DENV.

3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.4.2.2 Veränderung des Wirtszelllipidoms zur Propagierung von DENV mit neuer Lipidhülle

Nach Optimierung der Viruspropagierung und Aufreinigung und Entwicklung einer geeigneten massenspektrometrischen Methode zur Charakterisierung des Lipidoms von Insektenzellen und daraus propagierten Dengue Viren, wurde im nächsten Schritt versucht, die Lipidzusammensetzung der Wirtszelle und damit auch der des propagierten Virus zu modifizieren. Lladó *et al.* beschreiben, dass der Einsatz einer Ölsäure (NaCHO, 2-Hydroxyölsäure) die Sphingomyelin-Synthase aktiviert und damit den Sphingomyelin und Diacylglycerol-Anteil in Zellmembranen erhöht begleitend mit der Reduktion des PE- und PC-Gehaltes [280]. Auf Grundlage dessen wurden im nächsten Schritt die Lipide aus C6/36 Zellen extrahiert, die zuvor mit 200 μM der Ölsäure für 72 h bei 28°C behandelt wurden. Die Ergebnisse des Lipidoms von behandelten im Vergleich zu unbehandelten Insektenzellen ist in Abbildung 3.4.5 dargestellt.



	Anteil [%]		Änderungsfaktor
	MeOH	200 μM NaCHO	
LysoPC	0,05	+ 3,60	
PC	28,52	+ 1,10	
PE	50,52	+ 1,05	
SM	20,91	- 1,35	

Abbildung 3.4.5: Darstellung des Lipidoms von unbehandelten und mit NaCHO behandelten C6/36 Zellen. Links: Graphische Darstellung des Lipidoms von unbehandelten Insektenzellen mit Methanol als Lösungsmittelkontrolle (schwarz) und mit 200 μM NaCHO behandelten Zellen (grau). Rechts: Tabellarische Auflistung der Lipidanteile unbehandelter C6/36 Zellen (MeOH) und die Differenz im Lipidom von Zellen, die mit 200 μM NaCHO behandelt wurden.

Um auszuschließen, dass das Lösungsmittel, in diesem Fall Methanol (MeOH), einen Einfluss auf das Lipidom der Insektenzellen hat, wurden die Zellen parallel mit der gleichen Menge an Methanol, wie bei Zugabe der Ölsäure verwendet wurde, behandelt. Im Vergleich der beiden Lipidextrakte von unbehandelten und mit 200 μM NaCHO behandelten C6/36 Zellen kann lediglich eine Erhöhung des LysoPC-Anteils um den Faktor 3,6 beobachtet werden. Nach Lladó *et al.* wäre eine Reduktion im Phosphatidylethanolamin-Gehalt und ein signifikanter Anstieg im SM-Gehalt zu erwarten gewesen [280], doch dieser Effekt kann nicht beobachtet werden. Im Gegenteil konnte eine leichte Erhöhung des PE-Gehalts um 2,5% beobachtet werden. Ein möglicher Grund für den ausbleibenden Effekt der Ölsäure könnte sein, dass diese nur Auswirkungen auf das Lipidom humaner Zelllinien zeigt und keinen Effekt auf Insektenzellen aufweist. Im nächsten Schritt wird der Effekt der Ölsäure auf humane Huh7.5.1 Zellen betrachtet, die auch zur anschließenden Viruspropagierung verwendet werden können.

3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.4.2.3 Charakterisierung des Lipidoms von Huh7.5.1 Zellen und darin propagierten DENV

Zur Charakterisierung des Lipidoms von humanen Leberzellen (Huh7.5.1) wurde eine neue gezielte massenspektrometrische Methode entwickelt, da davon auszugehen ist, dass sich das Lipidom - vor allem die Fettsäurelängen und Anzahl an ungesättigten Bindungen - von dem der Insektenzellen unterscheidet. Für die Entwicklung der neuen Methode wurde ein Huh7.5.1 Lipidextrakt verwendet und die detektierten Lipide in einer neuen Massenliste für die Vermessung weiterer humaner Proben zusammengefasst. Mit dieser gezielten Methode konnten 125 verschiedene Lipide in den vier Lipidklassen LysoPC, PC, PE und SM detektiert werden. In den Phospholipid-Klassen PI und PS konnten keine Lipide im Huh7.5.1 Extrakt detektiert werden und weitere Klassen wurden in der gezielten massenspektrometrischen Messung nicht betrachtet. Eine Übersicht der Verteilung in den Lipidklassen ist in Tabelle 3.4.2 und in Abbildung 3.4.6 dargestellt.

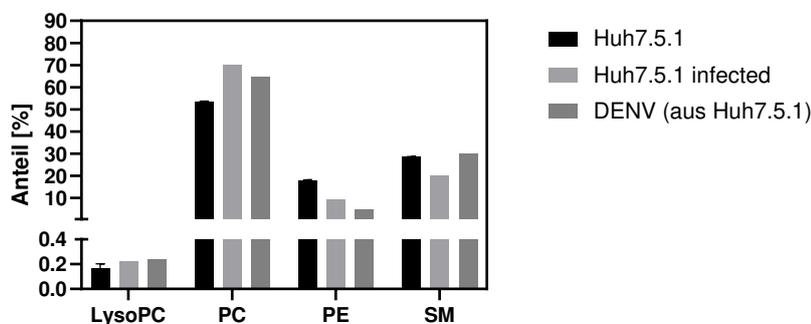


Abbildung 3.4.6: Darstellung der Lipidzusammensetzung von humanen Leberzellen (Huh7.5.1), infizierten Huh7.5.1 Zellen und daraus propagiertem DENV.

Tabelle 3.4.2: Tabellarische Darstellung der Lipidzusammensetzung von humanen Leberzellen (Huh7.5.1), infizierten Huh7.5.1 Zellen und daraus propagiertem DENV.

	Anteil[%]	Änderungsfaktor zu Huh7.5.1	
	Huh7.5.1	Infizierte Huh7.5.1	DENV (aus Huh7.5.1)
LysoPC	0,17	+ 1,29	+ 1,40
PC	53,36	+ 1,32	+ 2,21
PE	17,92	- 1,91	- 3,61
SM	28,55	- 1,42	+ 1,06

Im Gegensatz zu den C6/36 wird der Anteil an LysoPC durch die Infektion und in dem aufgereinigten Virus nur um den Faktor 1,29 in infizierten Zellen und das 1,40-fache in DENV erhöht. Die Änderung in der Lipidzusammensetzung der Huh7.5.1 Zellen durch die Infektion mit DENV spiegelt sich hauptsächlich in einer Erhöhung des PC-Gehalts um den Faktor 1,32 und einer Reduktion des PE- und SM-Anteils um den Faktor 1,91 bzw. 1,42 wider. Ein ähnlicher Effekt kann auch für den in Huh7.5.1 Zellen propagierten Virus beobachtet werden (Tab. 3.4.2, Abb. 3.4.6). Der PC-Gehalt ist um das 2,21-fache erhöht und der PE-Anteil in der viralen Lipidhülle sogar um den Faktor 3,61 reduziert. Ivanová *et al.* beschreiben ebenfalls für Influenza eine stark veränderte Lipidzusammensetzung des Virus im Vergleich zur Wirtszelle. Jedoch scheint für Influenza der PE-Gehalt im Virus stark erhöht zu sein, wobei der PC-Gehalt reduziert ist im Vergleich zur

3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Wirtszelle [279].

DENV ist ein lytischer Virus [257], der zur Zellyse und damit zum Zelltod führt. Es kann angenommen werden, dass der Prozess der Zellyse durch die DENV Infektion die Lipidzusammensetzung der Huh7.5.1 beeinflusst. Der Einfluss auf das Lipidom infizierten Huh7.5.1 Zellen spiegelt sich in einem Anstieg des PC-Gehaltes und einer Reduktion des PE-Anteils wider.

Bei dem Vergleich des Einflusses der DENV Infektion auf die beiden unterschiedlichen Wirtszellen und daraus propagierten Wirtszellen, kann sowohl für DENV aus C6/36 als auch aus Huh7.5.1 Zellen eine Reduktion den PE-Anteils in der Virushülle im Vergleich zur Wirtszelle um das 1,42- bzw. das 3,61-fache beobachtet werden. Eine signifikante Erhöhung des LysoPC-Gehalts kann nur bei der Infektion von Insektenzellen beobachtet werden. Während der PC-Anteil in DENV aus C6/36 überwiegend gleich bleibt ist er in DENV aus Huh7.5.1 um das 1,21-fache erhöht. Allgemein ist der Einfluss der DENV Infektion auf das Wirtzelllipidom stärker bei humanen Leberzellen ausgeprägt als bei C6/36 Zellen.

Merz *et al.* haben bereits die Lipidzusammensetzung von Huh7.5 Zellen mittels gezielter massenspektrometrischer Analyse aufgeklärt, die in deren Fall zur HCV Infektion verwendet wurden. Sie beschrieben das Huh7.5 Lipidom als Zusammensetzung von 30,17% PC, 5,37% SM, 21,37% PE, 6,6% PS, 9,24% PI, 0,25% PG, 0,36% HexCer, 0,32% Cer, 21,25% Chol und 5,07% CE [281]. Diese Werte weichen von der hier bestimmten Lipidzusammensetzung ab. Lediglich der bestimmte PE-Anteil gleicht dem mit der hier verwendeten Methode ermittelten PE-Gehaltes. In dieser Arbeit verwendeten Methode konnten ausschließlich Lipide in den drei Phospholipidklassen LysoPC, PC und PE und Sphingomyeline vermessen werden, die von Merz *et al.* verwendete Methode ermöglichte jedoch die Detektion von Lipiden in zehn verschiedenen Klassen. Obwohl Lipide in 6 weiteren Klassen detektiert werden konnten, sollte die allgemeine Verteilung in den Klassen LysoPC, PC und SM beider Messmethoden übereinstimmen. Der Unterschied in den Lipidklassen PC und SM kann vor allem dadurch erklärt werden, dass in der Studie von Merz *et al.* die Tochterzelllinie Huh7.5 statt Huh7.5.1 Zellen verwendet wurden. Darüber hinaus wurden dem Kultivierungsmedium nicht-essentielle Aminosäuren zugesetzt, die einen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung haben könnten.

Zusätzlich zu der Übersichtsgraphik ist in Abbildung 3.4.7 eine Heatmap der einzelnen 125 Lipide gezeigt. Die Lipidanteile der DENV aus Huh7.5.1 Zellen und infizierten Huh7.5.1 Zellen wurden \log_2 -transformiert und die Unterschiede zur Wirtszelle als entweder $\log_2(\text{DENV (aus Huh7.5.1)}/\text{Huh7.5.1})$ oder $\log_2(\text{infizierte Huh7.5.1}/\text{Huh7.5.1})$ berechnet.

In der detaillierten Darstellung in Abbildung 3.4.7 wird deutlich, dass einzelne Lipide des aufgereinigten DENV und der infizierten Huh7.5.1 Zellen im Vergleich zu den nicht-infizierten Wirtszellen signifikant reguliert sind. In der Klasse der LysoPCs erscheinen die meisten Lipide weiß und weisen demnach keinen signifikanten Unterschied zu der nicht-infizierten Huh7.5.1 Zellen auf. Der Anstieg im LysoPC-Gehalt um den Faktor 1,29 bei den infizierten Huh7.5.1 Zellen und um 1,4 bei dem aufgereinigten Virus wird hauptsächlich durch LysoPC15:0, das in beiden

3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

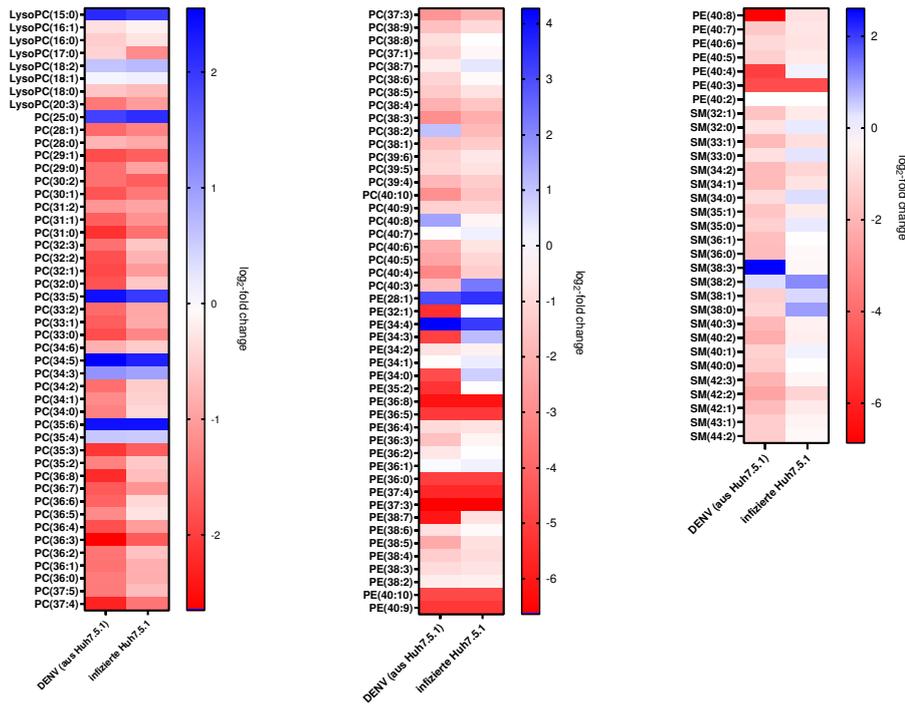


Abbildung 3.4.7: Heatmap der Lipidanteile in DENV aus Huh7.5.1 und infizierten Huh7.5.1 im Verhältnis zur nicht-infizierten Wirtszelle. Darstellung der einzelnen Lipidanteile, \log_2 -transformiert und die Unterschiede zur Wirtszelle als entweder $\log_2(\text{DENV (aus Huh7.5.1)}/\text{Huh7.5.1})$ oder $\log_2(\text{infizierte Huh7.5.1}/\text{Huh7.5.1})$ berechnet. Die Farbskala zeigt im Verhältnis zu nicht-infizierten Huh7.5.1 Zellen in blau erhöhte und in rot reduzierte Lipide. Die Lipide wurden wie folgt benannt: Kettenlänge : Anzahl der ungesättigten Bindungen.

Fällen um den Faktor 6 hochreguliert ist, verursacht. Phosphatidylcholin kommt sowohl im Virus als auch in der infizierten Zelle vermehrt vor. Diese Erhöhung um das 1,32 bzw. 1,21 fache wird hauptsächlich durch PC40:8, PC34:5, PC33:5 und PC35:6 verursacht. Darüber hinaus ist PC40:8 in DENV aus Huh7.5.1 Zellen um Faktor 3,5 und PC40:3 in den infizierten Zellen um den Faktor 6,5 erhöht. Betrachtet man die Klasse der Sphingomyeline für DENV wird deutlich, dass diese überwiegend reduziert vorkommen, doch der Anstieg in SM38:3 um Faktor 6,5 gleicht die überwiegend reduzierten Lipide wieder aus. Sodass innerhalb der Klasse der Sphingomyeline kein signifikanter Unterschied zwischen DENV und den Huh7.5.1 Zellen festgestellt werden kann. Für die infizierten Huh7.5.1 Zellen spiegelt sich die Reduktion des SM-Anteils um den Faktor 1,42 in allen Kandidaten wieder, da diese überwiegend um 20-50% reduziert vorliegen. Die Übersichtsgrafik (Abb. 3.4.6) zeigt bereits eine signifikante Reduktion des PE-Gehalts in infizierten Huh7.5.1 Zellen um Faktor 1,91 und in dem aufgereinigten Virus um Faktor 3,61 im Vergleich zur nicht-infizierten Wirtszelle. Dieser Trend wird von der detaillierten Darstellung untermauert, denn ein Großteil der Phosphatidylethanolamine liegt im Vergleich zu nicht-infizierten Huh7.5.1 um 85-90% reduziert vor. Doch auch im Fall der Phosphatidylethanolamine gibt es Ausnahmen, wie beispielsweise PE28:1 und PE34:4, die sowohl in DENV als auch in der infizierten Zelle hochreguliert sind. Die Ergebnisse der Unterschiede zwischen DENV aus Huh7.5.1 und infizierten Huh7.5.1 Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Huh7.5.1 Zellen, die in einer Heatmap, dargestellt sind, werden zusätzlich durch die Darstellung der Abundanzen untermauert (Abb. 3.4.9).

3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die signifikanten Reduktionen spezieller Lipide in DENV aus Huh7.5.1 Zellen kann in vielen Fällen auf ausbleibende Detektion zurückgeführt werden. Vor allem in der Klasse der Phosphatidylethanolamine werden viele Kandidaten in DENV nicht detektiert - unter anderem PE32:1, PE34:0, PE36:0 und PE40:8. Doch auch die Hochregulation von PE28:1 und PE34:4 in DENV und infizierten Huh7.5.1 kann durch Darstellung der Abundanz verdeutlicht werden.

Im nächsten Schritt wurden auch die Huh7.5.1 Zellen für 72 h bei 37°C mit 200 μ M NaCHO behandelt und anschließend die Lipide extrahiert. Auch hier wurde die gleiche Menge Methanol zu den Zellen als Lösungsmittelkontrolle gegeben. Beide Lipidextrakte wurden anschließend mit der oben beschriebenen Methode massenspektrometrisch vermessen und die sich daraus ergebende Verteilung ist in Abbildung 3.4.8 tabellarisch und graphisch dargestellt.

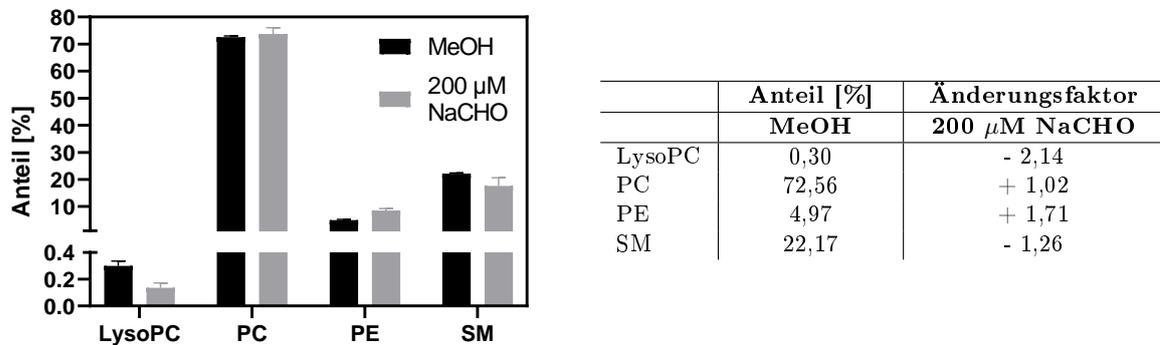


Abbildung 3.4.8: Darstellung des Lipidoms von unbehandelten und mit NaCHO behandelten Huh7.5.1 Zellen. Links: Graphische Darstellung des Lipidoms von unbehandelten humanen Leberzellen mit Methanol als Lösungsmittelkontrolle (schwarz) und mit 200 μ M NaCHO behandelten Zellen (grau). Rechts: Tabellarische Auflistung der Lipidanteile unbehandelter Huh7.5.1 Zellen (MeOH) und die Differenz im Lipidom von Zellen, die mit 200 μ M NaCHO behandelt wurden.

Auch bei den Huh7.5.1 wird kein deutlicher Effekt der Ölsäure auf die Lipidzusammensetzung deutlich. Ähnlich wie bei den C6/36 Zellen steigt der PE-Gehalt durch die Behandlung mit NaCHO um den Faktor 1,71 an, anstatt dass wie von Lladó *et al.* beschrieben zu sinken [280]. Des weiteren wird auch kein Anstieg der Sphingomyeline deutlich, sondern eine Reduktion um den Faktor 1,26. Auffallend ist jedoch, dass das Lipidom von Huh7.5.1 Zellen bereits durch die Behandlung mit Methanol verändert wird. Es kann dabei ein ähnlicher Trend, wie durch die Infektion mit DENV beobachtet werden. Der PC-Gehalt steigt um das 1,36-fache und der PE-Anteil fällt um den Faktor 3,6. Aufgrund dieser Übereinstimmung und der Tatsache, dass DENV ein lytischer Virus ist [257], kann angenommen werden, dass der Einsatz von 1% Methanol im Zellkulturmedium bereits toxisch für die Huh7.5.1 Zellen war. Gu *et al.* zeigten, dass bereits die Anwesenheit von 1% Methanol im Zellkulturmedium die Überlebensrate von Huh7.5 Zellen auf etwa 80% senken [282]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass NaCHO weder einen Einfluss auf die Lipidzusammensetzung von C6/36 noch auf Huh7.5.1 zeigt. Der gewünschte Effekt, der Variation des PE-Gehalts, blieb aus.

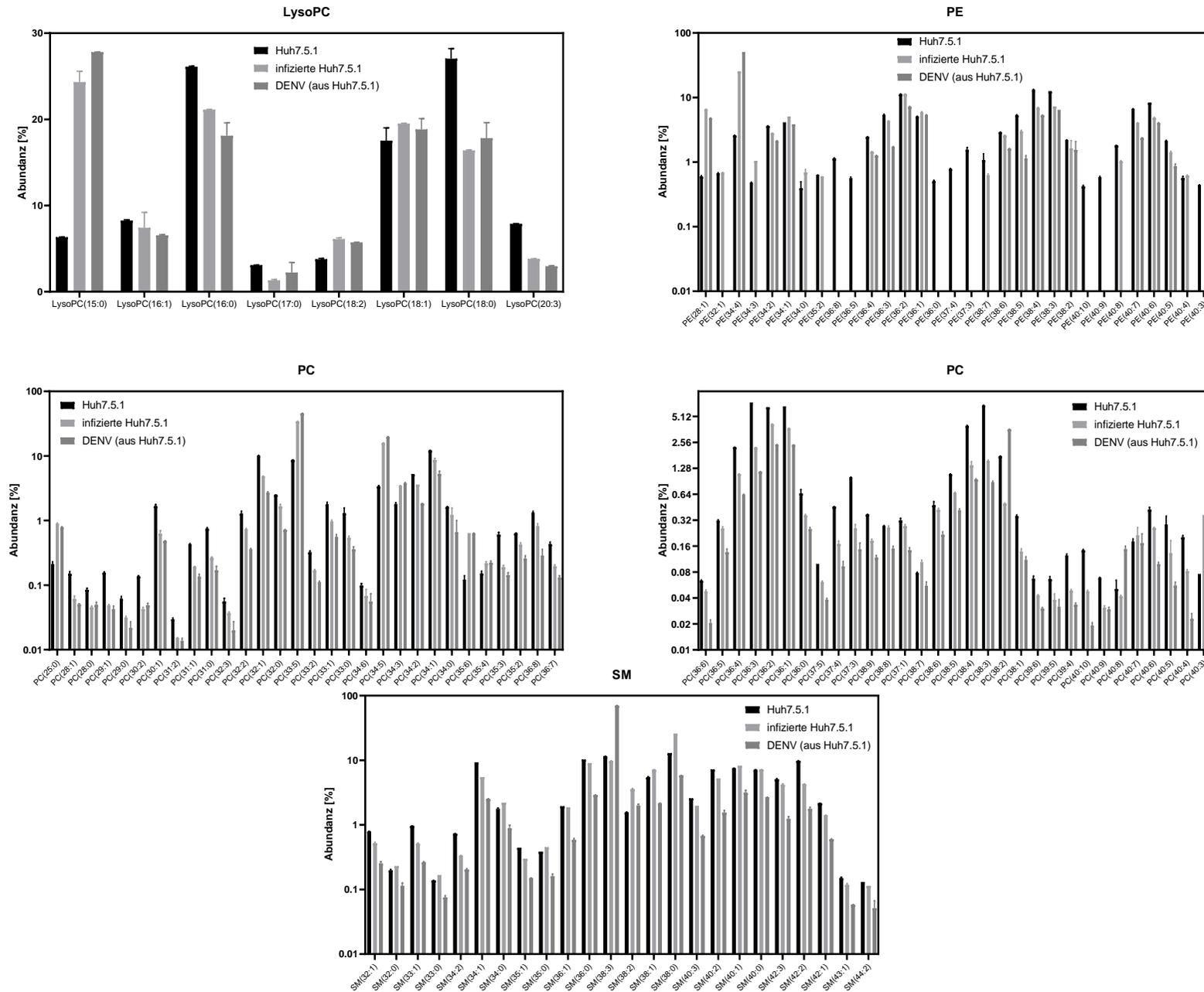


Abbildung 3.4.9: Auftragung der Abundanzen der jeweiligen Lipide in der dazugehörigen Lipidklasse für Huh7.5.1 Zellen, infizierte Huh7.5.1 Zellen und aus Huh7.5.1 Zellen propagierten DENV.

3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.4.2.4 Vergleich der Lipidome unterschiedlicher Zelllinien und daraus propagierten Viren

Beim Vergleich der Lipidome der unterschiedlichen Zelllinien, die als Wirtszellen dienen, wird deutlich, dass sich diese stark unterscheiden. In Abbildung 3.4.10 ist ein direkter Vergleich der Lipidzusammensetzungen der Wirtszellen, der infizierten Wirtszellen und daraus propagierten DENV dargestellt.

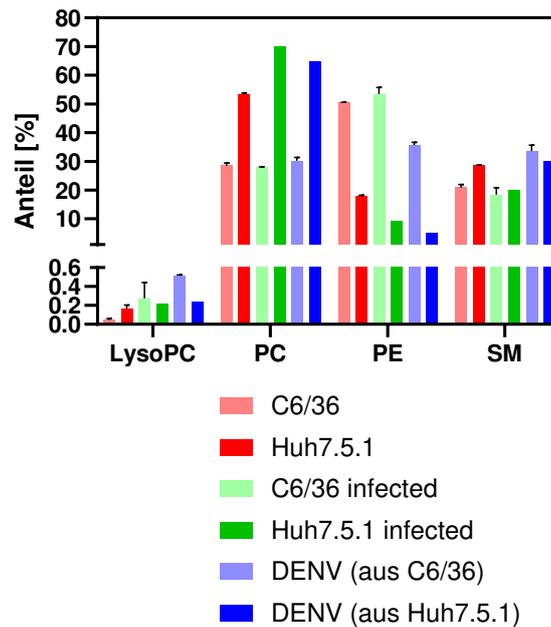


Abbildung 3.4.10: Vergleich der Lipidzusammensetzung von C6/36 und Huh7.5.1 Zellen als zwei verschiedene Wirtszellen zur Propagierung von DENV. Übersicht über die vier Hauptlipidklassen LysoPC, PC, PE und SM. Darstellung der Lipidome von propagierten Viren dazugehörigen infizierten und nicht-infizierten Wirtszellen.

Im Allgemeinen sind die Lipidzusammensetzungen, die jeweils einer Zelllinie angehören, sehr ähnlich. Daraus erschließt sich, dass das Lipidom der DENV von der jeweiligen Wirtszelle abhängt. Besonders auffällig ist die Variation der PC und PE-Gehalte zwischen den beiden Zelllinien. Beispielsweise liegt der PE-Gehalt in C6/36 bei 50,5% und bei Huh7.5.1 Zellen nur bei etwa 18%. Mit Huh7.5.1 Zellen konnten letztendlich Viren mit einem deutlich reduzierten PE-Gehalt von etwa 5% propagiert werden. Die in dieser Studie ermittelten PE-Gehalte sind konsistent mit bereits bekannten PE-Anteilen in humanen und Insektenzellen. Für humane Zelllinien liegen die PE-Gehalte im Bereich von 15-25% und für Insektenzellen im Bereich von 46-58% [257, 283]. Bei Betrachtung der Biosynthese von PE wird deutlich, dass PE und PC über PS metabolisch verbunden sind. Dabei katalysiert die Phosphatidylserin-Synthase die Reaktion von PC zu PS und die Reaktion von PS zu PE wird von der Phosphatidylserin-Carboxylase katalysiert [284]. Expressionsstudien dieser beiden Enzyme könnten Aufschluss über die erhöhten PE-Gehalte in C6/36 liefern. Denn wenn diese Enzyme stärker exprimiert werden, dann kann mehr PC in PE umgewandelt werden und könnte die erhöhten PE-Gehalte in C6/36 Zellen erklären.

3.4.3 Globale LC/MS/MS basierte Lipidom-Studien

Zur Ergänzung der bereits gezeigten gezielten LC/MS/MS basierten Lipidom-Studien von C6/36 und Huh7.5.1 Zellen und jeweils daraus propagierten Viren wurden globale LC/MS/MS Messungen der Lipidextrakte durchgeführt. Ziel war, es die bereits bestimmte Lipidverteilung zu untermauern und darüber hinaus bisher nicht gefundene Lipide bzw. Lipidklassen zu detektieren. Die Lipidextrakte wurden am TimsTOF Pro (Bruker) nach Abschnitt 3.3.10 vermessen. Eine Übersicht über alle detektierten Lipidklassen ist in Abbildung 3.4.11 dargestellt.

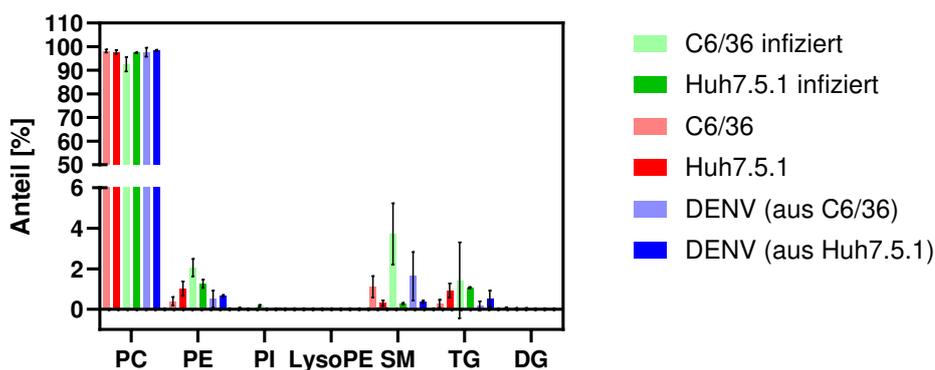


Abbildung 3.4.11: Darstellung der Ergebnisse der globalen Lipidomstudien. Verteilung der Lipidklassen der aufgereinigten DENV, infizierten und nicht-infizierten Wirtszellen jeweils für Insektenzellen und humane Leberzellen.

Mit der globalen LC/MS/MS Messung war es möglich, Lipide aus vier weiteren Klassen zu detektieren - PI, LysoPE, TG und DG. Jedoch konnte kein LysoPC gemessen werden. Für die Insektenzellen konnten insgesamt 117 Lipide in allen sieben Klassen (38 PC, 49 PE, 8 PI, 1 LysoPE, 8 SM, 7 TG und 6 DG) und für die Huh7.5.1 Zellen konnten 88 Lipide in fünf der sieben Klassen (45 PC, 20 PE, 15 SM, 7 TG und 1 DG) detektiert werden. Mit der von Perera *et al.* verwendeten globalen LC/MS/MS basierten Methode zur Charakterisierung des Insektenzelllipidoms konnten 78 Lipide in ebenfalls 7 Klassen (7 LysoPC, 33 PC, 9 SM, 4 LysoPC, 18 PE, 6 Cer, 4 Cer-PE) detektiert werden [278]. Merz *et al.* charakterisierten das Huh7.5-Zelllipidom mittels gezielter massenspektrometrischer Analyse. Die Verteilung über zehn detektierte Lipidklassen ist bereits in Abschnitt 3.4.2.3 aufgeführt. Weitere Angaben über die einzelnen detektierten Lipide werden nicht gemacht [281].

Bei der hier verwendeten globalen LC/MS/MS Methode handelt es sich bei über 90% aller detektierten Lipide um Phosphatidylcholin mit unterschiedlichen Kettenlängen und Sättigungen. Der laut Literatur erwartete PC-Gehalt für C6/36 wäre 39,2% und für Huh7.5 Zellen 30,17% [278,281]. Auch die experimentell bestimmten Anteile der anderen Lipidklassen weichen von denen in der Literatur beschrieben ab und das obwohl in allen Fällen die gleiche Extraktionsmethode nach Bligh & Dyer mit lediglich kleinen Variationen verwendet wurde. Beispielsweise wurde lediglich 0,4 bis 2% PE-detektiert und nicht wie erwartet 39 für C6/36 bzw. 21% für Huh7.5 Zellen. Jedoch der allgemeine Trend ist ähnlich - PC kommt am meisten vor, dann PE und dann Sphingomyelin.

Betrachtet man ausschließlich die hier experimentell ermittelte Verteilung wird deutlich, dass der PC-Gehalt in allen Proben sehr ähnlich ist. Lediglich beim Vergleich der Wirtszelle und der infizierten Wirtszelle wird speziell bei C6/36 Zellen eine Reduktion um Faktor 1,06 des PC-Gehalts nach Infektion sichtbar. Mit sinkendem PC-Gehalt steigt der Anteil an Phosphatidylethanolamin um Faktor 5,3 an. Dieses Phänomen wurde bereits von Ivanová *et al.* bei dem Vergleich von Influenza Virionen mit den nicht-infizierten Wirtszellen deutlich [279], konnte jedoch auf Grundlage gezielter LC/MS/MS Messungen des Lipidoms nicht beobachtet werden. Im aufgereinigten Virus ist der PE-Anteil jedoch nur in dem aus C6/36 propagierten Virus 1,7-fach erhöht und in dem aus Huh7.5.1 Zellen um Faktor 2 reduziert. Vergleicht man die PE-Gehalte zwischen humanen Leberzellen und Insektenzellen wird kein einheitlicher Trend wie bei der gezielten Messung sichtbar. Der PE-Gehalt ist in Huh7.5.1 Zellen um Faktor 2,6 höher als in C3/36 Zellen. Die infizierten Zellen weisen einen ähnlichen Trend wie in der gezielten Methode auf - PE ist in C6/36 doppelt so hoch wie in Huh7.5.1 Zellen. Bei den jeweils propagierten Viren zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied im PE-Anteil. Ähnlich wie bei der gezielten Methode ist Sphingomyelin sowohl bei den Insekten- als auch bei den humanen Leberzellen um Faktor 1,6 bzw. 1,2 erhöht im propagierten Virus im Vergleich zur jeweiligen Wirtszelle. Vor allem bei mit den DENV infizierten Insektenzellen ist der SM-Anteil 3 mal höher als in den nicht-infizierten C6/36 Zellen.

Im Allgemeinen sind die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien und daraus propagierten Viren gering. Vor allem der Vergleich der Lipidextrakte der aufgereinigten Viren zeigt lediglich einen Unterschied im Sphingomyelin-Anteil von 1,63% in DENV aus C6/36 Zellen zu 0,36% in DENV aus Huh7.5.1 Zellen.

3.4.4 Vergleich der gezielten und globalen Lipidomstudien

Durch die zusätzliche Durchführung von globalen Lipidomstudien wurden viele weitere Lipide und vier zusätzliche Lipidklassen detektiert. Jedoch konnten die in den gezielten LC/MS/MS Messungen ermittelten Verteilungen in den vier Lipidklassen (LysoPC, PC, PE und SM) nicht bestätigt werden. Im Allgemeinen ist eine gezielte Methode deutlich sensitiver als eine globale LC/MS/MS Messung und kann damit vorteilhaft zur Detektion von Lipiden sein, die nur in geringen Konzentrationen vorkommen. Zusätzlich stellt die Annotation der "Features" zu den dazugehörigen Lipiden in der globalen LC/MS/MS Messung oft ein Problem dar. Häufig kann nur ein sehr kleiner Teil der tatsächlich gemessenen "Features" auch wirklich einem Lipid zugeordnet werden. Alle nicht annotierten "Features" fallen aus der Auswertung und werden nicht weiter betrachtet, auch wenn es sich um mögliche weitere Lipide handeln könnte. Des Weiteren wurden die Lipidextrakte bei der gezielten Methode direkt in das Massenspektrometer injiziert ohne vorher über einen Gradienten separiert zu werden. Durch die Separation kann man eine höhere Auflösung der einzelnen Lipide erreichen, jedoch können durch die vorgeschaltete Flüssigchromatographie auch Lipide verloren gehen, die sehr stark mit der stationären Phase wechselwirken. Aus diesen beiden Gründen lassen sich die Ergebnisse der beiden Methoden nicht hundertprozentig miteinander vergleichen. Aufgrund der höheren Sensitivität einer gezielten LC/MS/MS Methode wird das Augenmerk hauptsächlich auf diese Ergebnisse gelegt, mit einer kleinen Er-

ganzung durch die ungezielte Methode, in der noch Lipide in vier weitere Lipidklassen detektiert wurden und somit die gezielte Messung erweitert wurde.

3.4.5 Einfluss des Phosphatidylethanolamin-Gehalts in der Virushülle von DENV auf die Labyrinthopeptin-Aktivität

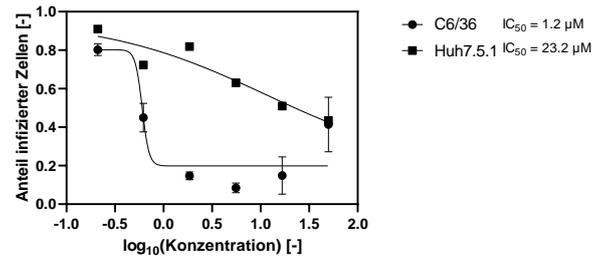
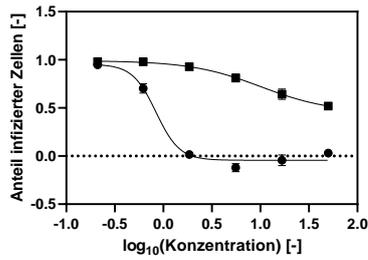
Es ist bereits bekannt, dass Labyrinthopeptin an Phosphatidylethanolamin in der Virushülle bindet und daraus die antivirale, lytische Aktivität resultiert. Durch Propagieren von DENV in unterschiedliche Wirtszellen konnten DENV generiert werden, die sich in ihrer Lipidzusammensetzung stark unterscheiden (basierend auf den gezielten LC/MS/MS Messungen). Vor allem der PE-Gehalt variiert zwischen etwa 50% bei den aus C6/36 propagierten Viren und 5% bei den in humanen Zellen propagierten DENV. Durch Untersuchungen zum Einfluss der Labyrinthopeptin-Konzentration, die wie in Abschnitt 3.3.7 durchgeführt wurden, sollte der Effekt der variierenden PE-Konzentrationen in der Lipidhülle von DENV charakterisiert werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit DENV aus C6/36 und aus Huh7.5.1 Zellen sind in Abbildung 3.4.12 dargestellt. Die Werte resultieren jeweils aus einer Doppelbestimmung für jede Labyrinthopeptin-Konzentration und zusätzlich wurde das Experiment zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Vergleicht man lediglich die Labyrinthopeptine untereinander und lässt zunächst den Vergleich zwischen den unterschiedlich propagierten Viren außen vor, wird ein synergistischer Effekt der Labyrinthopeptine A1 und A2 im Verhältnis 1:1 deutlich. Dieses Phänomen wurde bereits von Prochnow *et al.* beschrieben [257]. Darüber hinaus weist Labyrinthopeptin A2 bei den aus C6/36 propagierten DENV eine um Faktor 2,4 bzw. 1,6 geringere Aktivität auf als Labyrinthopeptin A1. Für die Aktivität auf DENV aus Huh7.5.1 Zellen wird dieser Effekt nicht deutlich und die Effektivität von Laby A2 scheint sogar um Faktor 1,5 bzw. 1,2 erhöhet zu sein mit einem IC_{50} -Wert von $13,8 \mu\text{M}$ zu einem IC_{50} -Wert von $20,2 \mu\text{M}$ für Laby A1. Ein potentieller Grund dafür kann die erhöhete Menge von an PE gebundenem Laby A1 sein [257], denn möglicherweise ist bei reduziertem PE-Gehalt in der Membran nicht genügend PE vorhanden, an das Laby A1 binden kann. Dadurch könnte die vermeidlich höhere Aktivität des Laby A1 reduziert sein.

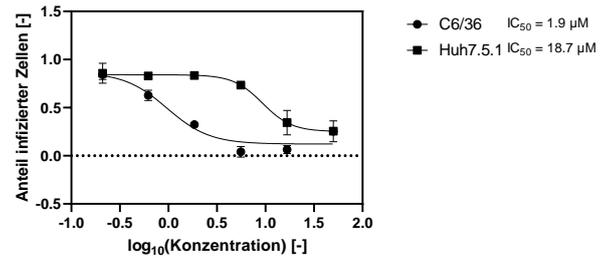
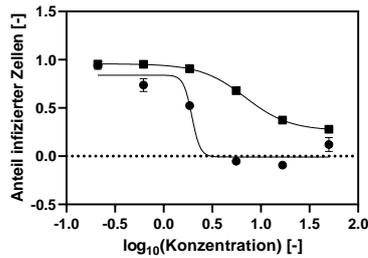
Betrachtet man die unterschiedlich propagierten Viren untereinander wird deutlich, dass die Aktivität des Labyrinthopeptins auf DENV aus C6/36 Zellen signifikant höhere ist als auf DENV aus Huh7.5.1 Zellen. Beispielsweise zeigt Labyrinthopeptin A1 einen IC_{50} -Wert von $1,6 \mu\text{M}$ auf DENV aus Insektenzellen und nur einen IC_{50} -Wert von $20,2 \mu\text{M}$ auf DENV aus humanen Leberzellen. Dieser Effekt wird auch bei Laby A2 und dem Gemisch aus Laby A1 und A2 deutlich. Zudem wurde bei humanen Leberzellen beobachtet, dass auch bei den höchsten Labyrinthopeptin-Konzentrationen noch ca. 50% infizierte Zellen vorliegen können. Daraus könnte man schließen, dass ein geringerer PE-Gehalt in der Virusmembran eine Reduktion der Labyrinthopeptin-Wirkung herbeiführt. Dieses Phänomen wurde bereits bei Chikungunya-Virus (CHIKV) beobachtet. Labyrinthopeptin zeigt eine höhere Aktivität gegen Chikungunya-Viren, die aus Insektenzellen mit einem PE-Gehalt der Wirtszelle von 46 bis 58% propagiert wurden, als gegen Viren aus der humanen Zelllinie BHK-21 mit einem PE-Gehalt der Wirtszelle von nur 15 bis 25% [257, 283]. Darüber hinaus konnten Prochnow *et al.* unter Verwendung unilamellarer

3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

A) Labyrinthopeptin A1



B) Labyrinthopeptin A2



C) Labyrinthopeptin A1:A2 (1:1)

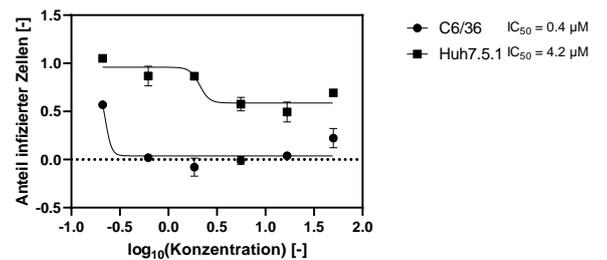
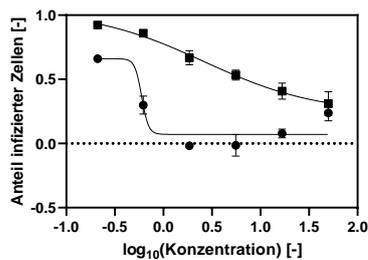


Abbildung 3.4.12: Darstellung der konzentrationsabhängigen Aktivität von Labyrinthopeptin auf DENV propagiert in C6/36 und Huh7.5.1 Zellen. Die Messwerte wurden in Doppelbestimmung in zwei unabhängigen Experimenten ermittelt - jeweils links Experiment 1 und rechts Wiederholungsexperiment. A) konzentrationsabhängige Aktivität von LabyA1, B) konzentrationsabhängige Aktivität von LabyA2 und C) konzentrationsabhängige Aktivität von LabyA1:A2 in einem Verhältnis 1:1.

3.4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Vesikel zeigen, dass mit steigendem PE-Anteil und Inkubation mit Labyrinthopeptin die Lyse dieser dieser begünstigt wird [257].

Schlussfolgernd zeigt Labyrinthopeptin eine verminderte Aktivität auf DENV aus humanen Leberzellen. Jedoch spiegeln Leberzellen nicht die einzigen Zellen wider, die von DENV infiziert werden. Primär infizieren Dengue Viren Leukozyten, wie Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, einschließlich Langerhans-Zellen [229,230]. Die Lipidkomposition ist zellspezifisch, kann aber für humane Zelllinien verallgemeinert werden. Humane Zellen weisen im Durchschnitt 40-50% PC und 20-50% PE. Beispielsweise ist der PE-Gehalt in Hirnzellen mit etwa 45% deutlich höher als in Leberzellen mit nur etwa 20% [284]. Der PE Anteil in Leukozyten liegt bei etwa 30%, das ist etwas höher als in Leberzellen, jedoch nach wie vor niedriger als in Insektenzellen [285]. Daraus ergibt sich über die Frage der Anwendung von Labyrinthopeptin als antivirale Substanz im Menschen eine neue Richtung. Die Anwendung von Labyrinthopeptin ist potentiell nur sinnvoll zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion, wenn sich der Virus noch nicht zu stark in humanen Zellen vermehrt und somit seine Lipidhülle geändert hat oder als prophylaktische Behandlung, um eine Infektion in Dengue-Risikogebieten zu verhindern.

3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Der Naturstoff Labyrinthopeptin zeigt antivirale Aktivität gegen viele umhüllte Viren, wie Dengue, Zika oder WNV. Die Aktivität des Labyrinthopeptins resultiert aus dem Binden an Phosphatidylethanolamin in der Virushülle gefolgt von der Lyse des Viruspartikels.

In dieser Dissertation wurde die Propagierung und Aufreinigung von Dengue Viren in C6/36 etabliert und optimiert. Die extrahierten Lipide aus den aufgereinigten Viruspartikeln wurden in einer neu entwickelten gezielten Methode massenspektrometrisch vermessen. Es konnten 47 Lipide in vier verschiedenen Lipidklassen (LysoPC, PC, PE und SM) detektiert und mittels internen Standard quantifiziert werden. Aufbauend auf diese neue Möglichkeit der Erfassung des Lipidoms von aufgereinigten Dengue Viruspartikeln wurde versucht, durch Modifikation des Wirtszelllipidoms die Zusammensetzung der Virushülle zu verändern. Die Ölsäure NaCHO sollte mehreren Publikationen zufolge den PE-Gehalt in Membranen senken [280,286–288], sie wurde für die Modifikation des Wirtszelllipidoms eingesetzt. Bei den Insektenzellen konnte kein Effekt der Ölsäure auf das Lipidom festgestellt werden. Um das Lipidom von humanen Leberzellen zu erschließen, wurde eine neue gezielte massenspektrometrische Methode entwickelt. Mit dieser Methode konnten 125 verschiedene Lipide in den gleichen vier Lipidklassen erfasst werden. Doch auch für humane Leberzellen konnte kein Effekt der Ölsäure auf die Lipidzusammensetzung festgestellt werden. Jedoch wurde beim Vergleich des Lipidoms von Insektenzellen und dem der humanen Leberzellen ein signifikanter Unterschied deutlich: Die Lipidklassen Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin variieren stark zwischen den beiden Zelllinien. Insektenzellen weisen 50,5% PE auf und humane Leberzellen nur etwa 18%.

Zur Erweiterung der gezielten massenspektrometrischen Analysen der unterschiedlichen Lipidome wurden die Lipidextrakte zusätzlich mit einer globalen LC/MS/MS Methode analysiert. Es konnten Lipide aus vier weiteren Klassen detektiert werden - PI, LysoPE, TG und DG. Die bei dieser Messung entstandene Lipidverteilung weicht von der der gezielten Messung ab, da hauptsächlich Phosphatidylcholine identifiziert wurden und in den anderen Klassen lediglich einige wenige Vertreter detektiert werden konnten. Die gezielte massenspektrometrische Analyse ermöglicht die Detektion eines größeren Spektrums an Lipiden, jedoch mit dem Verlust an Sensitivität. Um mit dieser Methode genauere Aussagen über das Lipidom der jeweiligen Proben treffen zu können, müsste die Methode durch beispielsweise Variation des Laufmittels und Gradienten zur Trennung der Lipide oder Verwendung eines anderen Massenspektrometers weiter optimiert werden.

Im nächsten Schritt wurden DENV sowohl in C6/36 als auch in Huh7.5.1 Zellen propagiert, aufgereinigt, Lipide extrahiert und massenspektrometrisch vermessen. Für die aufgereinigten Viruspartikel lässt sich eine ähnliche Verteilung in den vier Lipidklassen beobachten, wie für die jeweilige Wirtszelle. Dieses Phänomen resultiert daraus, dass der Virus seine Hülle von dem endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle erhält und somit eine Ähnlichkeit im Lipidom entsteht. Durch die Propagierung von DENV in zwei unterschiedlichen Wirtszellen wurden Viruspartikel generiert, die sich signifikant in ihrer Lipidzusammensetzung der Virushülle unterscheiden. Um einen möglichen Effekt der Lipidzusammensetzung der Virushülle auf die Labyrinthopeptin-

3.5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Aktivität festzustellen, wurde ein konzentrationsabhängiger Inhibitionstest durchgeführt. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Lipidzusammensetzung der Dengue Virushülle in der Tat einen Effekt auf die Labyrinthopeptin-Aktivität hat. Mit einem höheren Phosphatidylethanolamin-Anteil in der Virushülle weist Labyrinthopeptin eine deutlich höhere Aktivität auf, als wenn nur wenig PE vorhanden ist. Um dieses Phänomen genauer zu betrachten, könnte der PE-Gehalt gezielt über Enzymregulation von Phosphatidylserin-Synthase und Phosphatidylserin-Carboxylase variiert werden.

Da der PE-Gehalt in DENV aus humanen Leberzellen deutlich geringer ist, kann daraus eine mögliche Applikationsrichtung des Labyrinthopeptins als DENV Prophylaxe-Medikament oder als Behandlungsmöglichkeit einer Dengue Infektion im frühen Stadium hervorgehen. Im frühen Stadium einer Dengue Infektion hatte der Virus noch nicht viel Zeit, um sich im Wirt zu vermehren und somit die Lipidzusammensetzung seiner Virushülle zu verändern. In diesem Falle wäre die Aktivität von Labyrinthopeptin deutlich höher als zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion.

Kapitel 4

Ausblick

In dieser Studie wurden die Bindungseigenschaften zweier peptidischer Naturstoffe - Cystobactamid und Labyrinthopeptin - unter Verwendung verschiedener "Omics"-Strategien genauer betrachtet.

Cystobactamide zeigen enormes Potential in der Behandlung von sowohl Gram-negativen als auch Gram-positiven Vertretern der ESKAPE-Pathogene. Mit dieser Dissertation konnten neue Erkenntnisse über den Einsatz von photopharmakologisch modifizierten Sonden, die Identifizierung potentieller sekundärer Zielproteine, und über die Interaktion zwischen den Cystobactamiden und der Gyrase, gewonnen werden.

Photopharmakologisch modifizierte Sonden sollen ein An- und Ausschalten der biologischen Aktivität gewährleisten. Speziell bei dem Cystobactamid mit N-terminalem Photoschalter können durch die *trans*-Konfiguration zwei Resistenzmechanismen durch die Enzyme AlbD und AlbA überwunden werden. Die Umwandlung in die *cis*-Konfiguration kann genutzt werden, um das Cystobactamid gezielt durch AlbD oder AlbA zu inaktivieren. Die Effektivität der Konfigurationsänderung könnte durch weitere chemische Optimierungen verbessert werden, um den gewünschten Effekt des An- und Ausschaltens zu gewährleisten.

Während die Identifizierung potentieller sekundärer Zielstrukturen durch die Synthese eines Cystobactamid-Biotin-Komplexes noch weiter vorangetrieben werden kann, war die Charakterisierung der Gyrase-Bindestelle der Cystobactamide erfolgreich. Es konnten mehrere durch das Cystobactamid modifizierte Peptide identifiziert werden. Besonders die Modifikationen in der ATPase Domäne der Gyrase, die mit der für Coumarine bekannten Bindungsstelle überlappen, liefern vielversprechende Anhaltspunkte für die Bindungsstelle von Cystobactamiden an Gyrase. Zur Validierung der potentiellen Bindungsstelle können gezielte Aminosäuremutationen in dem Bereich der ATPase Domäne eingefügt werden. Wenn die Bindungsstelle der Cystobactamide in diesem Bereich liegt, würde eine gezielte Mutation entweder eine Reduktion in der inhibitorischen Aktivität der Cystobactamide oder gar die Generation einer Cystobactamid-resistenten Gyrase herbeiführen. Darüber hinaus würden Konkurrenzexperimente Auskunft über die Selektivität der Photoaffinitäts-Sonde liefern.

Labyrinthopeptine stellen antivirale Substanzen mit einem breitem Wirkungsspektrum gegen umhüllte Viren, unter anderem auch DENV, dar. Das weite Wirkungsspektrum kann durch Binden an Phosphatidylethanolamin in der Virushülle umhüllter Viren erklärt werden. In dieser Arbeit wurden zwei gezielte massenspektrometrische Methoden entwickelt, die die Lipidom-Analyse von sowohl aufgereinigten Viruspartikeln als auch die der jeweiligen Wirtszelle ermöglichen. Die Analyse des Lipidoms von aufgereinigten DENV Partikeln wurde bisher noch nicht beschrieben und bietet die Grundlage für die Charakterisierung des Effekts der Lipidzusammensetzung der Virushülle auf die Labyrinthopeptin-Aktivität. Es konnten durch Propagierung der Viren in unterschiedlichen Zelllinien DENV Viruspartikel generiert werden, die sich in ihrer Lipidzusammensetzung signifikant unterscheiden. In einem konzentrationsabhängigen Inhibitionstest konnte gezeigt werden, dass der Phosphatidylethanolamin-Gehalt in der Virushülle in der Tat einen Einfluss auf die Labyrinthopeptin-Aktivität hat. Ein höherer PE-Anteil in der Virus Hülle ermöglicht mehr Bindungsereignisse mit Labyrinthopeptin und erhöht somit dessen Aktivität. Aus diesem Ergebnis lässt sich die Applikation der Labyrinthopeptine als mögliche Prophylaxe-Behandlung oder als Medikament im frühen Infektionsstadium definieren. Um den Einfluss von Labyrinthopeptin auf die Viruspartikel noch genauer zu erforschen, könnten mechanosensitive fluoreszierende Sonden verwendet werden. Durch diese Sonden können Veränderungen in der Membranspannung detektiert werden. Eine mögliche Substanz stellt der sogenannte FliptR (Fluoreszenz-Lipid-Spannungs-Reporter) dar. Durch Erhöhung der Membranspannung werden die zwei fluoreszierenden Untereinheiten des FliptR in die planare Form überführt und sowohl die Extinktionsmaxima als auch die Lebensdauer der Fluoreszenz werden verändert. Die Lebensdauer der Fluoreszenz wird verwendet, um die Membranspannung zu charakterisieren [289].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass “Omic”-Studien eine hervorragende Möglichkeit bieten, die Zielstrukturen von zuvor identifizierten Leitstrukturen zu charakterisieren. Proteomstudien wurden eingesetzt, um sekundäre Zielstrukturen und Bindungsstellen mit der primären Zielstruktur zu identifizieren. Lipidomstudien wurden für die Charakterisierung des DENV-Lipidoms und der Relevanz der Abundanz von PE in der Virushülle verwendet. Zur Weiterführung dieser Arbeit könnte ein bereits mit Biotin markiertes Cystobactamid zur Identifizierung sekundärer Zielstrukturen verwendet werden und die postulierte Gyrase-Bindungsstelle durch gezielte Mutationsexperimente oder cryo-Elektronenmikroskopie validiert werden. Darüber hinaus bietet die gezielte Änderung des PE-Gehaltes in DENV durch Modifikation des Lipidoms der Wirtszelle die Möglichkeit zur genaueren Charakterisierung des Einflusses des PE-Gehaltes auf die Labyrinthopeptin-Aktivität.

Literaturverzeichnis

- [1] G. M. Cragg and D. J. Newman. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1):7–24, 2005.
- [2] A. G. Atanasov, B. Waltenberger, E.-M. Pferschy-Wenzig, T. Linder, C. Wawrosch, P. Uhrin, V. Temml, L. Wang, S. Schwaiger, E. H. Heiss, J. M. Rollinger, D. Schuster, J. M. Breuss, V. Bochkov, M. D. Mihovilovic, B. Kopp, R. Bauer, V. M. Dirsch, and H. Stuppner. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, 33(8):1582–1614.
- [3] D. Hoffmeister and N. P. Keller. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.*, 24(2):393–416, 2007.
- [4] J. W. Blunt, A. R. Carroll, B. R. Copp, R. A. Davis, R. A. Keyzers, and M. R. Prinsep. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 35(1):8–53, 2018.
- [5] J. Herrmann, A. A. Fayad, and R. Müller. Natural products from myxobacteria: novel metabolites and bioactivities. *Natural Product Reports*, 34:135–160.
- [6] W. Landwehr, C. Wolf, and J. Wink. Actinobacteria and myxobacteria - two of the most important bacterial resources for novel antibiotics. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, pages 273–302, 2016.
- [7] D. J. Newman and G. M. Cragg. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3):770–803, mar 2020.
- [8] A. Fleming. Penicillin. *British Medical Journal*, 2:386, 1941.
- [9] N. J. White. Clinical pharmacokinetics of antimalarial drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, 10(3):187–215, 1985.
- [10] J. Achan, A. O. Talisuna, A. Erhart, A. Yeka, J. K. Tibenderana, F. N. Baliraine, P. J. Rosenthal, and . D’Alessandro. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malaria Journal*, 10(1), 2011.
- [11] D. A. Dias, S. Urban, and U. Roessner. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2):303–336, 2012.
- [12] M. E. Maier. Design and synthesis of analogues of natural products. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 13:5302–5343.

- [13] S. Majhi and D. Das. Chemical derivatization of natural products: Semisynthesis and pharmacological aspects- a decade update. *Tetrahedron*, 78:131801.
- [14] J. Kretz, D. Kerwat, V. Schubert, S. Grätz, A. Pesic, S. Semsary, S. Cociancich, M. Royer, and R. D. Süßmuth. Totalsynthese von Albicidin - eine Leitstruktur aus *Xanthomonas albilineans* für potente antibakterielle Gyrase-Inhibitoren. *Angewandte Chemie*, 127(6):1992–1996, 2014.
- [15] S. Hüttel, G. Testolin, J. Herrmann, T. Planke, F. Gille, M. Moreno, M. Stadler, M. Brönstrup, A. Kirschning, and R. Müller. Discovery and total synthesis of natural cystobactamid derivatives with superior activity against gram-negative pathogens. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(41):12760–12764, 2017.
- [16] A. DerMarderosian. *The review of natural products : the most complete source of natural product information*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2014.
- [17] W. Zheng, N. Thorne, and J. C. McKew. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(21-22):1067–1073, 2013.
- [18] S. Joon Won, J. D. Eschweiler, J. D. Majmudar, F. San Chong, S. Ye Hwang, B. T. Ruotolo, and B. R. Martin. Affinity-based selectivity profiling of an in-class selective competitive inhibitor of acyl protein thioesterase 2. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 8(2):215–220, 2016.
- [19] I. Kola and J. Landis. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(8):711–716, 2004.
- [20] G. C. Terstappen, C. Schlüpen, R. Raggiaschi, and G. Gavigli. Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, pages 891–903.
- [21] E. A. Ponomarenko, E. V. Poverennaya, E. V. Ilgisonis, M. A. Pyatnitskiy, A. T. Kopylov, V. G. Zgoda, A. V. Lisitsa, and A. I. Archakov. The size of the human proteome: The width and depth. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2016:1–6, 2016.
- [22] S. Ziegler, V. Pries, C. Hedberg, and H. Waldmann. Target identification for small bioactive molecules: Finding the needle in the haystack. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(10):2744–2792.
- [23] Shobhna Kapoor, Herbert Waldmann, and Slava Ziegler. Novel approaches to map small molecule–target interactions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(15):3232–3245. Target Identification of Small Molecule Drugs and Chemical Probes.
- [24] C. Russell, A. Rahman, and A. R. Mohammed. Application of genomics, proteomics and metabolomics in drug discovery, development and clinic. *Therapeutic Delivery*, 4(3):395–413, 2013.
- [25] R. M. Peterson, T. Huang, J. D. Rudolf, M. J. Smanski, and B. Shen. Mechanisms of self-resistance in the platensimycin- and platencin-producing streptomyces platensis MA7327 and MA7339 strains. *Chemistry & Biology*, 21(3):389–397, 2014.

- [26] R. Byrne and G. Schneider. *In Silico Target Prediction for Small Molecules*. Springer New York, 2018.
- [27] A. D. Bates and A. Maxwell. *DNA Topology*. Oxford University Press, 2005.
- [28] A. J. Schoeffler and J. M. Berger. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 41(1):41–101, 2008.
- [29] K. C. Dong and J. M. Berger. *Protein-Nucleic Acid Interactions*. Royal Society of Chemistry, 2008.
- [30] L. Postow, N. J. Crisona, B. J. Peter, C. D. Hardy, and N. R. Cozzarelli. Topological challenges to DNA replication: Conformations at the fork. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15):8219–8226, 2001.
- [31] H.-Y. Wu, S. Shyy, J. C. Wang, and L. F. Liu. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*, 53(3):433–440, 1988.
- [32] M. Maftahi, C. S. Han, L. D. Langston, J. C. Hope, N. Zigouras, and G. A. Freyer. The top3(+) gene is essential in schizosaccharomyces pombe and the lethality associated with its loss is caused by rad12 helicase activity. *Nucleic Acids Research*, 27(24):4715–4724, 1999.
- [33] Y. Pommier, E. Leo, H. L. Zhang, and C. Marchand. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & Biology*, 17(5):421–433, 2010.
- [34] L. Liu, C. Liu, and B. Alberts. Type II DNA topoisomerases: Enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break. *Cell*, 19(3):697–707, 1980.
- [35] M. Nöllmann, N. J. Crisona, and P. B. Arimondo. Thirty years of escherichia coli DNA gyrase: From in vivo function to single-molecule mechanism. *Biochimie*, 89(4):490–499, 2007.
- [36] A. D. Bates and A. Maxwell. Energy coupling in type II topoisomerases: Why do they hydrolyze atp? *Biochemistry*, 46(27):7929–7941, 2007.
- [37] J. J. Champoux. DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annual Review of Biochemistry*, 70(1):369–413, 2001.
- [38] R. J. Reece and A. Maxwell. DNA gyrase: Structure and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26(3-4):335–375, 1991.
- [39] A. Vanden Broeck, C. Lotz, J. Ortiz, and V. Lamour. Cryo-em structure of the complete e. coli dna gyrase nucleoprotein complex. *Nature Communications*, 10(1), 2019.
- [40] K. M. Evans-Roberts, L. A. Mitchenall, M. K. Wall, J. Leroux, J. S. Mylne, and A. Maxwell. DNA gyrase is the target for the quinolone drug ciprofloxacin in arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry*, 291(7):3136–3144, 2016.

- [41] M. Ashraf Dar, A. Sharma, N. Mondal, and S. Kumar Dhar. Molecular cloning of apicoplast-targeted plasmodium falciparum DNA gyrase genes: Unique intrinsic ATPase activity and ATP-independent dimerization of PfGyrB subunit. *Eukaryotic Cell*, 6(3):398–412, 2007.
- [42] A. Basu, A. J. Schoeffler, J. M. Berger, and Z. Bryant. ATP binding controls distinct structural transitions of escherichia coli DNA gyrase in complex with DNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(5):538–546, 2012.
- [43] V. Anderson and N. Osheroff. Type II topoisomerases as targets for quinolone antibacterials turning dr. jekyll into mr. hyde. *Current Pharmaceutical Design*, 7(5):337–353, 2001.
- [44] K. Drlica, H. Hiasa, R. Kerns, M. Malik, A. Mustaev, and X. Zhao. Quinolones: Action and resistance updated. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9(11):981–998, 2009.
- [45] F. Collin, S. Karkare, and A. Maxwell. Exploiting bacterial dna gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011.
- [46] G. Y. Leshner, E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. Hays. Bailey, and R. P. Brundage. 1,8-naphthyridine derivatives. a new class of chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 5(5):1063–1065, 1962.
- [47] A. M. Emmerson. The quinolones: decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(90001):13–20, 2003.
- [48] D. E. King, R. Malone, and S. H. Lilley. New classification and update on the quinolone antibiotics. *American family physician*, 61(9):2741—2748, 2000.
- [49] C. M. Oliphant and G. M. Green. Quinolones: a comprehensive review. *American family physician*, 65(3):455—464, February 2002.
- [50] G. J. Anderson. Quinolone antimicrobial agents, 3rd edition. *Emerging Infectious Diseases*, 10(6):1177a–1177, 2004.
- [51] L. Heide. Genetic engineering of antibiotic biosynthesis for the generation of new aminocoumarins. *Biotechnology Advances*, 27(6):1006–1014, 2009.
- [52] Marko Oblak, Miha Kotnik, and Tom Solmajer. Discovery and development of ATPase inhibitors of DNA gyrase as antibacterial agents. *Current Medicinal Chemistry*, 14(19):2033–2047, aug 2007.
- [53] A. Sugino, N. P. Higgins, P. O. Brown, C. L. Peebles, and N. R. Cozzarelli. Energy coupling in DNA gyrase and the mechanism of action of novobiocin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(10):4838–4842, 1978.
- [54] J. Schimana, H.-P. Fiedler, I. Groth, R. D. Süssmuth, W. Beil, M. Walker, and A. Zeck. Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by streptomyces antibioticus tue 6040. i. taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *The Journal of Antibiotics*, 53(8):779–787, 2000.

- [55] M. J. Edwards, R. H. Flatman, L. A. Mitchenall, C. E. M. Stevenson, T. B. K. Le, T. A. Clarke, A. R. McKay, H.-P. Fiedler, M. J. Buttner, D. M. Lawson, and A. Maxwell. A crystal structure of the bifunctional antibiotic simocyclinone d8, bound to DNA gyrase. *Science*, 326(5958):1415–1418, 2009.
- [56] R. H. Flatman, A. Eustaquio, S.-M. Li, L. Heide, and A. Maxwell. Structure-activity relationships of aminocoumarin-type gyrase and topoisomerase IV inhibitors obtained by combinatorial biosynthesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4):1136–1142, 2006.
- [57] Lutz Heide. The aminocoumarins: biosynthesis and biology. *Natural Product Reports*, 26(10):1241, 2009.
- [58] Ahad A. Sadiq, Manish R. Patel, Blake A. Jacobson, Marco Escobedo, Keith Ellis, Lisa M. Oppgaard, Hiroshi Hiasa, and Robert A. Kratzke. Anti-proliferative effects of simocyclinone d8 (SD8), a novel catalytic inhibitor of topoisomerase II. *Investigational New Drugs*, 28(1):20–25, jan 2009.
- [59] E. Goetschi, P. Angehrn, H. Gmuender, P. Hebeisen, H. Link, R. Masciadri, and J. Nielsen. Cyclothialidine and its congeners: A new class of DNA gyrase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, 60(2):367–380, 1993.
- [60] N. Nakada, H. Gmunder, T. Hirata, and M. Arisawa. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by cyclothialidine, a novel DNA gyrase inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(9):1966–1973, 1994.
- [61] M. Oram, B. Dosanjh, N. A. Gormley, C. V. Smith, L. M. Fisher, A. Maxwell, and K. Duncan. Mode of action of GR122222x, a novel inhibitor of bacterial DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(2):473–476, 1996.
- [62] S. M. Hashimi, G. Huang, A. Maxwell, and R. G. Birch. DNA gyrase from the albicidin producer xanthomonas albilineans has multiple-antibiotic-resistance and unusual enzymatic properties. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4):1382–1390, 2008.
- [63] B. D. Bax, P. F. Chan, D. S. Eggleston, A. Fosberry, D. R. Gentry, F. Gorrec, I. Giordano, M. M. Hann, A. Hennessy, M. Hibbs, J. Huang, E. Jones, J. Jones, K. Koretke Brown, C. J. Lewis, E. W. May, M. R. Saunders, O. Singh, C. E. Spitzfaden, C. Shen, A. Shillings, A. J. Theobald, A. Wohlkonig, N. D. Pearson, and M. N. Gwynn. Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature*, 466(7309):935–940, 2010.
- [64] P. A. Bradford, A. A. Miller, J. O’Donnell, and J. P. Mueller. Zoliflodacin: An oral spiro-pyrimidinetrione antibiotic for the treatment of neisseria gonorrhoeae, including multi-drug-resistant isolates. *ACS Infectious Diseases*, 6(6):1332–1345. PMID: 32329999.
- [65] M. Durcik, A. Nyerges, Z. Skok, D. Gramec Skledar, J. Trontelj, N. Zidar, J. Ilas, A. Zega, C. D. Cruz, P. Tammela, M. Welin, Y. R. Kimbung, D. Focht, O. Benek, T. Revesz, G. Draskovits, P. E. Szili, L. Daruka, C. Pal, D. Kikelj, L. P. Masic, and T. Tomasic. New dual atp-competitive inhibitors of bacterial dna gyrase and topoisomerase iv active against escape pathogens. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 213:113200.

- [66] R. G. Birch and S. S. Patil. Evidence that an albicidin-like phytotoxin induces chlorosis in sugarcane leaf scald disease by blocking plastid DNA replication. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 30(2):207–214, 1987.
- [67] S. M. Hashimi, M. K. Wall, A. B. Smith, A. Maxwell, and R. G. Birch. The phytotoxin albicidin is a novel inhibitor of DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1):181–187, 2007.
- [68] S. Cociancich, A. Pesic, D. Petras, S. Uhlmann, J. Kretz, V. Schubert, L. Vieweg, S. Duplan, M. Marguerettaz, J. Noëll, I. Pieretti, M. Hügelland, S. Kemper, A. Mainz, P. Rott, M. Royer, and R. D. Süssmuth. The gyrase inhibitor albicidin consists of p-aminobenzoic acids and cyanoalanine. *Nature Chemical Biology*, 11(3):195–197, 2015.
- [69] E. Vivien, D. Pitorre, S. Cociancich, I. Pieretti, D. W. Gabriel, P. C. Rott, and M. Royer. Heterologous production of albicidin: a promising approach to overproducing and characterizing this potent inhibitor of DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4):1549–1552, ja 2007.
- [70] L. Zhang and R. G. Birch. Biocontrol of sugar cane leaf scald disease by an isolate of *pantoea dispersa* which detoxifies albicidin phytotoxins. *Letters in Applied Microbiology*, 22(2):132–136, 1996.
- [71] L. Zhang and R. G. Birch. Mechanisms of biocontrol by *pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *xanthomonas albilineans*. *Journal of Applied Microbiology*, 82(4):448–454, 1997.
- [72] L. Zhang and R. G. Birch. The gene for albicidin detoxification from *pantoea dispersa* encodes an esterase and attenuates pathogenicity of *xanthomonas albilineans* to sugarcane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(18):9984–9989, sep 1997.
- [73] L. Vieweg, J. Kretz, A. Pesic, D. Kerwat, S. Grätz, M. Royer, S. Cociancich, A. Mainz, and R. D. Süssmuth. The albicidin resistance factor *albd* is a serine endopeptidase that hydrolyzes unusual oligoaromatic-type peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 137(24):7608–7611, 2015. PMID: 26057615.
- [74] M. J. Walker, R. G. Birch, and J. M. Pemberton. Cloning and characterization of an albicidin resistance gene from *klebsiella oxytoca*. *Molecular Microbiology*, 2(4):443–454, 1988.
- [75] L. Rostock, R. Driller, S. Grätz, D. Kerwat, L. von Eckardstein, D. Petras, M. Kunert, C. Alings, F.-J. Schmitt, T. Friederich, M. C. Wahl, B. Loll, A. Mainz, and R. D. Süssmuth. Molecular insights into antibiotic resistance - how a binding protein traps albicidin. *Nature Communications*, 2018.
- [76] A. Sikandar, K. Cirnski, G. Testolin, C. Volz, M. Brönstrup, O. V. Kalinina, R. Müller, and J. Koehnke. Adaptation of a bacterial multidrug resistance system revealed by the structure and function of *alba*. *Journal of the American Chemical Society*, 140(48):16641–16649, 2018. PMID: 30422653.

- [77] T. J. Beveridge. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181(16):4725–4733, 1999.
- [78] L. B. Rice. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8):1079–1081, 2008.
- [79] S. Baumann, J. Herrmann, R. Raju, H. Steinmetz, K. L. Mohr, S. Hüttel, K. Harmrolfs, M. Stadler, and R. Müller. Cystobactamide: Topoisomerase-inhibitoren aus myxobakterien mit hoher antibakterieller aktivität. *Angewandte Chemie*, 126(52):14835–14839, 2014.
- [80] T. Gruger, J. L. Nitiss, A. Maxwell, E. L. Zechiedrich, P. Heisig, S. Seeber, Y. Pommier, and D. Strumberg. A mutation in escherichia coli DNA gyrase conferring quinolone resistance results in sensitivity to drugs targeting eukaryotic topoisomerase II. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(12):4495–4504, 2004.
- [81] Giambattista Testolin, Katarina Cirnski, Katharina Rox, Hans Prochnow, Verena Fetz, Charlotte Grandclaudon, Tim Mollner, Alain Baiyoumy, Antje Ritter, Christian Leitner, Jana Krull, Joop van den Heuvel, Aurelie Vassort, Sylvie Sordello, Mostafa M. Hamed, Walid A. M. Elgaher, Jennifer Herrmann, Rolf W. Hartmann, Rolf Müller, and Mark Brönstrup. Synthetic studies of cystobactamids as antibiotics and bacterial imaging carriers lead to compounds with high in vivo efficacy. *Chemical Science*, 11(5):1316–1334, 2020.
- [82] A.-P. Magiorakos, A. Srinivasan, R. B. Carey, Y. Carmeli, M. E. Falagas, C. G. Giske, S. Harbarth, J. F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D. L. Paterson, L. B. Rice, J. Stelling, M. J. Struelens, A. Vatopoulos, J. T. Weber, and D. L. Monnet. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3):268–281, 2012.
- [83] M. O. A. Sommer, . Munck, R. V. Toft-Kehler, and D. I. Andersson. Prediction of antibiotic resistance: time for a new preclinical paradigm? *Nature Reviews Microbiology*, 15(11):689–696, 2017.
- [84] WHO. *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*. World Health Organisation, 2014.
- [85] S. Bin Zaman, M. Awlad Hussain, R. Nye, V. Mehta, K. Taib Mamun, and N. Hossain. A review on antibiotic resistance: Alarm bells are ringing. *Cureus*, 2017.
- [86] D. L. Paterson and R. A. Bonomo. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4):657–686, 2005.
- [87] D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. R. Staley, and G. Garrity. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*. Springer US, 2005.
- [88] G. Fuchs. *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme, StuttgartNew York, 2007.
- [89] P. B. Eckburg. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728):1635–1638, 2005.

- [90] G. Uden and J. Bongaerts. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1320(3):217–234, 1997.
- [91] S. A. Jones, T. Gibson, R. C. Maltby, F. Z. Chowdhury, V. Stewart, P. S. Cohen, and T. Conway. Anaerobic respiration of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Infection and Immunity*, 79(10):4218–4226, 2011.
- [92] N. J. Sweeney, P. Klemm, B. A. McCormick, E. Moller-Nielsen, M. Utley, M. A. Schembri, D. C. Laux, and P. S. Cohen. The *Escherichia coli* K-12 gntP gene allows *E. coli* f-18 to occupy a distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine. *Infection and immunity*, 64(9):3497–3503, 1996.
- [93] P. M. Fratamico, C. DebRoy, Y. Liu, D. S. Needleman, G. M. Baranzoni, and P. Feng. Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2016.
- [94] T. A. T. Gomes, W. P. Elias, I. C. A. Scaletsky, B. E. C. Guth, J. F. Rodrigues, R. M. F. Piazza, L. C. S. Ferreira, and M. B. Martinez. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47:3–30, 2016.
- [95] K. A. Datsenko and B. L. Wanner. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12):6640–6645, 2000.
- [96] F. Bagnoli, R. Rappuoli, and G. Grandi. *Staphylococcus aureus*. Springer-Verlag GmbH, 2018.
- [97] E. S. Duthie and L. L. Lorenz. Staphylococcal coagulase: Mode of action and antigenicity. *Microbiology*, 6(1-2):95–107, 1952.
- [98] T. Bae, A. K. Banger, A. Wallace, E. M. Glass, F. Aslund, O. Schneewind, and D. M. Missiakas. *Staphylococcus aureus* virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(33):12312–12317.
- [99] R. P. Novick. Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology*, 48(6):1429–1449.
- [100] J. Ritter, R. Flower, G. Henderson, Humphrey, and Rang. *Rang & Dale's pharmacology*. Elsevier Churchill Livingstone, an imprint of Elsevier Limited, Philadelphia, PA, 2016.
- [101] I. R. Edwards and J. K. Aronson. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *The Lancet*, 356(9237):1255–1259, 2000.
- [102] K. Lewis. Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5):371–387, 2013.
- [103] D. Hanahan and R. A. Weinberg. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5):646–674, 2011.

- [104] R. Gaudana, H. Krishna Ananthula, A. Parenky, and A. K. Mitra. Ocular drug delivery. *The AAPS Journal*, 12(3):348–360, 2010.
- [105] W. A. Velema, W. Szymanski, and B. L. Feringa. Photopharmacology: Beyond proof of principle. *Journal of the American Chemical Society*, 136(6):2178–2191, 2014.
- [106] J. Broichhagen, J. A. Frank, and D. Trauner. A roadmap to success in photopharmacology. *Accounts of Chemical Research*, 48(7):1947–1960, 2015.
- [107] W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema, and B. L. Feringa. Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches. *Chemical Reviews*, 113(8):6114–6178, 2013.
- [108] M. M. Lerch, M. J. Hansen, G. M. van Dam, W. Szymanski, and B. L. Feringa. Neue ziele für die photopharmakologie. *Angewandte Chemie*, 128(37):11140–11163, 2016.
- [109] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, and Q. Peng. Photodynamic therapy. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 90(12):889–905, 1998.
- [110] Z. Huang. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4(3):283–293, 2005.
- [111] P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, and J. Golab. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4):250–281, 2011.
- [112] L. Fenno, O. Yizhar, and K. Deisseroth. The development and application of optogenetics. *Annual Review of Neuroscience*, 34(1):389–412, 2011.
- [113] M. J. Hansen, W. A. Velema, G. de Bruin, H. S. Overkleeft, W. Szymanski, and B. L. Feringa. Proteasome inhibitors with photocontrolled activity. *ChemBioChem*, 15(14):2053–2057, 2014.
- [114] W. Szymanski, M. E. Ourailidou, W. A. Velema, F. J. Dekker, and B. L. Feringa. Light-controlled histone deacetylase (HDAC) inhibitors: Towards photopharmacological chemotherapy. *Chemistry - A European Journal*, 21(46):16517–16524, 2015.
- [115] C. Falenczyk, M. Schiedel, B. Karaman, T. Rumpf, N. Kuzmanovic, M. Grötli, W. Sippl, M. Jung, and B. König. Chromo-pharmacophores: photochromic diarylmaimide inhibitors for sirtuins. *Chem. Sci.*, 5(12):4794–4799, 2014.
- [116] J. Broichhagen, M. Schönberger, S. C. Cork, J. A. Frank, P. Marchetti, M. Bugliani, A. M. J. Shapiro, S. Trapp, G. A. Rutter, D. J. Hodson, and D. Trauner. Optical control of insulin release using a photoswitchable sulfonyleurea. *Nature Communications*, 5(1), 2014.
- [117] W. A. Velema, J. P. van der Berg, M. J. Hansen, W. Szymanski, A. J. M. Driessen, and B. L. Feringa. Optical control of antibacterial activity. *Nature Chemistry*, 5(11):924–928, 2013.

- [118] K. Kalka, H. Merk, and H. Mukhtar. Photodynamic therapy in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(3):389–413, 2000.
- [119] A. Ziegler, D. J. Leffell, S. Kunala, H. W. Sharma, M. Gailani, J. A. Simon, A. J. Halperin, H. P. Baden, P. E. Shapiro, and A. E. Bale. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(9):4216–4220, 1993.
- [120] I. Yoon, J. Zhu Li, and Y. Key Shim. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clinical Endoscopy*, 46(1):7, 2013.
- [121] R. Weissleder and V. Ntziachristos. Shedding light onto live molecular targets. *Nature Medicine*, 9(1):123–128, 2003.
- [122] M. M. Lerch, M. J. Hansen, W. A. Velema, W. Szymanski, and B. L. Feringa. Orthogonal photoswitching in a multifunctional molecular system. *Nature Communications*, 7(1), 2016.
- [123] M. Zhu and H. Zhou. Azobenzene-based small molecular photoswitches for protein modulation. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 16:8434–8445, 2018.
- [124] F. Zhao, L. Grubert, S. Hecht, and D. Bléger. Orthogonal switching in four-state azobenzene mixed-dimers. *Chemical Communications*, 53:3323–3326, 2017.
- [125] E. S. Lander and et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822):860–921, 2001.
- [126] M. Fonovic and M. Bogyo. Activity based probes for proteases: Applications to biomarker discovery, molecular imaging and drug screening. *Current Pharmaceutical Design*, 13(3):253–261, 2007.
- [127] W. P. Heal, T. H. T. Dang, and E. W. Tate. Activity-based probes: discovering new biology and new drug targets. *Chemical Society Reviews*, 40(1):246–257, 2011.
- [128] Y. Liu, M. P. Patricelli, and B. F. Cravatt. Activity-based protein profiling: The serine hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26):14694–14699, 1999.
- [129] N. Jessani and B. F. Cravatt. The development and application of methods for activity-based protein profiling. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(1):54–59.
- [130] A. E. Speers and B. F. Cravatt. Chemical strategies for activity-based proteomics. *ChemBioChem*, 5(1):41–47.
- [131] B. F. Cravatt, A. T. Wright, and J. W. Kozarich. Activity-based protein profiling: From enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annual Review of Biochemistry*, 77(1):383–414.
- [132] A. R. Khan and M. N. G. James. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Science*, 7(4):815–836, 1998.
- [133] T. Schirmeister and A. Klockow. Cysteine protease inhibitors containing small rings. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 3(6):585–596, 2003.

- [134] A. Watzke, G. Kosec, M. Kindermann, V. Jeske, H.-P. Nestler, V. Turk, B. Turk, and K. U. Wendt. Selective activity-based probes for cysteine cathepsins. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(2):406–409, 2008.
- [135] D. Kato, K. M. Boatright, A. B. Berger, T. Nazif, G. Blum, C. Ryan, K. A. H. Chehade, G. S. Salvesen, and M. Bogyo. Activity-based probes that target diverse cysteine protease families. *Nature Chemical Biology*, 1(1):33–38, 2005.
- [136] Amir Masoud Sadaghiani, Steven H. L. Verhelst, Vasilena Gocheva, Kimberly Hill, Eva Majerova, Sherman Stinson, Johanna A. Joyce, and Matthew Bogyo. Design, synthesis, and evaluation of in vivo potency and selectivity of epoxysuccinyl-based inhibitors of papain-family cysteine proteases. *Chemistry & Biology*, 14(5):499–511, may 2007.
- [137] W. J. Bradshaw, J. M. Kirby, A. K. Roberts, C. C. Shone, and K. R. Acharya. The molecular structure of the glycoside hydrolase domain of cwp19 from clostridium difficile. *The FEBS Journal*, 284(24):4343–4357, 2017.
- [138] R. Ettari, C. Bonaccorso, N. Micale, C. Heindl, T. Schirmeister, M. L. Calabrò, S. Grasso, and M. Zappalà. Development of novel peptidomimetics containing a vinyl sulfone moiety as proteasome inhibitors. *ChemMedChem*, 6(7):1228–1237, 2011.
- [139] E. Smith and I. Collins. Photoaffinity labeling in target- and binding-site identification. *Future Medicinal Chemistry*, 7(2):159–183, 2015.
- [140] H. Shi, K. Liu, A. Xu, and S. Q. Yao. Small molecule microarray-facilitated screening of affinity-based probes (AfBPs) for γ -secretase. *Chemical Communications*, (33):5030, 2009.
- [141] S. J. Singer and R. F. Doolittle. Antibody active sites and immunoglobulin molecules. *Science*, 153(3731):13–25, 1966.
- [142] G. W. J. Fleet, R. R. Porter, and J. R. Knowles. Affinity labelling of antibodies with aryl nitrene as reactive group. *Nature*, 224(5218):511–512, 1969.
- [143] L. Dubinsky, B. P. Krom, and M. M. Meijler. Diazirine based photoaffinity labeling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(2):554–570, 2012.
- [144] Shin ichi Sato, Asako Murata, Takashi Shirakawa, and Motonari Uesugi. Biochemical target isolation for novices: Affinity-based strategies. *Chemistry & Biology*, 17(6):616–623, jun 2010.
- [145] H. Dückert, V. Pries, V. Khedkar, S. Menninger, H. Bruss, A. W. Bird, Z. Maliga, A. Brockmeyer, P. Janning, A. Hyman, S. Grimme, M. Schürmann, H. Preut, K. Hübel, S. Ziegler, K. Kumar, and H. Waldmann. Natural product - inspired cascade synthesis yields modulators of centrosome integrity. *Nature Chemical Biology*, 8(2):179–184, 2011.
- [146] T. Shiyama, M. Furuya, A. Yamazaki, T. Terada, and A. Tanaka. Design and synthesis of novel hydrophilic spacers for the reduction of nonspecific binding proteins on affinity resins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(11):2831–2841, 2004.

- [147] L. Pugliese, A. Coda, M. Malcovati, and M. Bognesi. Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 231(3):698–710, 1993.
- [148] S. H. L. Verhelst, M. Fonović, and M. Bogyo. A mild chemically cleavable linker system for functional proteomic applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8):1284–1286, 2007.
- [149] M. P. Patricelli, D. K. Giang, L. M. Stamp, and J. J. Burbaum. Direct visualization of serine hydrolase activities in complex proteomes using fluorescent active site-directed probes. *Proteomics*, 1(8):1067–1071, 2001.
- [150] L. E. Edgington, A. B. Berger, G. Blum, V. E. Albrow, M. G. Paulick, N. Lineberry, and M. Bogyo. Noninvasive optical imaging of apoptosis by caspase-targeted activity-based probes. *Nature Medicine*, 15(8):967–973, 2009.
- [151] Amir M Sadaghiani, Steven HL Verhelst, and Matthew Bogyo. Tagging and detection strategies for activity-based proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 11(1):20–28, feb 2007.
- [152] N. M. Green. Avidin. 1. the use of 14c biotin for kinetic studies and for assay. *Biochemical Journal*, 89(3):585–591, 1963.
- [153] Y. Kashiwayama, T. Tomohiro, K. Narita, M. Suzumura, T. Glumoff, J. K. Hiltunen, P. P. Van Veldhoven, Y. Hatanaka, and T. Imanaka. Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal β -oxidation enzyme by photoaffinity labeling with a novel palmitoyl derivative. *Journal of Biological Chemistry*, 285(34):26315–26325, 2010.
- [154] K. L. Leach, S. M. Swaney, J. R. Colca, W. G. McDonald, J. R. Blinn, L. M. Thomasco, R. C. Gadwood, D. Shinabarger, L. Xiong, and A. S. Mankin. The site of action of oxazolidinone antibiotics in living bacteria and in human mitochondria. 26(3):393–402.
- [155] E. Haldón, M. C. Nicasio, and P. J. Pérez. Copper-catalysed azide - alkyne cycloadditions (CuAAC): an update. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(37):9528–9550, 2015.
- [156] R. Huisgen. Cycloadditionen - begriff, einteilung und kennzeichnung. *Angewandte Chemie*, 80(9):329–337, 1968.
- [157] H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless. Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(11):2004–2021, jun 2001.
- [158] C. W. Tornøe, C. Christensen, and M. Meldal. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of Organic Chemistry*, 67(9):3057–3064, may 2002.
- [159] G. Baggerman, E. Vierstraete, A. De Loof, and L. Schoofs. Gel-based versus gel-free proteomics: A review. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 8(8):669–677, 2005.

- [160] J. K. Eng, A. L. McCormack, and J. R. Yates. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 5(11):976–989, 1994.
- [161] F. Bernaudo, F. Monteleone, M. Mesuraca, S. Krishnan, E. Chiarella, S. Scicchitano, G. Cuda, G. Morrone, H. M. Bond, and M. Gaspari. Validation of a novel shotgun proteomic workflow for the discovery of protein - protein interactions: Focus on ZNF521. *Journal of Proteome Research*, 14(4):1888–1899, mar 2015.
- [162] M. Pang, X.-Y. Bai, Y. Li, J.-Z. Bai, L.-R. Yuan, S.-A. Ren, X.-Y. Hu, X.-R. Zhang, B.-F. Yu, R. Guo, and H.-L. Wang. Label-free LC-MS/MS shotgun proteomics to investigate the anti-inflammatory effect of rCC16. *Molecular Medicine Reports*, 14(5):4496–4504, 2016.
- [163] M. J. MacCoss, W. H. McDonald, A. Saraf, R. Sadygov, J. M. Clark, J. J. Tasto, K. L. Gould, D. Wolters, M. Washburn, A. Weiss, J. I. Clark, and J. R. Yates. Shotgun identification of protein modifications from protein complexes and lens tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(12):7900–7905, 2002.
- [164] L. N. Mueller, M.-Y. Brusniak, D. R. Mani, and R. Aebersold. An assessment of software solutions for the analysis of mass spectrometry based quantitative proteomics data. *Journal of Proteome Research*, 7(1):51–61, 2008.
- [165] H. Eagle. The specific amino acid requirements of a mammalian cell (strain 1) in tissue culture. *The Journal of biological chemistry*, 214(2):839–852, 1955.
- [166] S.-E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. Bach Kristensen, H. Steen, A. Pandey, and M. Mann. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 1(5):376–386, 2002.
- [167] S.-E. Ong, I. Kratchmarova, and M. Mann. Properties of ^{13}C -substituted arginine in stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Journal of Proteome Research*, 2(2):173–181, 2003.
- [168] S. Wiese, K. A. Reidegeld, H. E. Meyer, and B. Warscheid. Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*, 7(3):340–350, 2007.
- [169] M. Kuljanin, D. C. Mitchell, D. K. Schweppe, A. S. Gikandi, D. P. Nusinow, N. J. Bulloch, E. V. Vinogradova, D. L. Wilson, E. T. Kool, J. D. Mancias, B. F. Cravatt, and S. P. Gygi. Reimagining high-throughput profiling of reactive cysteines for cell-based screening of large electrophile libraries. *Nature Biotechnology*, 2021.
- [170] P. V. Bondarenko, D. Chelius, and T. A. Shaler. Identification and relative quantitation of protein mixtures by enzymatic digestion followed by capillary reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 74(18):4741–4749, 2002.

- [171] W. Wang, H. Zhou, H. Lin, S. Roy, T. A. Shaler, L. R. Hill, S. Norton, P. Kumar, M. Anderle, and C. H. Becker. Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards. *Analytical Chemistry*, 75(18):4818–4826, 2003.
- [172] C. D. Kelstrup, C. Young, R. Lavalley, M. L. Nielsen, and J. V. Olsen. Optimized fast and sensitive acquisition methods for shotgun proteomics on a quadrupole orbitrap mass spectrometer. *Journal of Proteome Research*, 11(6):3487–3497, 2012.
- [173] J. C. Silva, R. Denny, C. A. Dorschel, M. Gorenstein, I. J. Kass, G.-Z. Li, T. McKenna, M. J. Nold, K. Richardson, P. Young, and S. Geromanos. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Analytical Chemistry*, 77(7):2187–2200, 2005.
- [174] Y. Zhang, B. R. Fonslow, B. Shan, M.-C. Baek, and J. R. Yates. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical Reviews*, 113(4):2343–2394, 2013.
- [175] A. B. Stergachis, B. MacLean, K. Lee, J. A. Stamatoyannopoulos, and M. J. MacCoss. Rapid empirical discovery of optimal peptides for targeted proteomics. *Nature Methods*, 8(12):1041–1043, 2011.
- [176] P. D. Compton, L. Zamdborg, P. Thomas, and N. Kelleher. On the scalability and requirements of whole protein mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 83 17:6868–74.
- [177] L. Switzar. *Advances in drug-protein adduct analysis Using LC-MS based proteomics*. PhD thesis, Vrije Universiteit Amsterdam, 2013. Naam instelling promotie: VU Vrije Universiteit Naam instelling onderzoek: VU Vrije Universiteit.
- [178] T. Angel, U. Aryal, S. Hengel, E. Baker, R. Kelly, E. Robinson, and R. Smith. Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chemical Society reviews*, 41 10:3912–28.
- [179] P. Giansanti, L. Tsiatsiani, T. Yew Low, and A. J. R. Heck. Six alternative proteases for mass spectrometry based proteomics beyond trypsin. *Nature Protocols*, 11(5):993–1006, 2016.
- [180] Gargi Choudhary, Shiaw-Lin Wu, Paul Shieh, and William S. Hancock. Multiple enzymatic digestion for enhanced sequence coverage of proteins in complex proteomic mixtures using capillary LC with ion trap MS/MS. *Journal of Proteome Research*, 2(1):59–67, feb 2003.
- [181] D. L. Swaney, C. D. Wenger, and J. J. Coon. Value of using multiple proteases for large-scale mass spectrometry-based proteomics. *Journal of Proteome Research*, 9(3):1323–1329, 2010.
- [182] J. Klose. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. *Human Genetic*, 326:231–243, 1975.
- [183] P. Z. O. Farrell, H. M. Goodman, and P. H. O. Farrell. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell*, 12(4):1133–1142, 1977.

- [184] R. E. Banks, M. J. Dunn, D. F. Hochstrasser, J.-C. Sanchez, W. Blackstock, D. J. Pappin, and P. J. Selby. Proteomics: new perspectives, new biomedical opportunities. *The Lancet*, 356(9243):1749–1756, 2000.
- [185] F. Chevalier, D. Centeno, V. Rofidal, M. Tauzin, O. Martin, N. Sommerer, and M. Rosignol. Different impact of staining procedures using visible stains and fluorescent dyes for large-scale investigation of proteomes by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 5(3):512–520, 2006.
- [186] D. A. Wolters, M. P. Washburn, and J. R. Yates. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Analytical Chemistry*, 73(23):5683–5690, 2001.
- [187] J. E. MacNair, K. C. Lewis, and J. W. Jorgenson. Ultrahigh-pressure reversed-phase liquid chromatography in packed capillary columns. *Analytical Chemistry*, 69(6):983–989, 1997.
- [188] A. Motoyama, J. D. Venable, C. I. Ruse, and J. R. Yates. Automated ultra-high-pressure multidimensional protein identification technology (UHP-MudPIT) for improved peptide identification of proteomic samples. *Analytical Chemistry*, 78(14):5109–5118, 2006.
- [189] S. Fekete, E. Olh, and J. Fekete. Fast liquid chromatography: The domination of core?shell and very fine particles. *Journal of Chromatography A*, 1228:57–71, 2012.
- [190] H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka, and N. Tanaka. Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 68(19):3498–3501, 1996.
- [191] C. Xie, M. Ye, X. Jiang, W. Jin, and H. Zou. Octadecylated silica monolith capillary column with integrated nanoelectrospray ionization emitter for highly efficient proteome analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(3):454–461, 2006.
- [192] J. Fenn, M. Mann, C. Meng, S. Wong, and C. Whitehouse. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926):64–71, 1989.
- [193] M. Karas and F. Hillenkamp. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20):2299–2301, 1988.
- [194] A. P Bruins. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, 794(1-2):345–357, 1998.
- [195] Jarrod J. Sandow, Giuseppe Infusini, Laura F. Dagley, Rune Larsen, and Andrew I. Webb. Simplified high-throughput methods for deep proteome analysis on the timsTOF pro. *bioarxiv*, 2019.
- [196] F. Meier, A.-D. Brunner, M. Frank, A. Ha, I. Bludau, E. Voytik, S. Kaspar-Schoenefeld, M. Lubeck, O. Raether, R. Aebersold, B. C. Collins, H. L. Röst, and M. Mann. Parallel accumulation-serial fragmentation combined with data-independent acquisition (diaPA-SEF): Bottom-up proteomics with near optimal ion usage. *bioarxiv*, 2019.

- [197] F. Meier, A.-D. Brunner, S. Koch, H. Koch, M. Lubeck, M. Krause, N. Goedecke, J. Decker, T. Kosinski, M. A. Park, N. Bache, O. Hoerning, J. Cox, O. Räther, and M. Mann. Online parallel accumulation–serial fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion mobility mass spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(12):i–2545, 2018.
- [198] J. A. Silveira, M. E. Ridgeway, F. H. Laukien, M. Mann, and M. A. Park. Parallel accumulation for 100% duty cycle trapped ion mobility-mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 413:168–175, 2017.
- [199] K. Michelmann, J. A. Silveira, M. E. Ridgeway, and M. A. Park. Fundamentals of trapped ion mobility spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 26(1):14–24, 2014.
- [200] J. H. Gross. *Massenspektrometer*. Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [201] P. Hallett, A. J. Grimshaw, D. B. Wigley, and A. Maxwell. Cloning of the dna gyrase genes under tac promoter control: overproduction of the gyrase a and b proteins. *Gene*, 93(1):139–142.
- [202] I. Cvrtila, H. Fanlo-Virgós, G. Schaeffer, G. Monreal Santiago, and S. Otto. Redox control over acyl hydrazone photoswitches. *Journal of the American Chemical Society*, 139(36):12459–12465, 2017. PMID: 28749147.
- [203] A. Hoegl, M. B. Nodwell, V. C. Kirsch, N. C. Bach, M. Pfanzelt, M. Stahl, S. Schneider, and S. A. Sieber. Mining the cellular inventory of pyridoxal phosphate-dependent enzymes with functionalized cofactor mimics. *Nature chemistry*, 10(12):1234–1245, December 2018.
- [204] S. I. Presolski, V. P. Hong, and M. G. Finn. Copper-catalyzed azide–alkyne click chemistry for bioconjugation. *Current Protocols in Chemical Biology*, 3(4):153–162, 2011.
- [205] C. L. Ladner, J. Yang, R. J. Turner, and R. A. Edwards. Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Analytical Biochemistry*, 326(1):13–20, 2004.
- [206] C. S. Hughes, S. Moggridge, T. Müller, P. H. Sorensen, G. B. Morin, and J. Krijgsveld. Single-pot solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nature Protocols*, 2019.
- [207] T. Kosinski, S. Koch, M. Lubeck, P.-O. Schmit, N. Bache, O. B. Horning, L. Falkenby, and H. Koch. timstof pro with pasef and evosep one: Maximizing throughput, robustness and analytical depth for shotgun proteomics. Technical report, Bruker Daltonik GmbH, 2018.
- [208] T. Birkenstock, M. Liebeke, V. Winstel, B. Krismer, C. Gekeler, M. J. Niemiec, H. Bisswanger, M. Lalk, and A. Peschel. Exometabolome analysis identifies pyruvate dehydrogenase as a target for the antibiotic triphenylbismuthdichloride in multiresistant bacterial pathogens. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4):2887–2895, 2012.
- [209] H.-K. Ku, H.-M. Lim, K.-H. Oh, H.-J. Yang, J.-S. Jeong, and S.-K. Kim. Interpretation of protein quantitation using the bradford assay: Comparison with two calculation models. *Analytical Biochemistry*, 434(1):178–180, 2013.

- [210] A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havli, J. V. Olsen, and M. Mann. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1(6):2856–2860, 2006.
- [211] V. Aquilanti, K. C. Mundim, M. Elango, S. Kleijn, and T. Kasai. Temperature dependence of chemical and biophysical rate processes: Phenomenological approach to deviations from arrhenius law. *Chemical Physics Letters*, 498(1-3):209–213, 2010.
- [212] M. Wegener, M. J. Hansen, A. J. M. Driessen, W. Szymanski, and B. L. Feringa. Photo-control of antibacterial activity: Shifting from uv to red light activation. *Journal of the American Chemical Society*, 139(49):17979–17986, December 2017.
- [213] C. Knie, M. Utecht, F. Zhao, H. Kulla, S. Kovalenko, A. M. Brouwer, P. Saalfrank, S. Hecht, and D. Bléger. ortho-fluoroazobenzenes: Visible light switches with very long-lived z isomers. *Chemistry – A European Journal*, 20(50):16492–16501.
- [214] A. Chapman-Smith and J. E. Cronan. The enzymatic biotinylation of proteins: a post-translational modification of exceptional specificity. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(9):359–363, 1999.
- [215] C. Kang, H. J. Kim, D. Kang, D. Y. Jung, and M. Suh. Highly sensitive and simple fluorescence staining of proteins in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide-based gels by using hydrophobic tail-mediated enhancement of fluorescein luminescence. *Electrophoresis*, 24(19-20):3297–3304, 2003.
- [216] M. Stracy, A. J. M. Wollman, E. Kaja, J. Gapinski, J.-. Lee, V. A. Leek, S. J. McKie, L. A. Mitchenall, A. Maxwell, D. J. Sherratt, M. C. Leake, and P. Zawadzki. Single-molecule imaging of DNA gyrase activity in living escherichia coli. *Nucleic Acids Research*, 47(1):210–220, 2018.
- [217] C. Sissi and M. Palumbo. Effects of magnesium and related divalent metal ions in topoisomerase structure and function. *Nucleic Acids Research*, 37(3):702–711, 2009.
- [218] H. Yoshida, M. Bogaki, M. Nakamura, L. M. Yamanaka, and S. Nakamura. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrB gene of escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(8):1647–1650, 1991.
- [219] A. Confreres and A.. Maxwell. gyrB mutations which confer coumarin resistance also affect DNA supercoiling and ATP hydrolysis by escherichia coli DNA gyrase. *Molecular Microbiology*, 6(12):1617–1624, 1992.
- [220] B. D. Lindenbach and C. M. Rice. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, pages 23–61, 2003.
- [221] G. Kuno, G.-J. J. Chang, K. R. Tsuchiya, N. Karabatsos, and C. B. Cropp. Phylogeny of the genus flavivirus. *Journal of Virology*, 72(1):73–83, 1998.
- [222] B. D. Lindenbach and C. M. Rice. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- [223] D. S. Burke and T. P. Monath. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

- [224] S. Bhatt, P. W. Gething, O. J. Brady, J. P. Messina, A. W. Farlow, C. L. Moyes, J. M. Drake, J. S. Brownstein, A. G. Hoen, O. Sankoh, M. F. Myers, D. B. George, T. Jaenisch, G. R. W. Wint, C. P. Simmons, T. W. Scott, Jeremy J. Farrar, and Simon I. Hay. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496(7446):504–507, 2013.
- [225] WHO. Dengue and severe dengue, June 2020.
- [226] O. J. Brady, P. W. Gething, S. Bhatt, J. P. Messina, J. S. Brownstein, A. G. Hoen, C. L. Moyes, A. W. Farlow, T. W. Scott, and S. I. Hay. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8):e1760, 2012.
- [227] R. J. Kuhn, W. Zhang, M. G. Rossmann, S. V. Pletnev, J. Corver, E. Lenches, C. T. Jones, S. Mukhopadhyay, P. R. Chipman, E. G. Strauss, T. S. Baker, and J. H. Strauss. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108(5):717–725, 2002.
- [228] Z. Zeng, J. Shi, X. Guo, L. Mo, N. Hu, J. Sun, M. Wu, H. Zhou, and Y. Hu. Full-length genome and molecular characterization of dengue virus serotype 2 isolated from an imported patient from myanmar. *Virology Journal*, 15(1), 2018.
- [229] K. Jessie, M. Y. Fong, S. Devi, S. K. Lam, and K. Wong. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(8):1411–1418, 2004.
- [230] S.-J. L. Wu, G. Grouard-Vogel, W. Sun, J. R. Mascola, E. Brachtel, R. Putvatana, M. K. Louder, L. Filgueira, M. A. Marovich, H. K. Wong, A. Blauvelt, G. S. Murphy, M. L. Robb, B. L. Innes, D. L. Bix, C. G. Hayes, and S. Schlesinger Frankel. Human skin langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Medicine*, 6(7):816–820, jul 2000.
- [231] R. F. Mercado-Curiel, W. C. Black, and M. de L. Munoz. A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in aedes aegypti. *BMC Microbiology*, 8(1), 2008.
- [232] J. Reyes del Valle, S. Chávez-Salinas, F. Medina, and R. M. del Angel. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *Journal of Virology*, 79(8):4557–4567, 2005.
- [233] Y. Chen, T. Maguire, R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. D. Esko, R. J. Linhardt, and R. M. Marks. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine*, 3(8):866–871, 1997.
- [234] H. M. van der Schaar, M. J. Rust, C. Chen, H. van der Ende-Metselaar, J. Wilschut, X. Zhuang, and J. M. Smit. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathogens*, 4(12):e1000244, 2008.
- [235] K. Stiasny, S. L. Allison, J. Schalich, and F. X. Heinz. Membrane interactions of the tick-borne encephalitis virus fusion protein e at low pH. *Journal of Virology*, 76(8):3784–3790, 2002.

- [236] I. A. Rodenhuis-Zybert, J. Wilschut, and J. M. Smit. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(16):2773–2786, 2010.
- [237] K. Clyde, J. L. Kyle, and E. Harris. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of Virology*, 80(23):11418–11431, 2006.
- [238] J. E. Bryant, A. E. Calvert, K. Mesesan, M. B. Crabtree, K. E. Volpe, S. Silengo, R. M. Kinney, C. Y.-H. Huang, B. R. Miller, and J. T. Roehrig. Glycosylation of the dengue 2 virus e protein at n67 is critical for virus growth in vitro but not for growth in intrathoracically inoculated aedes aegypti mosquitoes. *Virology*, 366(2):415–423, 2007.
- [239] Y. Zhang, W. Zhang, S. Ogata, D. Clements, J. H. Strauss, T. S. Baker, R. J. Kuhn, and M. G. Rossmann. Conformational changes of the flavivirus e glycoprotein. *Structure*, 12(9):1607–1618, 2004.
- [240] W. Zhang, P. R. Chipman, J. Corver, P. R. Johnson, Y. Zhang, S. Mukhopadhyay, T. S. Baker, J. H. Strauss, M. G. Rossmann, and R. J. Kuhn. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(11):907–912, 2003.
- [241] I.-M. Yu, W. Zhang, H. A. Holdaway, L. Li, V. A. Kostyuchenko, P. R. Chipman, R. J. Kuhn, M. G. Rossmann, and J. Chen. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*, 319(5871):1834–1837, 2008.
- [242] I. A. Zybert, H. van der Ende-Metselaar, J. Wilschut, and J. M. Smit. Functional importance of dengue virus maturation: infectious properties of immature virions. *Journal of General Virology*, 89(12):3047–3051, 2008.
- [243] K. Meindl, T. Schmiederer, K. Schneider, A. Reicke, D. Butz, S. Keller, H. Gühring, L. Vértesy, J. Wink, H. Hoffmann, M. Brönstrup, G. M. Sheldrick, and R. D. Süßmuth. Labyrinthopeptide - eine neue klasse carbacyclischer lantibiotika. *Angewandte Chemie*, 122(6):1169–1173, 2010.
- [244] C. Chatterjee, M. Paul, L. Xie, and W. A. van der Donk. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Reviews*, 105(2):633–684, 2005.
- [245] J. M. Willey and W. A. van der Donk. Lantibiotics: Peptides of diverse structure and function. *Annual Review of Microbiology*, 61(1):477–501, 2007.
- [246] F. J. M. van De Ven and G. Jung. Structures of lantibiotics studied by NMR. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69(2):99–107, 1996.
- [247] S.-T. D. Hsu, E. Breukink, G. Bierbaum, H.-G. Sahl, B. de Kruijff, R. Kaptein, N. A. J. van Nuland, and A. M. J. J. Bonvin. NMR study of mersacidin and lipid II interaction in dodecylphosphocholine micelles. *Journal of Biological Chemistry*, 278(15):13110–13117, 2003.

- [248] E. Breukink. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 286(5448):2361–2364, 1999.
- [249] H. Grasmann, F. Stehling, H. Brunar, R. Widmann, T. W. Laliberte, L. Molina, G. Döring, and F. Ratjen. Inhalation of moli1901 in patients with cystic fibrosis. *Chest*, 131(5):1461–1466, 2007.
- [250] G. Seibert, L. Vértesy, J. Wink, I. Winkler, R. Süßmuth, G. Sheldrick, K. Meindl, M. Brönstrup, H. Hoffmann, H. Guehring, and L. Toti, 2013.
- [251] J. Wink, R. M. Kroppenstedt, G. Seibert, and E. Stackebrandt. *Actinomadura namibiensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3):721–724, 2003.
- [252] R. Dorenbos, T. Stein, J. Kabel, C. Bruand, A. Bolhuis, S. Bron, W. J. Quax, and J. M. van Dijk. Thiol-disulfide oxidoreductases are essential for the production of the lantibiotic sublancin 168. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19):16682–16688, 2002.
- [253] E. Bekerman and S. Einav. Combating emerging viral threats. *Science*, 348(6232):282–283, 2015.
- [254] V. Boldescu, M. A. M. Behnam, N. Vasilakis, and C. D. Klein. Broad-spectrum agents for flaviviral infections: dengue, zika and beyond. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(8):565–586, 2017.
- [255] J. P. Martinez, F. Sasse, M. Brönstrup, J. Diez, and A. Meyerhans. Antiviral drug discovery: broad-spectrum drugs from nature. *Natural Product Reports*, 32(1):29–48, 2015.
- [256] T. K. Warren, J. Wells, R. G. Panchal, K. S. Stuthman, N. L. Garza, S. A. Van Tongeren, L. Dong, C. J. Retterer, B. P. Eaton, G. Pegoraro, S. Honnold, S. Bantia, P. Kotian, X. Chen, B. R. Taubenheim, L. S. Welch, D. M. Minning, Y. S. Babu, W. P. Sheridan, and S. Bavari. Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. *Nature*, 508(7496):402–405, 2014.
- [257] H. Prochnow, K. Rox, N. V. S. Birudukota, L. Weichert, S.-K. Hotop, P. Klahn, K. Mohr, S. Franz, D. H. Banda, S. Blockus, J. Schreiber, A. Haid, M. Oeyen, J. P. Martinez, R. D. Süßmuth, J. Wink, A. Meyerhans, C. Goffinet, M. Messerle, T. F. Schulz, A. Kröger, D. Schols, T. Pietschmann, and M. Brönstrup. Labyrinthopeptins exert broad-spectrum antiviral activity through lipid-binding-mediated virolysis. *Journal of Virology*, 94(2), 2020.
- [258] D. Vance. *Biochemistry of lipids, lipoproteins, and membranes*. Elsevier, Amsterdam Boston, 2002.
- [259] X. Han, D. R. Abendschein, J. G. Kelley, and R. W. Gross. Diabetes-induced changes in specific lipid molecular species in rat myocardium. *The Biochemical journal*, 144(5):646–674, 2000.
- [260] A. Llorente, T. Skotland, T. Sylv[’]anne, D. Kauhanen, T. Róg, A. Orłowski, I. Vattulainen, K. Ekroos, and K. Sandvig. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate

- cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(7):1302–1309, 2013.
- [261] X. Hann. *Lipidomics*. John Wiley & Sons, Inc, 2016.
- [262] E. Fahy, S. Subramaniam, H. A. Brown, C. K. Glass, A. H. Merrill, R. C. Murphy, C. R. H. Raetz, D. W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. van Meer, M. S. Van Nieuwenhze, S. H. White, J. L. Witztum, and E. A. Dennis. A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 46(5):839–861, 2005.
- [263] D. Bach and E. Wachtel. Phospholipid/cholesterol model membranes: formation of cholesterol crystallites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1610(2):187–197, 2003.
- [264] K. Kishimoto, R. Urade, T. Ogawa, and T. Moriyama. Nondestructive quantification of neutral lipids by thin-layer chromatography and laser-fluorescent scanning: Suitable methods for “lipidome” analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(3):657–662, 2001.
- [265] X. Han, K. Yang, and R. W. Gross. Multi-dimensional mass spectrometry-based shotgun lipidomics and novel strategies for lipidomic analyses. *Mass Spectrometry Reviews*, 31(1):134–178, 2011.
- [266] J. Folch, M. Lees, and G. H. S. Stanley. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1):497–509, 1957.
- [267] E. G. Bligh and W. J. Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8):911–917, 1959. PMID: 13671378.
- [268] T. Cajka and O. Fiehn. Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 61:192–206, 2014.
- [269] C. G. Vasilopoulou, K. Sulek, A.-D. Brunner, N. Sanjib Meitei, U. Schweiger-Hufnagel, S. W. Meyer, A. Barsch, M. Mann, and F. Meier. Trapped ion mobility spectrometry and PASEF enable in-depth lipidomics from minimal sample amounts. *Nature Communications*, 11(1), 2020.
- [270] L. Wigger, M. Barovic, A.-D. Brunner, F. Marzetta, E. Schöniger, F. Mehl, N. Kipke, D. Friedland, F. Burdet, C. Kessler, M. Lesche, B. Thorens, E. Bonifacio, C. L. Quigley, P. Delerive, A. Dahl, K. Simons, D. Aust, J. Weitz, M. Distler, A. M. Schulte, M. Mann, M. Ibberson, and M. Solimena. Multi-omics profiling of living human pancreatic islet donors reveals heterogeneous beta cell trajectories toward type 2 diabetes. *Nature Metabolism*, 2020.
- [271] X. Han and R. W. Gross. Electrospray ionization mass spectroscopic analysis of human erythrocyte plasma membrane phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22):10635–10639, 1994.

- [272] G. Liebisch, W. Drobnik, B. Lieser, and G. Schmitz. High-throughput quantification of lysophosphatidylcholine by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 48(12):2217–2224, 2002.
- [273] G. Liebisch, W. Drobnik, M. Reil, B. Trümbach, R. Arnecke, B. Olgemöller, A. Roscher, and G. Schmitz. Quantitative measurement of different ceramide species from crude cellular extracts by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Journal of Lipid Research*, 40(8):1539–1546, 1999.
- [274] D. Schwudke, J. Oegema, L. Burton, E. Entchev, J. T. Hannich, C. S. Ejsing, T. Kurzchalia, and A. Shevchenko. Lipid profiling by multiple precursor and neutral loss scanning driven by the data-dependent acquisition. *Analytical Chemistry*, 78(2):585–595, 2006.
- [275] F. Medina, J. F. Medina, C. Colón, E. Vergne, G. A. Santiago, and J. L. Muñoz-Jordán. Dengue virus: Isolation, propagation, quantification, and storage. *Current Protocols in Microbiology*, 27(1):15D.2.1–15D.2.24, 2012.
- [276] R. Perera and R. J. Kuhn. Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*, 11(4):369–377, aug 2008.
- [277] L. Ma, C. T. Jones, T. D. Groesch, R. J. Kuhn, and C. B. Post. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10):3414–3419, 2004.
- [278] R. Perera, C. Riley, G. Isaac, A. S. Hopf-Jannasch, R. J. Moore, K. W. Weitz, L. Pasa-Tolic, T. O. Metz, J. Adamec, and R. Kuhn. Dengue virus infection perturbs lipid homeostasis in infected mosquito cells. *PLOS Pathogens*, 8(3):1–18, 2012.
- [279] P. Ivanová, D. S. Myers, S. Milne, J. McClaren, P. Thomas, and H. Brown. Lipid composition of viral envelope of three strains of influenza virus - not all viruses are created equal. *ACS infectious diseases*, 1 9:399–452, 2015.
- [280] V. Lladó, D. J. López, M. Ibaruren, M. Alonso, J. B. Soriano, P. V. Escribá, and X. Busquets. Regulation of the cancer cell membrane lipid composition by nacholeate: Effects on cell signaling and therapeutical relevance in glioma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1838(6):1619 – 1627, 2014. Membrane Structure and Function: Relevance in the Cell’s Physiology, Pathology and Therapy.
- [281] A. Merz, G. Long, M.-S. Hiet, B. Brügger, P. Chlanda, P. Andre, F. Wieland, J. Krijnse-Locker, and R. Bartenschlager. Biochemical and morphological properties of hepatitis c virus particles and determination of their lipidome. *The Journal of biological chemistry*, 286(4):3018—3032, January 2011.
- [282] Y. Gu, T. Tkiwa, K. Kino, T. Ohno, and M. Namba. Cytotoxicity test of methanol using various human hepatoma cell lines. *AATEX*, 2:105–108.
- [283] A. Luukkonen, M. Brummer-Korvenkontio, and O. Renkonen. Lipids of cultured mosquito cells (*aedes albopictus*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 326(2):256–261, 1973.

- [284] J. E. Vance. Thematic review series: Glycerolipids. phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *Journal of Lipid Research*, 49(7):1377–1387, jul 2008.
- [285] E. L. Gottfried. Lipids of human leukocytes: relation to cell type. *Journal of Lipid Research*, 8(4):321–327, 1967.
- [286] G. Barcelo-Coblijn, M. L. Martin, R. F. M. de Almeida, M. A. Noguera-Salva, A. Marcilla-Etxenike, F. Guardiola-Serrano, A. Luth, B. Kleuser, J. E. Halver, and P. V. Escriba. Sphingomyelin and sphingomyelin synthase (SMS) in the malignant transformation of glioma cells and in 2-hydroxyoleic acid therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49):19569–19574, nov 2011.
- [287] M. L. Martin, G. Barceló-Coblijn, R. F. M. de Almeida, M. A. Noguera-Salvá, S. Terés, M. Higuera, G. Liebisch, G. Schmitz, X. Busquets, and P. V. Escribá. The role of membrane fatty acid remodeling in the antitumor mechanism of action of 2-hydroxyoleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(5):1405–1413, 2013.
- [288] A. Marcilla-Etxenike, M. L. Martín, M. A. Noguera-Salvà, J. M. García-Verdugo, M. Soriano-Navarro, I. Dey, P. V. Escribá, and X. Busquets. 2-hydroxyoleic acid induces ER stress and autophagy in various human glioma cell lines. *PLoS ONE*, 7(10):e48235, oct 2012.
- [289] A. Colom, E. Derivery, S. Soleimanpour, C. Tomba, M. Dal Molin, N. Sakai, M. González-Gaitán, S. Matile, and A. Roux. A fluorescent membrane tension probe. *Nature Chemistry*, 10(11):1118–1125, 2018.

Danksagung

Zu aller erst gilt mein Dank meinen Doktorvater Prof. Mark Brönstrup, der es mir ermöglicht hat meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Ich möchte mich auch bei Ursula Bilitewski bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mit vielen konstruktiven Ratschlägen tatkräftig zur Seite stand. Ein besonderer Dank gilt auch Lothar Jänsch und seiner Arbeitsgruppe besonders Josef Wissing und Manfred Nimtze, die mich tatkräftig in allen Proteomstudien unterstützt haben.

Ich möchte mich bei der ganzen CBIO-Arbeitsgruppe bedanken, die mir 3 sehr schöne Jahre ermöglicht hat. Besonders meinen Bürokollegen und Mitstreitern Tobi, Volker, Mariel, Aditya, Sven-Kevin, Federica, Tiankun und Yi-Hui möchte ich mich für interessante Unterhaltungen und amüsante Mittagspausen bedanken. Ich habe viel über andere Kulturen und Lebensweisen lernen können. Ganz besonders möchte ich mich bei Heike für ihre Unterstützung sowohl privat als auch im Labor bedanken.

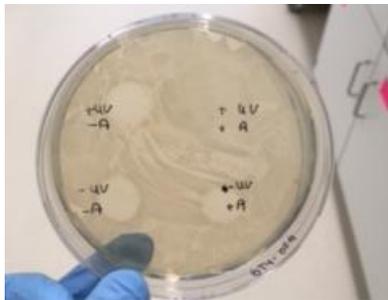
Ein besonderer Dank gilt auch Susanne Talay und dem ganzen S3-Team, die es mir ermöglicht haben meine Virusexperimente in unserem BSL-3 Labor durchzuführen. Ich habe die etwas andere Arbeit wirklich sehr genossen.

Vor allem meiner Familie und Freunden möchte ich danken, denn ohne deren Unterstützung wäre ich nicht hier, wo ich jetzt bin. Ein ganz besonders großer Dank gilt meiner Mutter, die mich immer unterstützt hat und immer für mich da war. Ich möchte mich auch bei meinem Verlobten Jonas bedanken, der ganz tapfer meine Launen ertragen hat und mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurück gebracht hat. Durch seine Unterstützung und Motivation habe ich es geschafft nie aufzugeben und immer weiter zu machen.

Anhang

Agar-Diffusions-Test - Plattenbilder

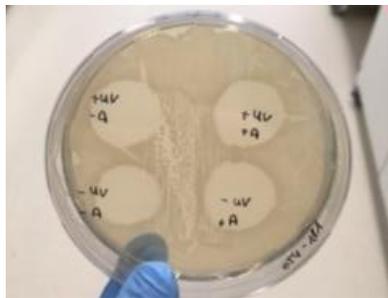
A) GT4-059



C) AR446



B) GT4-181



D) Albicidin



Plattenbilder des Agar-Diffusions-Tests der Photoschalter. A) GT4-059, B) GT4-181 und C) AR446 mit jeweils \pm AlbA und \pm Bestrahlung mit 365 nm. D) Albicidin mit und ohne AlbA.

Photoschalter - Kinetikexperimente: Berechnung der Konzentrationen des photostationären Zustandes aus den gemessenen Absorptionen

Die zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k verwendeten Absorptionen mussten zunächst in Konzentrationen umgerechnet werden. Da für bei dem C-terminalen Photoschalter kein Unterschied zwischen der *trans* und der *cis*-Konfiguration zu erkennen war, konnte diese Methode nicht verwendet werden, um die jeweiligen Anteile an *cis* und *trans* im Grund- bzw. photostationären Zustand zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde der Grundzustand so definiert, dass dieser mit dem höchst möglichen Anteil an *trans* populierte ist und dementsprechend ist der Anteil an *trans* im photostationären Zustand maximal gering. Daraus folgt die Annahme,

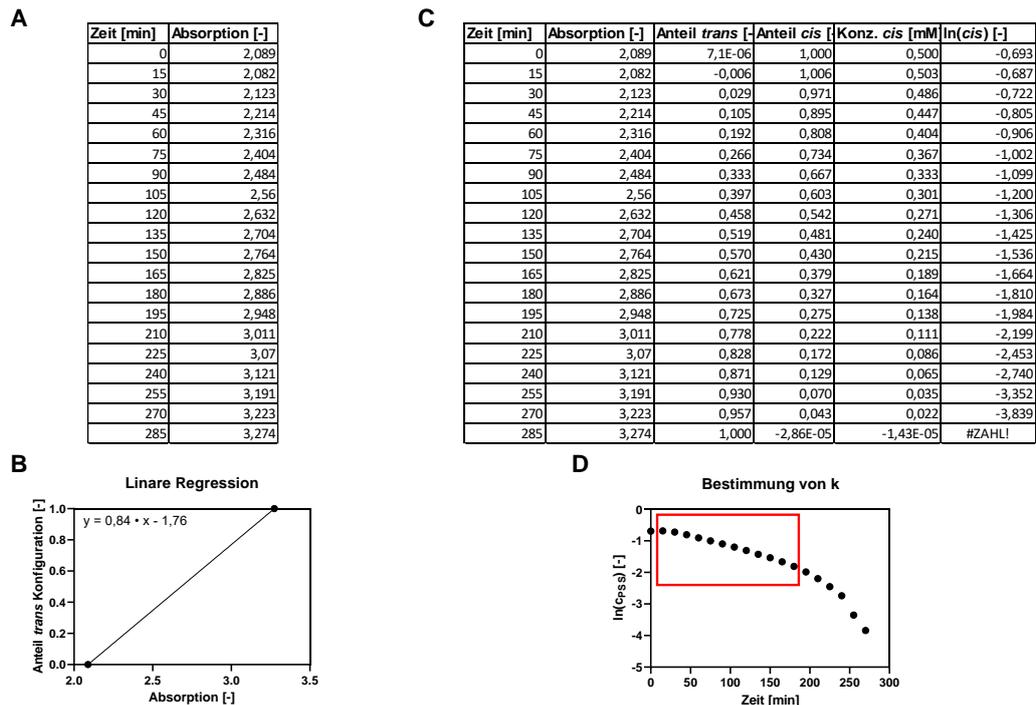


Abbildung 4.0.1: Berechnung der Konzentrationen der *cis*-Konfiguration aus den gemessenen Absorptionen. A) Absorptionswerte zu den jeweiligen Zeitpunkten, B) lineare Regression zur Umrechnung der Absorptionen in fiktive Anteile der *trans*-Konfiguration, C) Berechnung der Konzentration der *trans*-Konfiguration unter Verwendung der Gleichung in B, daraus erschließt sich die Konzentration des *cis*-Zustandes zur Berechnung von *k*.

dass im Grundzustand der Anteil der *trans*-Konfiguration 1 ist und im photostationären Zustand 0. In Abbildung 4.0.1 ist die Vorgehensweise genauer dargestellt. Der Ausgangspunkt sind die Absorptionswerte zu den dazugehörigen Zeitpunkten (A). Der Anfangswert spiegelt die Absorption des PSS wieder und der Gleichgewichtswert am Ende die Absorption des Grundzustandes. Diese Absorptionen werden den Werten 0 und 1 zugeordnet und über lineare Regression miteinander verbunden (B). Die daraus resultierende Gleichung wird in C dazu verwendet, um die Anteile der *trans*-Konfiguration zu berechnen. Aus 1 minus des Anteils der *trans*-Konfiguration ergibt sich folglich der Anteil der *cis*-Konfiguration. Für die Kinetik-Experimente wurden die jeweiligen Cystobactamide in einer Konzentration von 0,5 mM in DMSO verwendet. Durch Multiplikation der *cis*-Anteile mit der Konzentration ergibt sich die Konzentration der *cis*-Konfiguration, die für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten als $\ln(c_{PSS})$ verwendet wird (D). Dabei wird ausschließlich der lineare Bereich (rot umrandet) verwendet.

Charakterisierung von sekundären Zielstrukturen - Identifizierte Proteine

In diesem Abschnitt sind zuerst alle Proteine aller 8 durchgeführten Proteomstudien aufgelistet, die durch das Cystobactamid DK501 spezifisch mit einem $\log_2(\text{DK501}/\text{DMSO}) > 1$ angereichert wurden. Die Protein sind über ihre Uniprot Identifizierungsnummer Protein ID angeben und der Score beschreibt die Qualität der Annotation des Proteins mittels der Software PEAKS Xpro. Darüber hinaus sind die Spektren der jeweils 3 intensivsten Peptide zur Identifizierung der in Tabelle 2.4.5 aufgelisteten signifikant angereicherten Proteinen dargestellt.

*Spezifisch angereicherte Proteine ($\log_2(\text{DK501}/\text{DMSO}) > 1$) der Proteomstudie 1 mit *E. coli* BW25113 und Durchführung der Klick-Reaktion im Lysat.*

Protein ID	Score	Abdeckung [%]	$-\log_{10}(\text{p-value})$	$\log_2(\text{DK501}/\text{DMSO})$
P0AD59	107.29	19	2.375	5.462
P0A8N5	126.88	26	1.336	4.187
P0A9Q1	71.61	11	2.112	3.906
P08660	89.54	16	1.259	3.881
P0A6P9	236.29	23	1.233	3.679
P08506	170.04	43	1.229	3.491
P0C0V0	228.05	37	0.650	3.446
P0AET2	123.64	40	1.299	3.216
P0AEE5	338.35	60	1.387	3.018
P0A6X7	181.96	55	0.520	2.993
P00448	203.6	32	1.045	2.854
P0A7Z4	157.43	31	0.517	2.767
P0AG55	194.92	41	0.817	2.724
P0A6F3	106.33	27	0.623	2.719
P0A870	73.96	32	0.961	2.506
P0A6X3	204.21	22	1.037	2.502
P0A908	147	29	0.581	2.090
P0A7V3	181.57	37	0.501	2.090
P09169	95.44	35	0.383	2.007
P0A6Q6	171.38	40	0.324	2.004
P0AEX9	199.09	28	0.474	1.981
P0A7L0	212.82	30	0.281	1.891
P0A7V8	155.06	42	0.435	1.890
P09373	106.51	17	0.365	1.528
P23843	157.12	29	0.214	1.330
P0A7S9	97.74	44	0.291	1.319
P08997	88.03	16	0.251	1.282
P68206	173.26	75	0.253	1.209
P09551	66.47	29	0.259	1.207
P0A853	357.51	45	0.205	1.022
P02930	194.15	12	0.194	1.013

*Spezifisch angereicherte Proteine ($\log_2(\text{DK501}/\text{DMSO}) > 1$) der Proteomstudie 2 mit *E. coli* BW25113 und Durchführung der Klick-Reaktion im Lysat.*

Protein ID	Score	Abdeckung [%]	$-\log_{10}(\text{p-value})$	$\log_2(\text{DK501}/\text{DMSO})$
P0AEE5	271.75	36	1.779	5.077
P25526	115.64	20	1.441	4.882
P60422	362.6	53	1.669	3.976
P0A8M6	69.12	22	0.488	3.454
P09169	90.8	38	0.748	3.009
P0AEK4	65.99	40	0.748	2.823
P0A7V3	117.78	9	0.826	2.811
P66948	69.91	15	0.706	2.730
P0A7V0	96.31	29	0.412	2.554
P02943	125.05	29	0.713	2.506
P0A7R9	129.79	57	0.744	2.500
P0A6P1	88.63	27	1.398	2.207
P0A799	212.29	29	0.368	2.103
P0A8N3	115.33	15	0.329	2.034
P04825	67.84	7	0.235	1.992
P76116	80.36	14	0.334	1.967
P0ACF0	129.5	63	0.560	1.934
P0A862	129.54	27	0.490	1.832
P0ADB1	264.53	94	0.517	1.745
P0A858	159.38	56	0.442	1.743

P0A8C1	121.17	22	0.449	1.628
P0A7Y8	77.03	34	0.294	1.456
P0A917	303.21	51	0.207	1.116
P64604	112.42	51	0.191	1.099
P0ABB0	147.21	25	0.139	1.000

*Spezifisch angereicherte Proteine ($\log_2(DK501/DMSO) > 1$) der Proteomstudie 1 mit *S. aureus* Newman und Durchführung der Klick-Reaktion im Lysat.*

Protein ID	Score	Abdeckung [%]	$-\log_{10}(\text{p-value})$	$\log_2(DK501/DMSO)$
A0A0H3KH51	159.64	21	2.199	6.096
A0A0H3KEG7	123.88	10	1.947	5.036
A0A0H3KBJ6	60.05	18	1.482	4.915
A6QEJ1	225.66	25	1.588	4.692
A6QH79	245.16	26	1.123	4.313
A0A0H3KDS2	204.91	52	1.641	4.311
A0A0H3KDC9	88.95	7	2.019	4.271
A6QJ80	292.83	61	1.335	4.137
A6QJ88	205.46	78	1.082	4.112
A0A0H3K955	64.33	26	2.138	4.060
A6QD54	127.64	49	1.340	4.038
A6QJ70	159.17	50	1.558	3.875
A0A0H3KAT9	138.38	26	1.357	3.824
A6QJ92	154.3	19	1.315	3.822
A6QHL2	169.77	41	1.328	3.807
A6QGD8	202.27	48	1.431	3.789
A0A0H3KGV9	98.33	13	1.296	3.745
A6QJ73	175.5	39	1.231	3.739
A0A0H3K705	131.32	32	1.305	3.692
A6QE68	152.89	31	1.199	3.627
A6QJ86	269.44	44	0.838	3.617
A0A0H3K7D7	311.2	35	0.848	3.537
A0A0H3KJ25	370.72	46	0.753	3.525
A6QJ81	92.53	11	1.395	3.501
O86476	296.64	25	1.614	3.493
A6QJ90	98.01	37	0.909	3.437
A6QGA4	75.03	10	0.998	3.340
A6QJ75	254.7	37	0.758	3.219
A6QHC4	118.77	16	1.375	3.190
P0C046	297.91	63	1.009	3.184
A0A0H3K9U6	183.99	24	0.703	3.071
A0A0H3K8I5	124.92	33	0.743	3.015
A6QF62	105.45	13	0.612	3.014
A6QJ77	223.94	41	1.048	2.886
A0A0H3K645	84.51	11	0.834	2.853
A0A0H3KB72	103.84	12	0.860	2.839
A0A0H3K769	164.69	75	0.727	2.826
A6QG93	104.44	12	0.640	2.814
A6QED3	81.69	10	1.137	2.810
A6QJ68	223.17	45	0.553	2.784
A0A0H3K910	285.3	47	0.572	2.775
A6QJ93	140.11	36	0.823	2.749
A6QD57	89.54	22	0.657	2.746
A6QF85	385.11	31	0.662	2.744
A6QEF1	153.06	45	0.707	2.696
A0A0H3KDM7	108.96	47	0.477	2.660
A6QIM8	226.73	61	1.010	2.646
A6QHQ3	123.62	10	0.832	2.646
Q53653	350.65	11	0.914	2.602
A0A0H3KEU6	81.13	14	0.670	2.578
A0A0H3K695	344.98	41	0.595	2.556
A0A0H3K801	225.95	33	0.592	2.501
A0A0H3KC34	95.44	27	0.707	2.473
A0A0H3K979	227.1	23	0.557	2.414
A0A0H3KFX5	191.08	37	0.482	2.386
A0A0H3KBV2	156.83	23	0.708	2.363
A6QGC4	63.52	13	0.567	2.356
A6QFS2	318.09	45	0.524	2.355
A6QGE5	387.4	41	0.543	2.355
A6QD96	118.12	17	0.656	2.317
A0A0H3K9W6	159.75	29	0.654	2.282
A0A0H3K7F4	148.68	18	0.902	2.262
A0A0H3K828	346.73	38	0.525	2.259
A0A0H3K896	275.96	39	0.592	2.223
A0A0H3K7L0	320.65	64	0.753	2.199
A0A0H3KA10	106.11	10	0.664	2.191
A0A0H3K972	174.03	27	0.671	2.173

A0A0H3KE75	326.45	29	0.688	2.158
A0A0H3KDE2	110.9	12	0.691	2.136
A0A0H3KFX1	353.76	49	0.504	2.126
A0A0H3K7V7	123.09	23	0.578	2.120
A6QHL4	99.38	40	0.309	2.100
A6QFM5	283.13	30	0.640	2.085
A0A0H3KCE2	153.13	26	0.553	2.052
A6QJ67	173.98	44	0.653	2.031
A0A0H3KAB2	236.86	54	0.492	2.020
A0A0H3KC36	69.33	7	0.451	2.018
A6QJ83	96.1	13	0.619	2.008
A0A0H3KCR3	161.27	54	0.460	1.978
O86488	448.66	41	0.704	1.966
A0A0H3K8Z7	144.46	17	0.466	1.966
A6QER9	122.89	33	0.498	1.945
A0A0H3K7L7	198.16	28	0.323	1.915
A6QIM7	325.17	34	0.485	1.902
A0A0H3KFB6	191.95	29	0.578	1.883
A6QHI7	217.75	35	0.364	1.881
A0A0H3KIU5	191.51	38	0.441	1.870
A0A0H3K6X7	107.27	20	0.545	1.846
A6QJ76	267.33	46	0.337	1.834
A0A0H3K677	391.85	47	0.618	1.829
A0A0H3K6X5	294.9	60	0.872	1.809
A0A0H3KH14	153.56	27	0.347	1.759
A0A0H3K685	249.03	53	0.355	1.747
A0A0H3KAL9	145.34	17	0.528	1.745
A6QFH3	227.55	28	0.453	1.705
A0A0H3K742	203.95	32	0.393	1.691
A0A0H3K9F7	202.76	47	0.467	1.669
A0A0H3K686	663.99	63	1.370	1.645
A6QGZ6	131.82	34	0.356	1.642
A6QGF6	253.58	46	0.416	1.621
A6QI27	334.43	78	1.351	1.583
A0A0H3K9U4	154.11	30	0.281	1.547
A0A0H3K7D0	154.17	58	1.352	1.538
A0A0H3K8R0	164.95	31	0.319	1.502
A6QIW2	61.33	18	1.593	1.501
A6QHR5	318.95	33	0.379	1.495
A6QCG30	95.52	22	0.303	1.488
A6QJ59	92.87	10	0.289	1.470
A0A0H3K8R5	174.51	31	0.361	1.469
A0A0H3KF27	256.79	34	1.096	1.459
O86489	228.23	30	0.364	1.445
A0A0H3KF30	153.49	38	0.615	1.433
A0A0H3KA12	195.2	50	0.387	1.416
A0A0H3K8N9	401.85	51	0.297	1.416
A6QFY1	100.89	23	0.353	1.391
A0A0H3KE94	290.36	59	0.429	1.383
A6QHB6	312.08	42	0.321	1.382
A0A0H3KA29	74.89	15	0.244	1.373
A6QGD2	222.51	58	1.019	1.363
A6QHC8	183.27	46	0.515	1.344
A6QHL6	276.48	22	0.362	1.325
A6QE47	251.95	46	0.501	1.307
A6QIW4	156.9	46	0.916	1.297
A0A0H3K6K1	101.58	29	0.251	1.279
A6QIU9	216.15	21	0.290	1.275
A6QGF5	173.93	22	0.206	1.263
A0A0H3K722	114.31	21	1.311	1.259
A0A0H3K8L8	90.16	7	0.259	1.257
A0A0H3K7V5	258.1	15	0.331	1.256
A6QGH3	180.07	21	0.321	1.238
A0A0H3K7P7	185.67	25	1.099	1.224
A0A0H3KDT8	114.13	13	0.283	1.209
A6QJ78	170.16	29	0.383	1.161
A6QHF1	185.75	72	0.258	1.157
A0A0H3K700	80.23	8	0.241	1.154
A6QF82	213.09	32	0.301	1.145
A6QCG31	326.91	25	1.254	1.141
A6QJ66	237.15	43	0.420	1.130
A6QJ91	168.94	14	0.657	1.129
A6QEJ7	175.15	27	0.666	1.125
A0A0H3K8T4	328.17	53	0.672	1.125
A0A0H3KVK6	279.68	49	0.221	1.115
A0A0H3K851	205.03	25	0.298	1.105
A0A0H3K6E7	260.36	44	0.663	1.104
A0A0H3K8Z0	254.39	28	0.266	1.101
A0A0H3K9V4	194.37	27	0.322	1.084

A6QJ60	256.78	48	0.697	1.070
A0A0H3KI52	317.76	60	0.646	1.069
A0A0H3K9P0	150.25	27	0.207	1.061
A0A0H3KGD3	267.17	41	0.824	1.038
A0A0H3K8Q4	413.19	52	0.595	1.036
A6QH73	84.67	12	0.242	1.030
A6QHN3	158.4	20	0.189	1.024
A6QHK9	367.97	36	0.351	1.009
A6QLC8	274.4	35	0.164	1.007

*Spezifisch angereicherte Proteine ($\log_2(DK501/DMSO) > 1$) der Proteomstudie 2 mit *S. aureus* Newman und Durchführung der Klick-Reaktion im Lysat.*

Protein ID	Score	Abdeckung [%]	$-\log_{10}(p\text{-value})$	$\log_2(DK501/DMSO)$
A6QJ75	205.1	33	6.519	6.118
A6QHQ3	114.54	20	3.021	5.565
A6QJ76	229.53	41	2.377	4.881
A6QFS2	232.44	32	2.328	4.880
A6QEH1	135.11	24	1.457	4.796
A6QJ59	96.59	10	4.383	4.445
A0A0H3K9F7	73.19	37	1.013	3.943
A6QEJ8	171.79	22	2.004	3.776
A0A0H3K896	108.5	28	1.139	3.758
A6QGC4	92.99	24	2.262	3.634
A6QJ60	178.55	56	1.476	3.476
A6QGF6	159.87	35	1.028	3.393
A0A0H3K8Q1	200.01	34	0.757	3.295
Q53653	173.55	15	0.751	3.203
A0A0H3KGW2	205.97	69	0.868	3.175
A6QH17	132.7	35	1.176	2.908
A0A0H3KFX1	243.62	37	1.058	2.662
A0A0H3K7D7	188.02	47	1.434	2.596
O86488	68.14	16	0.526	2.565
A0A0H3KE94	104.74	30	1.290	2.502
A6QEJ0	223.84	30	0.908	2.488
A6QHC3	111.86	27	1.156	2.403
A0A0H3KI14	106.84	58	1.289	2.322
A6QK44	281.16	39	0.660	2.260
A6QJ91	104.37	14	0.666	2.222
A0A0H3K695	120.25	28	0.860	2.171
A6QJ65	67.38	19	0.382	2.052
A6QIW2	59.91	28	0.303	2.037
A6QHL3	118.27	27	0.447	1.948
A0A0H3KGD3	247.5	79	1.435	1.899
A6QK93	85.41	33	0.375	1.828
A6QHB6	117.48	40	0.393	1.816
A0A0H3KA24	100.16	21	0.572	1.739
A0A0H3K910	205.04	48	0.669	1.646
A6QE68	85.18	35	0.569	1.553
A6QHL2	175.58	29	2.023	1.496
A6QJ74	213.61	69	2.316	1.495
A0A0H3KEG7	263.64	53	1.219	1.430
A0A0H3KI52	269.9	44	0.301	1.318
A0A0H3K9R1	98.72	12	0.208	1.244
A0A0H3K6Y2	237.23	34	0.821	1.159
A0A0H3K6E7	159.51	24	0.441	1.137

*Spezifisch angereicherte Proteine ($\log_2(DK501/DMSO) > 1$) der Proteomstudie 1 mit *E. coli* BW25113 und Durchführung der Klick-Reaktion vor der Inkubation mit dem Bakterienlysat.*

Protein ID	Score	Abdeckung [%]	$-\log_{10}(p\text{-value})$	$\log_2(DK501/DMSO)$
P33643	113.3	24	1.666	6.376
P09323	247.66	15	1.590	5.942
P0ADV1	239.4	49	1.549	5.912
P0C0S1	93.2	20	3.105	5.879
P0A8Y5	189.11	24	1.495	5.707
P0A6X1	87.08	17	2.073	5.523
P23837	69.18	12	1.575	5.257
P33219	147.8	16	1.803	5.216
P39161	56.62	13	1.113	4.915
P0A8Z0	160.41	19	2.028	4.866
P37615	138.43	52	1.323	4.781
P76339	57.15	17	1.628	4.757

P46144	58.94	27	2.315	4.499
P0AD17	110.84	30	1.204	4.356
P39401	87.31	12	1.196	4.349
P0A780	200	23	1.179	4.292
P12008	185.01	32	1.528	4.269
P0AD14	186.64	23	1.362	4.223
P0A6Z6	163.4	27	0.863	4.131
P76542	59.29	20	2.172	4.130
P10100	170.34	18	1.399	4.025
P77674	166.1	53	1.541	4.001
P0AEL6	100.53	9	1.740	3.939
P25888	167.39	59	0.919	3.930
P0AFE4	77.75	13	1.044	3.923
P30870	55.2	17	0.779	3.897
Q46871	95.03	10	1.249	3.889
P77730	59.54	13	1.384	3.840
P0A729	131.58	34	1.155	3.818
P0AEJ2	66.34	28	1.098	3.804
P30750	111.21	31	1.296	3.781
P75798	87.65	10	1.375	3.700
P32157	125.46	38	0.836	3.687
P77569	132.3	38	1.115	3.684
P75830	139.82	36	1.276	3.664
P45568	91.07	8	1.189	3.573
P69874	136.27	33	0.732	3.555
P06709	87.57	14	1.391	3.541
P0A8N0	90.14	38	1.269	3.538
P0AA53	246.52	47	1.085	3.537
P05852	151.35	33	0.854	3.441
P37750	61.12	14	0.474	3.413
P37671	78.73	35	0.823	3.410
P13458	107.82	15	0.931	3.401
P08390	168.19	14	0.935	3.366
P0ACB0	106.87	21	1.210	3.308
P23909	59.88	20	0.806	3.294
P0AB24	174.81	41	1.135	3.248
P18196	202.6	41	0.932	3.248
P27859	61.63	8	1.222	3.234
P05041	169.42	17	1.203	3.231
P0ACE7	60.57	6	0.841	3.215
P39199	86.41	22	0.793	3.215
P45425	228.38	25	0.750	3.185
P0ABY4	111.74	12	0.859	3.174
P32099	107.59	17	1.133	3.126
P37760	242.9	27	0.523	3.098
P0A8W0	152.71	21	0.922	3.082
Q47710	114.62	35	0.977	3.034
P0A717	108.24	24	0.974	3.027
P27431	128.16	16	0.983	3.013
P39371	152.58	20	0.636	2.993
P0AGF2	167.69	46	0.776	2.990
P75736	170.51	54	0.979	2.984
P52086	85.87	18	0.642	2.945
P00893	61.33	14	0.703	2.830
P00960	84.25	34	0.670	2.812
P77611	110.73	19	0.887	2.770
P75831	96.65	18	0.831	2.747
P0AAD6	158.17	8	1.034	2.713
P0A8G0	157.45	27	0.899	2.704
P06989	100.55	9	0.786	2.691
P77444	239.46	26	0.926	2.668
P0AG99	187.69	30	1.000	2.644
P25536	177.42	27	1.242	2.640
P77712	195.01	17	0.598	2.629
P29131	243.11	55	3.421	2.623
P45544	81.8	5	0.640	2.612
P0AFT5	188.42	31	0.791	2.604
P39451	256.17	34	0.810	2.599
P0ACP5	179.68	52	0.900	2.588
P75867	152.41	18	0.790	2.558
P0A6F1	263.49	34	0.941	2.548
P0ABN5	85.4	5	0.700	2.525
P0A6M4	115.64	42	0.526	2.524
P15639	131.83	19	0.838	2.505
P0A725	152.99	33	0.464	2.497
P31666	54.89	9	0.721	2.488
P75915	65.95	21	0.640	2.457
P77202	203	57	1.743	2.456
P0AFZ1	99.71	12	0.950	2.455

P04995	163.06	37	0.560	2.449
P63224	307.51	42	1.176	2.414
P0ADX1	153.06	29	0.634	2.407
P23882	222.64	38	0.686	2.389
P69451	295.16	16	0.820	2.380
P0AFU0	96.93	16	0.716	2.375
P14377	60.08	17	0.709	2.343
P0AG63	109.66	31	0.768	2.328
P0AFA2	117.14	10	0.679	2.315
P77488	84.12	24	0.466	2.308
P16681	215.61	65	0.450	2.306
P63235	205.67	7	0.743	2.295
P08244	225.05	51	0.644	2.281
P00561	224.33	28	1.469	2.270
P0AG90	143.85	23	0.577	2.270
P77718	176.78	26	0.495	2.251
P0ACN4	122.34	28	0.679	2.250
P0ABJ9	246.74	23	0.397	2.241
P0ACG8	236.37	57	0.556	2.225
P0A955	241.5	26	0.626	2.225
P0A988	263.78	35	0.626	2.224
P75949	84.01	21	0.646	2.220
P25437	158.23	20	0.518	2.211
P08194	62.24	17	0.559	2.208
P08245	72.14	28	0.695	2.199
P60720	86.18	27	0.585	2.188
P07102	174.7	10	0.698	2.180
P75863	213.8	46	0.505	2.171
P15640	148.87	38	0.513	2.160
P0A944	99.83	24	0.856	2.156
P60664	138.19	42	0.365	2.150
P31475	102.97	19	0.548	2.150
P0A744	195.41	35	0.356	2.145
P15254	400.11	30	0.815	2.112
P20083	211.41	16	0.711	2.108
P0A8D3	117.2	53	0.437	2.100
P09155	148.32	27	0.789	2.091
P10442	51.69	30	0.369	2.089
P02929	107.58	25	0.964	2.089
P0AD12	323.59	57	0.636	2.064
P04983	289.41	59	1.190	2.062
P0A8P8	83.37	28	0.670	2.057
P62615	166.63	30	0.551	2.049
P0ADS9	103.22	24	0.596	2.042
P0AGG2	274.08	53	0.559	2.028
P33358	142.72	38	0.759	2.027
P37645	190.83	35	0.509	2.024
P76550	148.14	28	0.744	2.013
P31678	182.81	40	0.424	2.006
P77171	97.18	37	0.272	1.999
P77348	291.97	42	0.583	1.960
P0AB28	166.65	20	1.337	1.958
P25740	197.48	44	0.431	1.948
P0A6U8	241.38	23	1.159	1.927
P27249	210.15	31	0.682	1.924
P0ACU7	89.77	38	0.700	1.911
P37387	144.31	51	0.721	1.905
Q46861	56.93	17	0.343	1.892
P06282	65.19	22	0.372	1.879
P22525	154.38	20	0.645	1.876
P0ADP9	92.41	45	0.478	1.870
P0ACQ4	347.18	41	1.333	1.862
P0ACV6	152.75	23	0.459	1.852
P0ACP1	115.94	8	0.358	1.848
P0AEW6	78.4	19	0.386	1.847
P63386	204.78	42	0.507	1.839
P0C018	249.33	46	1.362	1.836
P11880	168.33	15	0.557	1.835
P40191	118.34	17	0.381	1.829
P31134	133.39	34	0.380	1.825
P0ADZ7	233.27	46	3.042	1.819
P0AAG0	356.36	60	0.942	1.816
P76237	102.11	16	0.561	1.815
P0A784	224.57	44	1.057	1.794
P36879	251.89	44	0.461	1.790
P64545	111.37	25	0.672	1.785
P42641	158.92	30	0.389	1.781
P31677	199.58	34	1.394	1.773
P65556	105.38	7	0.505	1.772

P76402	216.92	78	1.054	1.771
P0AG00	154.04	28	0.338	1.763
P21645	123.31	14	0.325	1.743
P32695	282.85	54	0.869	1.739
P52095	122.19	17	0.297	1.738
P0AE82	174.06	39	1.182	1.738
P27434	279.37	34	1.237	1.734
P0AGB6	75.39	50	0.267	1.731
P34209	173.04	29	0.313	1.728
P07024	252.2	43	0.519	1.725
P37329	154.7	47	0.416	1.723
P0A847	152.93	35	0.578	1.713
P0AAB4	219.14	29	1.190	1.712
P0ADK0	271.76	35	0.442	1.710
P0A9H3	50.49	22	0.411	1.706
P05020	232.97	50	0.409	1.692
P77399	193.66	29	1.289	1.690
P0ACB7	222.28	53	1.503	1.686
P0AAT9	180.93	46	0.434	1.665
P0A873	235.79	40	1.528	1.663
P0A9P6	352.65	49	2.014	1.638
P76235	132.01	28	0.331	1.632
P0ADC1	240.52	41	0.238	1.626
P69811	113.24	24	0.450	1.614
P0A821	165.58	45	0.899	1.596
P24554	63.48	20	0.389	1.593
P13857	211.36	60	0.499	1.583
P31120	82.99	14	0.279	1.576
P64519	213.11	71	0.519	1.575
P25745	269.74	46	0.358	1.574
P69776	265.65	65	1.179	1.572
P28903	57.78	19	0.424	1.570
P43671	227.37	35	1.331	1.566
P0A7D1	204.68	57	0.679	1.564
P10408	416.89	51	0.816	1.558
P0ACJ8	369.92	79	1.287	1.542
P08957	182.22	27	0.354	1.541
P37765	181.59	42	1.619	1.525
P75791	165.41	30	0.925	1.523
P07001	268.91	38	0.286	1.517
P37005	65.37	25	0.329	1.501
P0AEJ4	89.61	16	0.339	1.494
P24242	65.51	16	0.248	1.490
P0A8D0	236.38	50	1.381	1.488
P76251	95.19	7	0.337	1.488
P67660	189.33	36	0.368	1.486
P0AG40	174.93	42	0.287	1.481
P09152	84.55	20	0.435	1.479
P00634	231.06	35	0.319	1.469
P07762	182.69	25	0.495	1.461
P0A7A5	75.89	22	0.237	1.461
P25714	266.66	40	2.146	1.449
P0ACE3	165.41	28	0.419	1.448
P0ADA3	241.81	44	2.185	1.426
P0A898	166.27	10	0.245	1.425
P25894	211.99	51	0.354	1.402
P30855	81.04	17	0.272	1.400
P76403	264.1	50	1.115	1.400
P0AGJ2	130.22	27	0.284	1.395
P27278	115.66	14	0.262	1.381
P65292	200	97	1.101	1.374
P0C066	168.62	23	0.449	1.358
P37661	217.68	28	0.651	1.353
P00888	153.68	32	0.272	1.348
P36672	188.38	17	0.245	1.348
P12295	185.76	45	0.372	1.346
P0A6H5	386.05	47	1.189	1.340
P0A7Q6	50.62	34	0.197	1.337
P0A9C0	127.48	28	0.323	1.334
P0ABU9	244.37	35	0.825	1.328
P63389	311.87	41	0.739	1.321
P36680	120.43	58	0.329	1.307
P33218	128.21	34	0.263	1.297
P76170	188.4	50	0.322	1.290
P77257	119.7	38	1.205	1.289
P0A9W0	51.86	11	0.334	1.288
P0ABK2	136.61	6	1.645	1.287
P76541	87.28	23	0.279	1.275
P76539	140.72	18	0.383	1.248

P30178	283.47	45	0.329	1.246
P0AA89	113.74	34	0.232	1.240
P31057	267.71	45	1.365	1.238
P56580	200.61	29	0.901	1.232
P0AAR3	103.25	14	0.405	1.232
P09372	189.49	46	1.675	1.220
P0A8F0	241.54	53	0.464	1.213
P31473	265.5	40	0.426	1.205
P75838	123.19	15	0.225	1.202
P43337	58.2	17	0.385	1.202
P0ACX3	126.66	31	0.230	1.198
P0AGD7	104.02	38	0.355	1.195
P30958	150.88	22	0.243	1.190
P64596	155.27	48	0.230	1.186
P02358	370.25	82	2.248	1.182
P21151	320.14	55	0.535	1.182
P0ACN7	110.77	28	0.196	1.178
P76177	324.54	50	2.577	1.176
P00579	300.42	34	2.884	1.174
P09147	351.95	68	1.642	1.171
P0A610	206.15	57	0.236	1.169
P60560	310.97	46	2.568	1.169
P00926	147.13	23	0.275	1.169
P15042	212.86	32	0.794	1.168
P0A813	184	42	0.236	1.165
P0AD01	108.45	8	0.265	1.165
P64540	164.68	42	0.231	1.164
P0AE37	176.9	20	0.196	1.150
P77395	236.86	24	0.723	1.137
P0A927	246.12	32	1.838	1.128
P0AC33	444.41	61	0.648	1.124
P00803	188.58	26	0.171	1.124
P76108	238.63	66	1.145	1.116
P0C054	110.8	42	0.374	1.107
P24255	168.59	28	1.829	1.106
P76004	146.63	27	0.178	1.104
P0AEZ3	259.45	47	0.572	1.092
P77695	162.93	61	0.204	1.091
P69786	222.83	23	0.431	1.087
P63177	216.96	46	0.277	1.080
P22188	359.51	69	0.489	1.079
P23865	285.61	45	1.538	1.078
P67095	136.94	34	0.307	1.077
P60651	202.76	37	0.463	1.076
P00550	233.78	32	0.241	1.071
P0AEH1	146.46	39	0.271	1.069
P00562	233.77	33	0.792	1.063
P69805	210.84	36	0.572	1.058
P77181	78.84	33	0.190	1.053
P77338	159.95	23	0.615	1.052
P37692	155.48	50	0.639	1.049
P62517	85.15	14	0.147	1.044
P77544	82.22	29	0.178	1.038
P00895	333.96	52	0.906	1.032
P0A962	188.06	18	0.162	1.032
P0A8E1	357.46	81	0.516	1.031
P77044	53.53	38	0.180	1.015
P25738	98.18	31	0.212	1.006
P0A9F6	206.01	40	0.279	1.004

*Spezifisch angereicherte Proteine ($\log_2(DK501/DMSO) > 1$) der Proteomstudie 2 mit *E. coli* BW25113 und Durchführung der Klick-Reaktion vor der Inkubation mit dem Bakterienlysat.*

Protein ID	Score	Abdeckung [%]	$-\log_{10}(p\text{-value})$	$\log_2(DK501/DMSO)$
P39315	292.91	44	3.971	7.795
P0ADV7	171.31	22	2.244	5.544
P0ABI4	93.75	16	1.964	4.991
P00509	250.89	28	1.602	4.148
P23893	249.69	26	1.451	3.827
P06999	237.17	18	1.030	3.629
P00957	197.46	27	1.035	3.516
P33570	198.11	23	1.274	3.511
P0A698	69.51	10	0.790	3.387
P0AEK2	183.4	12	2.161	3.371
P33136	143.26	19	0.636	3.239

P0AG59	99.68	27	0.868	3.159
P07118	104.76	12	0.571	2.910
P0AFS3	138.84	27	0.662	2.885
P0A6F3	319.3	43	1.000	2.810
P0AA10	232.25	46	1.132	2.791
P27550	273.43	17	1.001	2.788
P23836	228.91	37	1.020	2.786
P60906	90.97	15	0.476	2.749
P0AES4	115.02	8	0.629	2.714
P27306	299.86	30	0.833	2.653
P0A7D4	231	40	0.879	2.558
P0A6A3	144.55	12	0.759	2.558
P60723	257.8	29	1.282	2.531
P07395	126.32	19	0.523	2.479
P0ABQ0	178.78	22	0.627	2.452
P0A9M8	159.31	18	0.709	2.412
P0ABK5	386.1	65	0.894	2.293
P77774	198.55	32	0.732	2.246
P0AF08	71.99	5	0.757	2.175
P0AGD3	107.68	9	0.804	2.158
P0AA13	117.85	5	0.436	2.098
P0A9X4	213.32	28	0.669	2.097
P38038	126.85	11	0.417	2.065
P0AG63	130.4	40	0.530	2.036
P0A707	172.79	24	0.897	2.023
P0A9J8	113.63	20	0.477	2.021
P64451	283.96	68	1.185	1.940
P45523	130.14	28	0.879	1.929
P0AG80	129.94	26	0.358	1.900
P07014	147.7	36	0.392	1.876
P0AEP3	194.52	28	0.848	1.831
P08312	230.61	28	0.324	1.808
P22523	56.73	9	0.455	1.771
P0A6B7	228.68	27	0.350	1.746
P0AFM6	105.04	27	0.335	1.740
P0A8G6	377.11	63	2.087	1.716
P0AES9	161.37	25	0.454	1.714
P23869	160.02	38	0.293	1.683
P0AEE1	103.36	6	0.714	1.648
P08839	234.08	34	0.307	1.628
P77717	142.56	28	0.515	1.569
P00448	226.27	33	0.389	1.504
P0AC69	71.68	7	0.447	1.497
P09546	131.98	9	0.348	1.480
P0ACF8	172.14	51	0.290	1.463
P0A825	247.85	26	0.500	1.445
P0AEK4	227.28	39	1.539	1.391
P0C8J6	262.69	23	1.543	1.376
P08506	335.14	48	0.391	1.353
P0AEX9	311.96	62	0.537	1.322
P0A7V8	370.6	54	0.555	1.315
P0A858	152.69	39	0.361	1.267
P0A7V0	246.3	38	1.349	1.164
P0AC38	221.23	23	0.254	1.117
P0ADU5	160.65	19	0.838	1.112
P0A799	378.99	42	0.887	1.071
P0ABB0	393.64	50	0.439	1.040
P60624	204.1	47	0.280	1.010

*Spezifisch angereicherte Proteine ($\log_2(DK501/DMSO) > 1$) der Proteomstudie 1 mit *S. aureus* Newman und Durchführung der Klick-Reaktion vor der Inkubation mit dem Bakterienlysat.*

Protein ID	Score	Abdeckung [%]	$-\log_{10}(p\text{-value})$	$\log_2(DK501/DMSO)$
A6QGF6	83.45	29	1.393	5.599
A0A0H3KCW8	59.7	26	2.674	5.477
A6QHA8	88.37	40	0.992	3.871
A0A0H3K9U6	180.71	38	0.648	3.040
A6QIS7	131.9	31	0.974	2.848
A0A0H3KEE5	107.21	32	1.380	2.814
A0A0H3K838	89.04	22	0.433	2.492
A6QIU6	118.22	25	0.456	2.442
A0A0H3KAL0	79.42	33	0.407	2.275
A6QE68	132.93	28	0.399	1.975
A6QJ78	119.95	42	0.482	1.855
A0A0H3K7S2	234.38	30	0.332	1.767

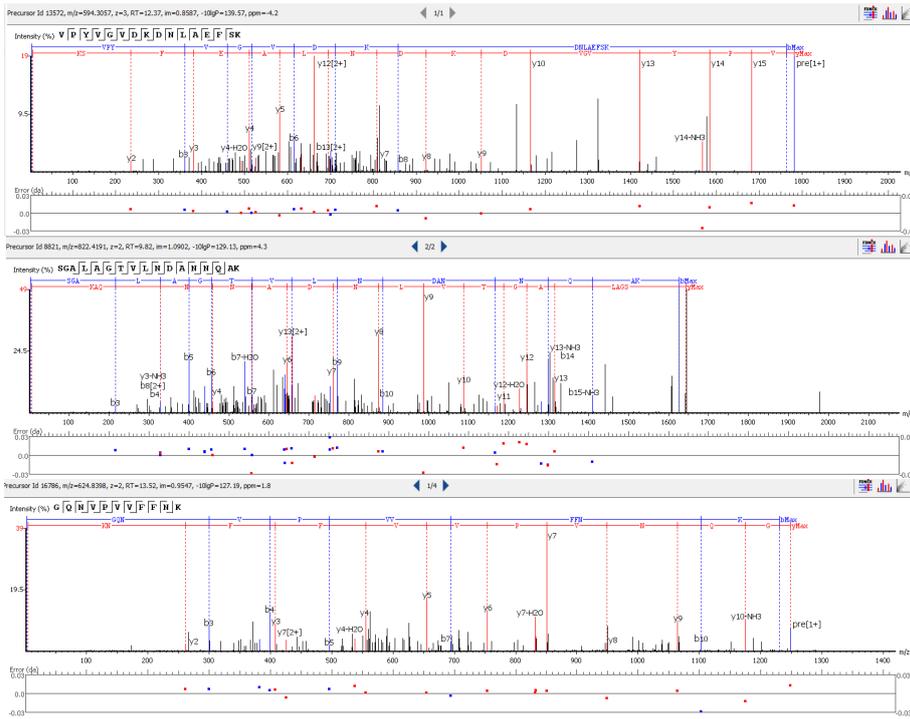
A0A0H3K7N2	123.64	35	0.620	1.704
A0A0H3K8Z0	273.99	55	1.726	1.666
A6QG14	89.33	26	0.371	1.613
A0A0H3K7Z9	152.14	37	0.288	1.561
A6QFH3	94.38	19	0.272	1.510
A0A0H3K8Q1	220.15	32	0.195	1.457
A6QH29	272.36	49	0.536	1.403
A0A0H3K822	106.5	23	0.216	1.379
A0A0H3K8B9	129.98	47	0.319	1.370
A6QJ80	267.45	72	0.453	1.316
A0A0H3K984	147.94	38	0.183	1.296
A6QEP0	131.83	26	0.424	1.273
A6QK89	122.68	15	0.375	1.263
A0A0H3KA24	262.55	61	0.626	1.188
A0A0H3K851	256.1	40	0.205	1.129
A0A0H3KCK7	211.4	28	0.305	1.117
P45723	69.54	20	0.219	1.077
A6QF82	80.48	10	0.210	1.075
A6QJ86	231.84	43	0.165	1.061

*Spezifisch angereicherte Proteine ($\log_2(DK501/DMSO) > 1$) der Proteomstudie 2 mit *S. aureus* Newman und Durchführung der Klick-Reaktion vor der Inkubation mit dem Bakterienlysat.*

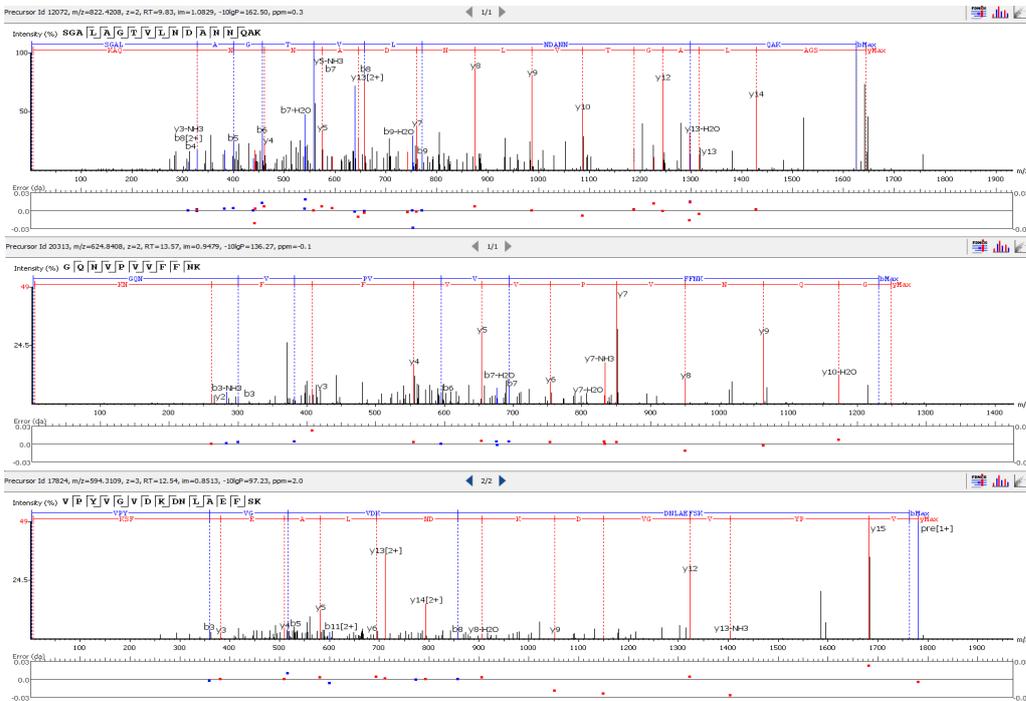
Protein ID	Score	Abdeckung [%]	$-\log_{10}(p\text{-value})$	$\log_2(DK501/DMSO)$
A0A0H3KAZ4	288.89	19	7.791	7.885
A0A0H3K7L0	260.63	68	5.531	5.826
A0A0H3K801	111.72	19	3.548	5.616
A0A0H3KGN1	117.48	44	1.418	4.412
A0A0H3K7Z9	260.81	21	2.115	4.280
A0A0H3K828	263.45	35	1.859	4.050
A0A0H3K8Q1	221.46	36	1.232	4.042
A6QJ86	92.5	20	0.923	3.862
A6QJ59	105.58	32	2.309	3.794
A6QIC8	92.55	16	1.087	3.732
A0A0H3K9P0	110.45	31	1.178	3.697
A0A0H3K8Z0	69.03	36	0.741	3.576
A0A0H3KCK7	193.85	40	0.741	3.504
A6QIG2	124.43	7	1.232	3.495
A6QI27	262.22	80	1.320	3.399
A0A0H3K8Q4	330.59	38	0.971	3.263
A0A0H3K7F5	160.3	21	1.607	3.200
A6QJ76	156.63	24	1.393	3.168
A6QHC8	180.77	46	0.837	3.166
A0A0H3K742	149.64	13	0.927	3.133
A6QHR5	223.33	26	1.164	3.113
A6QIM7	101.4	12	1.091	3.054
A6QEJ9	317.82	44	1.359	2.958
A6QIW4	126.8	62	1.370	2.844
A6QHL6	164.07	17	0.690	2.830
A6QHC3	257.56	32	0.885	2.820
A6QK44	247.04	34	0.510	2.799
A6QF85	171.11	18	1.127	2.708
A0A0H3KE75	137.8	27	1.280	2.661
A0A0H3K979	109.99	14	0.522	2.617
A0A0H3KAU1	141.42	30	0.405	2.571
A6QFS2	212.3	30	0.706	2.558
A0A0H3KFC4	100.54	29	0.497	2.410
A0A0H3K8G2	152.85	53	0.758	2.381
A0A0H3K910	210.23	47	0.421	2.374
A0A0H3K9T2	262.8	48	1.352	2.343
A0A0H3K8F4	385.04	30	1.572	2.316
A0A0H3K677	313.34	49	0.687	2.205
A0A0H3KAT9	274.9	34	4.847	2.201
A6QGF6	152.39	14	0.689	2.130
A0A0H3KA24	89.04	21	1.338	2.120
A0A0H3K7D7	163.05	34	0.554	2.114
A0A0H3KBJ6	60.83	15	0.445	2.098
A6QJ00	61.77	8	0.528	1.985
A0A0H3K6X5	58.52	23	0.540	1.929
A6QK93	238.91	52	0.596	1.910
A0A0H3K6P1	381.75	56	0.593	1.824
A6QGF7	274.28	42	1.939	1.745
A0A0H3KJ61	303.15	59	0.407	1.528
A0A0H3K6Y2	274.29	52	1.406	1.527
A0A0H3K896	250.49	28	0.309	1.503

ANHANG

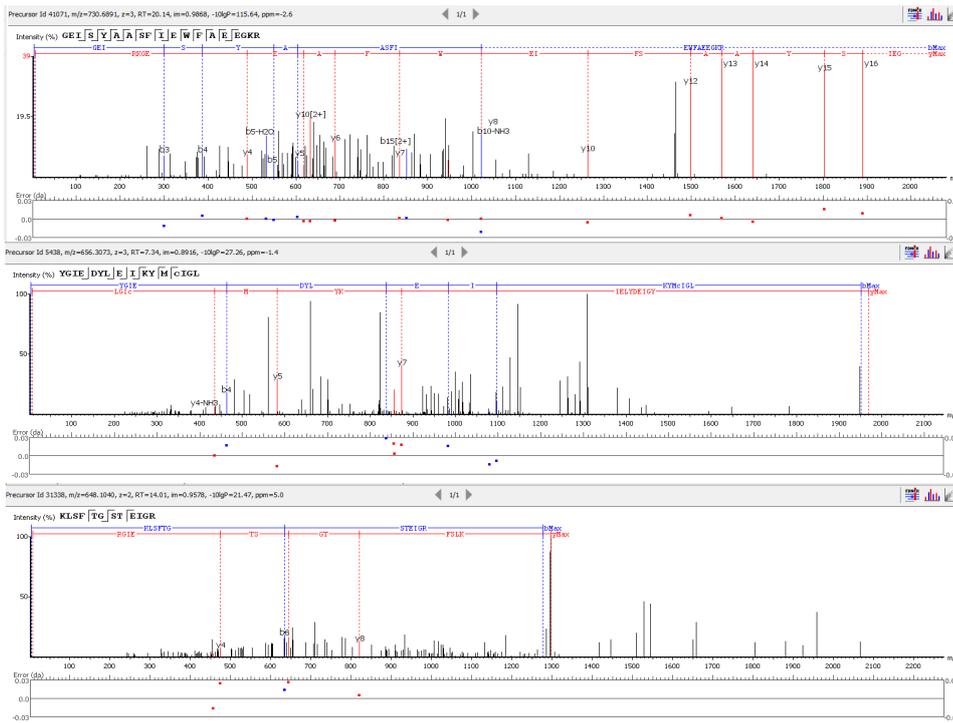
A0A0H3K7X7	659.62	73	2.117	1.430
Q53653	355.78	11	0.976	1.409
A0A0H3K7S2	123.19	19	0.324	1.331
A0A0H3K6E7	164.46	19	2.736	1.279
A6QEJ0	229.09	35	0.741	1.271
A0A0H3K9F7	99.96	20	0.398	1.243
A6QJQ7	341.07	33	0.765	1.232
O86488	473.48	46	0.645	1.199
A0A0H3KEG7	379.76	63	3.330	1.144
A0A0H3K822	100.89	13	0.214	1.123
A6QEJ7	160.44	27	0.429	1.036
A0A0H3K7M2	152.4	70	0.521	1.004



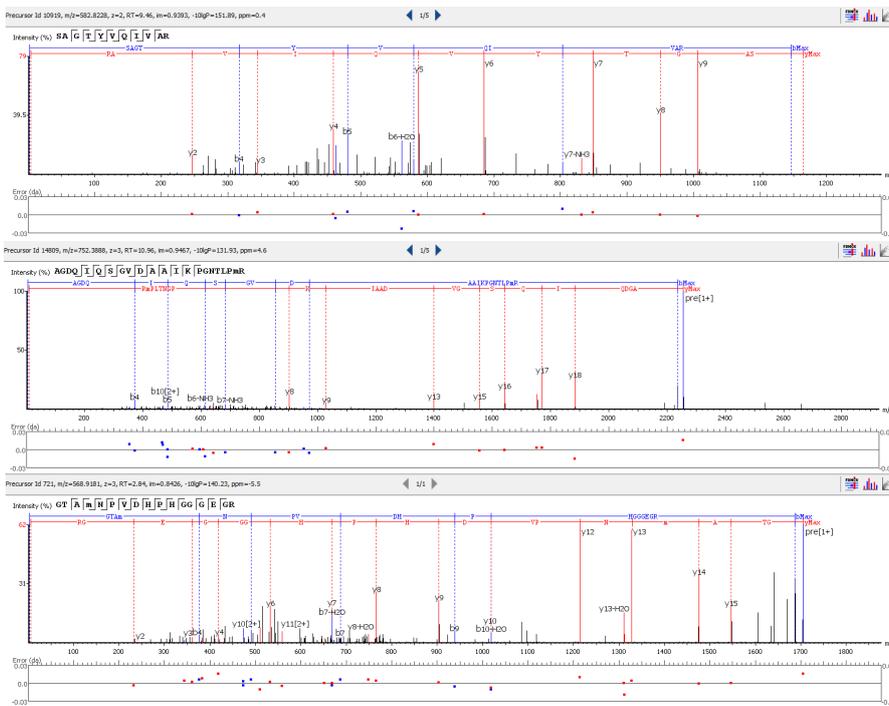
Tab. 2.4.5 A) *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion im Lysat, D-galactose binding periplasmic protein.



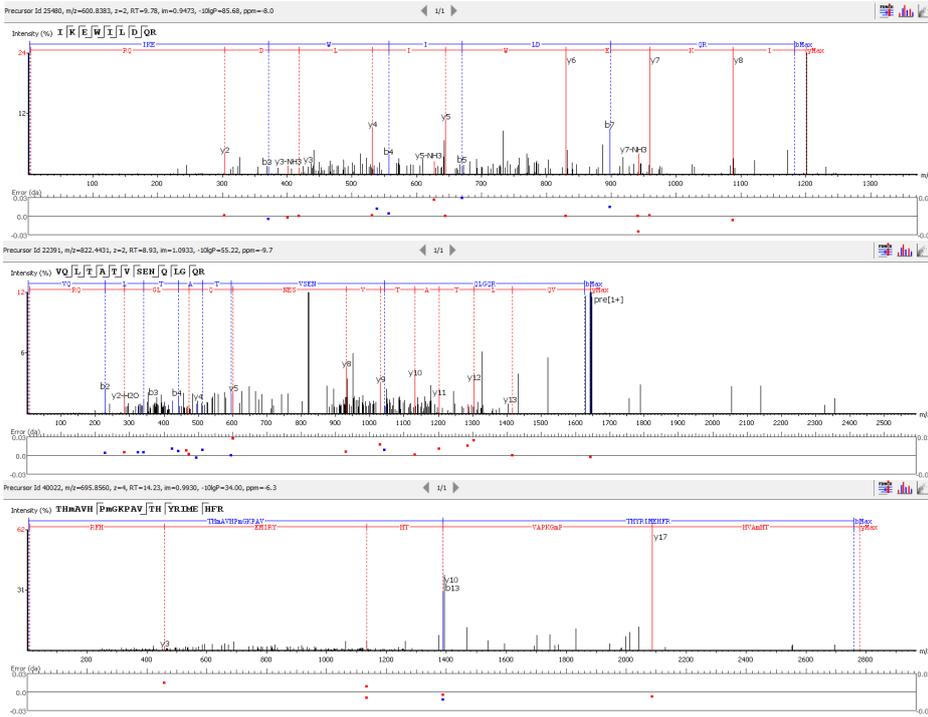
Tab. 2.4.5 B) *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion im Lysat, D-galactose-binding periplasmic protein.



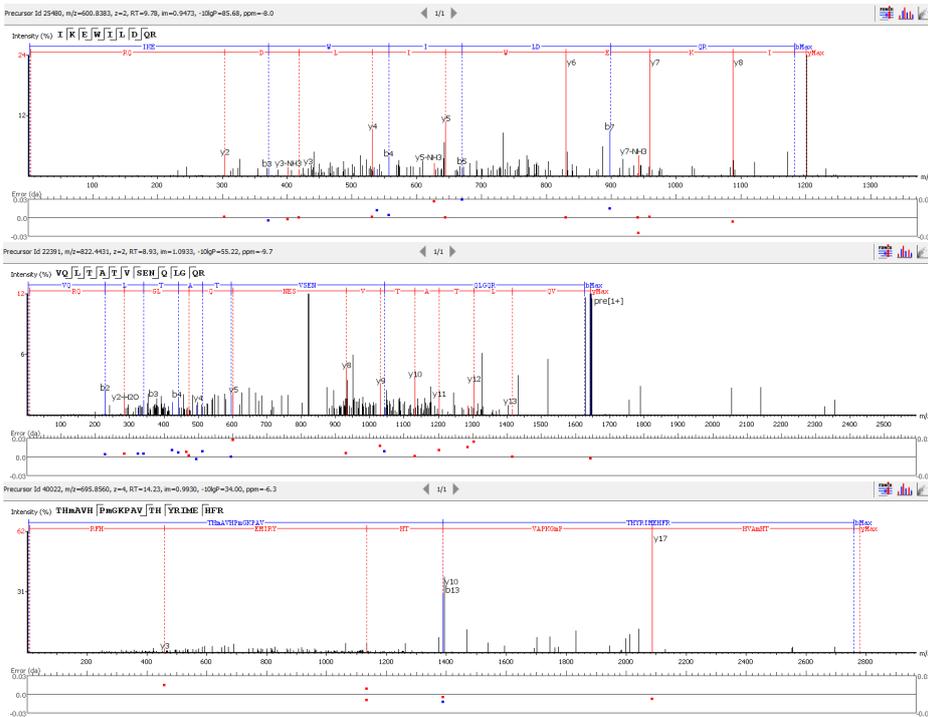
Tab. 2.4.5 B) *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion im Lysat, Succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP(+)] GabD.



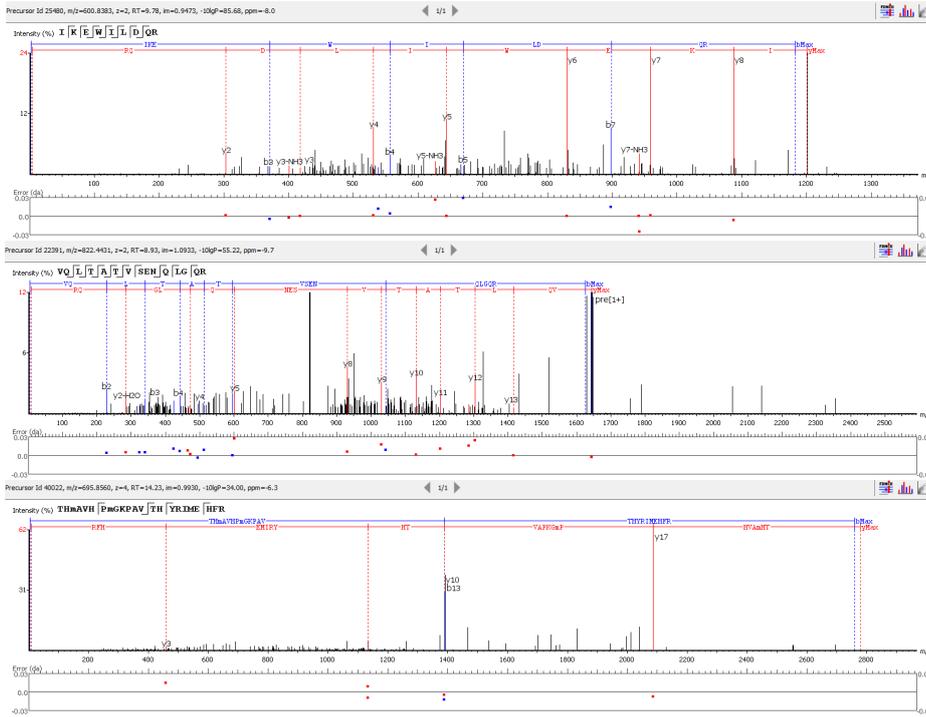
Tab. 2.4.5 B) *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion im Lysat, 50S ribosomal protein L2.



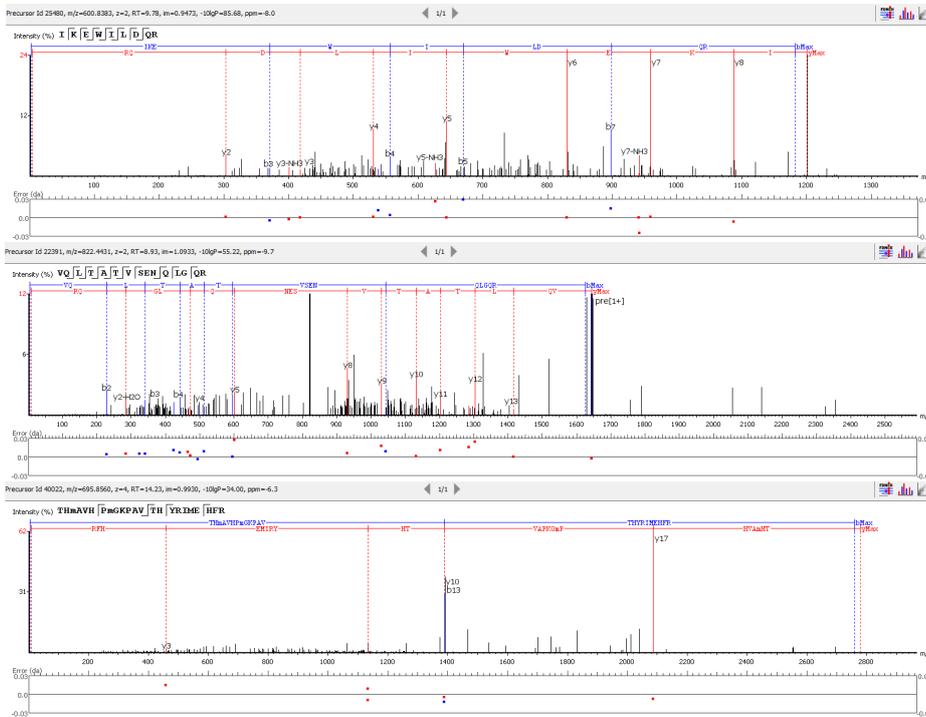
Tab. 2.4.5 B) *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat , 50S ribosomal protein L2.



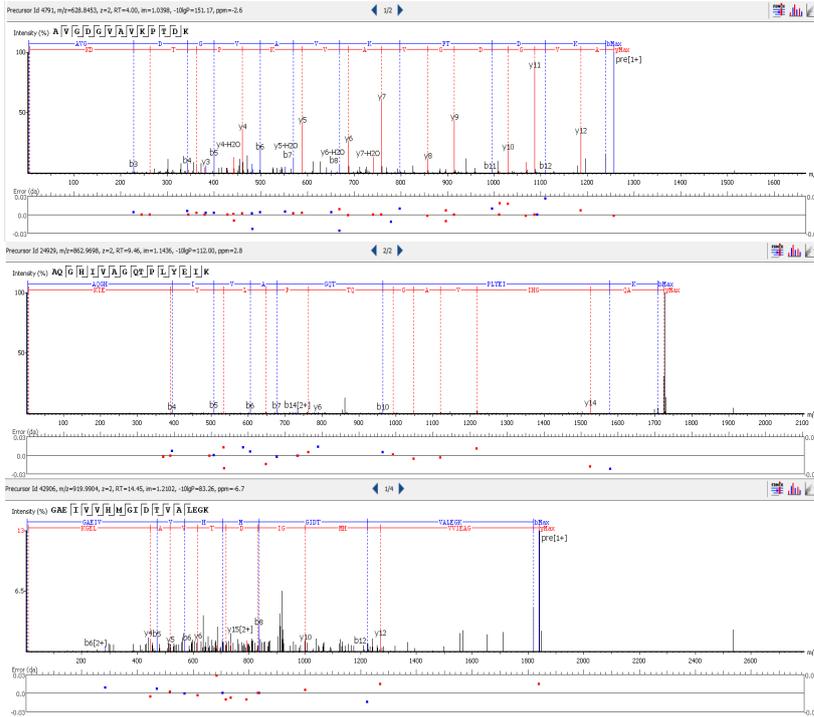
Tab. 2.4.5 B) *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat , 50S ribosomal protein L2.



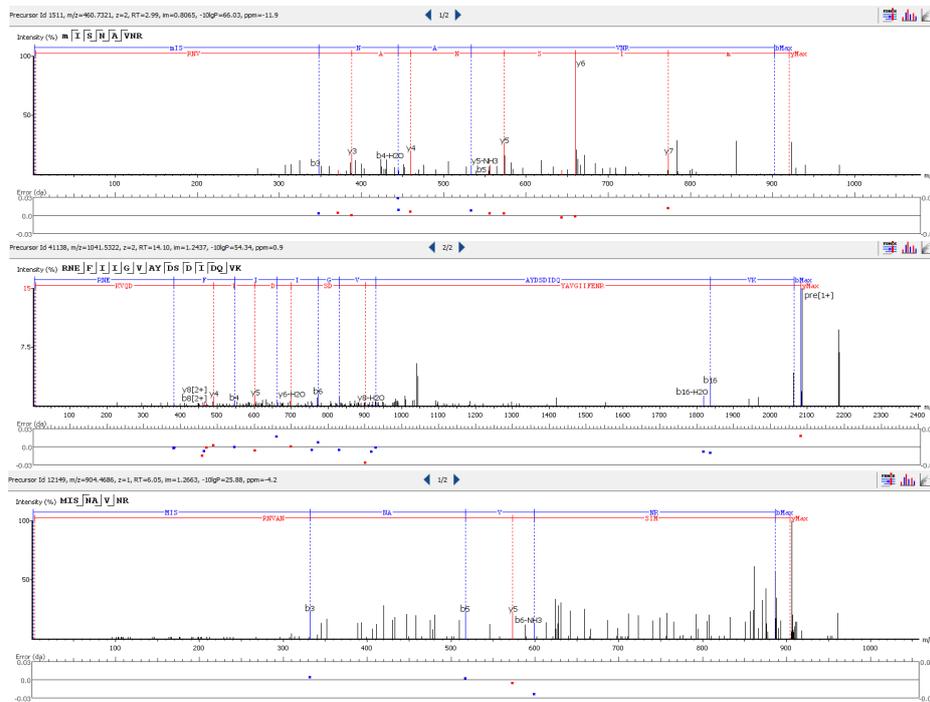
Tab. 2.4.5 B) *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat , 50S ribosomal protein L2.



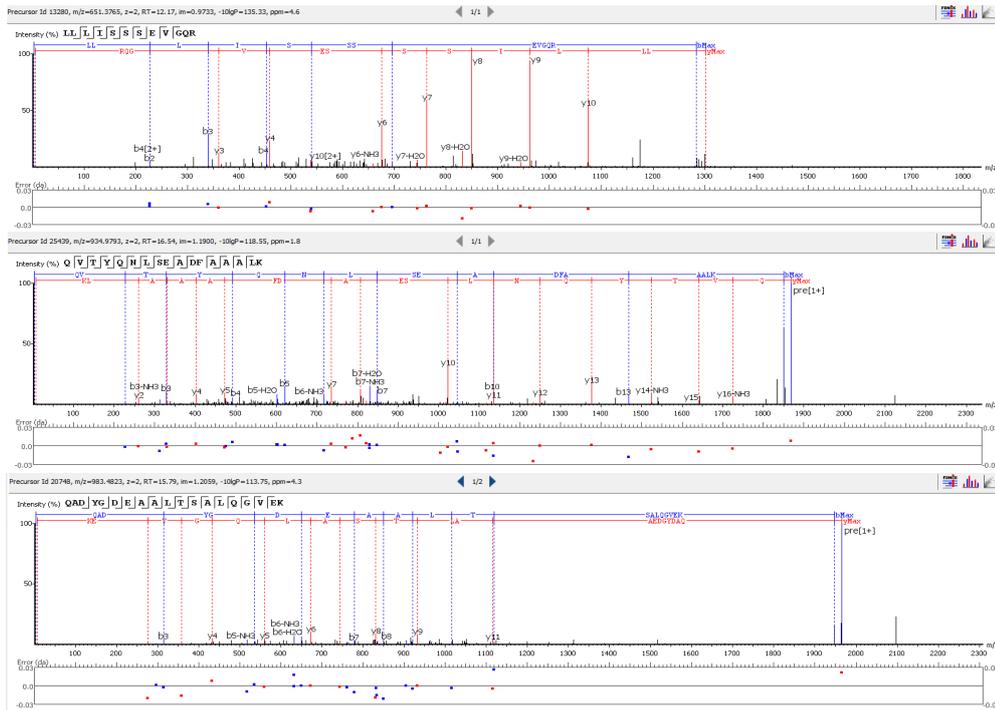
Tab. 2.4.5 C) *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat , Ribosomal large subunit pseudouridine synthase D.



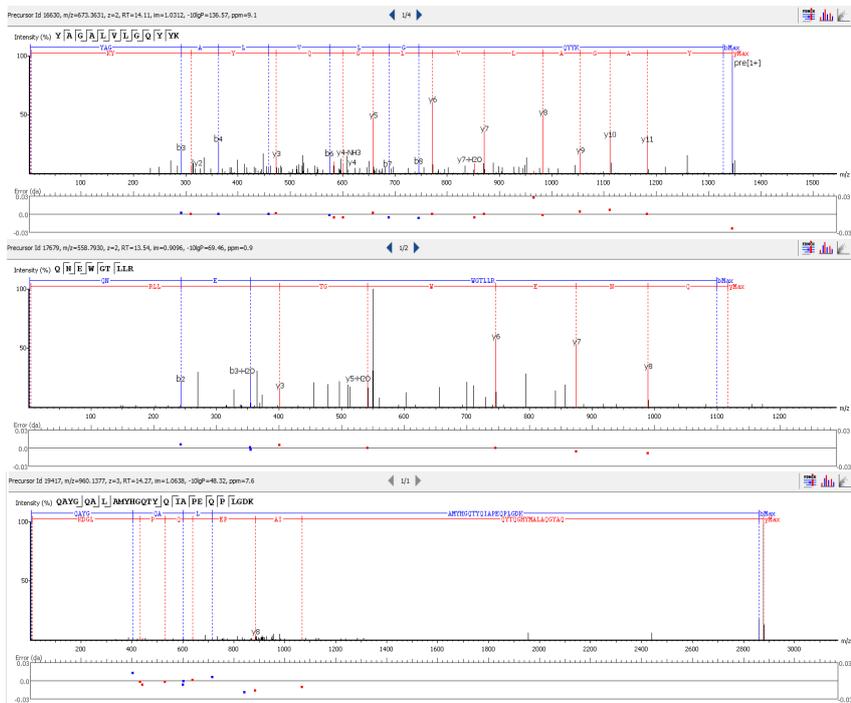
Tab. 2.4.5 C) *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat, PTS system N-acetylglucosamin specific EIICBA component.



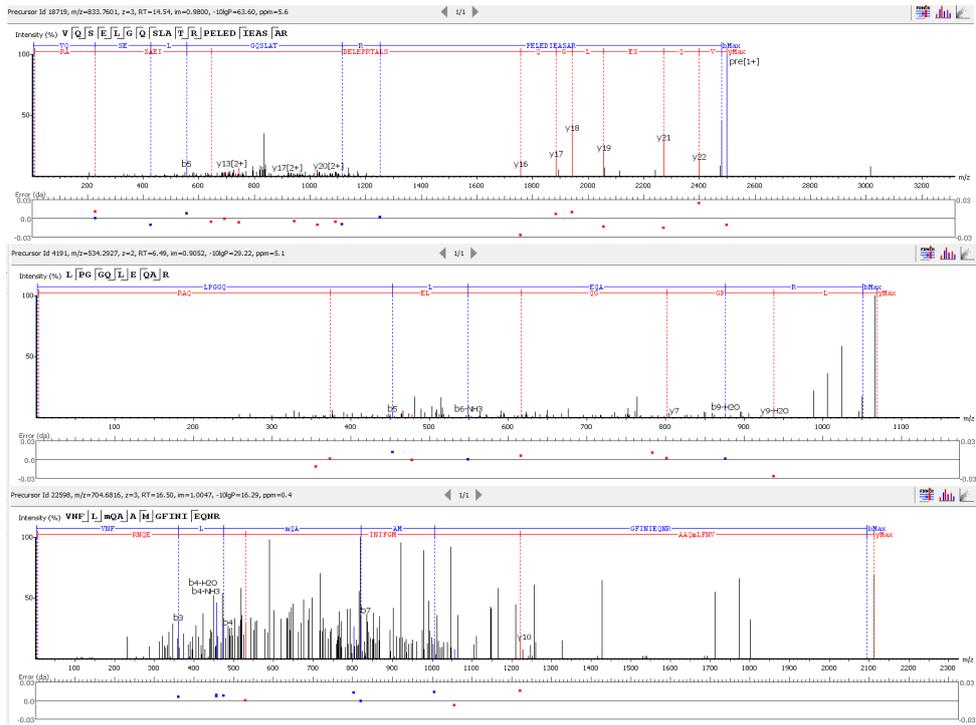
Tab. 2.4.5 C) *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat, Small conductance mechanosensitive channel.



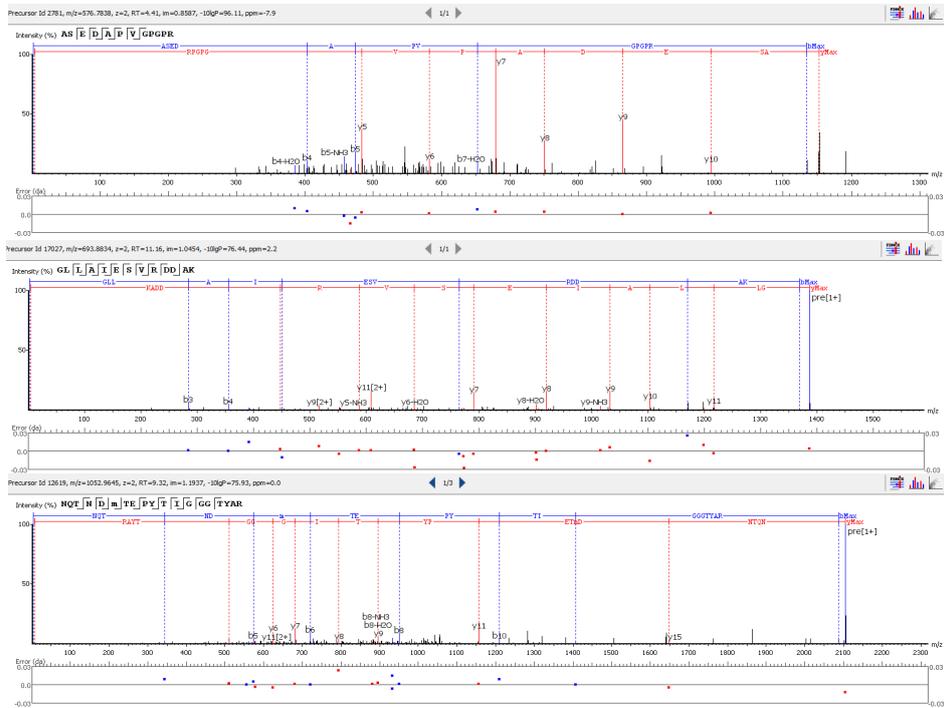
Tab. 2.4.5 D) *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat, Quinone oxidoreductase 2.



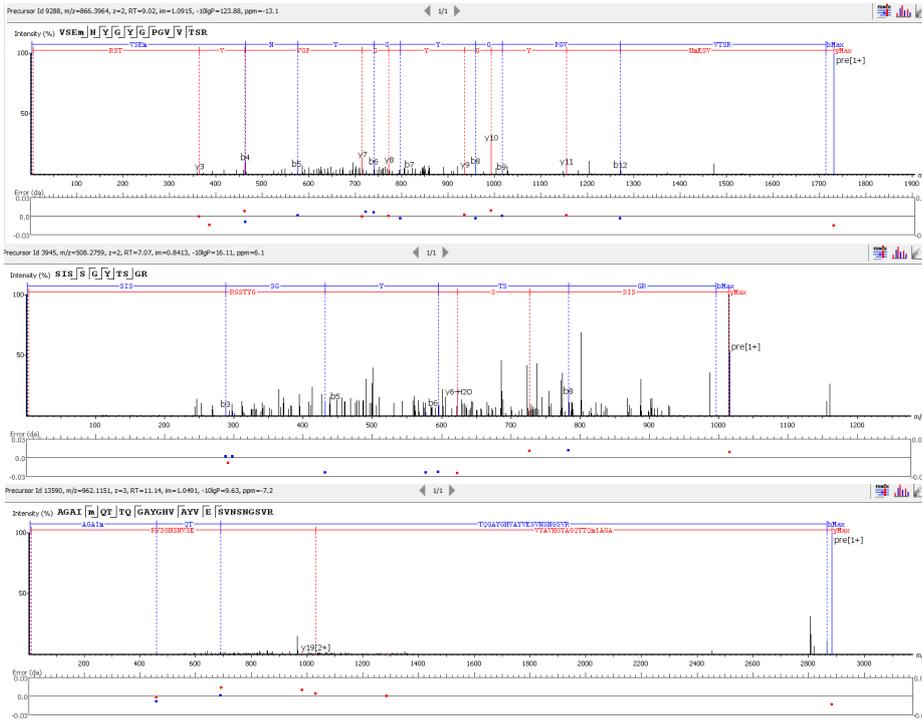
Tab. 2.4.5 D) *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat, Intermembrane phospholipid transportsystem binding protein MlaC.



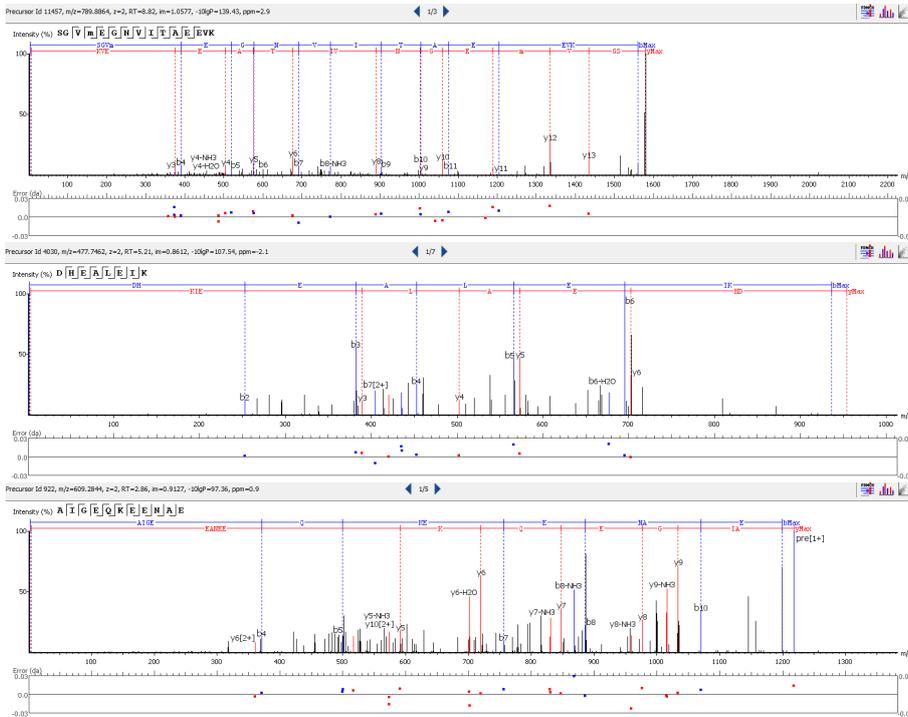
Tab. 2.4.5 D) *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat, Magnesium transport protein *CorA*.



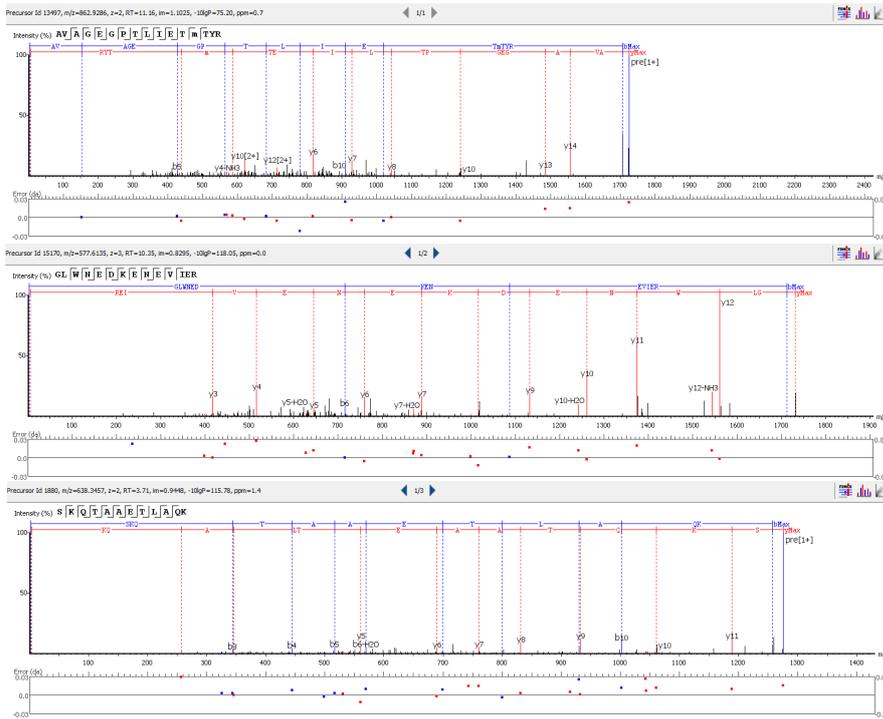
Tab. 2.4.5 E) *S. aureus* Newman Klick-Reaktion im Lysat, Peptidase M20/M25/M40 family protein.



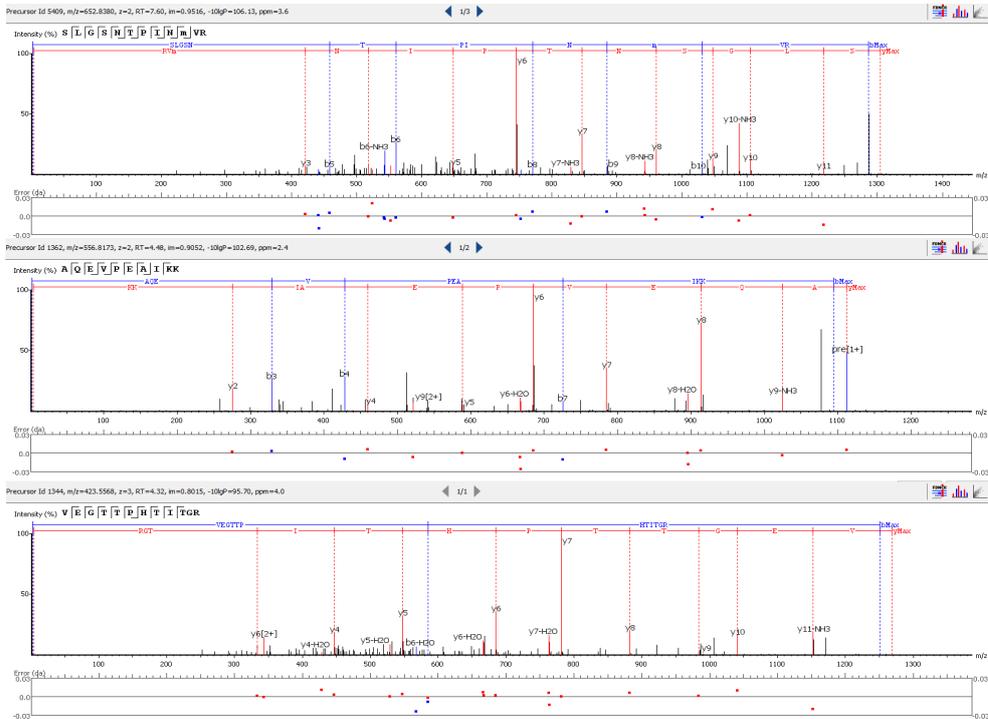
Tab. 2.4.5 E) *S. aureus* Newman Klick-Reaktion im Lysat, Secretory antigen SsaA.



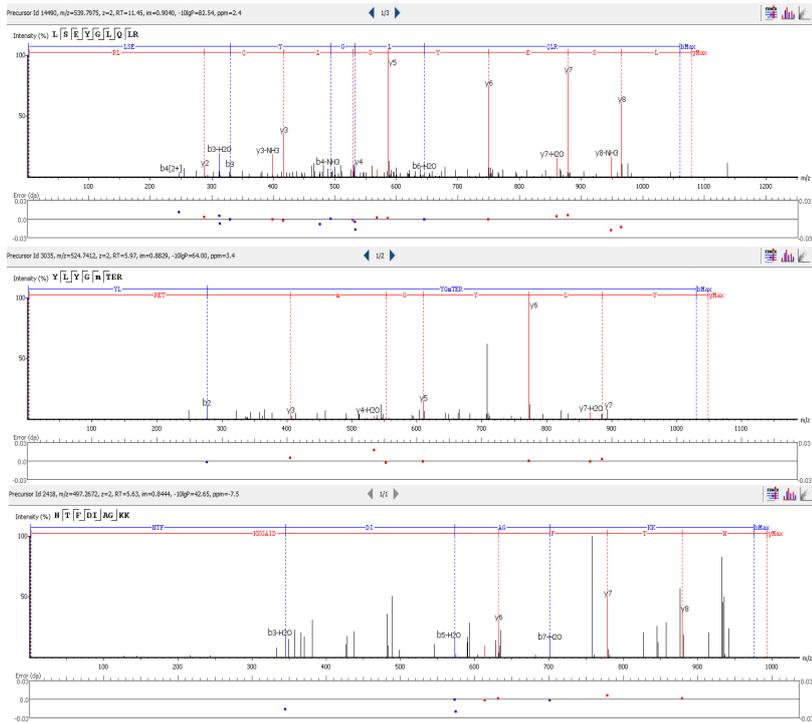
Tab. 2.4.5 E) *S. aureus* Newman Klick-Reaktion im Lysat, 50S ribosomal protein L10.



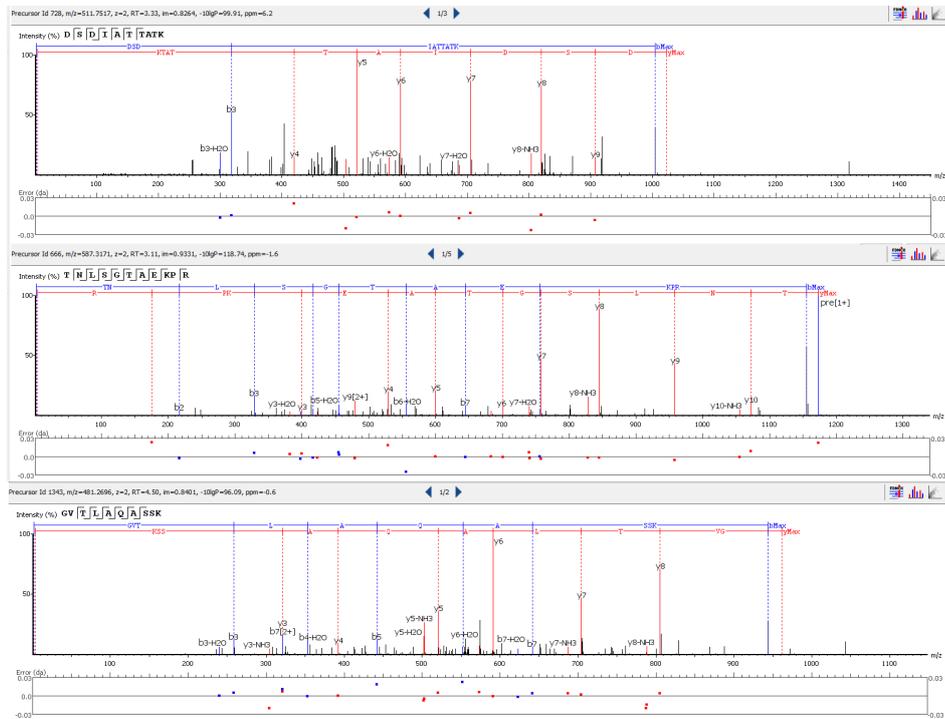
Tab. 2.4.5 E) *S. aureus* Newman Klick-Reaktion im Lysat, Pyruvat dehydrogenase E1 component α subunit.



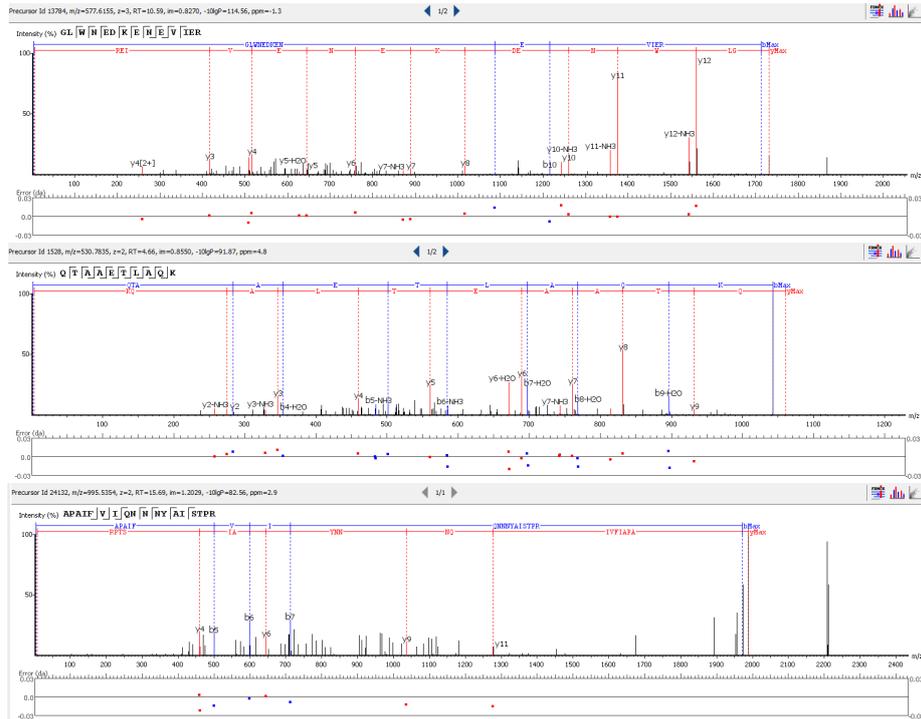
Tab. 2.4.5 F) *S. aureus* Newman Klick-Reaktion im Lysat, 30S ribosomal protein S5.



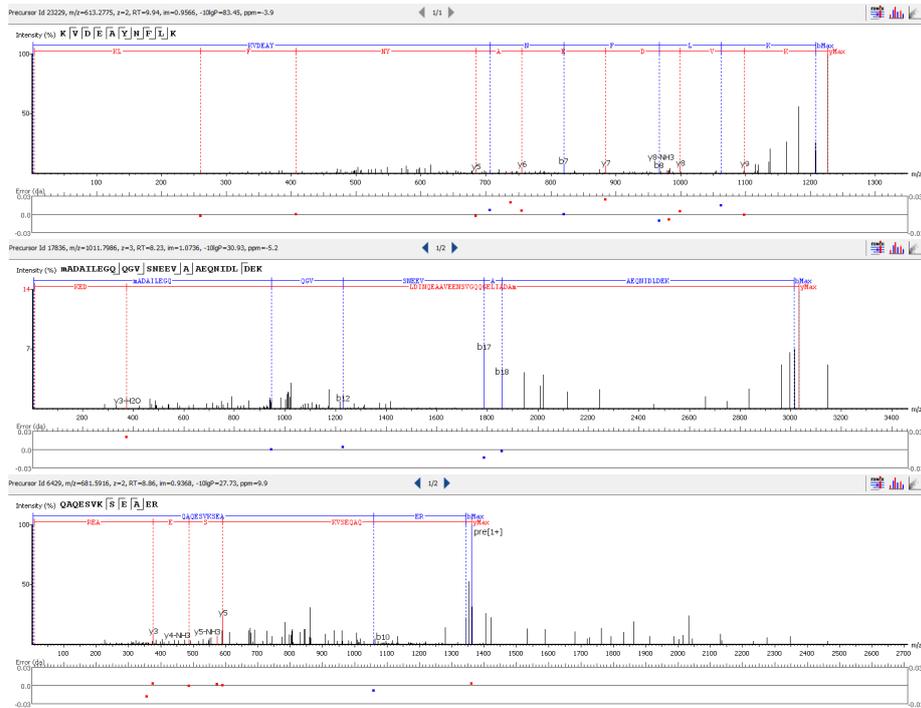
Tab. 2.4.5 F) *S. aureus* Newman Klick-Reaktion im Lysat, 30S ribosomal protein S4.



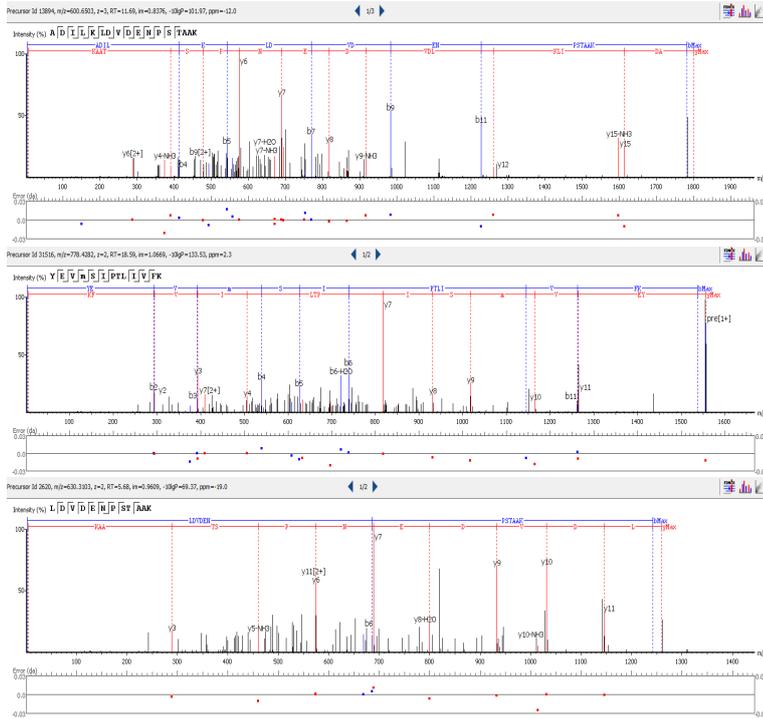
Tab. 2.4.5 F) *S. aureus* Newman Klick-Reaktion im Lysat, 50S ribosomal protein L18.



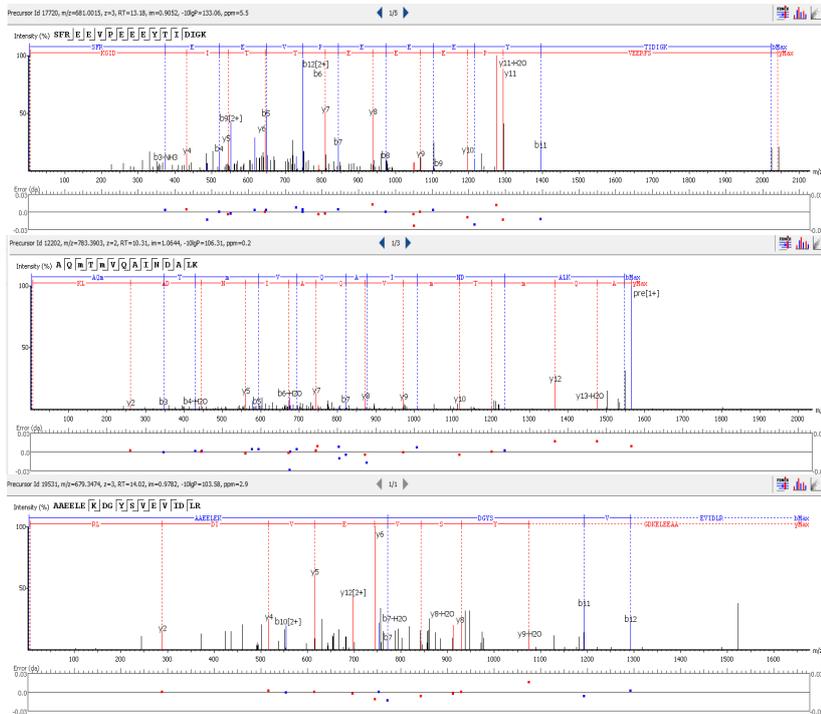
Tab. 2.4.5 F) *S. aureus* Newman Klick-Reaktion im Lysat, Pyruvat dehydrogenase E1 component α subunit.



Tab. 2.4.5 G) *S. aureus* Newman Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat, 30S ribosomal protein S2.



Tab. 2.4.5 H) *S. aureus* Newman Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat, Thioredoxin.



Tab. 2.4.5 H) *S. aureus* Newman Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat, Pyruvat dehydrogenase E1 component β subunit.

Charakterisierung von sekundären Zielstrukturen - Reproduzierbarkeit

Darstellung der Reproduzierbarkeit der massenspektrometrischen Messungen der spezifisch angereicherten Proteine. Proben 6 bis 10 spiegeln jeweils die spezifisch durch DK501 angereicherten Proteine dar.

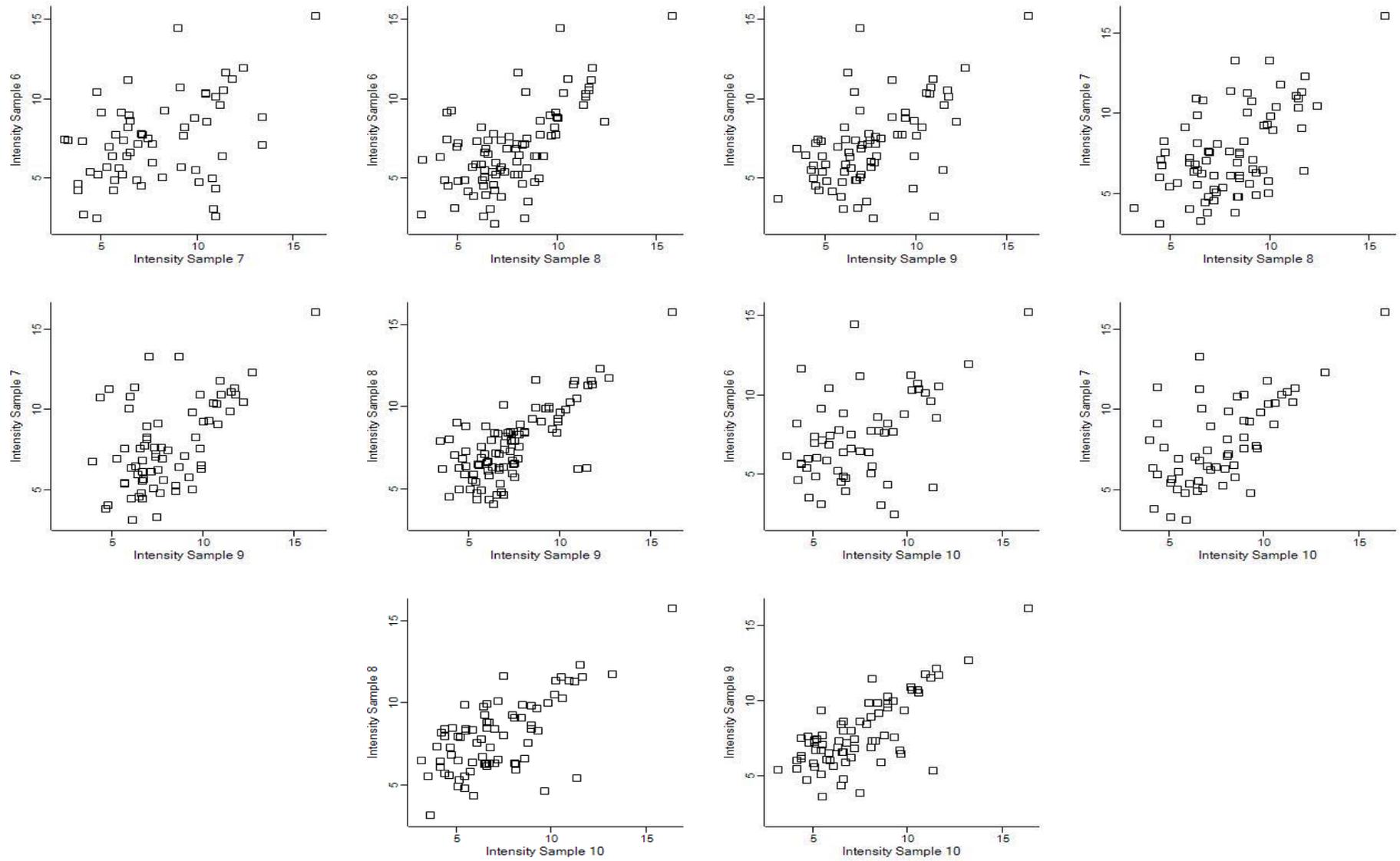


Abbildung 4.0.2: Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für *E. coli* BW25113 im Lysat 1.

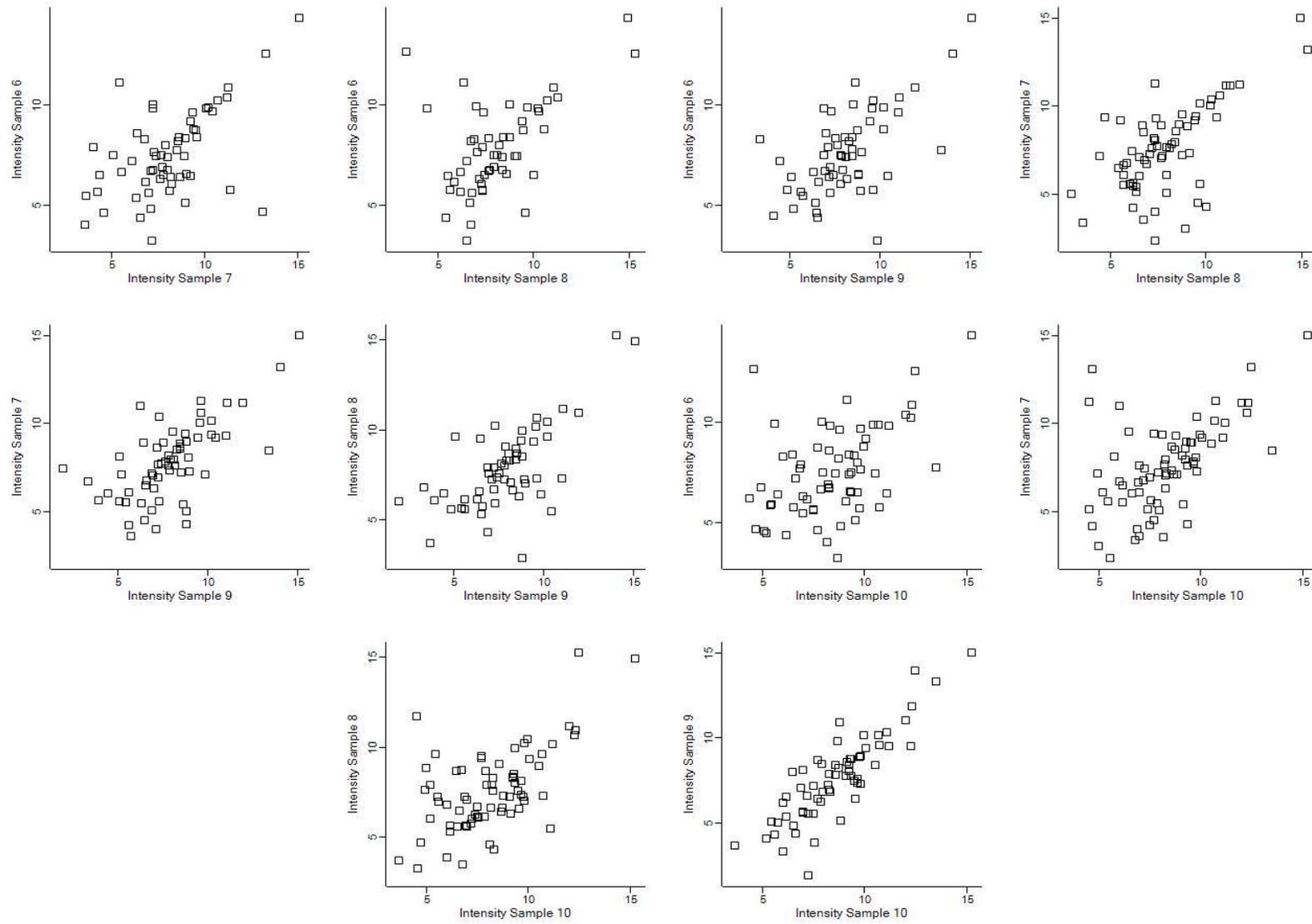


Abbildung 4.0.3: Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für *E. coli* BW25113 im Lysat 2.

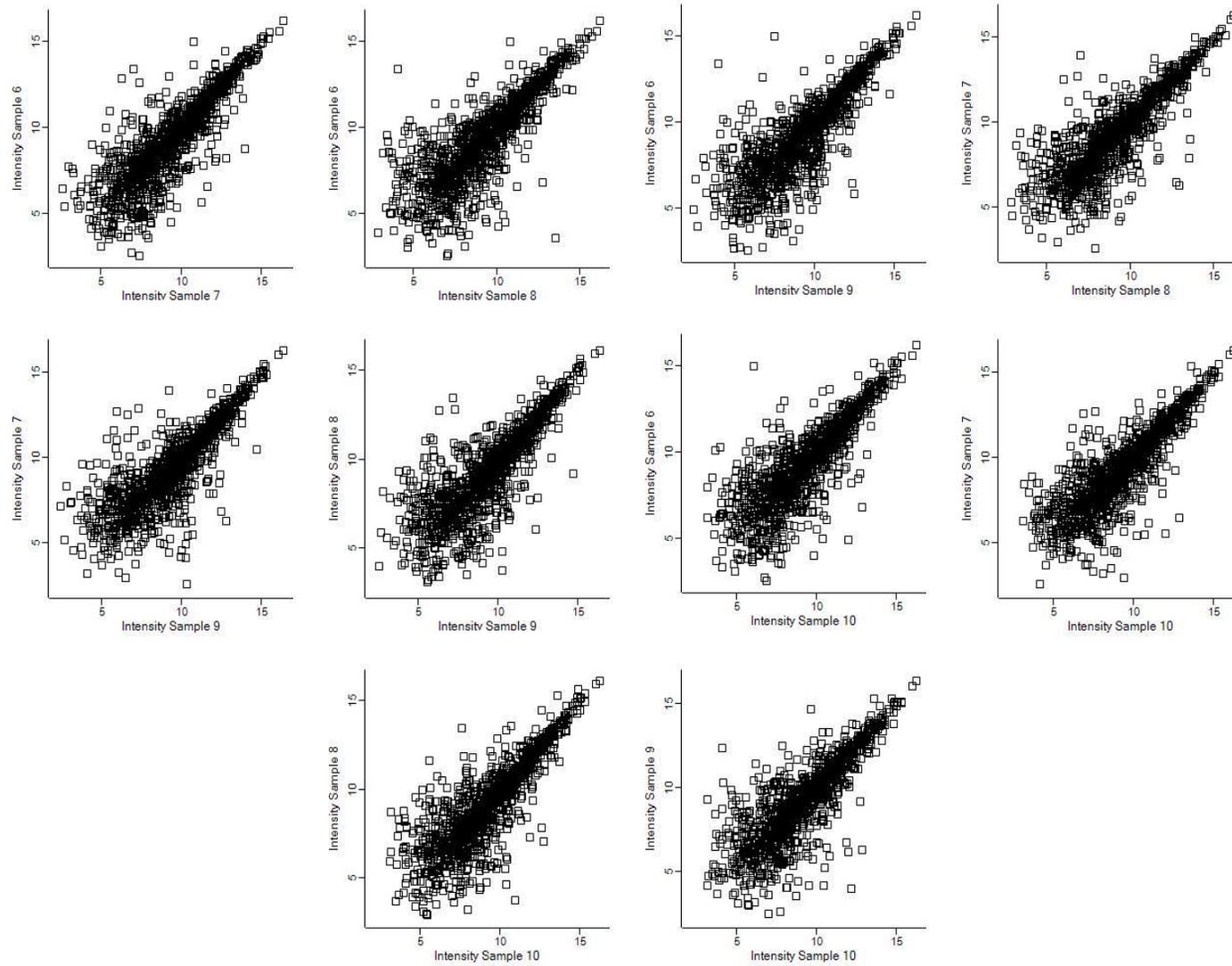


Abbildung 4.0.4: Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat 1.

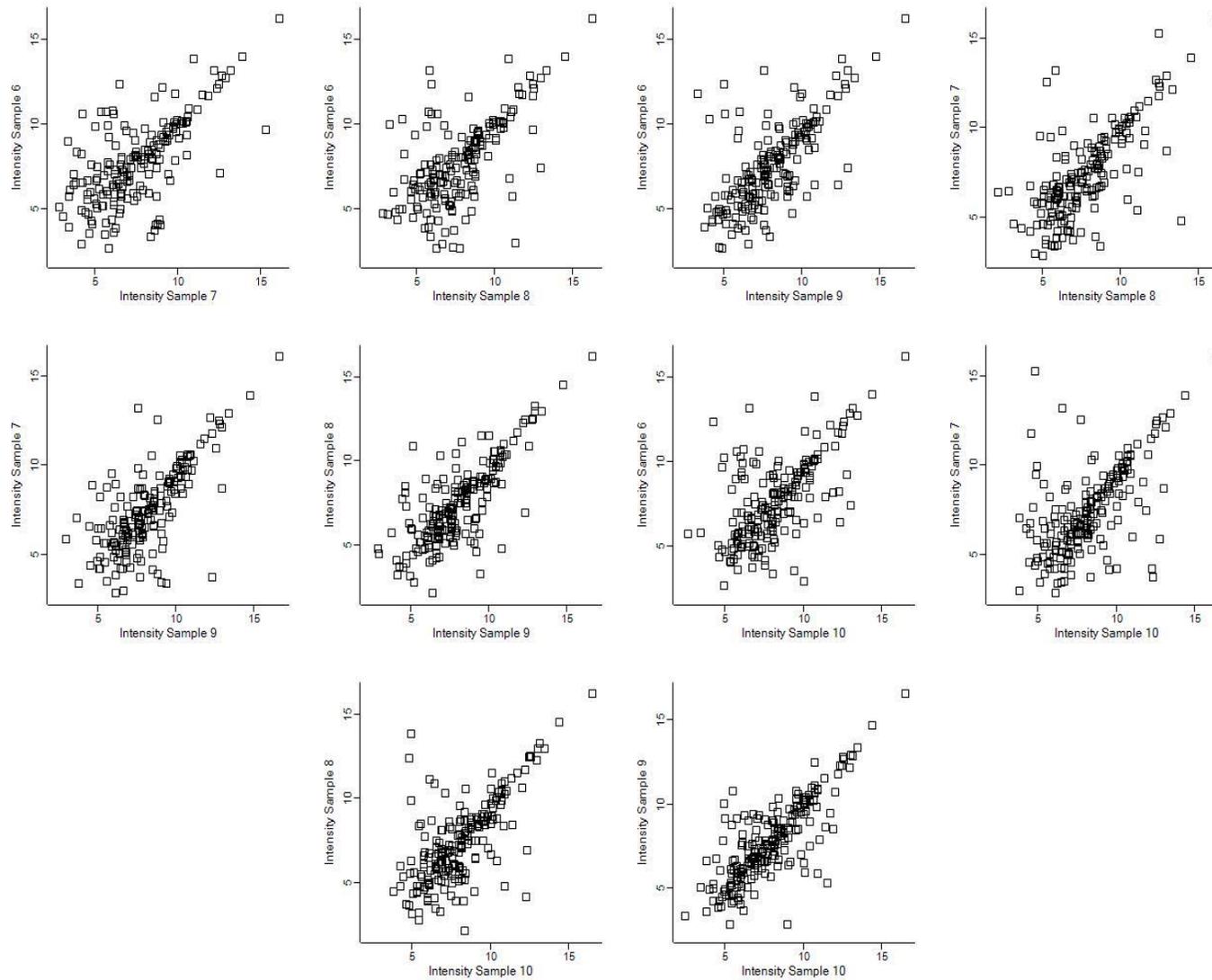


Abbildung 4.0.5: Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat 2.

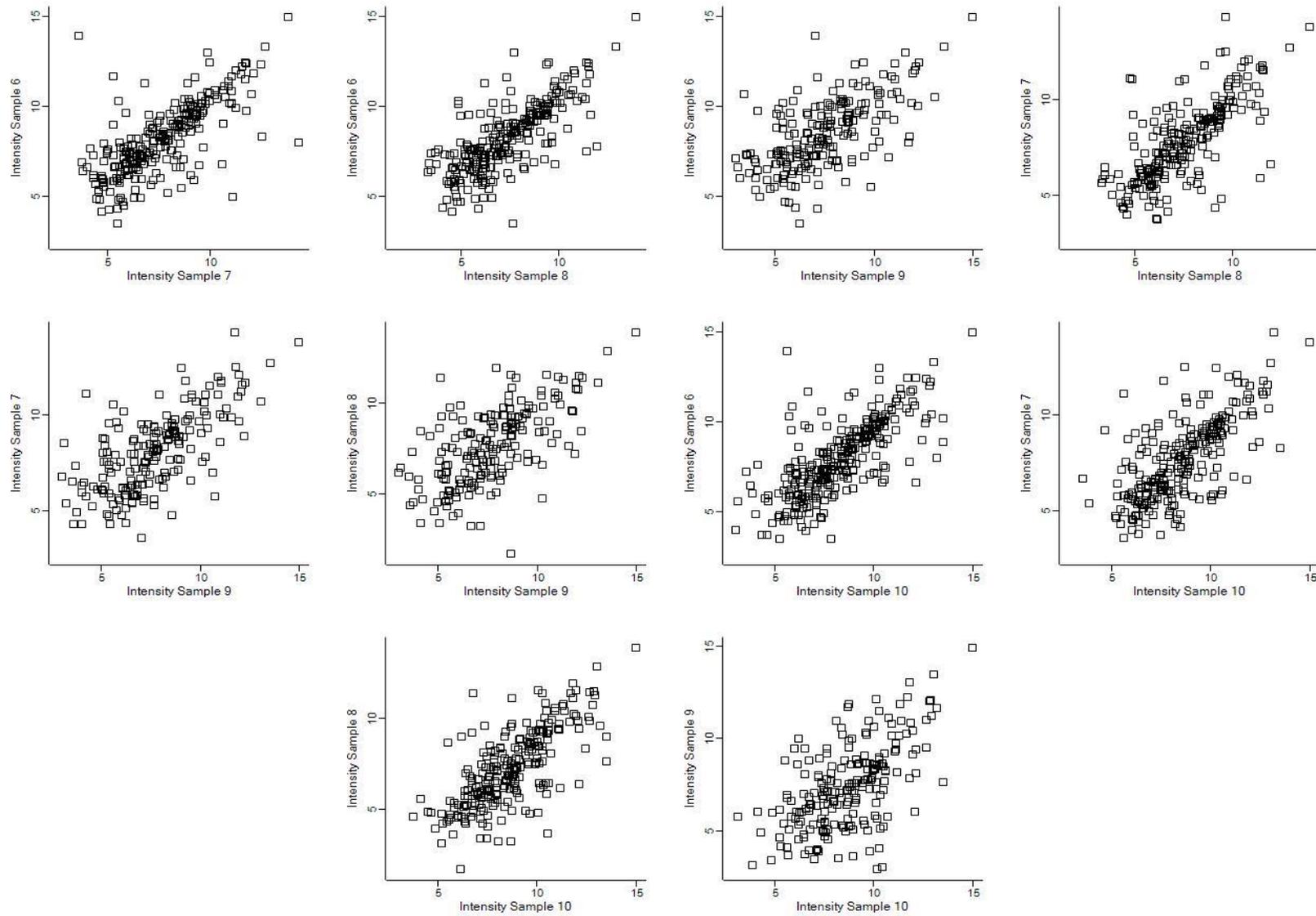


Abbildung 4.0.6: Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für *S. aureus* Newman im Lysat 1.

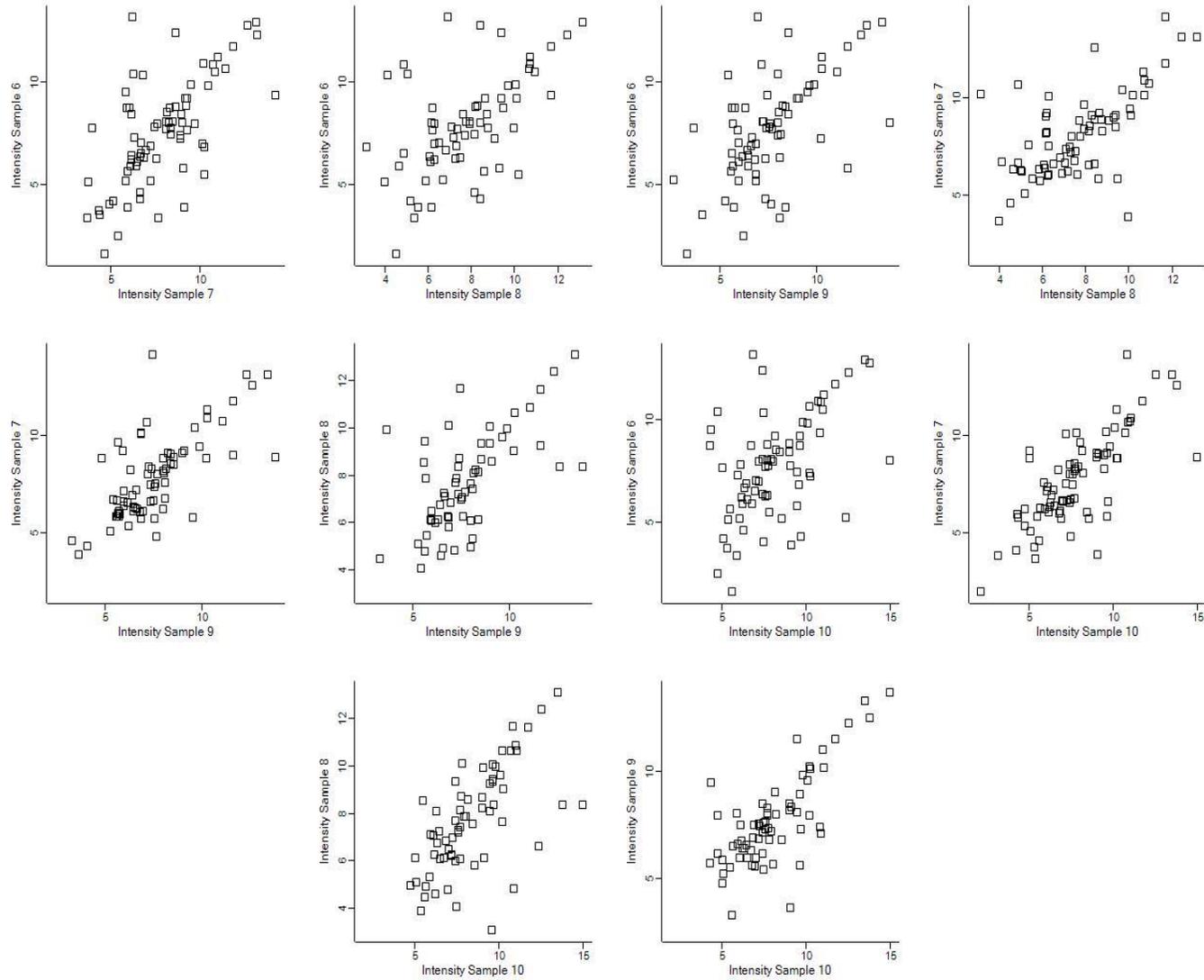


Abbildung 4.0.7: Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für *S. aureus* Newman im Lysat 2.

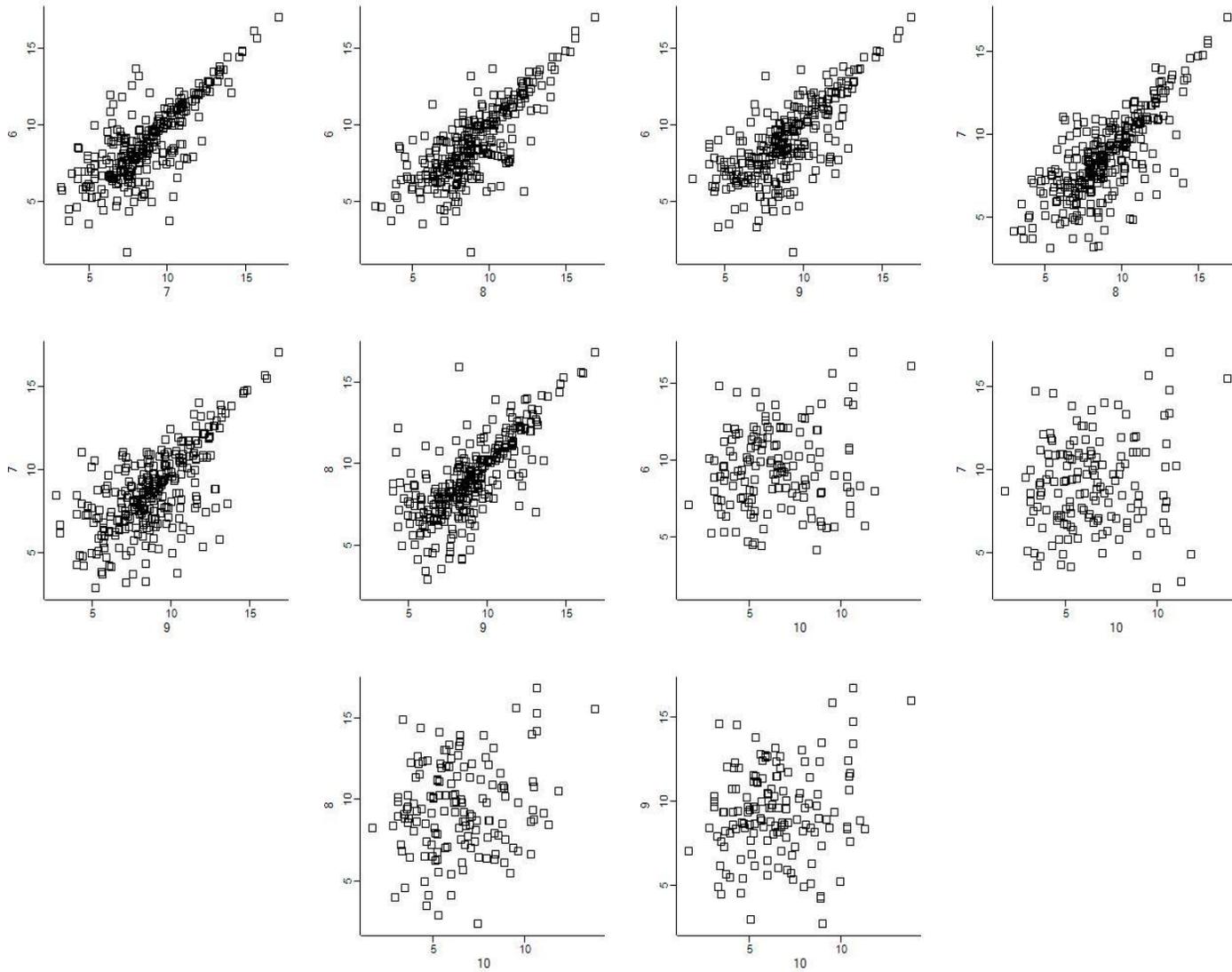


Abbildung 4.0.8: Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für *S. aureus* Newman Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat 1.

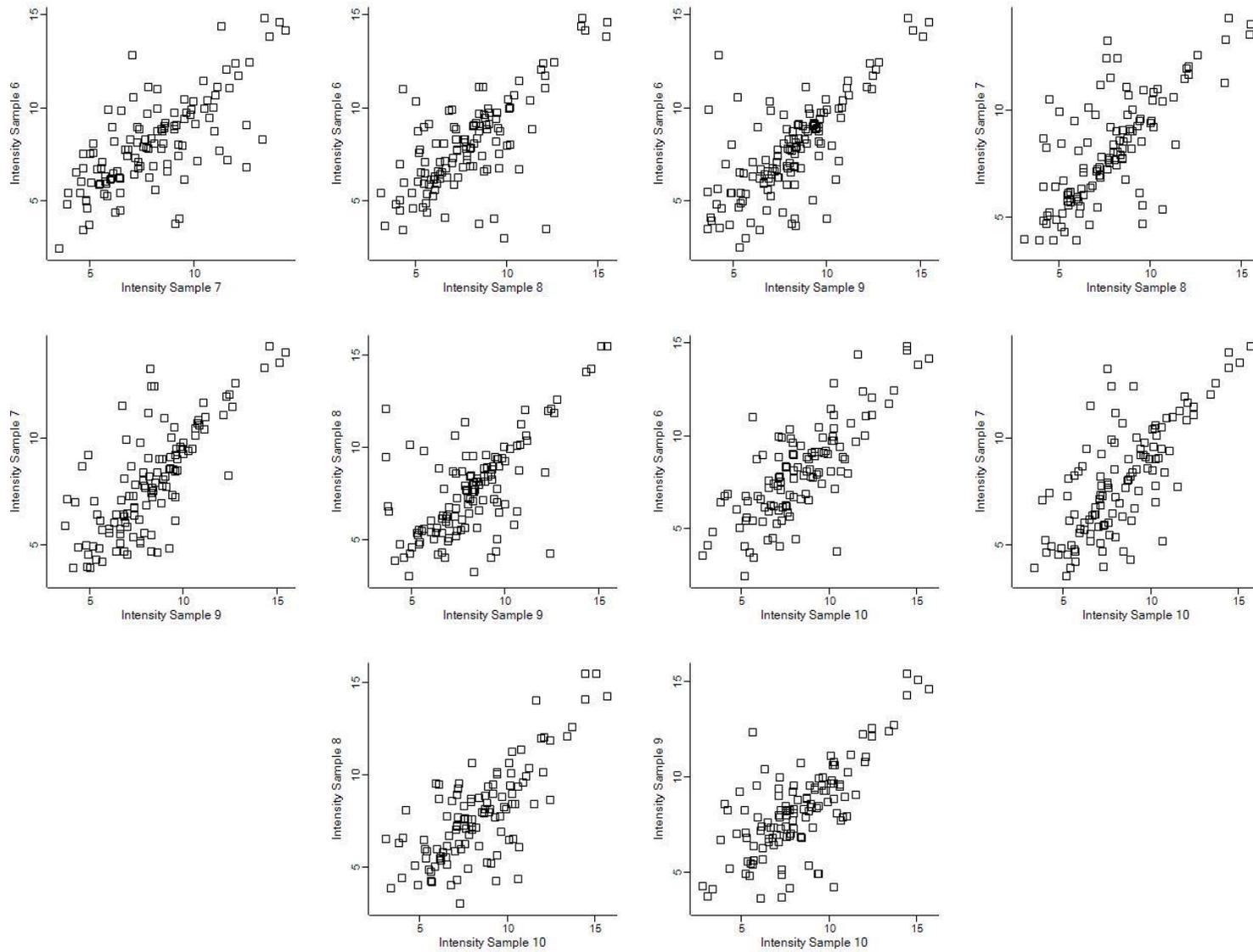


Abbildung 4.0.9: Darstellung der Abundanzen aller DK501 Proben für *S. aureus* Newman Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat 2.

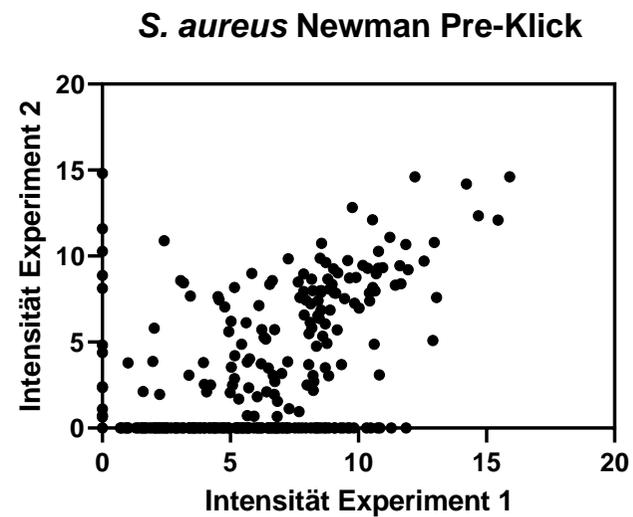
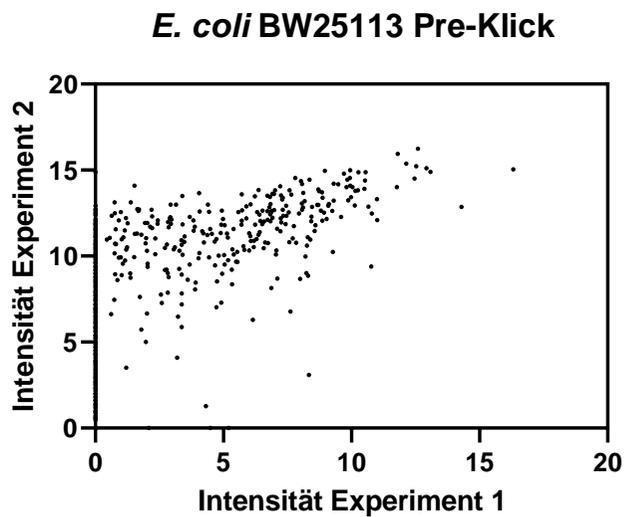
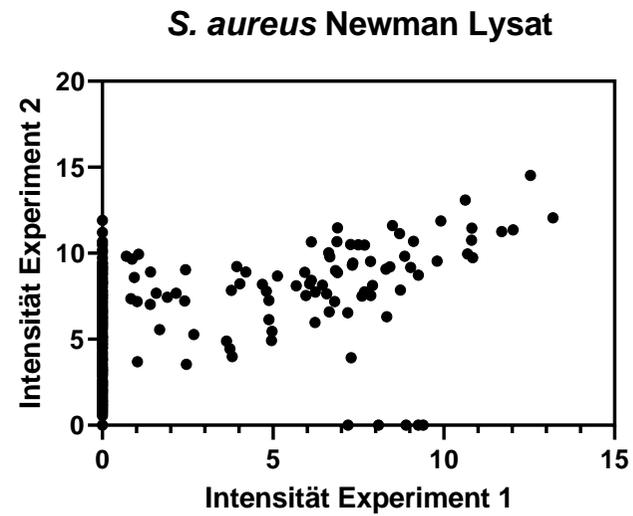
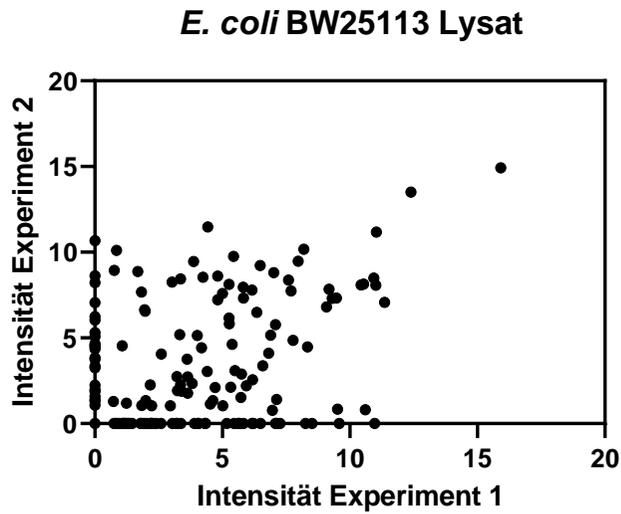
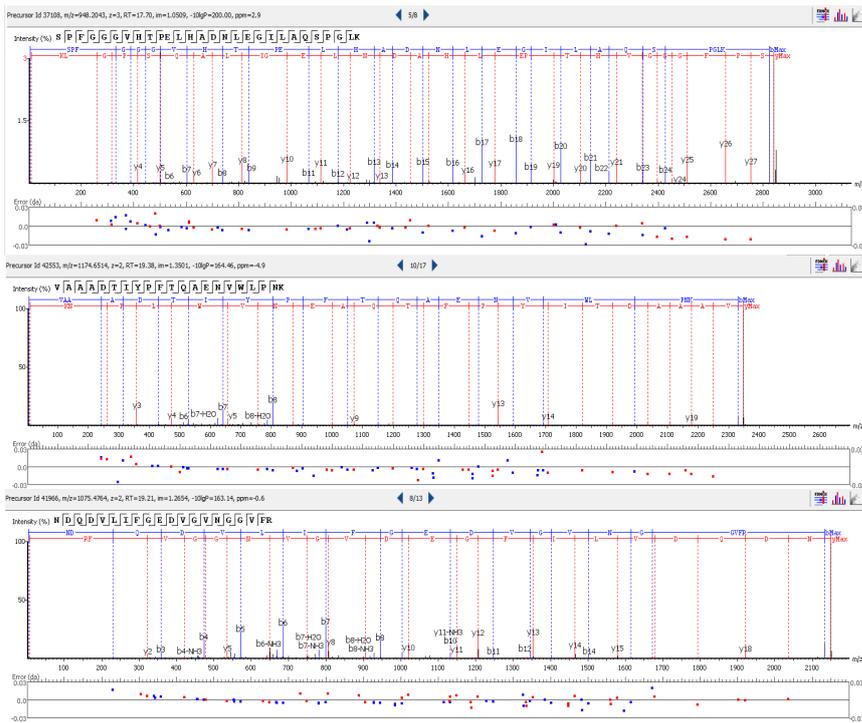
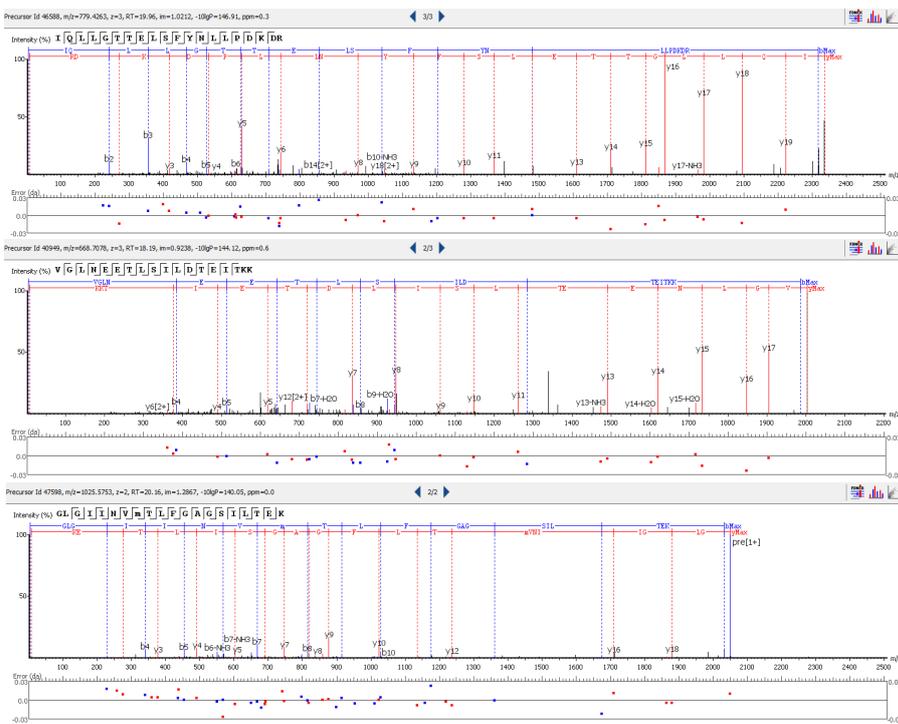


Abbildung 4.0.10: Vergleich der Intensitäten der Wiederholungsversuche der Anreicherungsexperimente. Links oben: *E. coli* BW25113 im Lysat, rechts oben: *S. aureus* Newman im Lysat, links unten: *E. coli* BW25113 Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat, rechts unten: *S. aureus* Newman Klick-Reaktion und anschließend Inkubation im Lysat.

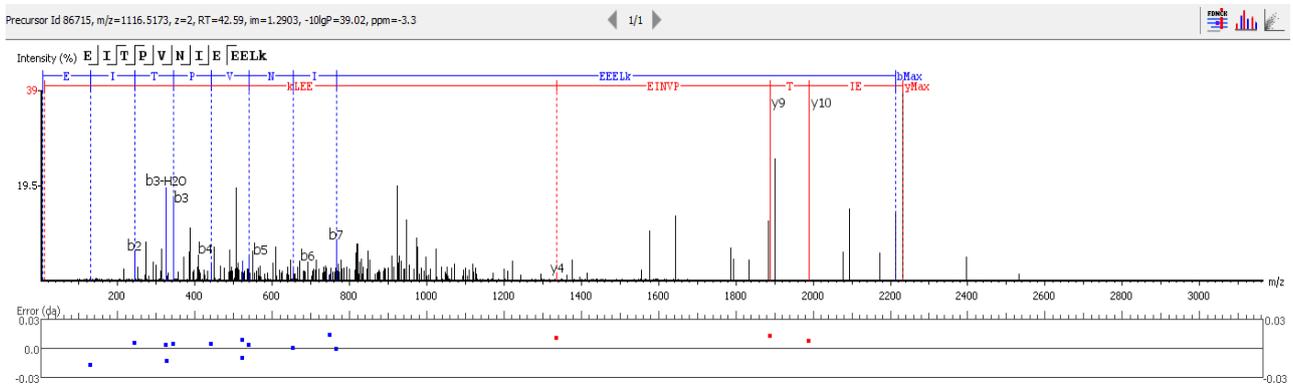


MS-Spektren der drei intensivsten Peptide der Bande 4: Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit β .

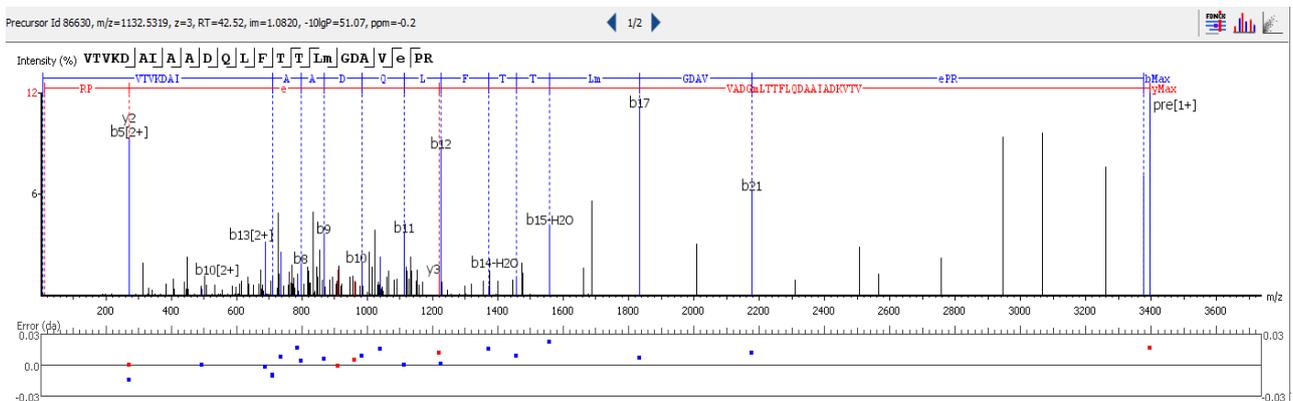


MS-Spektren der drei intensivsten Peptide der Bande 5: HPr kinase/phosphorylase.

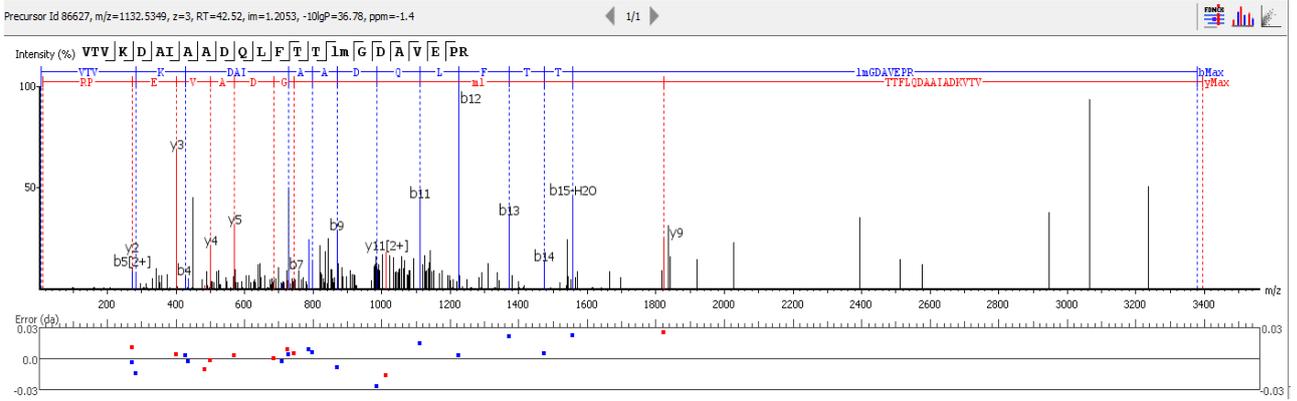
Modifizierte Peptide der Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente mit DK501 und DK352



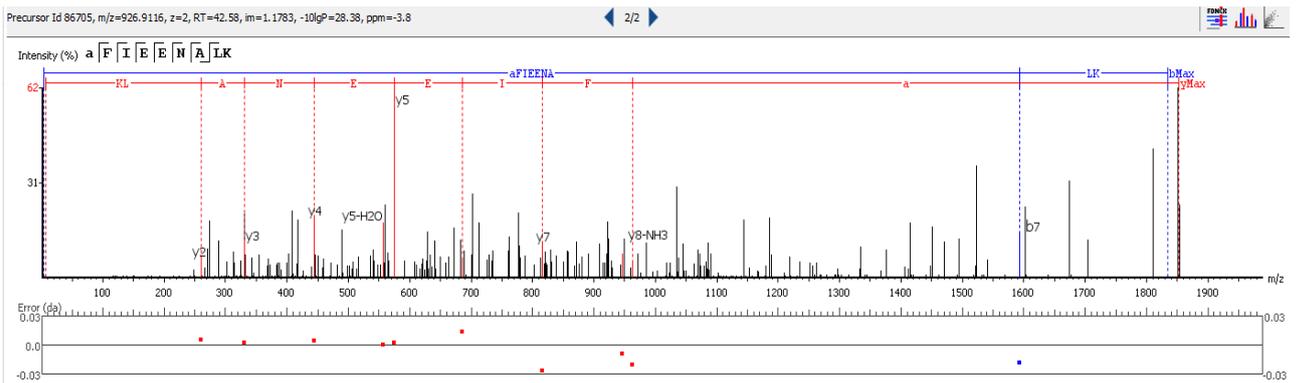
MS-Spektrum zur Identifizierung von EITPVNIEELk in GyrA nach Trypsinverdau modifiziert mit DK501.



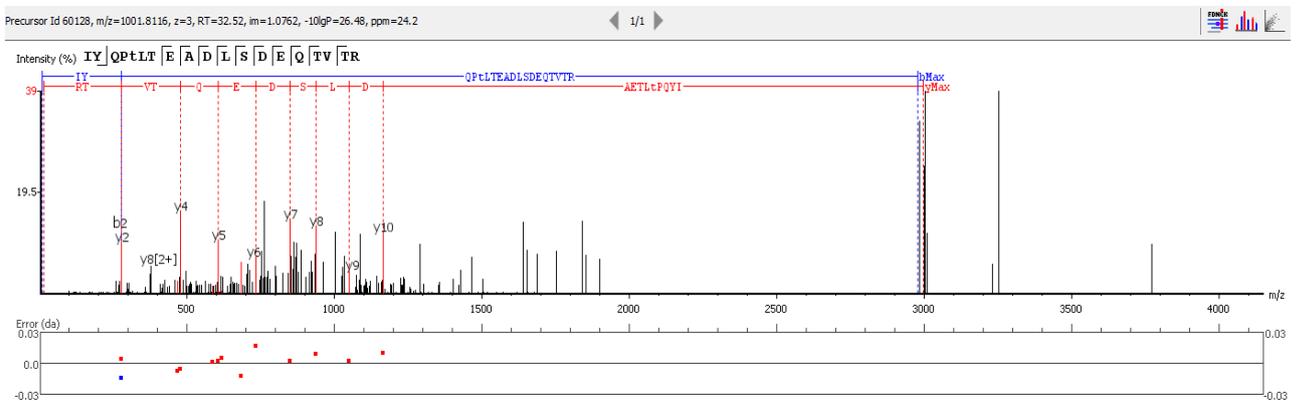
MS-Spektrum zur Identifizierung von VTVKDAIAADQLFTTLMGDAVePR in Gy-rB nach Trypsinverdau modifiziert mit DK501.



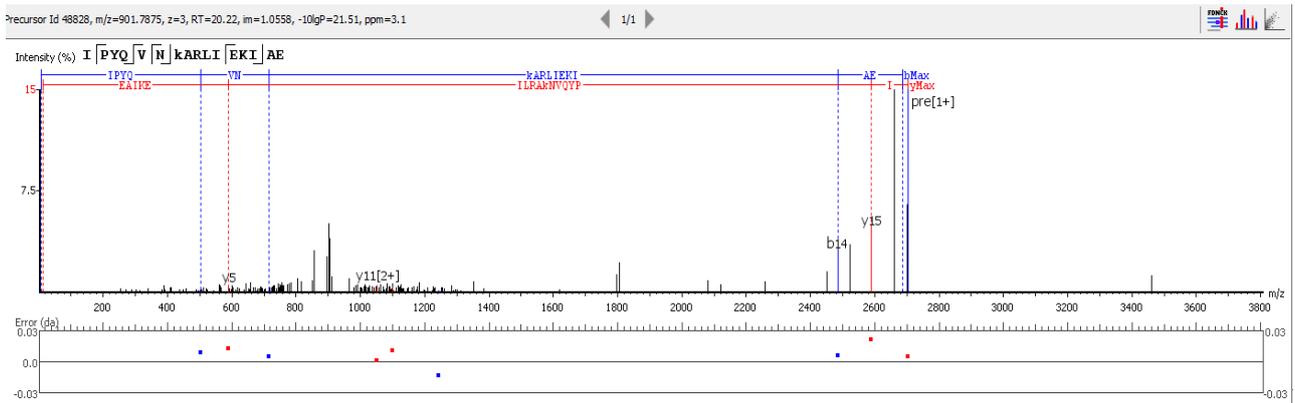
MS-Spektrum zur Identifizierung von VTVKDAIAADQLFTTUMGDAVEPR in GyrB nach Trypsinverdau modifiziert mit DK501.



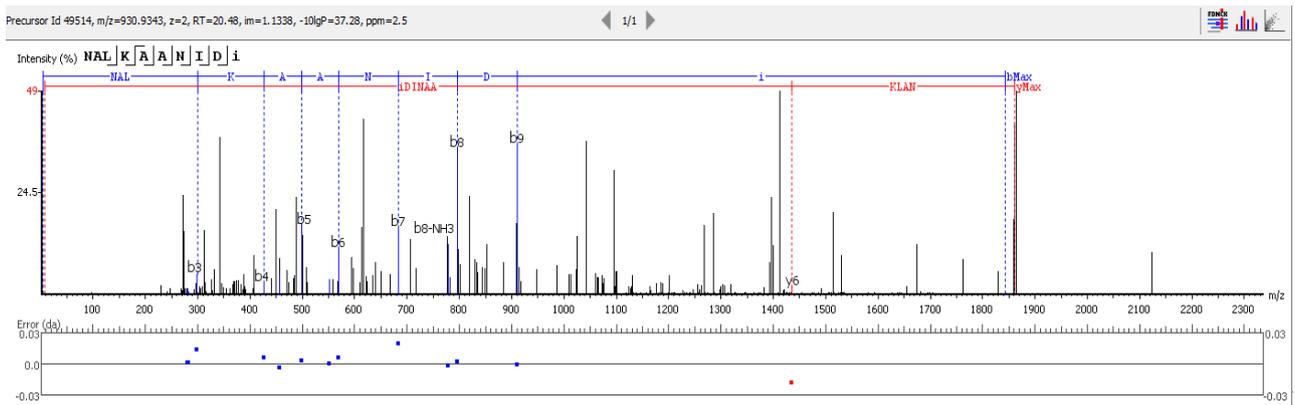
MS-Spektrum zur Identifizierung von aFIEENALK in GyrB nach Trypsinverdau modifiziert mit DK501.



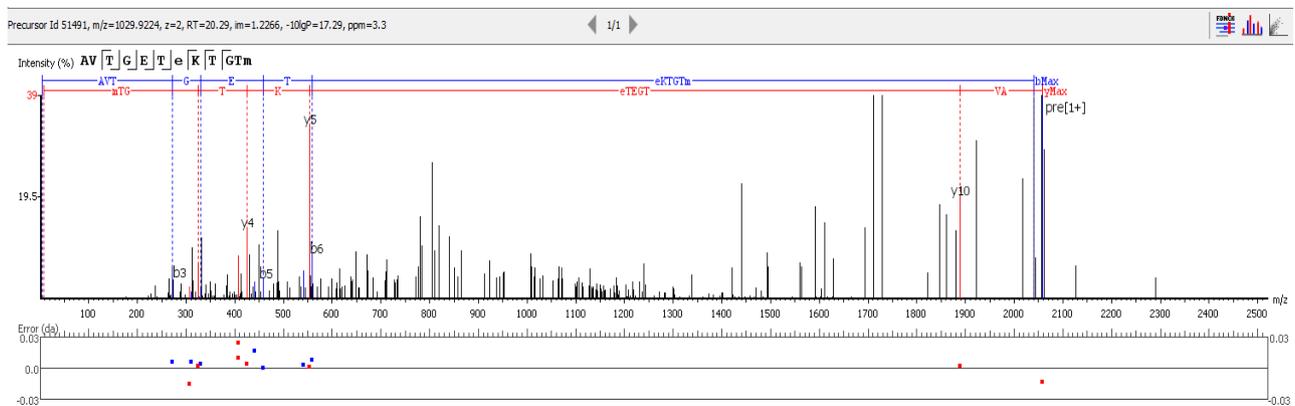
MS-Spektrum zur Identifizierung von IYQPtLTEADLSDEQTVTR in GyrB nach Trypsinverdau modifiziert mit DK501.



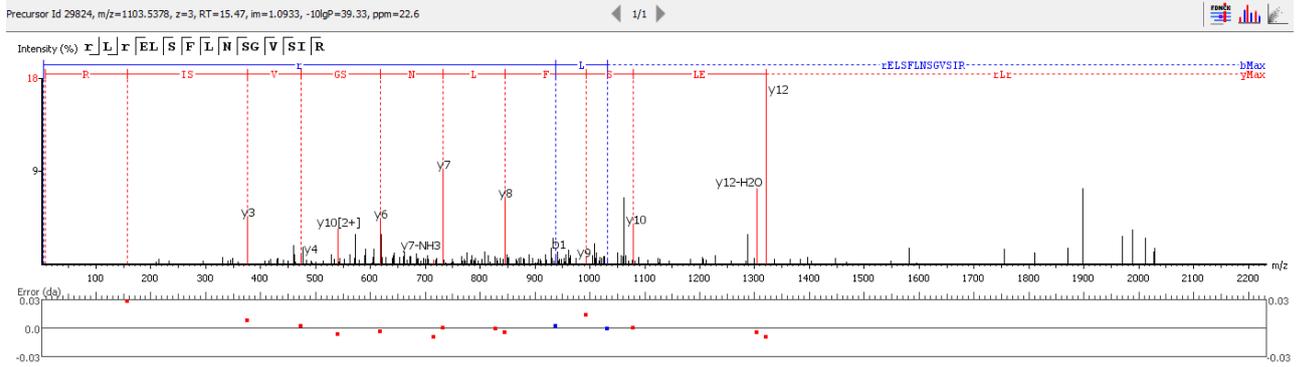
MS-Spektrum zur Identifizierung von IPYQVNkARLIEKIAE in GyrA nach GluC-Verdau modifiziert mit DK501.



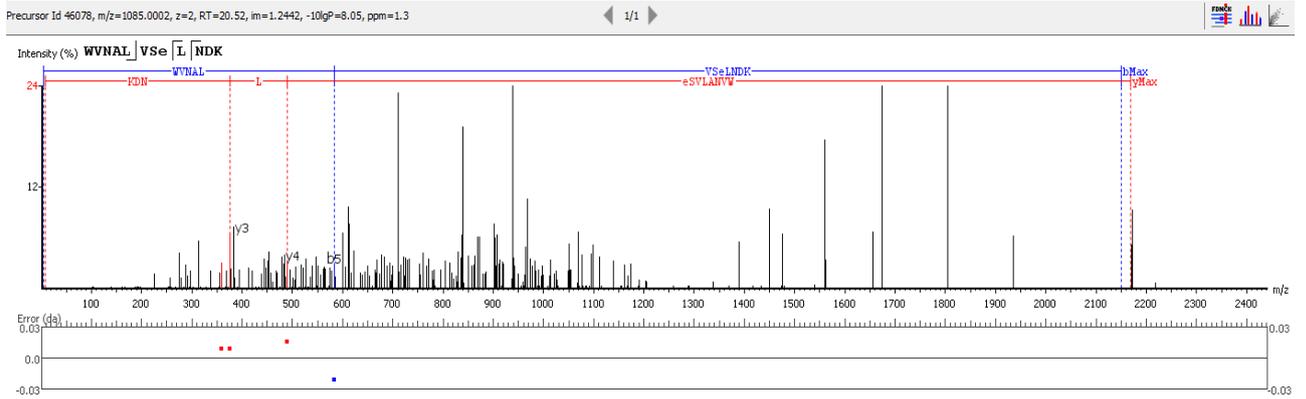
MS-Spektrum zur Identifizierung von NALKAANIDi in GyrB nach GluC-Verdau modifiziert mit DK501.



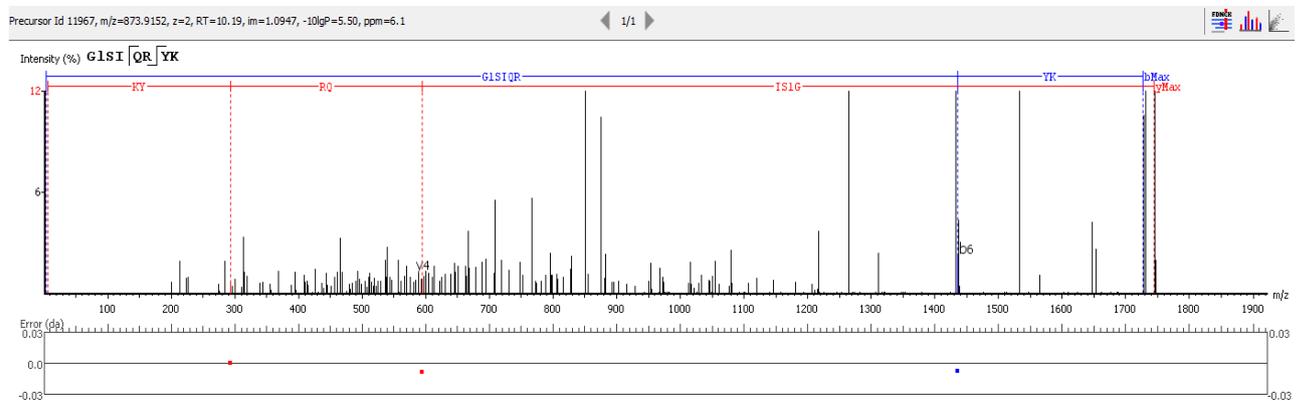
MS-Spektrum zur Identifizierung von AVTGETeKTGTm in GyrB nach Chymotrypsinverdau modifiziert mit DK501.



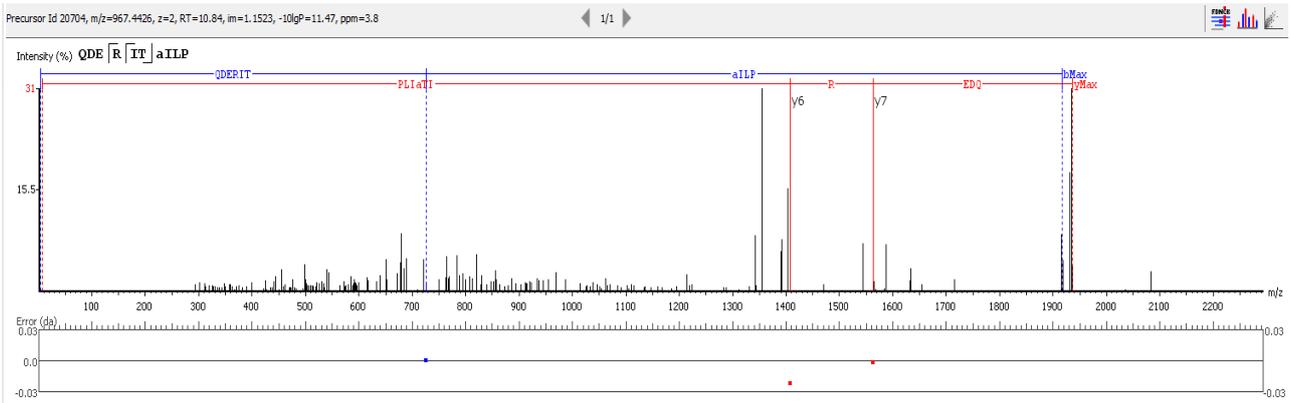
MS-Spektrum zur Identifizierung von rLrELSLFNSGVSI R in GyrB nach Trypsinverdau modifiziert mit DK352.



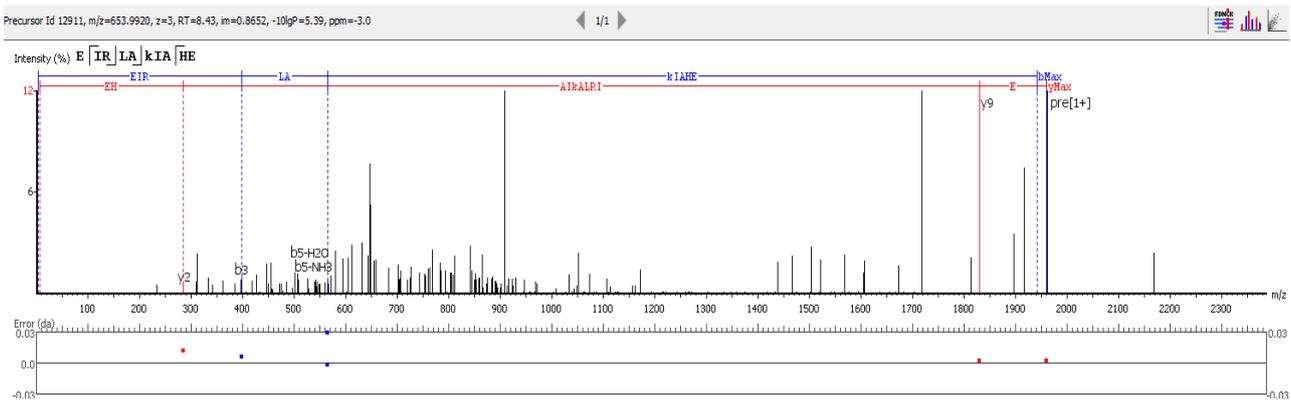
MS-Spektrum zur Identifizierung von WVNALVSeLNDEK in GyrB nach Trypsinverdau modifiziert mit DK352.



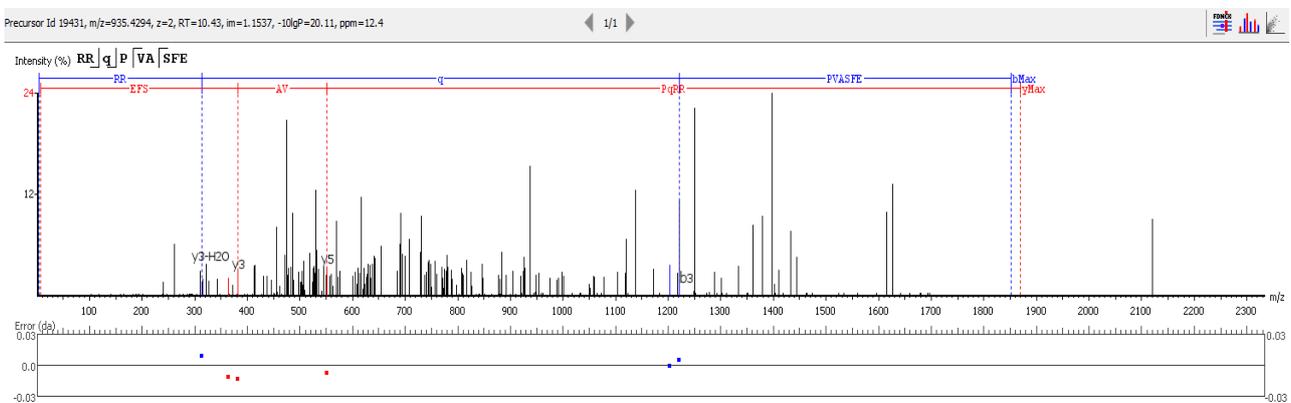
MS-Spektrum zur Identifizierung von GLSIQR YK in GyrB nach Trypsinverdau modifiziert mit DK352.



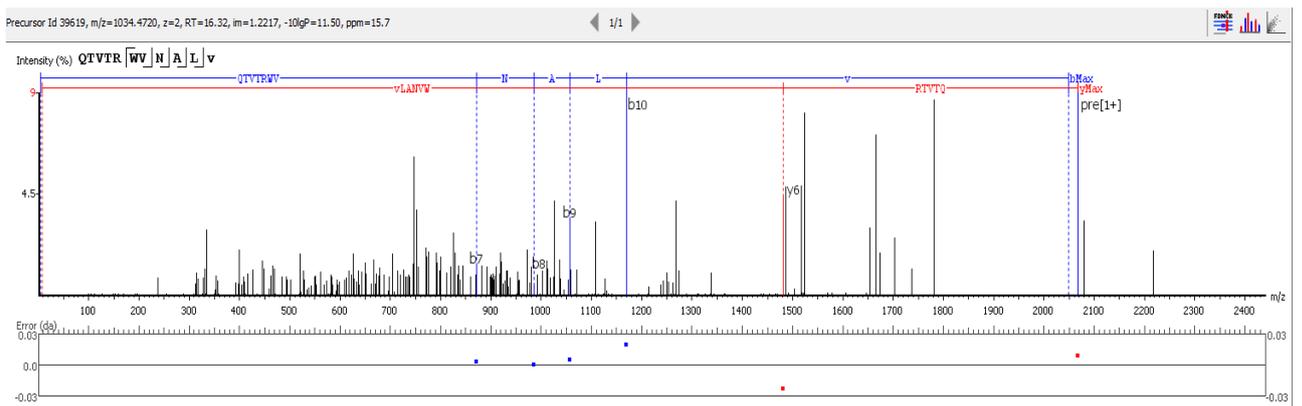
MS-Spektrum zur Identifizierung von QDERITaILP in GyrA nach GluC-Verdau modifiziert mit DK352.



MS-Spektrum zur Identifizierung von EIRLakIAHE in GyrB nach GluC-Verdau modifiziert mit DK352.



MS-Spektrum zur Identifizierung von RRqPVASFE in GyrB nach GluC-Verdau modifiziert mit DK352.



MS-Spektrum zur Identifizierung von QTVTRWVNALv in GyrB nach GluC-Verdau modifiziert mit DK352.

Massenliste der gezielten massenspektrometrischen Methoden

Zusammenfassung aller detektierten Lipide in den zwei gezielten massenspektrometrischen Methoden zur Analyse von C6/36 basierten und Huh7.5.1 basierten Lipidextrakten mit den dazugehörigen Intensitäten der jeweiligen Proben als Mittelwert (n=2).

Massenliste der gezielten massenspektrometrischen Analyse von C6/36 basierten Proben. Detektierte Intensitäten als Mittelwert (n=2) für DENV, infizierte C6/36 und C6/36.

Lipid	Identifizierung		Intensitäten		
	m/z 1	m/z 2	DENV	infizierte C6/36	C6/36
LysoPC(16:1)	494,320	184,100	5.46E+04	6.08E+05	2.58E+05
LysoPC(16:0)	496,340	184,100	1.73E+05	1.87E+06	2.40E+05
LysoPC(18:1)	522,360	184,100	2.37E+05	1.02E+06	3.44E+05
PC aa C38:1	816,700	184,000	6.06E+04	2.19E+05	1.46E+06
PC aa C38:6	806,600	184,000	4.64E+04	8.26E+05	8.14E+06
PC aa C38:5	808,600	184,000	9.32E+04	1.42E+06	6.30E+06
PC(26:0)	650,480	184,100	0.00E+00	1.39E+05	5.30E+05
PC(28:1)	676,490	184,100	5.82E+05	7.21E+06	2.82E+07
PC(28:0)	678,510	184,100	1.11E+06	1.55E+07	5.31E+07
PC(29:1)	690,510	184,100	7.26E+06	8.12E+07	7.40E+07
PC(30:1)	704,520	184,100	1.03E+06	1.07E+07	8.92E+06
PC(32:2)	730,540	184,100	3.43E+06	2.67E+07	5.92E+07
PC(32:1)	732,550	184,100	4.81E+06	5.98E+07	4.23E+07
PC(32:0)	734,570	184,100	5.84E+05	5.41E+06	4.46E+06
PC(34:2)	758,570	184,100	1.03E+06	7.42E+06	1.57E+07
PC(34:1)	760,590	184,100	4.83E+05	4.36E+06	6.41E+06
PC(34:0)	762,600	184,100	1.28E+05	3.55E+05	1.09E+06
PC(36:2)	786,600	184,100	1.97E+05	4.23E+05	1.36E+06
PC(36:1)	788,620	184,100	1.07E+05	6.91E+05	1.22E+06
PE(30:1)	662,480	521,500	4.04E+04	5.05E+05	3.78E+06
PE(32:2)	688,490	547,500	9.84E+04	1.48E+06	8.66E+06
PE(32:1)	690,510	549,500	1.01E+06	1.31E+07	1.91E+07
PE(32:0)	692,520	551,500	1.37E+05	1.43E+06	2.54E+06
PE(34:2)	716,520	575,500	4.07E+05	6.24E+06	1.70E+07
PE(34:1)	718,540	577,500	1.28E+06	1.62E+07	1.81E+07
PE(36:2)	744,550	603,600	3.24E+05	6.39E+06	8.68E+06
PE(36:1)	746,570	605,600	3.17E+05	4.00E+06	5.04E+06
PE(38:5)	766,540	625,500	0.00E+00	4.99E+05	8.13E+05
PE(39:8)	774,510	633,500	1.17E+05	1.62E+06	1.90E+06
SM(d32:1)	675,540	184,100	1.02E+04	4.86E+04	4.70E+05
SM(d33:1)	689,560	184,100	6.41E+04	7.40E+04	2.47E+05

SM(d33:0)	691,570	184,100	0.00E+00	6.05E+04	2.16E+05
SM(d34:1)	703,570	184,100	4.00E+05	2.24E+06	1.33E+07
SM(d34:0)	705,590	184,100	2.42E+05	2.91E+06	1.11E+07
SM(d36:1)	731,610	184,100	5.29E+05	8.98E+06	3.23E+07
SM(d36:0)	733,620	184,100	3.07E+06	3.18E+07	3.27E+07
SM(d38:2)	757,620	184,100	6.16E+06	4.31E+06	7.67E+06
SM(d38:1)	759,640	184,100	1.31E+06	1.30E+07	2.75E+07
SM(d38:0)	761,650	184,100	2.13E+06	2.60E+07	1.67E+07
SM(d40:2)	785,650	184,100	2.37E+05	6.85E+05	2.05E+06
SM(d40:1)	787,670	184,100	5.23E+05	3.98E+06	8.86E+06
SM(d40:0)	789,680	184,100	2.06E+05	1.86E+06	2.67E+06
SM(d41:1)	801,680	184,100	2.19E+05	1.94E+05	8.39E+05
SM(d42:3)	811,670	184,100	5.59E+05	5.92E+05	1.95E+06
SM(d42:2)	813,680	184,100	1.81E+05	4.46E+05	2.25E+06
SM(d42:1)	815,700	184,100	1.15E+05	3.50E+05	1.23E+06
SM(d42:0)	817,720	184,100	8.57E+04	4.29E+05	8.05E+05

Massenliste der gezielten massenspektrometrischen Analyse von Huh7.5.1 basierten Proben. Detektierte Intensitäten als Mittelwert (n=2) für DENV, infizierte Huh7.5.1 und Huh7.5.1.

Lipid	Identifizierung		Intensitäten		
	m/z 1	m/z 2	DENV	infizierte Huh7.5.1	Huh7.5.1
LysoPC(15:0)	482,320	184,100	3.01E+05	2.42E+05	2.07E+05
LysoPC(16:1)	494,320	184,100	7.08E+04	7.38E+04	2.71E+05
LysoPC(16:0)	496,340	184,100	1.96E+05	2.10E+05	8.56E+05
LysoPC(17:0)	510,360	184,100	2.41E+04	1.32E+04	1.01E+05
LysoPC(18:2)	520,340	184,100	6.18E+04	6.08E+04	1.24E+05
LysoPC(18:1)	522,360	184,100	2.04E+05	1.94E+05	5.75E+05
LysoPC(18:0)	524,370	184,100	1.93E+05	1.63E+05	8.87E+05
LysoPC(20:3)	546,360	184,100	3.20E+04	3.79E+04	2.58E+05
PC(25:0)	636,460	184,100	1.08E+06	1.27E+06	1.01E+06
PC(28:1)	676,490	184,100	6.94E+04	8.65E+04	7.19E+05
PC(28:0)	678,510	184,100	6.79E+04	6.42E+04	4.07E+05
PC(29:1)	690,510	184,100	5.84E+04	6.90E+04	7.47E+05
PC(29:0)	692,520	184,100	2.99E+04	4.44E+04	2.95E+05
PC(30:2)	702,510	184,100	6.72E+04	6.02E+04	6.57E+05
PC(30:1)	704,520	184,100	6.65E+05	8.89E+05	8.01E+06
PC(31:2)	716,520	184,100	1.88E+04	2.16E+04	1.42E+05
PC(31:1)	718,540	184,100	1.85E+05	2.72E+05	2.05E+06
PC(31:0)	720,550	184,100	2.32E+05	3.77E+05	3.57E+06
PC(32:3)	728,520	184,100	2.73E+04	5.19E+04	2.67E+05
PC(32:2)	730,540	184,100	4.95E+05	1.04E+06	6.17E+06
PC(32:1)	732,550	184,100	3.70E+06	6.87E+06	4.83E+07
PC(32:0)	734,570	184,100	9.86E+05	2.34E+06	1.20E+07
PC(33:5)	738,510	184,100	6.28E+07	4.84E+07	4.17E+07
PC(33:2)	744,550	184,100	1.52E+05	2.39E+05	1.55E+06
PC(33:1)	746,570	184,100	7.61E+05	1.36E+06	8.54E+06
PC(33:0)	748,590	184,100	4.93E+05	7.61E+05	6.22E+06
PC(34:6)	750,510	184,100	7.62E+04	9.56E+04	4.73E+05
PC(34:5)	752,520	184,100	2.72E+07	2.25E+07	1.62E+07
PC(34:3)	756,550	184,100	5.22E+06	4.85E+06	8.63E+06
PC(34:2)	758,570	184,100	2.52E+06	5.09E+06	2.50E+07
PC(34:1)	760,590	184,100	7.26E+06	1.23E+07	5.86E+07
PC(34:0)	762,600	184,100	9.04E+05	1.73E+06	7.78E+06
PC(35:6)	774,510	184,100	8.71E+05	8.94E+05	5.82E+05
PC(35:4)	764,520	184,100	3.06E+05	3.08E+05	7.25E+05
PC(35:3)	768,570	184,100	1.95E+05	2.68E+05	2.91E+06
PC(35:2)	770,590	184,100	3.54E+05	6.02E+05	3.04E+06

PC(36:8)	772,570	184,100	3.91E+05	1.16E+06	6.36E+06
PC(36:7)	776,520	184,100	1.79E+05	2.78E+05	2.06E+06
PC(36:6)	778,540	184,100	2.82E+04	6.75E+04	3.05E+05
PC(36:5)	780,550	184,100	1.87E+05	3.62E+05	1.52E+06
PC(36:4)	782,570	184,100	8.70E+05	1.56E+06	1.08E+07
PC(36:3)	784,590	184,100	1.61E+06	3.16E+06	3.54E+07
PC(36:2)	786,600	184,100	3.31E+06	5.91E+06	3.14E+07
PC(36:1)	788,620	184,100	3.29E+06	5.26E+06	3.19E+07
PC(36:0)	790,540	184,100	3.48E+05	5.14E+05	3.14E+06
PC(37:5)	794,570	184,100	5.25E+04	8.66E+04	4.77E+05
PC(37:4)	796,590	184,100	1.28E+05	2.40E+05	2.21E+06
PC(37:3)	798,600	184,100	2.02E+05	3.63E+05	4.81E+06
PC(38:9)	800,520	184,100	1.62E+05	2.62E+05	1.79E+06
PC(38:8)	802,540	184,100	2.05E+05	3.73E+05	1.32E+06
PC(37:1)	802,630	184,100	1.97E+05	3.87E+05	1.53E+06
PC(38:7)	804,550	184,100	7.55E+04	1.47E+05	3.76E+05
PC(38:6)	806,570	184,100	2.98E+05	5.98E+05	2.29E+06
PC(38:5)	808,590	184,100	5.73E+05	9.35E+05	5.27E+06
PC(38:4)	810,600	184,100	1.31E+06	1.97E+06	1.91E+07
PC(38:3)	812,620	184,100	1.21E+06	2.21E+06	3.30E+07
PC(38:2)	814,630	184,100	4.99E+06	7.04E+05	8.47E+06
PC(38:1)	816,650	184,100	1.52E+05	1.96E+05	1.71E+06
PC(39:6)	820,590	184,100	4.14E+04	6.04E+04	3.21E+05
PC(39:5)	822,600	184,100	3.60E+04	5.36E+04	3.18E+05
PC(39:4)	824,620	184,100	4.36E+04	6.88E+04	5.95E+05
PC(40:10)	826,540	184,100	4.59E+04	6.75E+04	6.85E+05
PC(40:9)	828,550	184,100	2.63E+04	4.35E+04	3.29E+05
PC(40:8)	830,570	184,100	4.05E+04	5.92E+04	2.44E+05
PC(40:7)	832,590	184,100	2.03E+05	3.03E+05	8.68E+05
PC(40:6)	834,600	184,100	2.38E+05	3.68E+05	2.04E+06
PC(40:5)	836,620	184,100	1.36E+05	1.88E+05	1.36E+06
PC(40:4)	839,630	184,100	7.67E+04	1.16E+05	9.70E+05
PC(40:3)	840,650	184,100	3.15E+04	5.20E+05	3.64E+05
PE(28:1)	634,440	184,100	7.09E+04	1.73E+05	9.76E+04
PE(32:1)	690,510	493,400	0.00E+00	1.80E+04	1.10E+05
PE(34:4)	712,490	549,500	7.43E+05	6.70E+05	4.25E+05
PE(34:3)	714,540	571,500	0.00E+00	2.75E+04	7.92E+04
PE(34:2)	716,520	573,500	3.14E+04	7.36E+04	5.94E+05
PE(34:1)	718,540	575,500	5.68E+04	1.33E+05	6.72E+05
PE(34:0)	720,550	577,500	0.00E+00	1.82E+04	6.44E+04
PE(35:2)	730,540	579,600	0.00E+00	1.57E+04	1.03E+05

PE(36:8)	732,460	589,500	0.00E+00	0.00E+00	1.87E+05
PE(36:5)	738,510	591,500	0.00E+00	0.00E+00	9.15E+04
PE(36:4)	740,520	597,500	1.86E+04	3.81E+04	4.04E+05
PE(36:3)	742,540	599,500	2.56E+04	1.14E+05	8.82E+05
PE(36:2)	744,550	601,500	1.06E+05	2.98E+05	1.84E+06
PE(36:1)	746,570	603,600	7.98E+04	1.55E+05	8.38E+05
PE(36:0)	748,490	605,600	0.00E+00	0.00E+00	8.27E+04
PE(37:4)	754,540	607,500	0.00E+00	0.00E+00	1.28E+05
PE(37:3)	756,550	613,500	0.00E+00	0.00E+00	2.55E+05
PE(38:7)	762,510	615,500	0.00E+00	1.64E+04	1.76E+05
PE(38:6)	764,520	621,500	2.38E+04	6.80E+04	4.76E+05
PE(38:5)	766,540	623,500	1.68E+04	7.85E+04	8.70E+05
PE(38:4)	768,550	625,500	7.82E+04	1.83E+05	2.16E+06
PE(38:3)	770,570	627,600	9.46E+04	1.91E+05	2.04E+06
PE(38:2)	772,590	629,600	2.28E+04	4.28E+04	3.57E+05
PE(40:10)	784,490	631,600	0.00E+00	0.00E+00	6.89E+04
PE(40:9)	786,510	643,500	0.00E+00	0.00E+00	9.55E+04
PE(40:8)	788,520	645,500	0.00E+00	2.72E+04	2.98E+05
PE(40:7)	790,540	647,500	3.50E+04	1.06E+05	1.09E+06
PE(40:6)	792,550	649,500	5.95E+04	1.28E+05	1.36E+06
PE(40:5)	794,570	651,600	1.27E+04	3.69E+04	3.48E+05
PE(40:4)	796,590	653,600	0.00E+00	1.63E+04	9.30E+04
PE(40:3)	798,600	655,600	0.00E+00	0.00E+00	7.16E+04
PE(40:2)	800,620	657,600	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
SM(32:1)	675,540	659,600	1.49E+05	1.83E+05	1.78E+06
SM(32:0)	677,560	184,100	6.72E+04	8.12E+04	4.49E+05
SM(33:1)	689,560	184,100	1.56E+05	1.81E+05	2.20E+06
SM(33:0)	691,570	184,100	4.47E+04	5.90E+04	3.14E+05
SM(34:2)	701,560	184,100	1.21E+05	1.17E+05	1.67E+06
SM(34:1)	703,570	184,100	1.49E+06	1.93E+06	2.11E+07
SM(34:0)	705,590	184,100	5.26E+05	7.80E+05	3.96E+06
SM(35:1)	717,570	184,100	8.86E+04	1.05E+05	1.01E+06
SM(35:0)	719,590	184,100	9.49E+04	1.59E+05	8.78E+05
SM(36:1)	731,610	184,100	3.47E+05	6.58E+05	4.43E+06
SM(36:0)	733,620	184,100	1.72E+06	3.18E+06	2.34E+07
SM(38:3)	755,610	184,100	4.15E+07	3.44E+06	2.61E+07
SM(38:2)	757,620	184,100	1.18E+06	1.26E+06	3.54E+06
SM(38:1)	759,640	184,100	1.28E+06	2.52E+06	1.24E+07
SM(38:0)	761,650	184,100	3.46E+06	9.11E+06	2.93E+07
SM(40:3)	783,640	184,100	4.00E+05	7.00E+05	5.86E+06
SM(40:2)	785,650	184,100	9.16E+05	1.85E+06	1.64E+07

SM(40:1)	787,670	184,100	1.86E+06	2.90E+06	1.71E+07
SM(40:0)	789,680	184,100	1.58E+06	2.53E+06	1.62E+07
SM(42:3)	811,670	184,100	7.35E+05	1.48E+06	1.16E+07
SM(42:2)	813,680	184,100	1.05E+06	1.50E+06	2.23E+07
SM(42:1)	815,700	184,100	3.56E+05	4.97E+05	4.93E+06
SM(43:1)	829,720	184,100	3.43E+04	4.16E+04	3.40E+05
SM(44:2)	841,720	184,100	3.04E+04	4.01E+04	2.98E+05

Massenliste der vermessenen Standards SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard. Detektierte Intensitäten n=6.

Lipid	Identifizierung		Intensität
	m/z 1	m/z 2	
LysoPC (18:1, d7)	529,290	184,100	1.28E+09
PC (15:0-18:1, d7)	753,590	184,100	6.43E+06
PE (15:0-18:1, d7)	711,480	570,500	1.81E+08
SM (d18:1-18:1, d7)	738,620	184,100	3.44E+08

Massenliste aller gemessenen Übergänge zur Methodenerstellung.

Lipid	Identifizierung	
	m/z 1	m/z 2
LysoPC(14:1)	466,29	184,1
LysoPC(14:0)	468,31	184,1
LysoPC(15:1)	480,31	184,1
LysoPC(15:0)	482,32	184,1
LysoPC(16:1)	494,32	184,1
LysoPC(16:0)	496,34	184,1
LysoPC(17:2)	506,32	184,1
LysoPC(17:1)	508,34	184,1
LysoPC(17:0)	510,36	184,1
LysoPC(18:4)	516,31	184,1
LysoPC(18:3)	518,32	184,1
LysoPC(18:2)	520,34	184,1
LysoPC(18:1)	522,36	184,1
LysoPC(18:0)	524,37	184,1
LysoPC(19:3)	532,34	184,1
LysoPC(19:2)	534,36	184,1
LysoPC(19:1)	536,37	184,1
LysoPC(19:0)	538,39	184,1
LysoPC(20:5)	542,32	184,1
LysoPC(20:4)	544,34	184,1

LysoPC(20:3)	546,36	184,1
LysoPC(20:2)	548,37	184,1
LysoPC(20:1)	550,39	184,1
LysoPC(20:0)	552,4	184,1
PC(20:4)vLysoPC(21:4)	558,32	184,1
PC(20:1)	564,37	184,1
PC(20:0)vLysoPC(21:0)	566,38	184,1
LysoPC(22:6)	568,34	184,1
LysoPC(22:5)	570,36	184,1
LysoPC(22:4)	572,37	184,1
LysoPC(22:2)	576,4	184,1
PC(21:1)vLysoPC(22:1)	578,38	184,1
PC(21:0)vLysoPC(22:0)	580,4	184,1
PC(22:1)	592,4	184,1
PC(22:0)	594,41	184,1
LysoPC(24:1)	606,45	184,1
LysoPC(24:0)	608,47	184,1
PC(24:0)	622,44	184,1
PC(25:0)	636,46	184,1
PC(26:1)	648,46	184,1
PC(26:0)	650,48	184,1
PC(27:1)	662,48	184,1
PC(27:0)	664,49	184,1
PC(28:2)	674,48	184,1
PC(28:1)	676,49	184,1
PC(28:0)	678,51	184,1
PC(29:2)	688,49	184,1
PC(29:1)	690,51	184,1
PC(31:0)	692,52	184,1
PC(30:4)	698,48	184,1
PC(30:3)	700,49	184,1
PC(30:2)	702,51	184,1
PC(30:1)	704,52	184,1
PC(31:4)	712,49	184,1
PC(31:3)	714,51	184,1
PC(31:2)	716,52	184,1
PC(31:1)	718,54	184,1
PC(31:0)	720,55	184,1
PC(32:5)	724,49	184,1
PC(32:4)	726,51	184,1
PC(32:3)	728,52	184,1

PC(32:2)	730,54	184,1
PC(32:1)	732,55	184,1
PC(32:0)	734,57	184,1
PC(33:5)	738,51	184,1
PC(33:4)	740,52	184,1
PC(33:3)	742,54	184,1
PC(33:2)	744,55	184,1
PC(33:1)	746,57	184,1
PC(33:0)	748,59	184,1
PC(34:6)	750,51	184,1
PC(34:5)	752,52	184,1
PC(34:4)	754,54	184,1
PC(34:3)	756,55	184,1
PC(34:2)	758,57	184,1
PC(34:1)	760,59	184,1
PC(34:0)	762,6	184,1
PC(35:6)	764,52	184,1
PC(35:5)	766,54	184,1
PC(35:4)	768,55	184,1
PC(35:3)	770,57	184,1
PC(35:2)	772,59	184,1
PC(36:8)vPC(35:1)	774,51	184,1
PC(36:7)vPC(35:0)	776,52	184,1
PC(36:6)	778,54	184,1
PC(36:5)	780,55	184,1
PC(36:4)	782,57	184,1
PC(36:3)	784,59	184,1
PC(36:2)	786,6	184,1
PC(36:1)	788,62	184,1
PC(37:7)vPC(36:0)	790,54	184,1
PC(37:6)	792,55	184,1
PC(37:5)	794,57	184,1
PC(37:4)	796,59	184,1
PC(37:3)	798,6	184,1
PC(38:9)vPC(37:2)	800,52	184,1
PC(38:8)	802,54	184,1
PC(37:1)	802,63	184,1
PC(38:7)vPC(37:0)	804,55	184,1
PC(38:6)	806,57	184,1
PC(38:5)	808,59	184,1
PC(38:4)	810,6	184,1

PC(38:3)	812,62	184,1
PC(38:2)	814,63	184,1
PC(38:1)	816,65	184,1
PC(39:7) \vee PC(38:0)	818,57	184,1
PC(39:6)	820,59	184,1
PC(39:5)	822,6	184,1
PC(39:4)	824,62	184,1
PC(40:10) \vee PC(39:3)	826,54	184,1
PC(40:9) \vee PC(39:2)	828,55	184,1
PC(40:8) \vee PC(39:1)	830,57	184,1
PC(40:7) \vee PC(39:0)	832,59	184,1
PC(40:6)	834,6	184,1
PC(40:5)	836,62	184,1
PC(40:4)	838,63	184,1
PC(40:3)	840,65	184,1
PC(40:2)	842,66	184,1
PC(40:1)	844,68	184,1
PC(41:7) \vee PC(40:0)	846,6	184,1
PC(41:6)	848,62	184,1
PC(41:5)	850,63	184,1
PC(42:11) \vee PC(41:4)	852,55	184,1
PC(42:10) \vee PC(41:3)	854,57	184,1
PC(42:9) \vee PC(41:2)	856,59	184,1
PC(42:8) \vee PC(41:1)	858,6	184,1
PC(42:7) \vee PC(41:0)	860,62	184,1
PC(42:6)	862,63	184,1
PC(42:5)	864,65	184,1
PC(42:4)	866,66	184,1
PC(42:3)	868,68	184,1
PC(42:2)	870,69	184,1
PC(42:1)	872,71	184,1
PC(42:0)	874,73	184,1
PC(43:6)	876,65	184,1
PC(44:12)	878,57	184,1
PC(43:4)	880,68	184,1
PC(44:10)	882,6	184,1
PC(43:2)	884,71	184,1
PC(44:8) \vee PC(43:1)	886,63	184,1
PC(44:7)	888,65	184,1
PC(43:0)	888,74	184,1
PC(44:6)	890,66	184,1

PC(44:5)	892,68	184,1
PC(44:4)	894,69	184,1
PC(44:3)	896,71	184,1
PC(44:2)	898,73	184,1
PC(44:1)	900,74	184,1
PC(44:0)	902,76	184,1
PC(46:1)	928,77	184,1
PC(46:0)	930,79	184,1
PC(48:2)	954,79	184,1
PC(48:0)	958,82	184,1
PC(50:0)	986,85	184,1
PC(52:4)	1006,82	184,1
PC(52:0)	1014,88	184,1
LysoPE(14:1)	424,25	283,2
LysoPE(14:0)	426,26	285,3
LysoPE(15:1)	438,26	297,3
LysoPE(15:0)	440,28	299,3
LysoPE(16:1)	452,28	311,3
LysoPE(16:0)	454,29	313,3
LysoPE(17:2)	464,28	323,3
LysoPE(17:1)	466,29	325,3
LysoPE(17:0)	468,31	327,3
LysoPE(18:4)	474,26	333,3
LysoPE(18:3)	476,28	335,3
LysoPE(18:2)	478,29	337,3
LysoPE(18:1)	480,31	339,3
LysoPE(18:0)	482,32	341,3
LysoPE(19:1)	494,32	353,3
LysoPE(19:0)	496,34	355,3
LysoPE(20:5)	500,28	359,3
LysoPE(20:4)	502,29	361,3
LysoPE(20:3)	504,31	363,3
LysoPE(20:2)	506,32	365,3
LysoPE(20:1)	508,34	367,3
LysoPE(20:0)	510,36	369,4
PE(20:0)	524,33	383,3
LysoPE(21:0)	524,37	383,4
LysoPE(22:6)	526,29	385,3
LysoPE(22:5)	528,31	387,3
LysoPE(22:4)	530,32	389,3
LysoPE(22:2)	534,36	393,4

LysoPE(22:1)	536,37	395,4
LysoPE(22:0)	538,39	397,4
LysoPE(24:6)	554,32	413,3
LysoPE(24:1)	564,4	423,4
LysoPE(24:0)	566,42	425,4
PE(24:0)	580,4	439,4
PE(25:0)	594,41	453,4
PE(26:1)	606,41	465,4
PE(26:0)	608,43	467,4
PE(27:1)	620,43	479,4
PE(27:0)	622,44	481,4
PE(28:2)	632,43	491,4
PE(28:1)	634,44	493,4
PE(28:0)	636,46	495,5
PE(29:2)	646,44	505,4
PE(29:1)	648,46	507,5
PE(29:0)	650,48	509,5
PE(30:4)	656,43	515,4
PE(30:3)	658,44	517,4
PE(30:2)	660,46	519,5
PE(30:1)	662,48	521,5
PE(30:0)	664,49	523,5
PE(31:4)	670,44	529,4
PE(31:3)	672,46	531,5
PE(31:2)	674,48	533,5
PE(31:1)	676,49	535,5
PE(31:0)	678,51	537,5
PE(32:5)	682,44	541,4
PE(32:4)	684,46	543,5
PE(32:3)	686,48	545,5
PE(32:2)	688,49	547,5
PE(32:1)	690,51	549,5
PE(32:0)	692,52	551,5
PE(33:5)	696,46	555,5
PE(33:4)	698,48	557,5
PE(33:3)	700,49	559,5
PE(33:2)	702,51	561,5
PE(33:1)	704,52	563,5
PE(33:0)	706,54	565,5
PE(34:6)	708,46	567,5
PE(34:5)	710,48	569,5

PE(34:4)	712,49	571,5
PE(34:3)	714,54	573,5
PE(34:2)	716,52	575,5
PE(34:1)	718,54	577,5
PE(34:0)	720,55	579,6
PE(35:6)	722,48	581,5
PE(35:5)	724,49	583,5
PE(35:4)	726,51	585,5
PE(35:3)	728,52	587,5
PE(35:2)	730,54	589,5
PE(36:8) \vee PE(35:1)	732,46	591,5
PE(36:7)	734,48	593,5
PE(35:0)	734,57	593,6
PE(36:6)	736,49	595,5
PE(36:5)	738,51	597,5
PE(36:4)	740,52	599,5
PE(36:3)	742,54	601,5
PE(36:2)	744,55	603,6
PE(36:1)	746,57	605,6
PE(37:7) \vee PE(36:0)	748,49	607,5
PE(37:6)	750,51	609,5
PE(37:5)	752,52	611,5
PE(37:4)	754,54	613,5
PE(37:3)	756,55	615,6
PE(38:9)	758,48	617,5
PE(37:2)	758,57	617,6
PE(38:8) \vee PE(37:1)	760,49	619,5
PE(38:7) \vee PE(37:0)	762,51	621,5
PE(38:6)	764,52	623,5
PE(38:5)	766,54	625,5
PE(38:4)	768,55	627,6
PE(38:3)	770,57	629,6
PE(38:2)	772,59	631,6
PE(39:8)	774,51	633,5
PE(38:1)	774,6	633,6
PE(39:7) \vee PE(38:0)	776,56	635,6
PE(39:6)	778,54	637,5
PE(39:5)	780,55	639,6
PE(39:4)	782,57	641,6
PE(40:10) \vee PE(39:3)	784,49	643,5
PE(40:9) \vee PE(39:2)	786,51	645,5

PE(40:8)vPE(39:1)	788,52	647,5
PE(40:7)vPE(39:0)	790,54	649,5
PE(40:6)	792,55	651,6
PE(40:5)	794,57	653,6
PE(40:4)	796,59	655,6
PE(40:3)	798,6	657,6
PE(40:2)	800,62	659,6
PE(40:1)	802,63	661,6
PE(41:7)vPE(40:0)	804,55	663,6
PE(41:6)	806,57	665,6
PE(41:5)	808,59	667,6
PE(42:11)vPE(41:4)	810,51	669,5
PE(42:10)vPE(41:3)	812,52	671,5
PE(42:9)vPE(41:2)	814,54	673,5
PE(42:8)vPE(41:1)	816,55	675,6
PE(42:7)	818,57	677,6
PE(41:0)	818,66	677,7
PE(42:6)	820,59	679,6
PE(42:5)	822,6	681,6
PE(42:4)	824,62	683,6
PE(42:3)	826,63	685,6
PE(42:2)	828,65	687,6
PE(42:1)	830,66	689,7
PE(42:0)	832,68	691,7
PE(43:6)	834,6	693,6
PE(44:12)	836,52	695,5
PE(43:5)	838,63	697,6
PE(44:10)	840,55	699,6
PE(43:2)	842,66	701,7
PE(44:8)	844,59	703,6
PE(44:7)vPE(43:0)	846,6	705,6
PE(44:6)	848,62	707,6
PE(44:5)	850,63	709,6
PE(44:4)	852,65	711,6
PE(44:3)	854,66	713,7
PE(44:2)	856,68	715,7
PE(44:1)	858,69	717,7
PE(44:0)	860,71	719,7
PE(46:1)	886,73	745,7
PE(52:4)	964,77	823,8
FS(17:0)	269,25	269,25

LysoPI(12:0)	515,23	241
LysoPI(13:0)	529,24	241
LysoPI(14:1)	541,24	241
LysoPI(14:0)	543,26	241
LysoPI(15:1)	555,26	241
LysoP(15:0)	557,27	241
LysoPI(16:1)	569,27	241
LysoPI(16:0)	571,29	241
LysoPI(17:2)	581,27	241
LysoPI(17:1)	583,29	241
LysoPI(17:0)	585,3	241
LysoPI(18:4)	591,26	241
LysoPI(18:3)	593,27	241
LysoPI(18:2)	595,29	241
LysoPI(18:1)	597,3	241
LysoPI(18:0)	599,32	241
LysoPI(19:1)	611,32	241
LysoPI(19:0)	613,34	241
LysoPI(20:5)	617,27	241
LysoPI(20:4)	619,29	241
LysoPI(20:3)	621,3	241
LysoPI(20:2)	623,32	241
LysoPI(20:1)	625,34	241
LysoPI(20:0)	627,35	241
LysoPI(21:0)	641,37	241
LysoPI(22:6)	643,29	241
LysoPI(22:4)	647,32	241
LysoPI(22:2)	651,35	241
LysoPI(22:1)	653,37	241
LysoPI(22:0)	655,38	241
PI(24:0)	697,39	241
PI(25:0)	711,41	241
PI(26:1)	723,41	241
PI(26:0)	725,42	241
PI(27:1)	737,42	241
PI(27:0)	739,44	241
PI(28:2)	749,42	241
PI(28:1)	751,44	241
PI(28:0)	753,46	241
PI(29:2)	763,44	241
PI(29:1)	765,46	241

PI(29:0)	767,47	241
PI(30:4)	773,42	241
PI(30:3)	775,44	241
PI(30:2)	777,46	241
PI(30:1)	779,47	241
PI(30:0)	781,49	241
PI(31:4)	787,44	241
PI(31:3)	789,46	241
PI(31:2)	791,47	241
PI(31:1)	793,49	241
PI(31:0)	795,5	241
PI(32:5)	799,44	241
PI(32:4)	801,46	241
PI(32:3)	803,47	241
PIP(26:0)	805,39	321
PI(32:1)	805,49	241
PI(32:1)	807,5	241
PI(32:0)	809,52	241
PI(33:5)	813,49	241
PI(33:4)	815,47	241
PI(33:3)	817,49	241
PI(33:2)	819,5	241
PI(33:1)	821,52	241
PI(33:0)	823,53	241
PI(34:6)	825,46	241
PI(34:5)	827,47	241
PI(34:4)	829,49	241
PIP(28:1)	831,41	321
PI(34:3)	831,5	241
PI(34:2)	833,52	241
PIP(28:0)	833,9	321
PI(34:1)	835,53	241
PI(34:0)	837,55	241
PI(35:6)	839,47	241
PI(35:5)	841,49	241
PI(35:4)	843,5	241
PI(35:3)	845,52	241
PI(35:2)	847,53	241
PI(36:8)	849,46	241
PI(35:1)	849,55	241
PI(36:7)	851,47	241

PI(36:6)	853,49	241
PI(36:5)	855,5	241
PI(36:4)	857,52	241
PIP(30:1)	859,44	321
PI(36:3)	859,53	241
PIP(30:0)	861,45	321
PI(36:2)	861,55	241
PI(36:1)	863,57	241
PI(37:7)	865,49	241
PI(36:0)	865,58	241
PI(37:6)	867,5	241
PI(37:5)	869,52	241
PI(37:4)	871,53	241
PI(37:3)	873,55	241
PI(38:9)	875,47	241
PI(38:8)	877,49	241
PI(38:7)	879,5	241
PI(38:6)	881,52	241
PI(38:5)	883,53	241
PIP2(26:0)	885,36	321
PI(38:4)	885,55	241
PIP(32:1)	887,47	321
PI(38:3)	887,57	241
PIP(32:0)	889,48	321
PI(38:2)	889,58	241
PI(38:1)	891,6	241
PI(39:7)	893,52	241
PI(38:0)	893,61	241
PI(39:6)	895,53	241
PI(39:5)	897,55	241
PI(39:4)	899,57	241
PI(40:10)	901,49	241
PI(40:9)	903,5	241
PI(40:8)	905,52	241
PI(40:7)	907,53	241
PI(40:6)	909,55	241
PIP2(28:1)	911,37	321
PI(40:5)	911,57	241
PIP2(28:0)	913,39	321
PI(40:4)	913,58	241
PIP(34:1)	915,5	321

PI(40:3)	915,6	241
PIP(34:0)	917,52	321
PI(40:2)	917,61	241
PI(40:1)	919,63	241
PI(40:0)	921,64	241
PI(41:6)	923,57	241
PI(41:5)	925,58	241
PI(41:4)	927,6	241
PI(42:10)	929,52	241
PI(41:3)	929,61	241
PI(41:2)	931,63	241
PI(41:1)	933,64	241
PI(42:7)	935,57	241
PI(41:0)	935,66	241
PIP(36:4)	937,48	321
PI(42:6)	937,58	241
PI(42:5)	939,6	241
PIP(36:2)	941,52	321
PI(42:4)	941,61	241
PIP(36:1)	943,53	321
PI(42:3)	943,63	241
PIP(36:0)	945,55	321
PI(42:2)	945,64	241
PI(42:1)	947,66	241
PI(42:0)	949,68	241
PIP(37:4)	951,5	321
PI(43:6)	951,6	241
PI(44:12)	953,52	241
PI(43:4)	955,63	241
PI(44:10)	957,55	241
PI(43:2)	959,66	241
PI(43:1)	961,68	241
PIP(38:5)	963,5	321
PI(43:0)	963,69	241
PIP2(32:2)	965,42	321
PI(44:6)	965,61	241
PIP2(32:1)	967,44	321
PI(44:5)	967,63	241
PIP2(32:0)	969,45	321
PI(44:4)	969,64	241
PI(44:3)	971,66	241

PI(44:2)	973,68	241
PI(44:1)	975,69	241
PI(44:0)	977,71	241
PIP(40:6)	989,52	321
PIP2(34:2)	993,45	321
PIP2(34:1)	995,47	321
PIP2(34:0)	997,48	321
PIP2(36:4)	1017,45	321
PIP2(36:3)	1019,47	321
PIP2(36:2)	1021,48	321
PIP2(36:1)	1023,5	321
PIP2(36:0)	1025,51	321
PIP2(37:4)	1031,47	321
PIP2(38:5)	1043,47	321
PIP3(32:2)	1045,39	321
PIP2(38:4)	1045,48	321
PIP3(32:1)	1047,4	321
PIP3(32:0)	1049,42	321
PIP2(40:6)	1069,48	321
PIP3(34:2)	1073,42	321
PIP3(34:1)	1075,43	321
PIP3(34:0)	1077,45	321
PIP3(36:4)	1097,42	321
PIP3(36:3)	1099,43	321
PIP3(36:2)	1101,45	321
PIP3(36:1)	1103,46	321
PIP3(36:0)	1105,48	321
PIP3(37:4)	1111,43	241
PIP3(38:5)	1123,43	321
PIP4(32:2)	1125,35	321
PIP3(38:4)	1125,45	321
PIP4(32:1)	1127,37	321
PIP3(38:3)	1127,46	321
PIP4(32:0)	1129,38	321
PIP3(38:2)	1129,48	321
PIP4(34:2)	1153,38	321
PIP4(34:1)	1155,4	321
PIP4(34:0)	1157,42	321
PIP4(36:4)	1177,38	321
PIP4(36:3)	1179,4	321
PIP4(36:2)	1181,42	321

PIP4(36:1)	1183,43	321
PIP4(36:0)	1185,45	321
PIP4(38:5)	1203,4	321
PIP5(32:2)	1205,32	321
PIP4(38:4)	1205,42	321
PIP5(32:1)	1207,33	321
PIP4(38:3)	1207,43	321
PIP5(32:0)	1209,35	321
PIP4(38:2)	1209,45	321
PIP5(34:2)	1233,35	321
PIP5(34:1)	1235,37	321
PIP5(34:0)	1237,38	321
PIP(28:1)	415,2	321
PIP(28:0)	416,4	321
PIP(30:1)	429,2	321
PIP(30:0)	430,2	321
PIP(32:2)	442,2	321
PIP(32:1)	443,2	321
PIP(32:0)	444,2	321
PIP2(28:1)	455,2	321
PIP2(28:0)vPIP(34:2)	456,2	321
PIP(34:1)	457,2	321
PIP(34:0)	458,3	321
PIP(36:4)	468,2	321
PIP2(30:1)vPIP(36:3)	469,2	321
PIP2(30:0)vPIP(36:2)	470,2	321
PIP(36:1)	471,3	321
PIP(36:0)	472,3	321
PIP(38:5)	481,2	321
PIP2(32:2)vPIP(38:4)	482,2	321
PIP2(32:1)vPIP(38:3)	483,2	321
PIP2(32:0)vPIP(38:2)	484,2	321
PIP2(34:2)	496,2	321
PIP2(34:1)	497,2	321
PIP2(34:0)	498,2	321
PIP2(36:4)	508,2	321
PIP2(36:3)	509,2	321
PIP2(36:2)	510,2	321
PIP2(36:1)	511,2	321
PIP2(36:0)	512,3	321
PIP2(38:5)	521,2	321

PIP3(32:2)vPIP2(38:4)	522,2	321
PIP3(32:1)vPIP2(38:3)	523,2	321
PIP3(32:0)vPIP2(38:2)	524,2	321
PIP3(34:2)	536,2	321
PIP3(34:1)	537,2	321
PIP3(34:0)	538,2	321
PIP3(36:4)	548,2	321
PIP3(36:3)	549,2	321
PIP3(36:2)	550,2	321
PIP3(36:1)	551,2	321
PIP3(36:0)	552,2	321
PIP3(38:5)	561,2	321
PIP4(32:2)vPIP3(38:4)	562,2	321
PIP4(32:1)vPIP3(38:3)	563,2	321
PIP4(32:0)vPIP3(38:2)	564,2	321
PIP4(34:2)	576,2	321
PIP4(34:1)	577,2	321
PIP4(34:0)	578,2	321
PIP4(36:4)	588,2	321
PIP4(36:3)	589,2	321
PIP4(36:2)	590,2	321
PIP4(36:1)	591,2	321
PIP4(36:0)	592,2	321
PIP4(38:5)	601,2	321
PIP5(32:2)vPIP4(38:4)	602,2	321
PIP5(32:1)vPIP4(38:3)	603,2	321
PIP5(32:0)vPIP4(38:2)	604,2	321
PIP5(34:2)	616,2	321
PIP5(34:1)	617,2	321
PIP5(34:0)	618,2	321
PIP5(36:4)	628,2	321
PIP5(36:3)	629,2	321
PIP5(36:2)	630,2	321
PIP5(36:1)	631,2	321
PIP5(36:0)	632,2	321
PIP5(38:5)	641,2	321
PIP5(38:4)	642,2	321
PIP5(38:3)	643,2	321
PIP5(38:2)	644,2	321
LysoPS(14:1)	468,24	283,1
LysoPS(14:0)	470,25	285,2

LysoPS(15:1)	482,25	297,2
LysoPS(15:0)	484,27	299,2
LysoPS(16:1)	496,27	311,2
LysoPS(16:0)	498,28	313,2
LysoPS(17:2)	508,27	323,2
LysoPS(17:1)	510,28	325,2
LysoPS(17:0)	512,3	327,2
LysoPS(18:4)	518,25	333,2
LysoPS(18:3)	520,27	335,2
LysoPS(18:2)	522,28	337,2
LysoPS(18:1)	524,3	339,2
LysoPS(18:0)	526,31	341,2
LysoPS(19:1)	538,31	353,2
LysoPS(19:0)	540,33	355,2
LysoPS(20:5)	544,27	359,2
LysoPS(20:4)	546,28	361,2
LysoPS(20:3)	548,3	363,2
LysoPS(20:2)	550,31	365,2
LysoPS(20:1)	552,33	367,2
LysoPS(20:0)	554,35	369,2
PS(21:0)	568,32	383,2
LysoPS(21:0)	568,36	383,3
LysoPS(22:6)	570,28	385,2
LysoPS(22:4)	574,31	389,2
LysoPS(22:2)	578,35	393,2
LysoPS(22:1)	580,36	395,3
LysoPS(22:0)	582,38	397,3
PS(24:0)	624,39	439,3
PS(25:0)	638,4	453,3
PS(26:1)	650,4	465,3
PS(26:0)	652,42	467,3
PS(27:1)	664,42	479,3
PS(27:0)	666,43	481,3
PS(28:2)	676,42	491,3
PS(28:1)	678,43	493,3
PS(28:0)	680,45	495,3
PS(29:2)	690,43	505,3
PS(29:1)	692,45	507,3
PS(29:0)	694,47	509,4
PS(30:4)	700,42	515,3
PS(30:3)	702,43	517,3

PS(30:2)	704,45	519,3
PS(30:1)	706,47	521,4
PS(30:0)	708,48	523,4
PS(31:4)	714,43	529,3
PS(31:3)	716,45	531,3
PS(31:2)	718,47	533,4
PS(31:1)	720,48	535,4
PS(31:0)	722,5	537,4
PS(32:5)	726,43	541,3
PS(32:4)	728,45	543,3
PS(32:3)	732,48	547,4
PS(32:1)	734,5	549,4
PS(32:0)	736,51	551,4
PS(33:5)	740,45	555,3
PS(33:4)	742,47	557,4
PS(33:3)	744,48	559,4
PS(33:2)	746,5	561,4
PS(33:1)	748,51	563,4
PS(33:0)	750,53	565,4
PS(34:6)	752,45	567,3
PS(34:5)	754,47	569,4
PS(34:4)	756,48	571,4
PS(34:3)	758,5	573,4
PS(34:2)	760,51	575,4
PS(34:1)	762,53	577,4
PS(34:0)	764,54	579,4
PS(35:6)	766,47	581,4
PS(35:5)	768,48	583,4
PS(35:4)	770,5	585,4
PS(35:3)	772,51	587,4
PS(35:2)	774,53	589,4
PS(36:8)vPS(35:1)	776,45	591,3
PS(36:7)vPS(35:0)	778,47	593,4
PS(36:6)	780,48	595,4
PS(36:5)	782,5	597,4
PS(36:4)	784,51	599,4
PS(36:3)	786,53	601,4
PS(36:2)	788,54	603,4
PS(36:1)	790,56	605,5
PS(37:6)vPS(36:0)	792,48	607,4
PS(37:6)	794,5	609,4

PS(37:5)	796,51	611,4
PS(37:4)	798,53	613,4
PS(37:3)	800,54	615,4
PS(38:5)vPS(37:2)	802,47	617,4
PS(38:8)	804,48	619,4
PS(37:1)	804,57	619,5
PS(38:7)vPS(37:0)	806,5	621,4
PS(38:6)	808,51	623,4
PS(38:5)	810,53	625,4
PS(38:4)	812,54	627,4
PS(38:3)	814,56	629,5
PS(38:2)	816,57	631,5
PS(39:8)vPS(38:1)	818,5	633,4
PS(39:7)vPS(38:0)	820,51	635,4
PS(39:4)	822,53	637,4
PS(39:5)	824,54	639,4
PS(39:4)	826,56	641,5
PS(40:10)vPS(39:3)	828,48	643,4
PS(40:9)vPS(39:2)	830,5	645,4
PS(40:8)vPS(39:1)	832,51	647,4
PS(40:7)vPS(39:0)	834,53	649,4
PS(40:6)	836,54	651,4
PS(40:5)	838,56	653,5
PS(40:4)	840,57	655,5
PS(40:3)	842,59	657,5
PS(40:2)	844,61	659,5
PS(40:1)	846,62	661,5
PS(41:7)vPS(40:0)	848,54	663,4
PS(41:6)	850,56	665,5
PS(41:5)	852,57	667,5
PS(42:11)vPS(41:4)	854,5	669,4
PS(42:10)vPS(41:3)	856,51	671,4
PS(42:9)vPS(41:2)	858,53	673,4
PS(42:8)vPS(41:1)	860,54	675,4
PS(42:7)vPS(41:0)	862,56	677,5
PS(42:6)vPS(42:6)	864,57	679,5
PS(42:5)	866,59	681,5
PS(42:4)	868,61	683,5
PS(42:3)	870,62	685,5
PS(42:2)	872,64	687,5
PS(42:1)	874,65	689,6

PS(42:0)	876,67	691,6
PS(43:6)	878,59	693,5
PS(43:4)	882,62	697,5
PS(44:10)	884,54	699,4
PS(43:2)	886,65	701,6
PS(44:8)vPS(43:1)	888,57	703,5
PS(44:7)	890,59	705,5
PS(43:0)	890,68	705,6
PS(44:6)	892,61	707,5
PS(44:5)	894,62	709,5
PS(44:4)	896,64	711,5
PS(44:3)	898,65	713,6
PS(44:2)	900,67	715,6
PS(44:1)	902,68	717,6
PS(44:0)	904,7	719,6
SM(d30:1)	647,51	184,1
SM(d30:1)	647,51	446,4
SM(d30:0)	649,53	184,1
SM(d30:0)	649,53	448,4
SM(d31:0)	663,54	184,1
SM(d31:0)	663,54	462,4
SM(d32:2)	673,53	184,1
SM(d32:2)	673,53	472,4
SM(d32:1)	675,54	184,1
SM(d32:1)	675,54	474,4
SM(d32:0)	677,56	184,1
SM(d32:0)	677,56	476,5
SM(d33:2)	687,54	184,1
SM(d33:2)	687,54	486,4
SM(d33:1)	689,56	184,1
SM(d33:1)	689,56	488,5
SM(d33:0)	691,57	184,1
SM(d33:0)	691,57	490,5
SM(d34:2)	701,56	184,1
SM(d34:2)	701,56	500,5
SM(d34:1)	703,57	184,1
SM(d34:1)	703,57	502,5
SM(d34:0)	705,59	184,1
SM(d34:0)	705,59	504,5
SM(d35:1)	717,59	184,1
SM(d35:1)	717,59	516,5

SM(d35:0)	719,61	184,1
SM(d35:0)	719,61	518,5
SM(d36:3)	727,57	184,1
SM(d36:3)	727,57	526,5
SM(d36:2)	729,59	184,1
SM(d36:2)	729,59	528,5
SM(d36:1)	731,61	184,1
SM(d36:1)	731,61	530,5
SM(d36:0)	733,62	184,1
SM(d36:0)	733,62	532,5
SM(d37:1)	745,62	184,1
SM(d37:1)	745,62	544,5
SM(d38:3)	755,61	184,1
SM(d38:3)	755,61	554,5
SM(d38:2)	757,62	184,1
SM(d38:2)	757,62	556,5
SM(d38:1)	759,64	184,1
SM(d38:1)	759,64	558,5
SM(d38:0)	761,65	184,1
SM(d38:0)	761,65	560,6
SM(d39:2)	771,64	184,1
SM(d39:2)	771,64	570,5
SM(d39:1)	773,65	184,1
SM(d39:1)	773,65	572,6
SM(d40:3)	783,64	184,1
SM(d40:3)	783,64	582,5
SM(d40:2)	785,65	184,1
SM(d40:2)	785,65	584,6
SM(d40:1)	787,67	184,1
SM(d40:1)	787,67	586,6
SM(d40:0)	789,68	184,1
SM(d40:0)	789,68	588,6
SM(d41:2)	799,67	184,1
SM(d41:2)	799,67	598,6
SM(d41:1)	801,68	184,1
SM(d41:1)	801,68	600,6
SM(d42:3)	811,67	184,1
SM(d42:3)	811,67	610,6
SM(d42:2)	813,68	184,1
SM(d42:2)	813,68	612,6
SM(d42:1)	815,7	184,1

SM(d42:1)	815,7	614,6
SM(d42:0)	817,72	184,1
SM(d42:0)	817,72	616,6
SM(d43:2)	827,7	184,1
SM(d43:2)	827,7	626,6
SM(d43:1)	829,72	184,1
SM(d43:1)	829,72	628,6
SM(d44:2)	841,72	184,1
SM(d44:2)	841,72	640,6
SM(d44:1)	843,73	184,1
SM(d44:1)	843,73	642,6
SM(d44:0)	845,75	184,1
SM(d44:0)	845,75	644,6

Identifizierte Lipide - globale massenspektrometrische Analyse

Annotierte Lipide im negativen Modus für C6/36 basierende Proben. Detektierte Intensitäten als Mittelwert (n=2) für DENV, infizierte C6/36 und C6/36.

Lipid	RT [min]	m/z	Theoretische Masse	ppm	Intensität		
					DENV	infizierte C6/36	C6/36
PI(36:6)	4.17	853.4873	853.4872	0.0834	0.00E+00	1.36E+04	2.61E+03
PI(30:1)	4.54	779.4716	779.472	0.5672	0.00E+00	1.37E+04	3.33E+03
PI(32:1)	5.72	807.5029	807.5018	1.3286	1.76E+02	1.21E+05	1.21E+04
PE(32:1)	7.59	688.4923	688.4929	0.8414	1.79E+03	7.14E+05	1.18E+05
PC(32:2)	8.93	728.5236	728.5234	0.1952	0.00E+00	5.29E+04	2.88E+04
PE(37:1)	13.46	758.5705	758.5695	1.3326	0.00E+00	1.76E+04	7.51E+03

Annotierte Lipide im positiven Modus für C6/36 basierende Proben. Detektierte Intensitäten als Mittelwert (n=2) für DENV, infizierte C6/36 und C6/36.

Lipid	RT [min]	m/z	Theoretische Masse	ppm	Intensität		
					DENV	infizierte C6/36	C6/36
PC(14:0)	1.48	468.3085	468.3075	2.008	0.00E+00	3.75E+04	2.91E+03
PC(17:1)	1.72	508.3398	508.3396	0.2676	0.00E+00	1.71E+04	6.08E+03
PC(18:1)	1.92	522.3554	522.3542	2.3532	6.27E+02	8.50E+04	4.07E+03
PE(16:0)	1.92	454.2928	454.2914	3.224	0.00E+00	1.12E+05	3.84E+03
LysoPE(18:1)	2.01	480.3085	480.312	7.3821	0.00E+00	6.22E+04	1.67E+03
PC(18:0)	2.39	524.3711	524.374	5.6394	2.12E+02	2.89E+04	1.74E+03
PE(18:0)	2.52	482.3241	482.3228	2.8242	0.00E+00	3.21E+04	6.50E+02
PE(20:0)	3.32	510.3554	510.3576	4.3485	0.00E+00	2.97E+04	7.73E+02
PC(24:0)	3.42	622.4442	622.4431	1.793	0.00E+00	1.09E+04	4.49E+03
PC(26:1)	3.56	648.4599	648.4576	3.454	0.00E+00	7.07E+03	4.65E+03
PC(30:2)	4.57	702.5068	702.5059	1.297	0.00E+00	6.41E+04	6.96E+04
PE(28:1)	4.65	634.4442	634.4435	1.1819	0.00E+00	1.96E+04	1.31E+04
PC(29:1)	4.88	690.5068	690.5059	1.4079	0.00E+00	4.22E+04	2.10E+04
PC(36:6)	4.96	778.5381	778.5372	1.2347	0.00E+00	7.16E+04	2.10E+04
PI(36:5)	5.05	879.4994	879.496	3.8262	0.00E+00	1.56E+04	8.88E+02
PC(34:4)	5.09	754.5381	754.5369	1.6785	0.00E+00	1.37E+04	4.21E+03
PC(31:2)	5.19	716.5225	716.5259	4.7413	0.00E+00	3.41E+04	9.26E+03
PC(28:0)	5.29	678.5068	678.5066	0.3534	2.11E+02	4.92E+05	9.87E+04
PC(29:1)	5.31	690.5068	690.506	1.1428	0.00E+00	6.16E+03	5.18E+03
PE(36:6)	5.32	736.4912	736.4929	2.2776	0.00E+00	1.76E+04	4.81E+03
PC(38:7)	5.44	804.5538	804.5526	1.4536	0.00E+00	1.47E+04	1.26E+04
PC(30:1)	5.45	704.5225	704.5232	1.0102	1.11E+03	1.45E+06	2.24E+05

PC(30:1)	5.46	742.4784	742.483	6.2879	0.00E+00	2.69E+04	3.80E+03
PE(31:2)	5.58	674.4755	674.4809	7.9537	0.00E+00	2.73E+03	9.05E+02
PC(37:6)	5.61	792.5538	792.5523	1.8606	0.00E+00	1.10E+04	6.98E+03
PC(32:2)	5.65	730.5381	730.538	0.2297	2.12E+03	2.45E+06	6.04E+05
PE(28:0)	5.67	636.4599	636.4595	0.5462	0.00E+00	3.45E+04	7.58E+03
PI(32:1)	5.7	809.5175	809.5164	1.2815	0.00E+00	4.31E+04	3.12E+03
PC(29:0)	5.71	692.5225	692.5223	0.2943	0.00E+00	3.00E+04	3.38E+03
PI(36:4)	5.85	859.5331	859.5292	4.5026	0.00E+00	1.75E+04	2.15E+03
PI(34:2)	5.88	835.5331	835.5311	2.3674	0.00E+00	2.72E+04	4.30E+03
PE(30:1)	5.9	662.4755	662.4745	1.5761	2.50E+02	1.81E+05	4.32E+04
PE(32:2)	6.09	688.4912	688.4922	1.5498	0.00E+00	3.38E+05	9.15E+04
PE(36:5)	6.22	738.5068	738.5066	0.3247	0.00E+00	1.48E+04	6.36E+03
PC(33:2)	6.41	744.5538	744.5535	0.423	0.00E+00	7.18E+05	2.69E+05
PE(34:3)	6.46	714.5068	714.5062	0.9335	0.00E+00	3.17E+04	7.22E+03
PE(36:5)	6.56	738.5068	738.506	1.1511	0.00E+00	5.35E+04	9.52E+03
PC(30:0)	6.73	706.5381	706.5378	0.4103	1.24E+03	1.17E+06	1.07E+05
PE(31:1)	6.73	676.4912	676.4906	0.8587	0.00E+00	1.82E+04	7.81E+03
PC(30:0)	6.75	706.5381	706.5361	2.9155	0.00E+00	1.16E+04	5.58E+02
PC(30:0)	6.75	744.494	744.4884	7.5358	6.11E+01	2.51E+04	1.77E+03
PE(38:6)	6.77	764.5225	764.5251	3.4856	0.00E+00	3.00E+04	8.34E+03
PE(36:4)	6.97	740.5225	740.5188	4.9732	0.00E+00	1.69E+04	3.00E+03
PC(32:1)	7.01	732.5538	732.5529	1.2631	0.00E+00	5.71E+04	8.14E+03
PE(37:5)	7.07	752.5225	752.5237	1.5947	0.00E+00	4.37E+03	3.69E+03
PC(34:2)	7.27	758.5694	758.5693	0.2069	3.71E+03	3.75E+06	6.55E+05
PC(31:0)	7.3	720.5538	720.5527	1.5383	0.00E+00	5.61E+04	3.46E+03
PE(30:0)	7.31	664.4912	664.4907	0.6905	0.00E+00	6.62E+04	9.71E+03
PE(35:3)	7.37	728.5225	728.5231	0.8932	0.00E+00	5.56E+03	5.02E+03
PE(34:4)	7.49	712.4912	712.4896	2.2716	0.00E+00	6.29E+03	9.70E+02
PI(36:2)	7.51	863.5644	863.5631	1.5005	0.00E+00	9.18E+03	8.31E+02
PC(40:6)	7.52	834.6007	834.601	0.2638	0.00E+00	9.48E+03	3.53E+03
PE(32:1)	7.63	690.5068	690.5073	0.7135	0.00E+00	4.57E+04	4.17E+03
PE(32:1)	7.63	712.4888	712.489	0.2513	6.50E+02	2.36E+05	4.83E+04
PC(31:0)	7.68	720.5538	720.5538	0.0136	4.90E+02	2.17E+04	3.34E+03
SM(36:2)	7.71	729.5905	729.5891	1.9056	0.00E+00	2.93E+05	4.59E+03
PE(36:4)	7.74	740.5225	740.5214	1.5115	0.00E+00	1.25E+05	3.09E+04
PE(34:2)	7.88	716.5225	716.5216	1.2214	0.00E+00	1.59E+04	2.21E+03
PE(31:0)	7.9	678.5068	678.5062	0.9831	0.00E+00	1.11E+04	1.22E+03
PC(33:1)	7.96	746.5694	746.5687	1.0278	5.77E+02	6.04E+05	3.31E+05
PC(33:1)	8	746.5694	746.5684	1.3548	0.00E+00	3.59E+03	4.59E+03
PC(O- 14:0/18:1(9Z))	8.16	718.5745	718.5743	0.2455	0.00E+00	1.14E+04	6.02E+03

PE(33:1)	8.22	704.5225	704.522	0.7224	0.00E+00	1.80E+04	2.47E+03
PE-Cer(36:2)	8.26	687.5436	687.5425	1.4689	0.00E+00	1.48E+05	1.14E+04
PE(36:3)	8.27	742.5381	742.5378	0.4726	0.00E+00	4.51E+04	8.22E+03
PC(O- 16:0/18:2(9Z,12Z))	8.34	744.5902	744.5889	1.7461	0.00E+00	1.46E+04	4.35E+03
PE(38:5)	8.52	766.5381	766.538	0.1393	0.00E+00	1.41E+04	1.65E+03
PC(36:3)	8.57	784.5851	784.5826	3.1103	6.09E+01	6.22E+03	1.94E+03
PE(33:1)	8.67	704.5225	704.5222	0.4625	3.38E+01	9.61E+04	4.82E+04
SM(36:1)	8.76	731.6062	731.6057	0.5998	0.00E+00	2.05E+03	0.00E+00
PE(35:2)	8.95	730.5381	730.5383	0.2716	0.00E+00	1.14E+05	4.18E+04
PC(34:1)	8.98	760.5851	760.5839	1.5233	0.00E+00	1.11E+05	0.00E+00
PE-Cer(36:1)	9.26	689.5592	689.5573	2.8286	0.00E+00	9.84E+04	2.79E+04
PE-Cer(37:2)	9.39	701.5592	701.559	0.2573	0.00E+00	3.73E+03	6.70E+02
PE(32:0)	9.45	692.5225	692.5239	1.9972	3.08E+02	4.41E+04	9.15E+03
SM(36:0)	9.56	733.6218	733.6163	7.5376	0.00E+00	1.20E+04	5.37E+03
PE(34:1)	9.83	718.5381	718.5372	1.3378	0.00E+00	3.73E+04	0.00E+00
PE(36:2)	10.07	744.5538	744.553	1.0788	0.00E+00	9.16E+05	7.37E+04
PE(33:0)	10.15	706.5381	706.5366	2.2244	0.00E+00	8.60E+03	2.39E+02
PC(35:1)	10.35	774.6007	774.5992	2.0008	0.00E+00	3.20E+04	1.47E+04
PE(35:1)	10.57	732.5538	732.5531	0.9299	0.00E+00	1.14E+04	1.70E+03
PE-Cer(38:2)	10.67	715.5749	715.5738	1.4814	0.00E+00	6.33E+04	5.50E+03
PE(35:1)	11.26	732.5538	732.5531	0.9299	0.00E+00	1.68E+04	3.43E+03
PE-Cer(38:1)	11.84	717.5905	717.5891	2.0225	0.00E+00	1.66E+04	1.07E+04
PE(36:1)	12.78	746.5694	746.5692	0.3737	6.47E+02	4.82E+05	2.84E+04
DG(30:0)	12.88	563.4646	563.4644	0.3139	0.00E+00	2.27E+04	3.91E+02
PC(37:1)	13.21	802.632	802.6323	0.2879	1.23E+02	4.11E+04	2.34E+04
DG(32:1)	13.22	589.4802	589.4813	1.7282	1.38E+03	2.63E+05	2.27E+04
PE(38:2)	13.23	772.5851	772.587	2.4505	0.00E+00	3.16E+04	4.62E+03
PE(37:1)	13.28	760.5851	760.5859	1.1249	0.00E+00	6.64E+03	8.37E+02
SM(42:2)	13.41	813.6844	813.6829	1.8935	3.89E+02	5.80E+04	5.96E+04
SM(40:1)	13.43	787.6688	787.6674	1.6917	3.88E+02	5.85E+04	7.50E+04
DG(38:6)	13.48	641.514	641.5166	4.1309	1.13E+03	1.34E+04	6.00E+03
PE-Cer(40:1)	13.58	745.6218	745.6149	9.2991	0.00E+00	1.64E+04	1.98E+04
DG(33:1)	13.62	603.4959	603.4985	4.3772	0.00E+00	1.99E+04	7.85E+03
PE(36:0)	13.68	748.5851	748.5814	4.9721	0.00E+00	1.27E+04	4.86E+03
SM(40:0)	13.7	789.6844	789.6778	8.3662	0.00E+00	5.97E+03	5.89E+03
PE(38:1)	13.75	774.6007	774.5993	1.8432	0.00E+00	9.90E+05	8.47E+04
PE(38:1)	13.75	796.5827	796.5854	3.4839	0.00E+00	9.82E+04	8.67E+03
DG(34:1)	13.93	617.5115	617.5127	1.8651	0.00E+00	2.26E+05	2.19E+04
Cer(38:1)	13.97	594.582	594.5815	0.8234	0.00E+00	3.68E+04	1.76E+04
SM(42:1)	14.06	815.7001	815.6979	2.6678	0.00E+00	2.84E+04	3.46E+04

PC(40:1)	14.1	844.679	844.6768	2.6336	5.14E+01	1.18E+04	2.25E+03
Cer(38:0)	14.21	596.5976	596.5969	1.2719	0.00E+00	1.00E+04	8.18E+03
DG(38:1)	15	673.5741	673.5737	0.6138	0.00E+00	1.14E+05	2.12E+03
TG(46:2)	15.95	797.663	797.6615	1.8302	4.98E+02	8.36E+04	5.63E+04
TG(48:3)	16	839.6525	839.6551	3.0266	5.26E+02	2.49E+04	4.73E+04
TG(54:6)	16.3	917.6995	917.6994	0.1061	0.00E+00	4.09E+03	5.13E+03
TG(50:3)	16.31	867.6838	867.6835	0.3647	9.70E+02	3.51E+04	5.21E+04
TG(48:1)	16.57	827.7099	827.7098	0.0849	8.45E+02	1.23E+05	1.58E+04
TG(50:2)	16.59	853.7256	853.7253	0.3262	6.43E+03	9.26E+04	4.58E+04
TG(50:1)	16.85	855.7412	855.7385	3.2077	1.25E+03	9.20E+04	1.13E+04

Annotierte Lipide im negativen Modus für Huh7.5.1 basierende Proben. Detektierte Intensitäten als Mittelwert (n=2) für DENV, infizierte Huh7.5.1 und Huh7.5.1.

Lipid	RT [min]	m/z	Theoretische Masse	ppm	Intensität		
					DENV	infizierte Huh7.5.1	Huh7.5.1
PE(38:4)	10.06	766.5392	766.5404	1.5335	1.39E+03	6.38E+03	1.07E+04
PE(36:2)	10.08	742.5392	742.5398	0.7611	5.41E+02	4.01E+03	1.10E+04
PE(38:3)	12.06	768.5549	768.5545	0.4885	1.61E+03	6.05E+03	2.04E+04
PE(36:1)	12.63	744.5549	744.5536	1.6519	7.73E+02	2.59E+03	1.39E+04

Annotierte Lipide im positiven Modus für Huh7.5.1 basierende Proben. Detektierte Intensitäten als Mittelwert (n=2) für DENV, infizierte Huh7.5.1 und Huh7.5.1.

Lipid	RT [min]	m/z	Theoretische Masse	ppm	Intensität		
					DENV	infizierte Huh7.5.1	Huh7.5.1
PC(16:1)	1.54	494.3241	494.324	0.2862	5.41E+02	1.82E+04	1.21E+04
PC(15:0)	1.64	482.3241	482.3245	0.7823	6.12E+03	7.91E+03	7.03E+03
PC(16:0)	1.85	496.3398	496.3391	1.4423	2.66E+03	9.09E+04	7.13E+04
PC(18:1)	1.87	522.3554	522.3543	2.1195	2.01E+03	2.87E+04	5.12E+04
PE(18:1)	1.91	480.3085	480.3072	2.5933	0.00E+00	1.69E+03	2.81E+03
PE(16:0)	1.92	454.2928	454.2936	1.8142	0.00E+00	4.23E+03	2.05E+03
PC(17:0)	1.94	510.3554	510.3559	0.9401	0.00E+00	4.74E+03	3.60E+03
PC(28:0)	5.29	678.5068	678.5068	0.0835	4.43E+02	2.17E+04	1.41E+04
PC(30:1)	5.47	704.5225	704.5229	0.5771	7.56E+02	6.31E+03	1.78E+04
PC(30:1)	5.66	704.5225	704.5215	1.3289	9.58E+02	6.57E+04	8.15E+03
SM(33:1)	5.77	689.5592	689.5547	6.5462	1.08E+03	1.35E+05	8.55E+04
PC(32:2)	5.84	730.5381	730.5371	1.3994	7.37E+02	1.17E+05	2.89E+04
PC(29:0)	5.95	692.5225	692.5221	0.5587	2.45E+02	1.75E+04	5.91E+03
PC(36:5)	6.06	780.5538	780.5518	2.5148	8.03E+02	5.38E+04	9.66E+03

SM(34:1)	6.13	703.5749	703.5743	0.7259	2.48E+02	1.13E+03	1.13E+04
PC(31:1)	6.16	718.5381	718.5372	1.3378	4.39E+02	3.45E+04	1.05E+04
PC(34:3)	6.24	756.5538	756.5524	1.8685	1.10E+03	8.86E+04	1.50E+04
SM(33:0)	6.35	691.5749	691.5729	2.7684	2.99E+02	1.14E+04	1.97E+04
PC(33:2)	6.6	744.5538	744.5541	0.3967	3.71E+02	4.16E+04	8.85E+03
PC(31:1)	6.74	718.5381	718.5372	1.2529	1.80E+02	1.39E+04	7.35E+03
PC(30:0)	6.75	706.5381	706.537	1.6197	3.22E+03	4.30E+05	1.16E+05
PC(33:2)	6.85	744.5538	744.5531	0.9149	0.00E+00	4.15E+04	8.93E+03
SM(34:0)	7.22	705.5905	705.5889	2.3164	2.20E+03	2.05E+05	1.48E+05
PC(32:1)	7.28	732.5538	732.553	1.0132	0.00E+00	2.87E+04	4.49E+03
PC(32:1)	7.28	754.5357	754.5344	1.8037	0.00E+00	7.36E+04	5.54E+03
PE(38:6)	7.28	764.5225	764.5255	3.8848	0.00E+00	5.84E+04	4.04E+03
PC(38:5)	7.34	808.5851	808.5834	2.1122	2.07E+03	2.09E+05	4.39E+04
SM(35:1)	7.45	717.5905	717.5894	1.5972	4.13E+02	3.19E+04	7.73E+03
PC(34:2)	7.49	758.5694	758.5692	0.3678	0.00E+00	1.16E+04	2.94E+03
PC(34:2)	7.49	780.5514	780.55	1.7757	8.31E+02	8.11E+04	1.80E+04
PE(32:1)	7.64	690.5068	690.5062	0.966	7.11E+02	4.15E+04	9.34E+03
PC(32:1)	7.66	732.5538	732.5526	1.5964	1.47E+03	1.65E+05	8.36E+04
PE(34:2)	7.78	716.5225	716.5242	2.3562	0.00E+00	4.79E+04	9.49E+03
SM(35:0)	7.81	719.6062	719.6032	4.0873	0.00E+00	9.17E+03	1.07E+04
PC(33:1)	7.89	746.5694	746.5686	1.1095	0.00E+00	3.99E+03	2.39E+03
PE(38:5)	7.94	766.5381	766.5375	0.7763	4.99E+02	1.58E+05	7.20E+03
PC(33:1)	8.26	746.5694	746.5685	1.273	1.34E+03	1.54E+05	4.62E+04
SM(36:1)	8.5	731.6062	731.605	1.6009	9.36E+02	7.51E+04	2.01E+04
PC(40:6)	8.68	834.6007	834.5993	1.7107	1.14E+03	8.71E+04	1.64E+04
PC(32:0)	8.72	734.5694	734.5706	1.6143	0.00E+00	9.50E+03	4.48E+03
PC(38:4)	8.82	810.6007	810.6	0.8578	2.95E+03	4.88E+05	1.39E+05
PC(34:1)	8.99	760.5851	760.5844	0.9615	0.00E+00	2.90E+04	4.61E+03
PE(38:4)	9.04	768.5538	768.5526	1.5216	0.00E+00	2.50E+04	2.67E+03
PC(36:2)	9.25	786.6007	786.5999	1.0392	1.04E+04	8.42E+05	4.81E+05
PC(38:4)	9.26	810.6007	810.5998	1.159	2.67E+03	4.07E+05	6.57E+04
PE(36:3)	9.34	742.5381	742.5375	0.8014	6.46E+02	1.46E+05	1.08E+04
SM(36:0)	9.4	733.6218	733.6213	0.7155	1.98E+02	1.03E+04	8.29E+03
PC(33:0)	9.41	748.5851	748.5846	0.6508	2.19E+03	3.57E+05	9.27E+04
PC(34:1)	9.43	760.5851	760.5845	0.7208	4.70E+03	5.91E+05	1.21E+05
PE(40:6)	9.48	792.5538	792.5543	0.6807	3.79E+02	7.93E+04	4.73E+03
PE(38:4)	9.59	768.5538	768.5541	0.3843	5.51E+02	2.06E+05	9.59E+03
PC(38:3)	9.68	812.6164	812.6118	5.6936	9.46E+02	9.15E+04	3.56E+04
PC(37:3)	9.81	798.6007	798.5989	2.3228	7.80E+02	1.38E+05	3.53E+04
PE(34:1)	9.81	718.5381	718.5377	0.5733	5.28E+02	4.59E+04	1.28E+04
PC(33:0)	9.89	748.5851	748.5842	1.2215	0.00E+00	4.42E+04	1.34E+04

PE(36:2)	10.07	744.5538	744.5533	0.587	0.00E+00	5.67E+04	1.42E+04
PE(38:4)	10.07	768.5538	768.5526	1.5216	9.87E+02	3.28E+05	1.66E+04
PC(35:1)	10.24	774.6007	774.5995	1.5281	1.48E+03	1.34E+05	5.42E+04
PC(36:2)	10.4	786.6007	786.5992	1.9703	3.38E+02	4.87E+04	2.72E+04
PC(37:2)	10.4	800.6164	800.6147	2.1196	5.13E+02	0.00E+00	1.11E+04
SM(40:2)	11.09	785.6531	785.6507	3.0625	3.82E+02	3.11E+04	1.90E+04
SM(38:1)	11.15	759.6375	759.6354	2.7327	5.42E+02	2.78E+04	1.02E+04
PE(35:1)	11.19	732.5538	732.5496	5.7623	0.00E+00	8.00E+03	1.75E+03
PC(34:0)	11.23	762.6007	762.5987	2.6726	1.41E+03	1.53E+05	9.26E+04
PC(40:4)	11.26	838.632	838.6287	3.9457	2.37E+02	1.82E+04	6.85E+03
PC(36:1)	11.63	788.6164	788.6155	1.0683	1.18E+04	1.47E+06	4.84E+05
PE(38:3)	12.07	770.5694	770.5681	1.7086	1.33E+03	4.55E+05	3.21E+04
PC(35:0)	12.13	776.6164	776.6124	5.093	6.85E+02	1.10E+05	2.30E+04
PE(36:1)	12.66	746.5694	746.567	3.3169	0.00E+00	4.39E+04	1.69E+04
PC(40:3)	13.21	840.6477	840.6463	1.6427	3.60E+02	2.52E+04	8.59E+03
SM(40:1)	13.44	787.6688	787.6674	1.6917	2.75E+03	2.55E+05	1.13E+05
PC(38:1)	13.49	816.6477	816.6489	1.4481	5.95E+02	5.48E+04	2.27E+04
SM(43:2)	13.62	827.7001	827.6979	2.5554	5.05E+02	3.13E+04	1.96E+04
SM(41:1)	13.78	801.6844	801.6807	4.5865	1.03E+03	8.33E+04	2.95E+04
DG(34:3)	13.86	591.4983	591.5009	4.4194	1.23E+03	5.72E+04	1.41E+04
SM(44:2)	14.01	841.7157	841.7135	2.6151	2.84E+02	1.39E+04	9.55E+03
SM(42:1)	14.06	815.7001	815.6977	2.8923	2.60E+03	2.53E+05	8.57E+04
TG(50:3)	16.33	867.6838	867.6823	1.7715	4.51E+03	5.35E+04	4.79E+04
TG(51:3)	16.48	881.6995	881.6985	1.1488	9.46E+02	1.31E+04	1.27E+04
TG(54:5)	16.5	919.7151	919.7153	0.1987	2.82E+03	3.06E+04	2.57E+04
TG(50:2)	16.59	869.6995	869.7003	0.8706	6.82E+03	4.98E+04	4.53E+04
TG(52:3)	16.63	895.7151	895.7126	2.8623	8.64E+03	5.22E+04	4.75E+04
TG(51:2)	16.72	883.7151	883.7145	0.7601	2.08E+03	1.79E+04	1.65E+04
TG(52:2)	16.87	881.7569	881.7557	1.3417	0.00E+00	1.06E+03	8.06E+02

Annotierte Lipide des internen Standards SPLASH® LIPIDOMIX® Mass Spec Standard. Intensitäten sind Mittelwerte (n=12).

Lipid	RT [min]	m/z	Theoretische Masse	ppm	Polarität	Intensität
PC(15:0/18:1(d7))	7.84	753.6139	752.6061	0.2923	Positiv	2.12E+04
PE(15:0/18:1(d7))	8.51	711.5652	710.5591	1.8999	Positiv	2.00E+04
LysoPE(18:1(d7))	2	487.352	486.3451	0.699	Positiv	3.40E+04
SM(d18:1/18:1(d7))	6.76	738.6462	737.6397	1.1117	Positiv	3.31E+05
DAG(15:0/18:1(d7))	13.58	610.539	587.5506	1.1743	Positiv	9.21E+04
TAG(15:0/18:1(d7)/15:0)	16.53	834.7513	811.7646	3.092	Positiv	2.47E+05
PC(15:0/18:1(d7))	13.92	751.5151	752.6061	6.623	Negativ	3.97E+05

ANHANG

PE(15:0/18:1(d7))	8.51	709.5517	710.5591	0.2252	Negativ	9.89E+03
PI(15:0/18:1(d7))	6.36	829.526	829.5698	0.5907	Negativ	1.37E+04

Publikationen

W. Elgaher, M. M. Hamed, S. Baumann, J. Hermann, L. Siebenbürger, J. Krull, K. Cirnski, A. Kirschning, M. Brönstrup, R. W. Hartmann, *Cystobactamid 507: Concise Synthesis, Mode of Action and Optimization toward More Potent Antibiotics*, Chem. Eur. J., 2020, 26, 7219-7225.

G. Testolin, K. Cirnski, K. Rox, H. Prochnow, V. Fetz, C. Grandclaudon, T. A. Mollner, A. Baiyoumy, A. Ritter, C. Leitner, J. Krull, J. van den Heuvel, A. Vassort, S. Sordello, M. Hamed, W. Elgaher, J. Herrmann, R. Hartmann, R. Müller and M. Brönstrup, *Synthetic studies of cystobactamids as antibiotics and bacterial imaging carriers lead to compounds with high in vivo efficacy*, Chem. Sci., 2020, 11, 1316-1334.

Posterbeiträge

"The efficacy of the broad-spectrum antiviral labyrinthopeptin depends on the viral lipid composition", EMBO Workshop, Chemical Biology 2020, 03-05. September 2020, Heidelberg, Deutschland.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Jana Krull
Geburtsdatum/-ort 10.11.1993 in Wolfenbüttel

Studium und Ausbildung

Jul. 2021 - heute
London School of Hygiene and Tropical Medicine
Postdoctoral Research Assistant
Department of Infection Biology
Gruppe von Anil Koul

Nov. 2017 - Apr. 2021
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
Promotion
Abteilung Chemische Biologie
Betreuer: Prof. Dr. Mark Brönstrup
Titel der Arbeit: *Charakterisierung von Wirkmechanismen der peptidischen Naturstoffe Labyrinthopeptin und Cystobactamid*

Okt. 2015 - Aug. 2017
Technische Universität Braunschweig
M.Sc. in Biotechnologie
Betreuer: Prof. Dr. Rainer Krull
Titel der Arbeit: *Cultivation of Staphylococcus carnosus at micro-scale - Influence of different reactor performances*
Abschlussnote: 1,5 (sehr gut)

Okt. 2016 - Dez. 2016
University College London
Forschungspraktikum
Betreuer: Prof. Dr. Nikolas Szita

Okt. 2012 - Sep. 2015
Technische Universität Braunschweig
B. Sc. in Biotechnologie
Betreuer: Prof. Dr. Rainer Krull
Titel der Arbeit: *Biotechnologische Produktion des Antikörperfragments D1.3scFV in Bacillus sp.*
Abschlussnote: 1,7 (gut)

Jun. 2012
Wilhelm-Gymnasium Braunschweig
Abitur
Abschlussnote: 1,8 (gut)