

**Identifizierung und Charakterisierung
neuer antimikrobieller Inhibitoren
der zellfreien prokaryotischen
Transkriptions-/Translationsreaktion**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe – Universität
in Frankfurt am Main

von Markus Weidlich
aus Mannheim

Frankfurt am Main (2008)

(D 30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe – Universität Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan: Herr Professor Dr. Dieter Steinhilber
Gutachter: Herr Professor Dr. Michael Karas
Herr Professor Dr. Torsten Stein

Datum der Disputation:

Meiner Familie und meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die globale bakterielle Resistenzentwicklung gegen Antibiotika	1
1.2 Die antimikrobielle Wirkstoffsuche	2
1.2.1 Geschichtlicher Hintergrund	2
1.2.2 Strategien zum Auffinden neuer antimikrobieller Wirkstoffe	3
1.2.2.1 Chemische Modifikation bekannter antimikrobieller Wirkstoffe	3
1.2.2.2 Klassische und moderne Screening-Ansätze	5
1.3 Das bakterielle Ribosom als Zielstruktur antimikrobieller RNA-Liganden	7
1.3.1 Der Prozess der prokaryotischen Translation	7
1.3.2 Interaktion antimikrobieller Translationsinhibitoren am prokaryotischen Ribosom	10
1.3.2.1 Wirkmechanismen ausgewählter Stoffklassen prokaryotischer Translationsinhibitoren	11
1.3.2.1.1 Aminoglykosid-Antibiotika	11
1.3.2.1.2 Makrolid-Antibiotika	12
1.3.2.1.3 Tetrazykline	13
1.3.2.1.4 Chloramphenicol	14
1.4 Die zellfreie Proteinbiosynthese	15
1.4.1 Vor- und Nachteile der zellfreien Proteinbiosynthese	15
1.4.2 Unterschiedliche Systeme der zellfreien Proteinbiosynthese	16
1.4.2.1 Bakterielle und eukaryotische zellfreie Translationssysteme	16
1.4.2.2 <i>Batch- versus Continuous-Design</i>	17
1.5 Grünes Fluoreszierendes Protein (GFP) als Reporterprotein	20
1.6 Methoden der Proteomanalytik	24
1.6.1 Die Analyse des bakteriellen Proteoms zur Charakterisierung antimikrobieller Wirkmechanismen	25
1.6.2 Die zweidimensionale Gelelektrophorese	27
1.6.2.1 Isoelektrische Fokussierung – 1. Dimension	27
1.6.2.2 PAGE bzw. SDS-PAGE – 2. Dimension	29
1.6.3 Die Massenspektrometrie in der Bioanalytik	30
1.6.3.1 MALDI - <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>	31
1.6.3.2 Der Flugzeitmassenanalysator – TOF (<i>time-of-flight</i>)	33
1.6.4 <i>Bottom-up proteomics</i>	36
1.6.5 Die Gel-basierte proteomanalytische Quantifizierung	39
1.7 Zielsetzung der Arbeit	43

2. Material und Methoden	45
2.1 Material	45
2.1.1 Bakterienstämme	45
2.1.2 Eukaryotische Zelllinie	46
2.1.3 Nährmedien	46
2.1.4 Plasmid	47
2.1.5 Antibiotika	48
2.1.6 Naturstoffe	48
2.1.7 Lösungsmittel und Chemikalien	49
2.1.8 Enzyme	49
2.1.9 Kits	49
2.2 Methoden	49
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	49
2.2.1.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α -Zellen	50
2.2.1.2 Transformation von pIVEX2.3-GFP	50
2.2.1.3 Präparative Plasmidisolierung	51
2.2.1.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	52
2.2.2 Mikrobiologische Methoden	52
2.2.2.1 Bestimmung der MHK durch Anwendung der Bouillon-Mikrodilutionsmethode	52
2.2.2.2 Bestimmung der MHK gegen humanpathogene und resistente Mikroorganismen	53
2.2.2.3 Bestimmung der IC ₅₀ gegen <i>B. subtilis</i> 168 unter aeroben Wachstumsbedingungen	54
2.2.2.4 Gewinnung roher bakterieller Kulturüberstände	54
2.2.3 Bestimmung der Zytotoxizität und Wachstumsinhibition gegen eukaryotische NALM-6-Zellen	54
2.2.4 Der zellfreie gekoppelte prokaryotische Transkriptions-/Translationsassay	56
2.2.5 Bestimmung der Assayqualität	58
2.2.6 Bestimmung der Linearität im Messbereich	60
2.2.7 Fluoreszenzspektroskopie	60
2.2.8 Absorptionsspektroskopie	61
2.2.9 Affinitätschromatographische Aufreinigung	61
2.2.10 2D-DIGE-Studien	62
2.2.10.1 Anzuchtbedingungen	64
2.2.10.2 Herstellung des bakteriellen Zelllysats	64
2.2.10.3 Proteinquantifizierung	65
2.2.10.4 Fluoreszenzmarkierung der Proteine (<i>labeling</i>)	65
2.2.10.5 Versuchsaufbau der DIGE-Experimente	66
2.2.11 1D-SDS-PAGE	67
2.2.12 2D-SDS-PAGE	68
2.2.12.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF) – 1. Dimension	68
2.2.12.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) – 2. Dimension	70
2.2.13 Färbemethoden	72
2.2.13.1 Silberfärbung	72
2.2.13.2 Kolloidale Coomassiefärbung	73
2.2.13.3 Fluoreszenzfärbung mit RuBPS	75
2.2.14 Elektronische Methoden	76
2.2.14.1 Scannen der Gele	76

2.2.14.2 Softwaregestützte Auswertung der 2D-DIGE-Gele	77
2.2.15 Ausstechen bzw. Ausschneiden der Proteinspots	78
2.2.16 Tryptischer Verdau der Proteine	78
2.2.17 Massenspektrometrische Proteinidentifizierung	80
2.2.17.1 Aufreinigung per ZipTip [®] _{μ-C18}	80
2.2.17.2 „Dried-droplet“-Präparation	80
2.2.18 MALDI-TOF-MS	81
2.3 Kooperationsprojekte	82
3. Ergebnisse	85
3.1 Optimierung, Validierung und Charakterisierung des ZFTT-Assays	85
3.1.1 Optimierung der Salzkonzentrationen	85
3.1.2 Optimierung der Plasmidkonzentration	86
3.1.3 DMSO-Kompatibilitätsprüfung	87
3.1.4 Identifizierung selektiver Inhibitoren der ZFTT-Reaktion	88
3.1.5 Bestimmung der Assayqualität	92
3.1.6 Bestimmung der Linearität im Messbereich	94
3.2 Bestimmung unterschiedlicher Aktivitätsprofile von Translationsinhibitoren unter zellfreien und Ganzzellbedingungen	95
3.3 Identifizierung neuer antimikrobieller Inhibitoren der ZFTT-Reaktion unter Anwendung virtueller Screeningverfahren	99
3.3.1 Bestimmung der ZFTT-Assayaktivität potentieller ribosomaler A-Site Liganden	99
3.3.2 Identifizierung neuer potentieller RNA-Liganden im ZFTT-Assay	101
3.3.2.1 Bestimmung der ZFTT-Aktivität potentieller RNA-Liganden (Specs-Substanzen)	102
3.3.2.2 Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes von Substanz 31 im ZFTT-Assay	104
3.3.2.3 Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung von Substanz 31	105
3.3.2.4 Bestimmung des antimikrobiellen Potentials der Specs-Substanzen	107
3.3.2.5 Bestimmung des antimikrobiellen Potentials von Substanz 31 gegen humanpathogene Bakterienstämme	109
3.3.2.6 Bestimmung der ZFTT-Aktivität potentieller RNA-Liganden (ASINEX-Substanzen)	110
3.3.2.7 Bestimmung des antimikrobiellen Potentials der ASINEX-Substanzen gegen humanpathogene und multiresistente bakterielle Teststämme	111
3.4 Identifizierung und Charakterisierung neuer antimikrobieller Tripeptide	112
3.4.1 Identifizierung aktiver Tripeptide im ZFTT-Assay	112
3.4.2 IC ₅₀ -Werte aktiver Tripeptide im ZFTT-Assay	115
3.4.3 Antimikrobielles Potential gegen <i>B. subtilis</i> 168	116
3.4.4 Antimikrobielles Potential ZFTT-aktiver Tripeptide gegen humanpathogene Teststämme	118
3.4.5 IC ₅₀ -Wert des Tripeptids G12 gegen <i>B. subtilis</i> 168	118
3.4.6 Zytotoxizität der Tripeptide G10, G11, G12 und G27 gegen eukaryotische NALM-6-Zellen	121
3.5 Pentazyklische Triterpene als antimikrobielle Inhibitoren der ZFTT-Reaktion	125

3.5.1 ZFTT-Aktivität von Boswelliasäuren	125
3.5.2 Struktur-Wirkungsbeziehung ausgewählter pentazyklischer Triterpene	127
3.5.3 Antimikrobielles Profils ZFTT-aktiver pentazyklischer Triterpene	129
3.6 Bakterielle Kulturüberstände als Quelle antimikrobieller ZFTT-Inhibitoren	131
3.6.1 ZFTT-Aktivität von Nisin und Surfactin	131
3.6.2 ZFTT-Aktivität bakterieller Kulturüberstände	132
3.6.3 Antimikrobielles Profil bakterieller Kulturüberstände	135
3.7 Proteomanalytische Charakterisierung des antimikrobiellen Wirkmechanismus mittels 2D-DIGE	136
3.7.1 Ermittlung der Proteinbeladungsmenge für die 2D-SDS-PAGE	136
3.7.2 Ergebnisse der 2D-DIGE-Studie von Substanz 31 (DIGE-Studie I)	138
3.7.2.1 Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes gegen <i>B. subtilis</i> 168	138
3.7.2.2 2D-DIGE-Experiment	140
3.7.3 Ergebnisse der 2D-DIGE-Studie von Tripeptid G12 (DIGE-Studie II)	146
4. Diskussion	149
4.1 Etablierung des ZFTT-Assays – Optimierung, Charakterisierung und Validierung	149
4.2 Die Rolle der bakteriellen Zellwand im Prozess der antimikrobiellen Wirkstofffindung	152
4.3 Die Verwendung von Naturstoffen und rohen bakteriellen Kulturüberständen als Quelle neuer antimikrobieller Inhibitoren der ZFTT-Reaktion	154
4.4 Identifizierung und Charakterisierung neuer antimikrobieller Inhibitoren der bakteriellen ZFTT-Reaktion – Teil I: <i>small molecules</i>	156
4.4.1 Identifizierung neuer Inhibitoren der ZFTT-Reaktion	156
4.4.2 Antimikrobielles Potential und Beurteilung der RNA-Selektivität	159
4.4.3 Proteomanalytische Identifizierung induzierter Markerproteine und Hypothese des antimikrobiellen Wirkmechanismus (DIGE-Studie I)	161
4.4.3.1 2D-DIGE	161
4.4.3.2 Biologische Funktionen induzierter Proteine und Vergleich mit Markern antimikrobieller Substanzen	162
4.4.3.3 Hypothese des antimikrobiellen Wirkmechanismus	165
4.5 Identifizierung und Charakterisierung neuer antimikrobieller Inhibitoren der bakteriellen ZFTT-Reaktion – Teil II: antimikrobielle Tripeptide	171
4.5.1 Identifizierung neuer Inhibitoren der ZFTT-Reaktion und Beurteilung der RNA-Selektivität	171
4.5.2 Proteomanalytische Identifizierung induzierter Markerproteine und Hypothese des antimikrobiellen Wirkmechanismus von Tripeptid G12	173
4.5.2.1 Biologische Funktionen induzierter Proteine und Vergleich mit Markern antimikrobieller Substanzen	173
4.5.2.2 Hypothese des antimikrobiellen Wirkmechanismus	178
5. Zusammenfassung	183

6. Anhang	185
6.1 Absorptionsspektren aktiver ZFTT-Inhibitoren	185
6.1.1 Absorptionsspektren ZFTT-aktiver Standardsubstanzen unter 3.2	185
6.1.2 Absorptionsspektren ZFTT-aktiver kleiner Moleküle unter 3.3.2	186
6.1.3 Absorptionsspektren ZFTT-aktiver Tripeptide unter 3.4.1	187
6.1.4 Absorptionsspektren ZFTT-aktiver pentazyklischer Triterpene unter 3.5.1	188
6.2 Chemische Bezeichnung analysierter Substanzen	189
6.2.1 Specs-Substanzen zu 3.3.1	189
6.2.2 Specs-Substanzen zu 3.3.2	190
6.2.3 ASINEX-Substanzen zu 3.3.2.6	191
6.3 Strukturformeln analysierter Substanzen	192
6.3.1 Specs-Substanzen zu 3.3.1	192
6.3.2 Specs-Substanzen zu 3.3.2	193
6.3.3 ASINEX-Substanzen zu 3.3.2.6	195
6.3.4 Tripeptide zu 3.4	196
6.4 Antimikrobielle Aktivität gegen <i>B. subtilis</i> 168	198
6.4.1 Antimikrobielle Aktivität der Specs-Substanzen (zu 3.3.2.4)	198
6.4.2 Antimikrobielle Aktivität der Tripeptide (zu 3.4.3)	199
6.5 Zytotoxizität antimikrobieller Tripeptide gegen eukaryotische NALM-6-Zellen (zu 3.4.6)	200
6.5.1 NALM-6-Wachstumskurven	200
6.5.2 Zellvitalität der NALM-6-Zellen	202
7. Abkürzungsverzeichnis	203
8. Literaturverzeichnis	207

Curriculum Vitae

Publikationen & Präsentationen

Danksagung

1 Einleitung

1.1 Die globale bakterielle Resistenzentwicklung gegen Antibiotika

Der durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) 1999 veröffentlichte „*WHO report on infectious diseases*“ zeigte, dass Infektionserkrankungen weltweit die zweithäufigste Todesursache darstellen (WHO/CDS/99.1). Ein Grund für die stetig steigende Zahl tödlich verlaufender Infektionserkrankungen ist der kontinuierliche Anstieg resistenter Mikroorganismen, die mit einem oder mehreren Resistenzmechanismen gegen antimikrobielle Wirkstoffe ausgestattet sind. Bezüglich der bakteriellen Resistenzsituation zeigen neueste Studien eine alarmierend hohe Zahl pathogener Erreger mit ausgeprägter Multiresistenz, d. h. einer Resistenz gegen drei oder mehr angewendete antibakterielle Wirkstoffe. Besonders zu nennen ist der Gram-positive Stamm *Staphylococcus aureus*, der als zweithäufigster Auslöser für systemische Infektionserkrankungen bzw. Infektionen der unteren Atemwege verantwortlich ist (Goossens, 2005). Vor allem Methicillin-resistente Stämme von *Staphylococcus aureus* (MRSA), welche sich durch Resistenz gegenüber dem β -Laktamantibiotikum Methicillin (bzw. weiteren β -Laktamantibiotika) und anderen antimikrobiellen Wirkstoffen (meist Makrolide, Aminoglykoside oder Fluorochinolone) charakterisieren lassen, sind hervorzuheben. Wie das *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, USA) in seiner 2007 vorgestellten Studie beschreibt, kam es in den USA im Jahre 2005 zu über 90.000 MRSA-Infektionen, welche in knapp 20 % der Fälle einen tödlichen Krankheitsverlauf zeigten. Weiterhin wurde in dieser landesweiten Studie festgestellt, dass von 2 Millionen nosokomialen Infektionen, 70 % der humanpathogenen Mikroorganismen in mindestens einem Fall antimikrobielle Resistenz zeigten (Klevens *et al.*, 2007). Das weltweit organisierte Programm zur Überwachung der globalen Resistenzentwicklung *SENTRY* (finanziert durch Bristol Meyer Squibb; existent seit 1997) veröffentlichte 2003 auch für Europa besorgniserregende Resistenzzahlen bzgl. isolierter MRSA-Stämme. Hier wurden im Zeitraum von 2000 – 2002 42 % der isolierten *S. aureus*-Stämme als MRSA identifiziert (Rodriguez-Villalobos *et al.*, 2002). Therapiestandard für die Behandlung einer MRSA-Infektion stellt das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin dar. Aber auch die antimikrobiellen Wirkstoffe Linezolid (Oxazolidinon), Daptomycin (Lipopeptid-Antibiotikum), Tigecyclin (Glycylcyclin) und die synergistisch wirkende Streptograminkombination Quinupristin/Dalfopristin werden zur Behandlung von MRSA

eingesetzt. Resistenzen gegen Vancomycin (Hiramatsu *et al.*, 1997), Linezolid (Tsiodras *et al.*, 2001) und Quinupristin/Dalfopristin (Werner *et al.*, 2001) sind bereits publiziert.

Weitere Problemkeime stellen Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE), Penicillin-resistente Stämme von *Streptococcus pneumoniae*, resistente *E. coli* bzw. *Klebsiella*-Stämme gegen neuere Cephalosporine, sowie multiresistente Formen von *Pseudomonas aeruginosa* bzw. *Acinetobacter* dar. Vor allem die steigende Resistenzentwicklung der Gram-negativen Problemkeime, wie z. B. Breitspektrum β -Laktamase (ESBL) produzierende *E. coli*- und *Klebsiella*-Stämme stellen eine große Gefahr für die öffentliche Gesundheit dar, da es zurzeit keinerlei neue Wirkstoffe bzw. Leitstrukturen zur Behandlung von Infektionen dieser Erreger in der klinischen Forschung gibt (Talbot *et al.*, 2006). Daher besteht momentan ein hoher Bedarf an neuen antimikrobiellen Substanzen mit neuen Wirkmechanismen. Seit 2004 wurden durch die US-amerikanische Zulassungsbehörde FDA (*U.S. Food and Drug Administration*, Rockville, Maryland, USA) nur fünf neue antimikrobielle Wirkstoffe zugelassen, wobei vier dieser Stoffe zu bereits bekannten Wirkstoffklassen gehörten (Frimodt-Møller, 2007). Wie die *Antimicrobial Availability Task Force* (AATF) der *Infectious Disease Society of America* (IDSA) in ihrem Bericht "*Bad Bugs, No Drugs: as antibiotic R&D stagnates, a public health crisis brews*" (IDSA, Alexandria, Virginia, USA; 2004) darstellte, zeigt die pharmazeutische Industrie immer geringeres Interesse an der Forschung und Entwicklung neuer antimikrobieller Wirkstoffe. Vor diesem Hintergrund ist es wichtig Kooperationen zwischen der pharmazeutischen Industrie, öffentlichen Forschungsinstituten, sowie den nationalen Regierungen aufzubauen, um das Resistenzproblem gemeinsam zu bekämpfen.

1.2 Die antimikrobielle Wirkstoffsuche

1.2.1 Geschichtlicher Hintergrund

Mit Salvarsan (Arsphenamin) wurde 1910 durch Paul Ehrlich das erste gezielt wirkende Chemotherapeutikum zur Behandlung der Syphilis zugelassen. 1929 publizierte Alexander Fleming die Isolierung des Penicillins aus dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* zur Anwendung in der Wundversorgung (Fleming, 1929). Gerhard Domagk entdeckte 1932 die antibakteriellen Eigenschaften des Azofarbstoffes Sulfamidochrysoidin (Prontosil[®]) zur Behandlung Staphylokokken- bzw. Streptokokken-infizierter Mäuse (Domagk, 1935). Aktiver Metabolit des Prontosil[®] war Sulfanilamid, welches die Grundstruktur der Stoffklasse der

Sulfonamide darstellt. Im Zeitraum von 1940–60 wurde eine Vielzahl neuer antimikrobieller Stoffklassen mit unterschiedlichsten Wirkmechanismen entdeckt bzw. isoliert. Unter ihnen befanden sich Vertreter der Aminoglykoside (z. B. Streptomycin; Schatz *et al.*, 1944), Chloramphenicol (Ehrlich *et al.*, 1947), Tetrazykline (z. B. Chlortetrazyklin; Duggar, 1948), Makrolide (z. B. Erythromycin; McGuire *et al.*, 1952) und Rifamycin (Sensi *et al.*, 1959). Nach der Entdeckung der antimikrobiellen Wirkung durch die Hemmung der bakteriellen Dihydrofolsäurereduktase durch das Diaminobenzylpyrimidin Trimethoprim (Bushby und Hitchings, 1968) vergingen 32 Jahre bis zur Zulassung einer neuen antimikrobiellen Stoffklasse, dem synthetischen Oxazolidinon Linezolid (Zyvox[®]).

1.2.2 Strategien zum Auffinden neuer antimikrobieller Wirkstoffe

1.2.2.1 Chemische Modifikation bekannter antimikrobieller Wirkstoffe

Um entstandene Resistenzen gegen antibakterielle Wirkstoffe zu bekämpfen, lassen sich zwei grundsätzliche Strategien unterscheiden. Zum einen die wesentlich zeit- und kostenintensiveren Methoden zum Auffinden neuer antimikrobieller Stoffklassen mit möglichst neuen Wirkmechanismen bzw. Zielstrukturen und daneben die chemische Modifikation vorhandener aktiver Wirkstrukturen zur Generierung von Analogpräparaten. Die zeit- und kostensparendere Strategie, im Vergleich zum Auffinden neuer antimikrobieller Stoffklassen, wurde bis heute bei nahezu allen bekannten Substanzklassen antimikrobieller Wirkstoffe angewendet. Sie dient hauptsächlich der Verbesserung der pharmakokinetischen bzw. pharmakodynamischen Eigenschaften des Wirkstoffes, sowie der Erweiterung des Wirkspektrums (Schwarz und Kehrenberg, 2006). Ein Beispiel ist die chemische Modifikation des Makrolidantibiotikums Erythromycin (s. Abb. 1-1). Im Falle von Clarithromycin wurde die Hydroxylgruppe an C6 durch eine Methoxyfunktion ersetzt, wodurch sich die Säurestabilität, sowie das pharmakokinetische und antibakterielle Profil im Vergleich zu Erythromycin verbesserte (Mazzei *et al.*, 1993; Piscitelli *et al.*, 1992). Durch die Einführung einer tertiären Aminofunktion in den Makrolidring wurde die Stoffgruppe der Azalide in Form des Azithromycin als neues Makrolidantibiotikum mit einem verbesserten Wirkspektrum gegen Gram-negative Keime, wie z. B. *Chlamydia trachomatis* oder *Neisseria gonorrhoeae* entwickelt (Williams *et al.*, 1991).

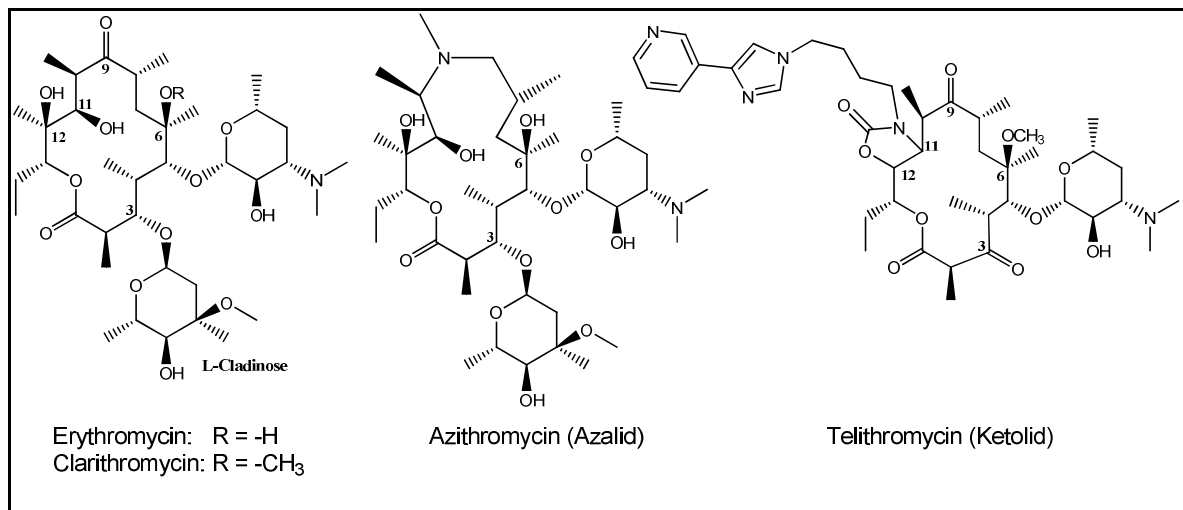


Abb. 1-1: Vertreter aus den Stoffklassen der Makrolide, Azalide und Ketolide.

Allerdings zeigten diese beiden Vertreter (Clarithromycin und Azithromycin) Kreuzresistenz mit Erythromycin. Zu einer Verbesserung der Resistenzsituation gegen die Klasse der Makrolidantibiotika kam es durch die Einführung der von Erythromycin abgeleiteten Stoffklasse der Ketolide (z. B. Telithromycin; Zulassung durch die FDA im April 2004). Ausgehend von Erythromycin erfolgte hier der Austausch der L-Cladinose an Position C3 durch eine Ketogruppe, sowie die Substitution der Hydroxylfunktion durch eine Methoxyfunktion, wie im Falle des Clarithromycins. Dadurch erreichte man neben der Erhöhung der Magensäurestabilität vor allem eine Verbesserung der antimikrobiellen Aktivität gegen Erythromycin-resistente Stämme, sowie gegen Stämme mit ausgeprägter MLS_B-Resistenz (Makrolid-Lincosamid-Streptogramin B-Resistenz) (Pankuch *et al.*, 1998). Das verbesserte Wirkspektrum der Ketolide beruht auf der Erhöhung der Affinität zur ribosomalen RNA (rRNA) durch die Einführung eines N-substituierten Carbamats an C11/C12 (Douthwaite und Champney, 2001), sowie auf der fehlenden Induzierbarkeit der MLS_B-Resistenz durch die L-Cladinose der Makrolide (Bonney *et al.*, 1997).

Auch die Entwicklung der Penicilline (β -Laktamantibiotika) ausgehend von Penicillin G über Penicillinase-stabile Verbindungen (z. B. Methicillin), Aminopenicilline mit erweitertem Gram-negativem Wirkspektrum (z. B. Ampicillin) zu den Carboxypenicillinen mit Aktivität gegen Bakterien aus der Familie der *Enterobacteriaceae* bzw. gegen *P. aeruginosa* (z. B. Ticarcillin) stellt ein prominentes Beispiel für die erfolgreiche chemische Modifikation einer antimikrobiellen Stoffklasse dar (Wright, 1999).

Das Strategieprinzip der chemischen Modifikation bekannter antimikrobieller Wirkstoffe zur Synthese bzw. Partialsynthese neuer antimikrobieller Wirkstoffe wurde vor allem im Zeitraum von 1960 – 1980 durch die pharmazeutische Industrie verfolgt (Fernandes, 2006).

1.2.2.2 Klassische und moderne Screening-Ansätze

Bis heute werden neue antibakterielle Wirkstoffe durch klassische Ganzzell-Screeningansätze identifiziert. Hierfür wird die Wachstumshemmung humanpathogener Keime (z. B. durch Bestimmung des Hemmhofes auf Agarplatten) nach Inkubation der Bakterienkulturen mit synthetischen Substanzen oder Zellsuspensionen unterschiedlicher Mikroorganismen oder Pflanzenextrakten bestimmt. Anschließend erfolgt die Charakterisierung der Aktivität einer Substanz bzw. eines Substanzgemisches durch die Angabe der minimalen Hemmkonzentration (MHK), die der Konzentration der Substanz entspricht, bei der kein Wachstum des Testkeims mehr stattfindet. Als Hauptlieferanten natürlicher antimikrobieller Wirkstoffe unter den Mikroorganismen dienen hauptsächlich Gram-positive Bakterien aus der Ordnung der *Actinomycetales*. Diese werden bzw. wurden als Produzenten einer Vielzahl von Antibiotika genutzt (z. B. Chloramphenicol aus *Streptomyces venezuelae*, Erythromycin aus *Streptomyces erythraeus*). Daneben werden auch Pilze als Quellen antimikrobieller Wirkstoffe (z. B. Penicillin aus der Gattung *Aspergillus*) eingesetzt. Die Mehrzahl der bis heute zugelassenen antimikrobiellen Arzneistoffe sind auf einen natürlichen pflanzlichen oder bakteriellen Ursprung zurückzuführen (Walsh und Wright, 2005).

Obwohl bisher alle sich auf dem Markt befindlichen Antibiotika durch klassische Ganzzell-Screeningassays aufgefunden wurden (Breithaupt, 1999), kam es in jüngster Zeit zur Entwicklung moderner Strategien zur Entdeckung neuer antibakterieller Wirkstoffklassen und/oder Zielstrukturen. Methoden dieser Strategien stellen die Röntgenstrukturanalyse zur Strukturaufklärung potentieller *targets*, das computerbasierte virtuelle Screening, die kombinatorische Chemie zur Erweiterung bzw. Optimierung genutzter Substanzbibliotheken, sowie die Entwicklung unterschiedlichster funktioneller Assays (z. B. zellfreie Transkriptions-/Translationsassays) zur Charakterisierung der antibakteriellen Potenz einer aktiven Substanz (*hit*) bzw. einer Leitstruktur (*lead*) dar.

Diese modernen Strategien der antimikrobiellen Wirkstoffsuche lassen sich durch den Begriff des Paradigmenwechsels in der Antibiotikaforschung zusammenfassen. Ermöglicht wurden diese neuen Ansätze durch die steigende Anzahl sequenzierter Genome humanpathogener Mikroorganismen. Ausgehend vom ersten vollständig sequenzierten Genom von *H. influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995) wurden bis heute 438 bakterielle Genome sequenziert (*The Institute for Genomic Research*, Rockville, USA; www.tigr.org; Stand: 18.09.2008).

Die Hauptstrategien dieser modernen Ansätze lassen sich in den zielstrukturbasierten (*target based*) Ansatz und die als *reverse genomics* bezeichnete Strategie unterteilen (Brötz-

Oesterhelt et al., 2005). Am Anfang des zielstrukturbasierten Ansatzes steht der Prozess der Targetidentifizierung bzw. -validierung. Um als valide zu gelten, muss eine Zielstruktur als Angriffspunkt für antibakterielle Wirkstoffe folgende Kriterien erfüllen:

- a) sie muss in einem breiten Spektrum humanpathogener Bakterien vertreten sein,
- b) sie sollte in Säugern möglichst nicht vorhanden sein (Selektivität),
- c) sie muss essentiell für das Überleben des Bakteriums sein,
- d) sie muss für Screening-Ansätze zugänglich sein,
- e) sie muss arzneimitteltauglich (*druggable*) sein,
- f) sie darf keine Kreuzresistenz mit anderen Antibiotika zeigen

(Haney *et al.*, 2002; Miesel *et al.*, 2003).

Etwa 10 % aller bakteriellen Gene werden als essentiell angesehen, d. h. dass ein Ausschalten dieser Gene (*gene knockout*) zur Inhibition des bakteriellen Wachstums (bakteriostatische Wirkung) bzw. zum Zelltod (bakterizide Wirkung) führt. Genprodukte (i. Allg. Enzyme), die über ein möglichst breites Spektrum an humanpathogenen Keimen verteilt sind und bereits bei geringster Inhibition bakterizide Effekte aufweisen, stellen hierbei optimale antibakterielle *targets* dar. Als valide eingestufte Zielstrukturen werden anschließend in Enzymaktivitätstests im Rahmen eines Hochdurchsatz-Screening (*high-throughput screening*; HTS) unter dem Einfluß potentieller Hemmstoffe charakterisiert. Identifizierte aktive Verbindungen (*hits*) werden zusätzlich in weiteren funktionellen Assays untersucht, um vermutete Wirkmechanismen zu bestätigen. Aus den gewonnenen *Screening*-Daten (meist IC₅₀ oder MHK-Werte) werden Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet und als Grundlage zum Auffinden neuer Leitstrukturen (*leads*) eingesetzt.

Ein weiterer Ansatz zum Auffinden neuer antibakterieller Wirkstoffe ist das Verfahren des zielstrukturbasierten Wirkstoffdesigns. Voraussetzung ist die Kenntnis der entweder über Röntgenstrukturanalyse, NMR oder Homologiemodellierung aufgeklärten Zielstruktur des funktionellen Proteins oder der Nukleinsäure (z. B. die rRNA der Ribosomen) (Anderson, 2003). Durch Anwendung computerbasierter *docking*- und *scoring*-Methoden lassen sich potentielle Inhibitoren in die Zielstruktur einpassen und bewerten. Die Aktivität vielversprechender Strukturen wird nachfolgend in biochemischen Assays getestet. Dieser Ansatz dient vor allem der Charakterisierung ausgewählter Leitstrukturen bzw. der Optimierung vorhandener schwach aktiver Leitstrukturen. Nachteile dieser Strategie sind die häufig auftretende schlechte Penetration der als aktiv definierten Substanzen durch die bakterielle Zellwand unter Ganzzellbedingungen (Barker, 2006).

Im *reverse genomics*-Ansatz geht man von einer antibakteriellen Substanz mit bekannter MHK aus und versucht durch molekularbiologische Methoden die Zielstruktur bzw. den Wirkmechanismus zu ermitteln. Zu diesen Methoden gehören u.a. die Transkriptomanalyse, die Proteomanalyse, Einbautests mit radioaktiven Biosynthesestufen, sowie die FT-IR-Spektroskopie (Häbich *et al.*, 2006).

1.3 Das bakterielle Ribosom als Zielstruktur antimikrobieller RNA-Liganden

1.3.1 Der Prozess der prokaryotischen Translation

Das Ribosom ist in der Zelle für die Übersetzung des genetischen Codes durch Polymerisation von Aminosäuren in Proteine (Translation) zuständig. Die Struktur der Ribosomen als „Schlüssel“ dieses essentiellen Biosyntheseweges stellt ein attraktives *target* für antimikrobielle Substanzen dar. Prokaryotische Ribosomen sind große Ribonukleotid-Proteinpartikel, welche sich mit einer Masse von ca. 2,3 MDa aus zwei funktionellen Untereinheiten zusammensetzen (s. Abb. 1-2). Beide Untereinheiten bestehen aus Ribonukleinsäuren (ribosomale RNA; rRNA) und ribosomalen Proteinen. Die große ribosomale Untereinheit (50S) setzt sich aus der 23S rRNA, der 5S rRNA und 34 ribosomalen Proteinen zusammen. Die kleine ribosomale Untereinheit (30S) besteht aus der 16S rRNA und 20 ribosomalen Proteinen (Poehlsaard und Douthwaite, 2005). Beide ribosomale Untereinheiten besitzen drei Bindungsstellen für tRNA-Moleküle, welche als *A-Site* (Aminoacyl), *P-Site* (Peptidyl) und *E-Site* (Exit) bezeichnet werden. Die *A-Site* dient als Akzeptorstelle für die Anlagerung von Aminoacyl-tRNA-Molekülen, die *P-Site* bindet die wachsende an die Peptidyl-tRNA gebundene Peptidkette, und an der *E-Site* wird die deacylierte tRNA vor der Abspaltung vom Ribosom gebunden (s. Abb. 1-2; Ramakrishnan, 2002). Durch Assoziation der ribosomalen Untereinheiten und der zu translatierenden mRNA entsteht während des Translationszyklus das prokaryotische 70S Ribosom. Das Dekodierzentrum der 30S-Untereinheit ist als funktionelle Struktur für die korrekte Anlagerung der dem Codon der mRNA entsprechenden Anticodonsequenz der Aminoacyl-tRNA an der *A-Site* des Ribosoms verantwortlich. Das wichtigste funktionelle Zentrum der 50S-Untereinheit stellt das Peptidyltransferasezentrum (PTC) dar, welches die Transpeptidierungsreaktion durch Übertragung der an die Aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) gebundene Aminosäure auf die wachsende Peptidkette der Peptidyl-tRNA katalysiert (Rodnina *et al.*, 2007).

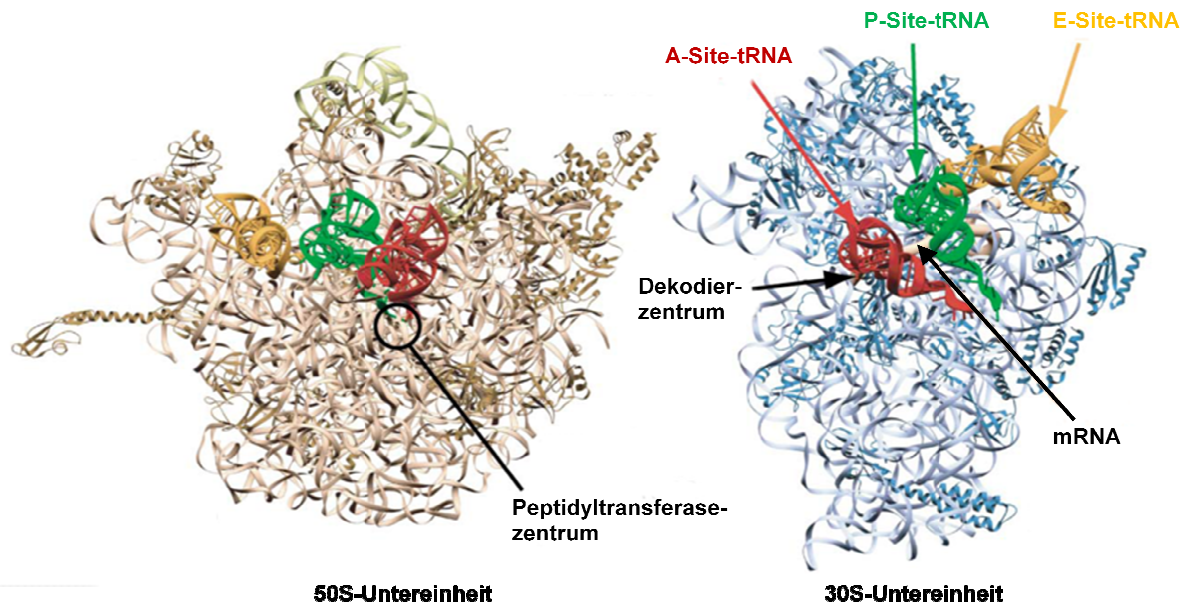


Abb. 1-2: Kristallographische Strukturen der ribosomalen Untereinheiten von *Thermus thermophilus* inklusive funktioneller Strukturelemente (modifiziert aus: Ramakrishnan, 2002)

Der Prozeß der prokaryotischen Translation ist in vier Phasen unterteilt: die Initiation, die Elongation, die Termination und das Ribosomenrecycling.

1. Die Initiationsphase:

Die Initiationsphase der prokaryotischen Translation beginnt mit der Bildung des 30S-Initiationskomplexes, welcher aus der mRNA, der Initiator-tRNA (Formylmethionyl-tRNA; fMet-tRNA^{fMet}), der 30S-Untereinheit und drei Initiationsfaktoren (IF 1-3) besteht (Gualerzi und Pon, 1990). Durch die Bindung der großen ribosomalen Untereinheit entsteht das funktionelle 70S Ribosom.

2. Die Elongationsphase:

Die Elongationsphase wird durch die Bindung eines ternären Komplexes aus aa-tRNA, Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) und GTP an die A-Site des Ribosoms eingeleitet (s. Abb. 1-3). Durch Basenpaarung des Anticodons der cognaten aa-tRNA mit dem Codon der mRNA an der ribosomalen A-Site, wird durch Konformationsänderung des Ribosoms die Bindung der aa-tRNA stabilisiert und die Hydrolyse von GTP zu GDP durch EF-Tu erreicht. Nach der Dissoziation von EF-Tu lagert sich das Aminoacylende der aa-tRNA von der A-Site in Richtung des Peptidyltransferasezentrums an der P-Site um (Akkomodationsphase). Anschließend erfolgt die Transpeptidierungsreaktion durch den nukleophilen Angriff der α -Aminogruppe der aa-tRNA am Carbonylkohlenstoff der Peptidyl-tRNA. Nach Bildung eines tetraedrischen Zwischenproduktes spaltet sich die an der P-Site gebundene deacylierte tRNA

ab (Moore und Steitz, 2003). Diese Transpeptidierungsreaktion wird allein durch die 23S rRNA des Peptidyltransferasezentrums (PTC) katalysiert (Green und Noller, 1997; Ban *et al.*, 2000; Nissen *et al.*, 2000). Daher ist die 23S rRNA auch als erstes Beispiel eines natürlichen Ribozyms mit Aminosäurepolymeraseaktivität zu bezeichnen. Nach der Transpeptidierungsreaktion erfolgt der Translokationsschritt, bei dem die deacylierte tRNA von der *P*- zur *E*-Site und die Peptidyl-tRNA von der *A*- zur *P*-Site wandern. Die Translokation wird durch die Hydrolyse des an den Elongationsfaktor G (EF-G) gebundenen GTP katalysiert (Spirin, 2004).

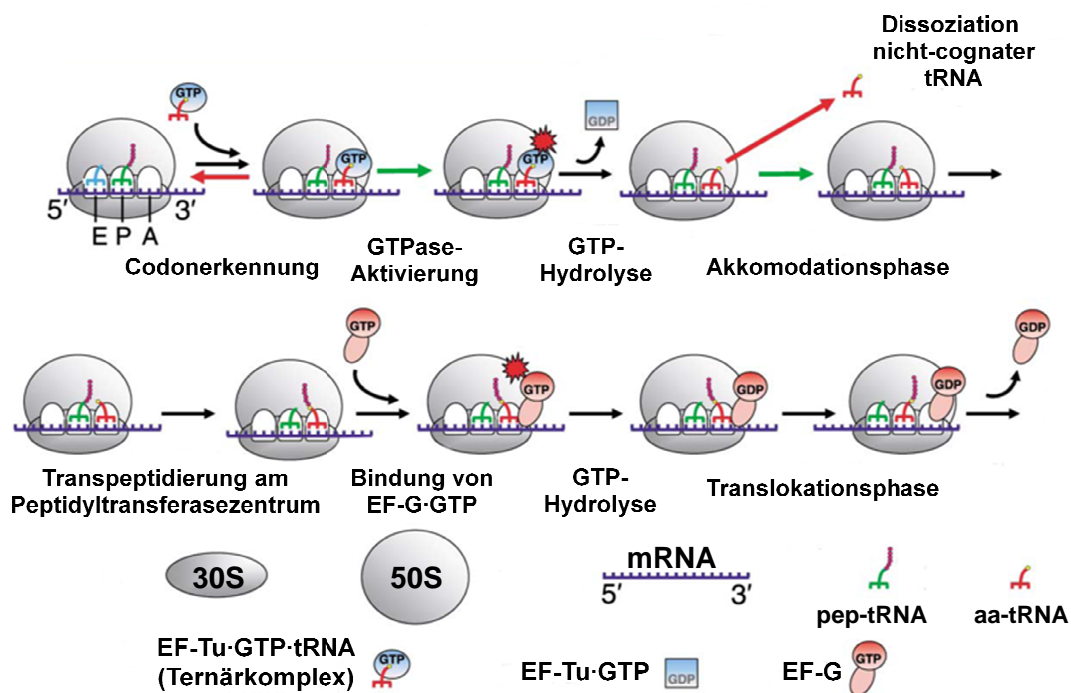


Abb. 1-3: Schematische Übersicht über die Elongationsphase der prokaryotischen Translation. Abkürzungen: A, P, E = *A*-, *P*-, *E*-Site; EF = Elongationsfaktor; pep-tRNA = Peptidyl-tRNA; aa-tRNA = Aminoacyl-tRNA (modifiziert aus: Ramakrishnan, 2002)

3. Die Terminationsphase:

Durch das Auftreten eines Stopcodons auf der mRNA (UGA, UAG oder UAA) wird die Terminationsphase der Translation durch die Bindung von Release-Faktoren (RF-1 oder RF-2) an die *A*-Site eingeleitet. Es erfolgt die Spaltung der Esterbindung zwischen Peptidkette und tRNA-Molekül der Peptidyl-tRNA am PTC (Kisselev *et al.* 2003). Dadurch dissoziiert die translatierte Peptidkette vom Ribosom ab. RF-3 führt durch Bindung an das Ribosom zur Abspaltung von RF-1 bzw. RF-2, und dissoziiert selbst durch GTP-Hydrolyse ab (Zavialov *et al.*, 2001).

4. Ribosomenrecycling:

Nach der Abspaltung der Peptidkette verbleiben mRNA und die deacylierte tRNA an der ribosomalen *P-Site*. Die Interaktion des Ribosomen-Recycling-Faktors (RRF) und EF-G mit dem ribosomalen Post-Terminationskomplex führt zur Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten (Karimi *et al.*, 1999). Diese letzte Phase der Translation führt zum Zerfall der 70S-Ribosomen in seine funktionellen Bestandteile und damit zum Erhalt des Reservoirs der folgenden Initiationsphase.

1.3.2 Interaktion antimikrobieller Translationsinhibitoren am prokaryotischen Ribosom

Durch Ligandenbindung an die RNA-Komponenten der bakteriellen ribosomalen Untereinheiten (16S rRNA bzw. 5S und 23S rRNA) lassen sich antimikrobielle Effekte durch Hemmung der prokaryotischen Proteinbiosynthese erreichen. Unterschiedlichste Stoffklassen von Antibiotika hemmen die bakterielle Translation auf verschiedenen Ebenen:

Stoffklasse	Beispiel	Inhibierter Translationsschritt	Ribosomale Zielstruktur
Aminoglykoside	Paromomycin	Elongation; Decoding	16S rRNA; A-Site ¹
Aminoglykosid	Spectinomycin	Elongation; Translokation	16S rRNA; Helix 34 ²
Tetrazykline	Chlortetrazyklin	Elongation; aa-tRNA-Docking	16S rRNA; A-Site ³
Makrolide	Erythromycin	Elongation; Translokation	23S rRNA; <i>exit tunnel</i> ⁴
Phenylpropanoide	Chloramphenicol	Elongation; Transpeptidierung	23S rRNA; PTC; <i>exit tunnel</i> ⁵
Lincosamide	Clindamycin	Elongation; Transpeptidierung, Translokation	23S rRNA; A- / P-Site ⁶
Oxazolidinone	Linezolid	exakter Wirkmechanismus ist noch nicht aufgeklärt ⁷	23S rRNA; PTC; A-site ⁸
Streptogramine	Dalfopristin / Quinupristin	Elongation; Transpeptidierung, Translokation	23S rRNA; PTC (D), <i>exit tunnel</i> (Q) ⁹

Tab. 1-1: Zielstrukturen ausgewählter bakterieller Proteinbiosyntheseinhibitoren.

¹Vakulenko und Mobashery, 2003; ²Carter *et al.*, 2000; ³Brodersen *et al.*, 2000; ⁴Schlünzen *et al.*, 2001; ⁵Hansen *et al.*, 2002; ⁶Schlünzen *et al.*, 2001; ⁷Ippolito *et al.*, 2008; ⁸Tenson und Mankin, 2006; ⁹Hansen *et al.*, 2003b

Die Inhibition der bakteriellen Translation durch antimikrobielle Wirkstoffe wird vor allem durch die Bindung der Liganden an die ribosomale RNA erreicht (Hermann, 2003). Die polyanionische ribosomale RNA baut sich aus einer komplexen Tertiärstruktur auf, welche aus irregulären doppelhelikalen Stamm- und Schleifenstrukturen besteht. Spalten (*clefts*) zwischen den unterschiedlichen Tertiärstrukturen der rRNA dienen hierbei als definierte Bindungsstellen der RNA-Liganden (Gallego und Varani, 2001).

1.3.2.1 Wirkmechanismen ausgewählter Stoffklassen antimikrobieller Translationsinhibitoren

1.3.2.1.1 Aminoglykosid-Antibiotika

Die ribosomale Zielstruktur der antimikrobiellen Stoffklasse der Aminoglykoside ist die 16S rRNA der 30S-Untereinheit des prokaryotischen Ribosoms. Aminoglykoside lassen sich in die Gruppen der 4,5-2-Deoxystreptamine (4,5-2-DOS; Neomycin-Klasse) bzw. 4,6-2-Deoxystreptamine (4,6-2-DOS; Kanamycin-Klasse) und Vertreter der Streptaminderivate (z. B. Streptomycin) unterteilen (s. Abb. 1-4).

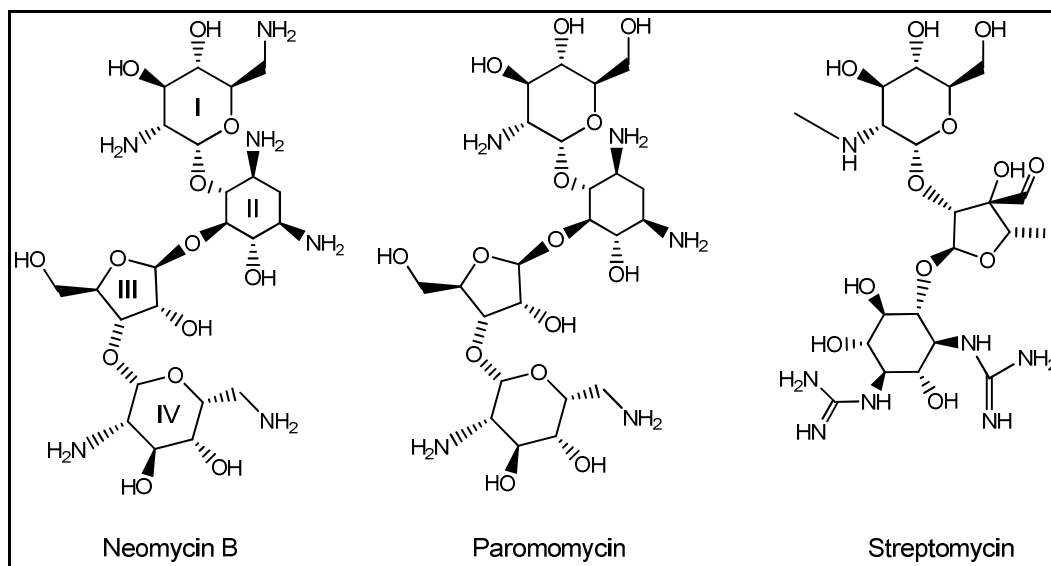


Abb. 1-4: Aminoglykosid-Antibiotika; Ring II in Neomycin/Paromomycin = 2-DOS-Teil; Ring I + II = Neaminteil.

Die Wirkung der Aminoglykoside mit 2-DOS-Einheit beruht auf der indirekten Interaktion mit den Basen A1492 und A1493 (*E. coli* Bezifferung) der Helix 44 der 16S rRNA. Durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Neaminteil der Aminoglykoside und den Basen A1408, G1494 und U1495 kommt es zur Fixierung einer *bulged-out*-Konformation der Basen A1492 und A1493 am Dekodierzentrum der *A-Site* des Ribosoms (Ogle *et al.*, 2001). Diese fixierte räumliche Orientierung der Basen entspricht der Konformation während des Dekodierprozesses zwischen Codon und Anticodon und signalisiert eine korrekte Basenpaarung zwischen mRNA und aa-tRNA. Zusätzlich führt die Interaktion der Liganden zur Steigerung der GTP-Hydrolyse des EF-Tu katalysierten Akkomodationsschritt bei falscher Codon-Anticodon-Interaktion (Pape *et al.*, 2000). Diese Effekte des fehlerhaften Ablesens (*miscoding*) führen schließlich zur Erhöhung des Fehleinbaus von Aminosäuren in

die wachsende Peptidkette während der Translation (Ogle und Ramakrishnan, 2005). Die bakterizide Wirkung der Aminoglykoside beruht auf der Erhöhung der Permeabilität der bakteriellen Zellmembran durch den Einbau fehlerhaft translatierter Proteine. Dies führt zum verstärkten irreversiblen Einstrom von Aminoglykosiden in die Zelle, was schließlich die letale Inhibition der Translation zur Folge hat (Davis, 1987).

Das Streptaminderivat Streptomycin führt genau wie die auf 2-DOS basierenden Aminoglykoside zum *miscoding* während der Translation. Allerdings zeigt Streptomycin mit Helix 18 und 27, sowie dem ribosomalen Protein S12 andere Ligandenbindungsstellen an der 16S rRNA (Carter *et al.*, 2000).

1.3.2.1.2 Makrolid-Antibiotika

Die Gruppe der Makrolid-Antibiotika besteht strukturell aus 14–16-gliedrigen natürlichen oder synthetisch modifizierten Lakton- bzw. Azalidringssystemen mit einem oder mehreren glykosidisch gebundenen Neutral- und/oder Aminozuckereinheiten (s. Abb. 1-5).

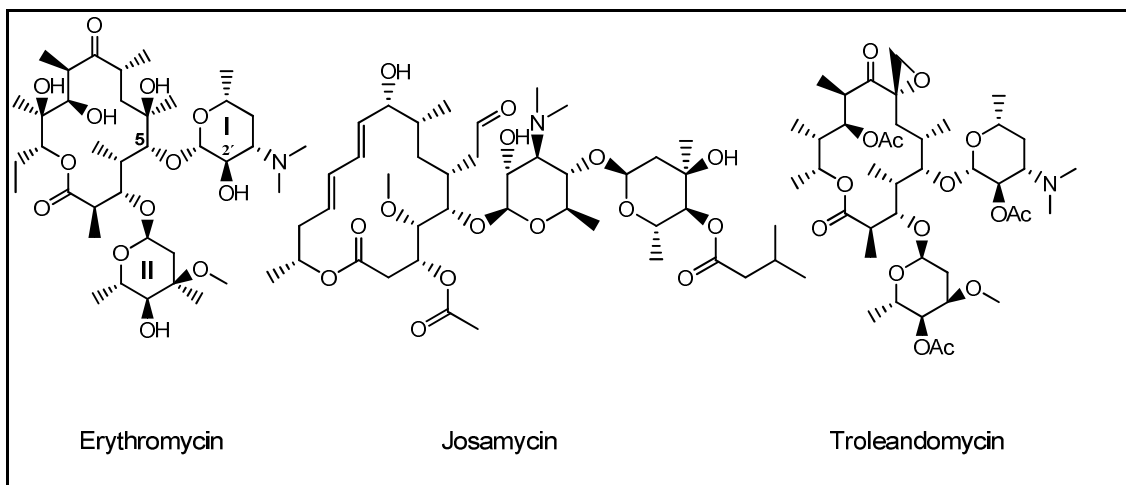


Abb. 1-5: Makrolid-Antibiotika; Troleandomycin (= Oleandomycintriacetat).

I = Desosamin; II = Cladinose

Die Zielstruktur der Makrolide ist der Ausgangstunnel (*exit tunnel*) der wachsenden Peptidkette in der Nähe des PTC der 23S rRNA. Kristallographische Studien von Makrolid-50S-Komplexen zeigten, dass sich der hydrophobe Laktonring an die Wand des Ausgangstunnels anlagerte und die polaren Zuckereinheiten in die Richtung des PTC ragten (Hansen *et al.*, 2002). Die Zuckersubstituenten in Position 5 des Laktonringes (z. B. Desosamin in Erythromycin) tragen hauptsächlich zur Interaktion mit der 23S rRNA bei (Schlünzen *et al.*, 2001). Die 2'-OH-Gruppe des Desosaminzuckers bildet drei

Wasserstoffbrückenbindungen mit A2058 und A2059 aus. Diese für die Bindung und Wirkung der Makrolide als essentiell identifizierten Nukleotide bestätigten sowohl kristallographische Studien (Schlünzen *et al.*, 2001), als auch eine durch Basenmethylierung induzierte Makrolidresistenz (Madsen *et al.*, 2005). Die Blockade des Ausgangstunnels durch das aus einem 14-gliedrigen Laktoring bestehenden Erythromycin führt zur Bildung von Peptiden, welche aus 5-6 Aminosäuren aufgebaut sind. Anschließend bewirkt Erythromycin den Abbruch der Translation während der Elongationsphase (Kettenabbruchreaktion) und die Induktion der Peptidyl-tRNA-Dissoziation vom Ribosom (Menninger und Otto, 1982).

1.3.2.1.3 Tetrazykline

Antibiotika der Klasse der Tetrazykline bestehen aus einem linear fusionierten tetrazyklischen Ringsystem, an welches eine Vielzahl funktioneller Gruppen gebunden sind. Auffallend ist die amphiphile Molekülstruktur der Tetrazykline mit hydrophilen Gruppen auf der einen Seite und einer eher hydrophoben Gegenseite (s. Abb. 1-6).

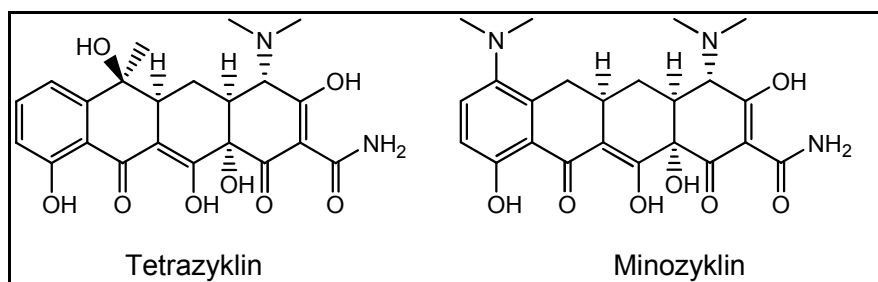


Abb. 1-6: Translationsinhibitoren aus der Klasse der Tetrazykline.

Die Zielstruktur der bakteriostatisch wirkenden Tetrazykline ist die 16S rRNA der ribosomalen 30S-Untereinheit (Chopra und Roberts, 2001). Röntgenkristallographische Untersuchungen an Tetrazyklin-30S-Komplexen von *Thermus thermophilus* zeigten zwei distinkte Bindungsareale für Tetrazyklinmoleküle. Tetrazyklin blockiert zum einen die *A-Site* der 30S-Untereinheit und verhindert somit ein Andocken aminosäurebeladener aa-tRNA-Moleküle (Primärbindungsstelle). Die zweite eher unspezifische Bindungsstelle konnte innerhalb der *body*-Region der 30S-Untereinheit zwischen den Helixstrukturen 27 und 11 identifiziert werden (Sekundärbindungsstelle). Die Hauptinteraktion von Tetrazyklin an der Primärbindungsstelle beruht auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der rRNA der Helix 34 und den Sauerstoffatomen des Tetrazyklins. Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Studie Hinweise auf eine hydrophobe Interaktion der Nukleotide 1054 und 1196 der Helix 34 mit dem tetrazyklischen Ringsystem

gefunden (Brodersen *et al.*, 2000). Zusätzlich zeigten Studien die Bindung des Tetrazyklins an die Zielstruktur in Form eines Magnesium-Tetrazyklin-Chelatkomplexes, wobei Magnesium vermittelte Salzbrücken an die Phosphatgruppen der Nukleotide G1197 und G1198 ausgebildet wurden (Chopra *et al.*, 1992; White and Cantor, 1971). Die Bindung von Tetrazyklinen an ihre Zielstrukturen führt zur Inhibition der aa-tRNA-Assoziation an der ribosomalen *A-Site* und damit zur Hemmung der Translation in der Elongationsphase.

1.3.2.1.4 Chloramphenicol

Chloramphenicol bindet als Ligand des Peptidyltransferasezentrums an die 50S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms.

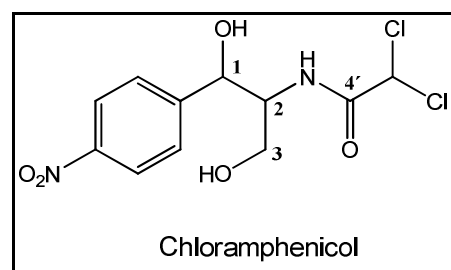


Abb. 1-7: Chloramphenicol

Kristallographische Studien an 50S-Kristallen des Halobakteriums *Haloarcula marismortui* aus der Gruppe der Archäen zeigten die Anlagerung des 4-Nitrophenylsubstituenten in die enge hydrophobe Spalte am Eingang zum Peptid Ausgangstunnel (*exit tunnel*) zwischen den Nukleotiden A2058 und A2059. Damit wurde die Überlagerung der Bindungsstellen mit der Gruppe der Makrolide nachgewiesen (Hansen *et al.*, 2002; s. 1.3.2.1.2). Studien mit Kristallen der großen ribosomalen Untereinheit von *Deinococcus radiodurans* zeigten eine weitere Bindungsstelle an der räumlich grösseren hydrophoben Spalte der *A-Site* des PTC (*active-site crevice*) (Schlünzen *et al.*, 2001). Weitere Untersuchungen an Ribosomen von Eubakterien beschrieben die konzentrationsabhängige Affinität von Chloramphenicol zu beiden genannten Ligandenbindungsstellen (Hansen *et al.*, 2003a; Moazed und Noller, 1987). Die Bindung an der *A-Site* des PTC erfolgt v. a. durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken ausgehend vom *p*-Nitrosubstituent (mit C2452, U2504), der 1-Hydroxylgruppe (mit G2061), der 3-Hydroxylgruppe (mit U2506, G2505), sowie der 4'-Carbonylgruppe (mit U2506) mit den Sauerstoffatomen bzw. Stickstoffatomen der genannten Nukleotide (s. Abb. 1-7; Schlünzen *et al.*, 2001). Die Interaktion von Chloramphenicol mit der *A-Site* am PTC führt zur Inhibition

der Translation auf der Ebene der Elongation durch Hemmung der Transpeptidierungsreaktion.

1.4 Die zellfreie Proteinbiosynthese

1.4.1 Vor- und Nachteile der zellfreien Proteinbiosynthese

Die Möglichkeit der Expression von Proteinen nach der Zerstörung von Zellen unter Nutzung isolierter Zellfraktionen wurde bereits in der 1950er Jahren von unterschiedlichen Forschungsgruppen nachgewiesen (Borsook *et al.*, 1950; Siekevitz und Zamecnik, 1951; Gale und Folkes, 1954). Die zellfreie Expression von Proteinen hat gegenüber den klassischen Methoden der Expression in bakteriellen oder eukaryotischen Zellen einige Vorteile. Diese Vorteile stellen zum einen das Umgehen der Bildung von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) durch Überexpression falsch gefalteter, unlöslicher rekombinanter Proteine (Charles *et al.*, 1993; Chrnyk *et al.*, 1993) und zum anderen die fehlende intrazelluläre Hydrolyse der translatierten Proteine durch zelluläre Proteasen (Maurizi *et al.*, 1987) dar. Auch die Produktion von zytotoxischen, regulatorischen und instabilen Proteinen, die nicht in Zellen exprimierbar sind, ist durch die zellfreie Expression möglich (Stiege und Erdmann, 1995). Weitere Vorteile der zellfreien Expression gegenüber der zellbasierten Variante ist die Möglichkeit der direkten Kontrolle der Genexpression durch die Variation der Reaktionsbedingungen, welche auf das zu synthetisierende Protein angepasst werden können (z. B. pH-Wert, Ionenkonzentration, Redoxpotential). Die zellfreie Proteinexpression ermöglicht weiterhin die Zugabe und Analyse potentieller Inhibitoren der bakteriellen Translation ohne die Penetration der Zellwand als aktivitätslimitierenden Transportprozess. Auch die Faltung von Proteinen lässt sich durch die Zugabe von Chaperonen oder Kofaktoren zu den offen zugänglichen Expressionssystemen beeinflussen (Tsalkova *et al.*, 1993). Die Anwendung der zellfreien Proteinbiosynthese wurde auch zum Einbau markierter oder modifizierter Aminosäuren (Kigawa *et al.*, 1999) und zur direkten Expression linearer PCR-Produkte genutzt (Ohuchi *et al.*, 1998). Außerdem gelang es unterschiedlichste Membranproteine im präparativen Massstab durch die zellfreie Expression zu gewinnen (Klammt *et al.*, 2007). Nachteile der zellfreien Proteinbiosynthese sind u. a. die zeitintensiven Optimierungsschritte der Reaktionsbedingungen, die vergleichsweise hohen Kosten der Reaktionskomponenten (v. a. der verwendeten Enzyme), sowie die aufwändige Präparation des verwendeten Zellextraktes. Hauptnachteil ist jedoch bis heute die v. a. im *Batch*-System

erreichte geringe Proteinausbeute. Ursache hierfür stellt hauptsächlich die während der Reaktion auftretende Akkumulation von anorganischem Phosphat (P_i) aus den Energiequellen, wie z. B. ATP, GTP oder Phosphoenolpyruvat (PEP) dar (Kim und Swartz, 1999; Kim und Swartz 2000).

1.4.2 Unterschiedliche Systeme der zellfreien Proteinbiosynthese

1.4.2.1 Bakterielle und eukaryotische zellfreie Translationssysteme

Der erste revolutionäre Schritt in der Entwicklung der zellfreien Translation war die Expression exogener mRNA durch Nirenberg und Matthaei in einem auf *E. coli* basierenden System (Nirenberg und Matthaei, 1961). Dieses ermöglichte erstmals die gesteuerte zellfreie Translation von Proteinen. Auch die Verwendung eukaryotischer Zellextrakte aus tierischen Zellen (z. B. Kaninchen Retikulozyten Lysat) oder Pflanzen (z. B. Weizenkeimextrakt) wurde und wird erfolgreich für die zellfreie Proteinbiosynthese genutzt (Woodward *et al.*, 1974; Roberts und Paterson, 1973). Grundsätzlich ist die Verwendung jedes Organismus zur Präparation eines Extraktes zur Anwendung in zellfreien Systemen möglich. *E. coli* S30-Extrakte, die als Überstand nach Zentrifugation bei 30000 g zur zellfreien Translation verwendet werden, enthalten vor allem endogene Ribosomen, Transkriptions-/Translationsfaktoren, Enzyme (z. B. Acetatkinase), sowie tRNA-Moleküle. Die endogen vorhandene mRNA muss vor der Verwendung des Extraktes durch einen sogenannten *run-off*-Schritt vom Ribosom entfernt und durch Ribonukleasen zerstört werden (Zubay, 1973). Eine weitere Möglichkeit der Anwendung eines bakteriellen zellfreien Systems stellt das Gold-Schweiger-System dar, in dem die durch Verwendung eines Ionenaustauschers von Aminosäuren und Nukleinsäuren aufgereinigte *E. coli* S100-Fraktion unter Zugabe vorher isolierter Ribosomen verwendet wird (Schweiger und Gold, 1969; Gold und Schweiger, 1971). Der Vorteil der Verwendung eukaryotischer zellfreier Systeme liegt in der besseren Eignung der Translation eukaryotischer Proteine mit der Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation des Syntheseproduktes. Die Vorteile der Verwendung von Weizenkeimextrakten sind der geringe Anteil an endogener mRNA und eine damit verbundene einfachere direkte Translation exogener Substrate (Anderson *et al.*, 1983). Eukaryotische zellfreie Translationssysteme auf der Basis von Kaninchen Retikulozyten, welche aus lysierten Blutzellen anämischer Kaninchen gewonnen werden, müssen aufgrund einer hohen endogenen mRNA-Konzentration vor der Zugabe exogener mRNA mit

mikrokokkaler Ca^{2+} -abhängiger RNase behandelt werden (Pelham und Jackson, 1976). Insgesamt erwiesen sich auf *E. coli*-Extrakt basierende Systeme als produktiver (Proteinkonzentrationen bis mg/ml) und daher für präparative Fragestellungen besser geeignet. Eukaryotische Systeme eignen sich eher für funktionelle Studien der Translation eukaryotischer Proteine mit posttranslationalen Modifikationen (Katzen *et al.*, 2005).

Zellfreie Expressionssysteme bakteriellen bzw. eukaryotischen Ursprunges zur Identifizierung und Charakterisierung neuer Inhibitoren der prokaryotischen Translationsreaktion unter Verwendung unterschiedlichster Nachweismethoden der Genexpressionsprodukte stellen heute ein standardmäßig angewendetes Werkzeug in der antimikrobiellen Wirkstoffforschung dar (Gorokhovatsky *et al.*, 1998; Jefferson *et al.*, 2002; Bøddekker *et al.*, 2002; Dandliker *et al.*, 2003; Pratt *et al.*, 2004).

1.4.2.2 *Batch- versus Continuous-Design*

Die klassische zellfreie Proteinexpression ermöglicht die Translation exogener mRNA nach der Inkubation mit einem rohem Zellextrakt unter paralleler Zugabe von Aminosäuren und einem Energie liefernden bzw. regenerierenden System. Die gekoppelte zellfreie Transkriptions-/Translationsreaktion (ZFTT-Reaktion) ausgehend von der DNA (z. B. zirkuläre Plasmid-DNA) zeigt i. Allg. höhere Proteinausbeuten, als die nicht-gekoppelte Variante (Katzen *et al.*, 2005). Allerdings müssen für die gekoppelte ZFTT-Reaktion exogene RNA-Polymerasen (z. B. T7-RNA-Polymerase), sowie die Nukleotidtriphosphate (NTP) für die Biosynthese der mRNA zum Reaktionsansatz gegeben werden, um ausreichend hohe Proteinausbeuten zu erhalten. Neben der Verwendung von Plasmid-DNA wurde auch die Expression linearer PCR-Fragmente in eukaryotischen und bakteriellen gekoppelten zellfreien Expressionssystemen durchgeführt (Martemyanov *et al.*, 1997; Michel-Reydellet *et al.*, 2005). Das einfachste Design eines zellfreien Translationssystems ist das *Batch*-System. Das Charakteristikum dieses Systems stellt die Vereinigung der Komponenten der Substratlösungen und der Reaktionslösungen in einem Kompartiment dar. Der Nachteil dieses Designs ist die begrenzte Reaktionszeit und die einhergehende geringe Proteinausbeute. Ein Grund für die kurze Translationsaktivität ist die Akkumulation von anorganischem Phosphat aus Sekundärenergiequellen zur Regeneration von verbrauchtem ATP und GTP, wie z. B. Phosphoenolpyruvat (PEP), Acetylphosphat (AcP) oder Kreatinphosphat (CrP). Untersuchungen von Kim und Swartz zeigten, dass in *E. coli* S30-Extrakt enthaltene endogene Phosphatasen nach 30 Minuten bis zu 70 % des PEP dephosphoryliert hatten. Die

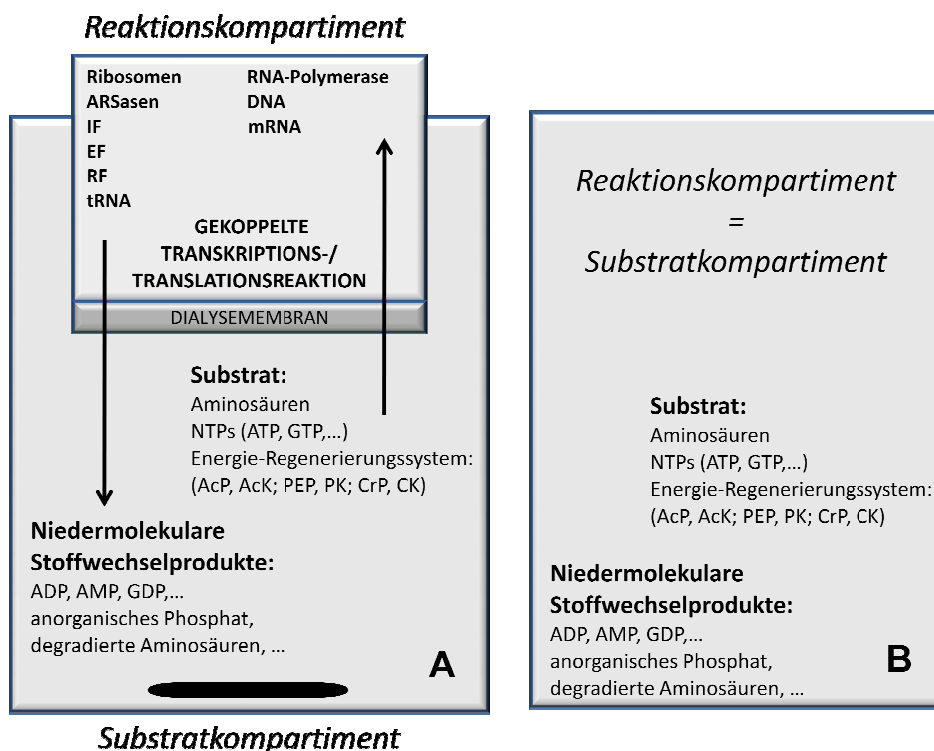
Akkumulation von anorganischem Phosphat führt ab Konzentrationen von 40 mM zur Komplexbildung von Magnesiumionen und damit zur Inhibition der Translationsreaktion (Kim und Swartz, 1999). Ein weiterer Grund für die Kurzlebigkeit des *Batch*-Systems ist die kontinuierliche Degradation essentieller Aminosäuren (v. a. Arginin, Cystein und Tryptophan). Die Proteinausbeute ließ sich jedoch hierbei durch die Erhöhung der Konzentration der einzelnen Aminosäuren verbessern. Durch die Modifikation der Zusammensetzung der Reaktionsbestandteile, wiederholte Zugabe von Substrat bzw. Verwendung von aufkonzentriertem Extrakt konnten im *Batch*-System bis zu 400 µg/ml Protein synthetisiert werden (Patnaik und Swartz, 1998; Kim *et al.*, 1996). Die Hauptvorteile des *Batch*-Ansatzes stellen die einfache Handhabung des Systems, der geringe apparative Aufwand, sowie die Kompatibilität mit *high-throughput*-Ansätzen dar.

Durch die Entwicklung neuer komplexerer zellfreier Expressionssysteme, wie dem CFCF-System (*continuous-flow cell-free*), dem CECF-System (*continuous-exchange cell-free*) und dem Bilayer-Diffusionssystem konnte die Proteinausbeute, durch aktive bzw. passive Entfernung entstehender hemmender Reaktionsmetabolite und gleichzeitiger Versorgung der Reaktionslösung mit Substrat in den mg/ml-Bereich gesteigert werden. Das CFCF- und das CECF-System sind durch die Trennung des Reaktionskompartiments und des Substratkompartiments mittels einer semipermeablen Ultrafiltrationsmembran (CFCF) bzw. einer Dialysemembran (CECF) charakterisiert (s. Abb. 1-8). Durch Spirin wurde 1988 erstmals der Nutzen des CFCF-Systems zur Verlängerung der zellfreien Translationsreaktion publiziert (Spirin *et al.*, 1988). Dieses System basiert auf dem konstanten Fluss der Substratlösung (*feeding solution*) durch eine die Reaktionslösung beinhaltende Reaktionskammer. Die Substratlösung wird nach der Passage der Reaktionskammer durch eine Ultrafiltrationsmembran gepumpt und befreit somit die Reaktionslösung von synthetisiertem Protein und potentiell inhibierenden Reaktionsprodukten (z. B. P_i, RNasen). Durch Anwendung des CFCF-Systems erreichten Spirin *et al.* Reaktionszeiten von bis zu 40 Stunden mit eukaryotischen und bakteriellen Extrakten. Auch die Anwendung der gekoppelten ZFTT-Reaktion wurde bereits Ende der 80er Jahre im CFCF-System durchgeführt (Baranov *et al.*, 1989). Die Nachteile dieses Systems stellen der hohe apparative Aufwand und die damit verbundenen Kosten dar. Auch das häufige Auftreten aggregierter Reaktionsbestandteile, welche zum Verstopfen der Trennmembran führen, sind ein Nachteil dieses Designs eines zellfreien Systems (Shirokov *et al.*, 2002).

Die CFCF-Methode wurde durch die Verwendung von Dialysemembranen mit Porengrößen von 10 – 50 kDa zur Trennung der Reaktionslösung von der Substratlösung vereinfacht. Diese

als CECF oder SFCF (*semi-continuous-flow cell-free*) bezeichnete Methode, erlaubte die Synthese von über 1 mg/ml Protein in einer 1 ml Dialysekammer, bei einer konstanten Syntheserate von über 14 Stunden (Kim und Choi, 1996). Anders als im CFCF-System akkumuliert hier das Protein im Reaktionskompartiment, wobei nur niedermolekulare Produkte die Dialysemembran in das voluminösere Substratgemisch passieren. Zum effizienten Stoffaustausch zwischen beiden Kompartimenten sollte die Reaktion unter Rühren durchgeführt werden. Hauptvorteile des CECF-Systems gegenüber der CFCF-Methode stellen die einfachere Handhabung und geringeren Kosten, aufgrund eines vereinfachten Aufbaus des Systems dar.

Die Entwicklung des Bilayer-Systems vereinigt die effizientere Syntheseleistung der *Continuous*-Methoden mit der Zugänglichkeit des Systems zur *high-throughput*-Translation von cDNA-Bibliotheken. Hierzu wird die Reaktionslösung mit der 5-fachen Menge an Substratlösung überschichtet und die Reaktion in Mikrotiterplatten durchgeführt (Sawasaki *et al.*, 2002). Nachfolgend sind das CECF- und das CFCF-System im *Continuous*-Design, sowie das *Batch*-System schematisch dargestellt:



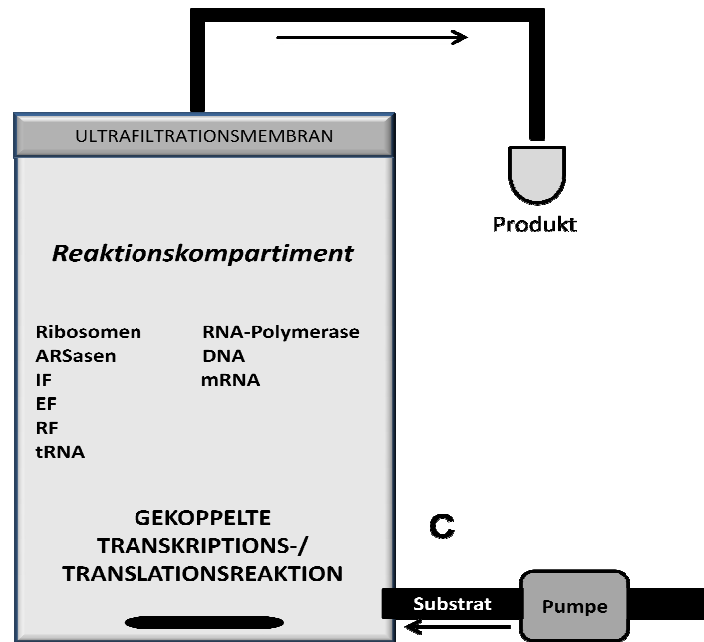


Abb. 1-8: Schematische Übersicht unterschiedlicher zellfreier Expressionssysteme; A: CECF-System; Trennung der Reaktions- und Substratlösungen durch eine semipermeable Dialysemembran; B: *Batch*-System; Vereinigung der Reaktions- und Substratlösungen; C: CFCF-System; aktiv gepumpter Substratfluss durch das Reaktionskompartiment; Produktanreicherung nach Passage einer Ultrafiltrationsmembran (modifiziert nach Shirokov *et al.*, 2002).

1.5 Grünes Fluoreszierendes Protein (GFP) als Reporterprotein

Das erstmals 1962 durch Shimomura (Shimomura *et al.*, 1962) aus der Qualle *Aequorea aequorea* isolierte grüne fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*; GFP) zeichnet sich durch eine besonders hohe Proteinstabilität, eine relativ geringe Masse und die Eigenschaft der Substratunabhängigkeit zur autokatalytischen Ausbildung des Fluorophors aus. GFP (aus *Aequorea*) ist ein monomeres Protein, welches aus 238 Aminosäuren besteht und eine Masse von 26,95 kDa besitzt. In der Qualle führt die enzymatisch katalysierte Oxidation von Coelenterazin als Luciferinkomponente, durch Aequorin als Luciferase, nach Bildung eines Calcium vermittelten Ca_3 -apo-aequorin-coelenteramidkomplex zur Emission von blauem Licht. Dieses blaue Licht wird durch strahlungslosen Energietransfer auf das GFP-Molekül übertragen und führt schließlich zur Emission von grün fluoreszierendem Licht (Ward und Cormier, 1979).

Das 1994 erstmals als Reporterprotein in prokaryotischen und eukaryotischen Zellen exprimierte GFP durch Chalfie *et al.* (Chalfie *et al.*, 1994) zeigte eine substratunabhängige autokatalytische posttranslationale Ausbildung des Fluorophors. Abbildung 1-9 beschreibt den, durch Heim und Cubitt (Heim *et al.*, 1994; Cubitt *et al.*, 1995) vorgeschlagenen Mechanismus zur Ausbildung des GFP-Chromophors:

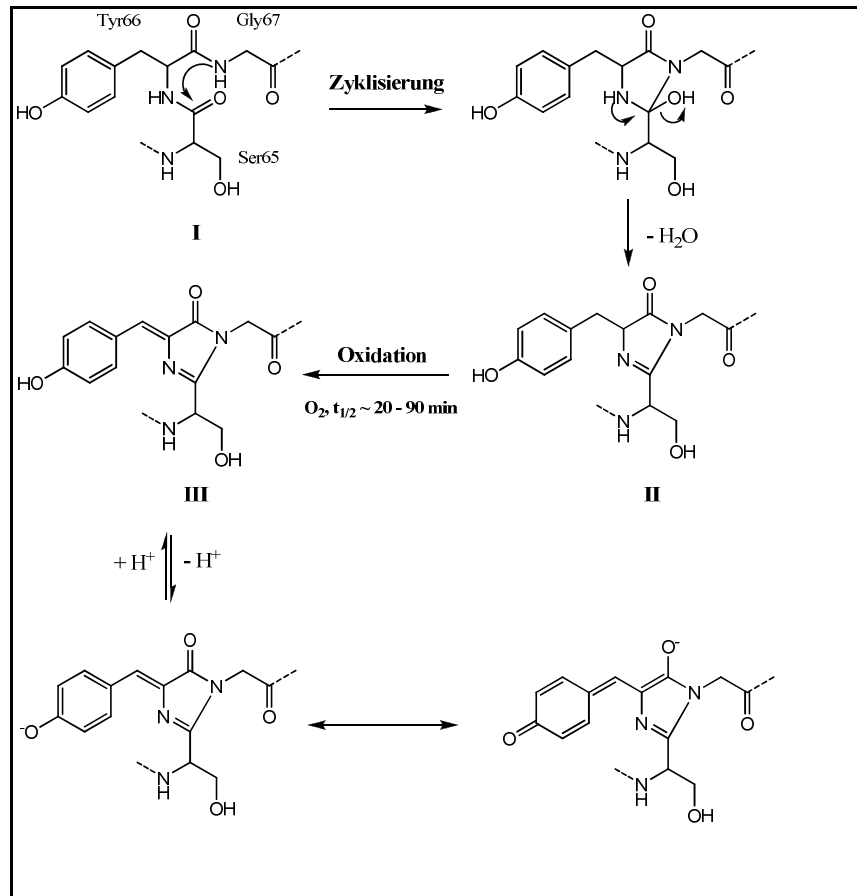


Abb. 1-9: Vorgeschlagener Mechanismus zur Ausbildung des GFP-Chromophors (modifiziert aus: Heim *et al.*, 1994).

Durch die Zyklisierung der Aminosäurereste Ser65, Tyr66 und Gly67 (I) und der Dehydratisierung zu einem *p*-Hydroxybenzylidimidazol-5-on (II) bildet sich die Chromophorstruktur des GFP aus. Nach der Oxidation der α,β -Position des Aminosäurerestes Tyr66 durch molekularen Sauerstoff kommt es zur Bildung des aromatischen *p*-Hydroxybenzylidenimidazol-5-on (III), welches die photochemischen Eigenschaften des GFP aufweist (s. Abb. 1-9). Das Chromophor des Wildtyp-GFP aus *Aequorea* besitzt ein Hauptabsorptionsmaximum bei 395 – 397 nm (Extinktionskoeffizient; $\epsilon = 25000 - 30000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und einen schwächeren Anregungsbereich bei 470 – 475 nm ($\epsilon = 9500 - 14000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Das Emissionsmaximum von GFP bei der Anregung mit Licht einer Wellenlänge von

395 nm zeigt sich bei 509 nm und entspricht strukturell der neutralen bzw. protonierten Struktur des Chromophors (s. Abb. 1-10; Heim *et al.*, 1994).

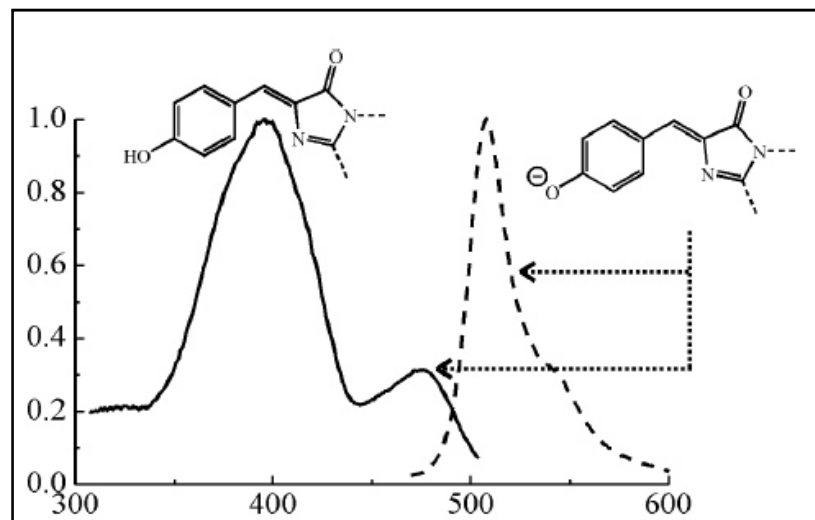


Abb. 1-10: Anregungs- und Emissionsspektrum (durchgezogene bzw. gestrichelte Linie) von Wildtyp-GFP, sowie der für die Spektren verantwortlichen Chromophorstrukturen (aus: Tsien, 1998).

Neben der substratunabhängigen autokatalytischen Ausbildung des Fluorophors zeigt GFP zusätzlich eine außerordentlich hohe Stabilität gegenüber denaturierenden Bedingungen (Ward und Bokman, 1982). Dies lässt sich durch die dreidimensionale Struktur des Proteins bzw. die Lage des Chromophors im Protein erklären. Die Röntgenkristallstrukturanalyse von GFP (aus *Aequorea victoria*) offenbarte die Lage des Chromophors nahe dem geometrischen Zentrum einer aus 11 β -Faltblattsträngen und einer Zentralhelix bestehenden zylindrischen β -Kannenstruktur (β -Can). Zusammen mit den sich an den Enden der Kannenstruktur befindenden kurzen Helix- und Schleifensegmenten bildet sich eine kompakte dreidimensionale Struktur, welche eine Interaktion des Chromophors mit Liganden erschwert bzw. die Stabilität des Proteins gegenüber denaturierenden Bedingungen oder Hitze erhöht (Yang *et al.*, 1996).

Weitere Eigenschaften des GFP, wie die einfache Quantifizierung bzw. Qualifizierung durch die nicht-invasive Messung der Fluoreszenz und eine hohe Sensitivität und

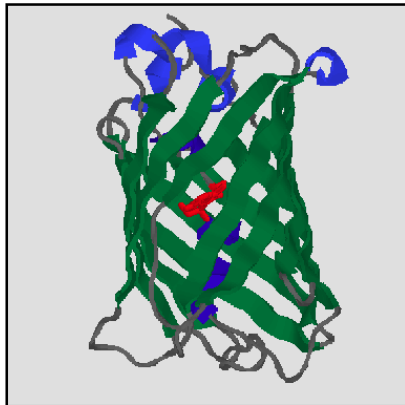


Abb. 1-11:
Schematische Darstellung der
dreidimensionalen Struktur von
WT-GFP;
(aus: Yang *et al.*, 1996)

Assaykompatibilität ermöglichten die stetige Erweiterung des biotechnologischen Anwendungsspektrums dieses Proteins. Es umfasst vor allem die Anwendung als fluoreszentes Reporterprotein zur Analyse der promotorabhängigen zellulären Genexpression in unterschiedlichsten Organismen (Zimmer, 2002), sowie die Verwendung von GFP als Fusionsprotein, durch die Expression chimärer Konstrukte aus GFP und des zu untersuchenden endogenen Proteins zur visuellen Darstellung dynamischer zellulärer Vorgänge (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2001). Weitere biotechnologische

Anwendungen von GFP stellen die Ganzzellvisualisierung von Mikroorganismen und die Analyse stressbedingter zellulärer Promotoraktivität dar (March *et al.*, 2003). Auch zur Untersuchung von Protein-Proteininteraktionen läßt sich GFP zusammen mit den GFP-Mutanten *cyan fluorescent protein* (CFP) oder *yellow fluorescent protein* (YFP) durch die Anwendung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) einsetzen (Takanishi, 2006).

Andere Reporterproteine, welche häufig zur Genexpressionsanalyse verwendet werden sind die Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT), β -Galactosidase, β -Glucuronidase, alkalische Phosphatase, sowie die Luciferasen aus Bakterien und dem Glühwürmchen (*firefly luciferase*). Der Nachweis dieser Proteine erfolgt entweder kolorimetrisch (z. B. β -Galactosidase, β -Glucuronidase, alkalische Phosphatase), durch Messung der Lumineszenz (z. B. β -Galactosidase, alkalische Phosphatase, Luciferasen), durch Messung der Radioaktivität (z. B. CAT), sowie durch Fluoreszenzmessungen (z. B. β -Galactosidase, β -Glucuronidase). Nachteile dieser Reporterproteine im Vergleich zu GFP sind v. a. die Substratabhängigkeit zur Ausbildung des Chromophors, die teilweise multimere Struktur der Proteine (z. B. tetramere bakterielle β -Galactosidase) (Silverman *et al.*, 1998) und die begrenzte Anwendbarkeit der Proteine durch eine hohe endogene enzymatische Aktivität in biologischen Systemen (Craig *et al.*, 1995). Nachteile bei der Verwendung von GFP als Reporterprotein ist die begrenzte Anwendbarkeit bei parallel eingesetzten endogenen bzw. exogenen fluoreszenten Substanzen, welche mit dem Emissionsspektrum des Reporterproteins überlappen.

1.6 Methoden der Proteomanalytik

Das Proteom bezeichnet die durch das Genom codierte Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle, einem Kompartiment oder einem Organismus, welche zu einem definierten Zeitpunkt, unter definierten Bedingungen translatiert vorliegen (Wasinger *et al.* 1995; Wilkins *et al.*, 1996). Daraus abgeleitet impliziert *Proteomics* die Analyse des Proteoms in seiner Gesamtheit (Aebersold *et al.*, 2000). Dazu zählen u. a. die Untersuchungen von Proteinisoformen, Proteinmodifikationen, Protein-Protein-Interaktionen, sowie die strukturelle Analyse von Proteinen bzw. Proteinkomplexen. Ein weiterer wichtiger Bereich der Proteomanalyse stellt der Vergleich unterschiedlicher Proteinexpressionsmuster unter dem Einfluss verschiedenster Stimuli (z. B. der Behandlung mit pharmakologischen Wirkstoffen) dar. Diese Analyse ermöglicht die Ermittlung von Biomarkern, welche zur Aufklärung pharmakologischer Wirkmechanismen neuer Wirkstoffe genutzt werden können (Righetti *et al.*, 2004). Damit ergänzt *Proteomics* die funktionelle Genomanalyse (*Genomics*) bzw. Transkriptomanalyse (*Transcriptomics*) und ermöglicht den systematischen Aufbau umfangreicher Datenbanken zur Beschreibung genexpressionsabhängiger Phänotypisierungen auf Zell- und Organismusebene (Tyers und Mann, 2003).

Der hohe dynamische Bereich (im Gegensatz zum vergleichsweise „statischen“ Genom) und die Komplexität des Proteoms eines Organismus stellen höchste Anforderungen an Techniken zur Aufklärung proteomanalytischer Fragestellungen. Zu diesen Techniken gehören u. a. Proteinarrays, *Yeast two-hybrid* Assays, die Röntgenstrukturanalyse, Antikörperassays und fluoreszenzbasierte Methoden (z. B. FRET-Assays) (Tyers und Mann, 2003). Als eine Methode der Wahl zur Charakterisierung komplexer Proteingemische hat sich vor allem die Kombination aus multidimensionaler Flüssigkeitschromatographie zur Auftrennung von Proteinen auf Peptidebene und der Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) zur Proteinidentifizierung etabliert. Durch diese sogenannte gelfreie *shotgun*-Analyse lassen sich mehrere tausend Proteine in einem einzelnen Experiment identifizieren und charakterisieren (Wolters *et al.*, 2001).

Die Kombination von „klassischer“ zweidimensionaler Gelelektrophorese (2-DE) und der Massenspektrometrie stellt eine weitere weit verbreitete Methode zur Proteintrennung und -identifizierung dar. Die Begrenzung dieses gelbasierten Ansatzes betrifft die Auftrennung von Proteinen mit extremen isoelektrischen Punkten (pI -Werte $> 11,5$), molaren Massen (> 250 kDa) und v. a. die Trennung stark hydrophober Proteine (z. B. Membranproteine) (Westermeier, 2001). Ein Vorteil der 2-DE gegenüber dem gelfreien Ansatz stellt die

Möglichkeit der Identifizierung posttranslational modifizierter Proteine bzw. Proteinisoformen durch erkennbare Änderung der Masse und des isoelektrischen Punktes auf dem Gel dar. Daher ist zur Analyse eines Proteoms die Kombination aus gelfreiem und gelbasiertem Ansatz als komplementäre Techniken zur maximalen Abdeckung zu identifizierender Proteine und deren Quantifizierung empfehlenswert (Schmidt *et al.*, 2004; Wolff *et al.*, 2006).

1.6.1 Die Analyse des bakteriellen Proteoms zur Charakterisierung antimikrobieller Wirkmechanismen

Erst die Entschlüsselung des Genoms unterschiedlicher bakterieller Organismen ermöglichte die Abschätzung der durch die Translation exprimierten Menge von Genprodukten und deren Charakterisierung durch die Anwendung der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE). Die gelelektrophoretische Auftrennung und massenspektrometrische Identifizierung einer möglichst hohen Anzahl bakterieller Proteine, stellt eine gute Basis für die Proteomanalyse zellulärer Reaktionen auf extrazelluläre Stimuli dar (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2004). Proteinexpressionsprofile, die durch die Anwendung proteomanalytischer Quantifizierungsstrategien eine veränderte Expression (Hoch- bzw. Herunterregulation) bestimmter Proteine unter bestimmten Wachstumsbedingungen zeigen, lassen sich zu einer Proteomsignatur (*proteomic signature*) zusammenfassen (VanBogelen *et al.*, 1999). Proteomsignaturen ermöglichen die Interpretation unterschiedlicher Proteinexpressionsmuster unter dem Einfluss zu analysierender Stimuli, wie z. B. die Behandlung mit antimikrobiellen Wirkstoffen mit unbekanntem Wirkmechanismus. Proteomsignaturen, welche die Interpretation des antimikrobiellen Wirkmechanismus unterschiedlichster Translationsinhibitor Klassen ermöglichen, stellen z. B. das Hitze- bzw. Kälteschockprofil des Gram-positiven Modellorganismus *Bacillus subtilis* dar. Aminoglykosid-Antibiotika (z. B. Streptomycin, Kanamycin) führen durch Interaktion mit dem bakteriellen Ribosom zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine in der Zelle und folglich zur induzierten Translation von Chaperonen und Proteasen. Diese Proteomsignatur entspricht dem Muster induzierter Proteine, welche bei Temperaturen von über 37 °C verstärkt in der Zelle exprimiert werden (Hitzeschockprofil). Die Gruppe der Antibiotika, welche ihre translationsinhibierende Wirkung durch Interaktion mit dem Peptidyltransferasezentrum des Ribosoms entfalten (z. B. Chloramphenicol, Erythromycin) führen zu einer Proteomsignatur mit induzierten ribosomalen Proteinen (bei *B. subtilis*) bzw. Kälteschockproteinen (bei *E.*

coli). Diese dem Kälteschockprofil entsprechende Signatur zeigte sich auch beim bakteriellen Wachstum unter 23 °C und stellt den durch Temperatursenkung hervorgerufenen verlangsamten Translationsprozess in der Zelle dar (VanBogelen und Neidhardt, 1990; Bandow *et al.*, 2003a).

Proteomanalytische Studien im Bereich der antimikrobiellen Wirkstoffforschung dienten v. a. der Identifizierung neuer Zielstrukturen für die antimikrobielle Therapie bzw. der Aufklärung der Wirkmechanismen neuer und bereits etablierter Antibiotika (Apfel *et al.*, 2001; Evers *et al.*, 2001; Gmuender *et al.*, 2001; Bandow *et al.*, 2003a; b). Das Studiendesign beinhaltete die Analyse des Proteom bzw. Subproteom des ausgewählten und unter Standardbedingungen kultivierten Bakterium. Der Einfluss antimikrobieller Wirkstoffe auf das Wachstum bakterieller Testorganismen zeigte Proteomsignaturen, welche als Indikator für die Interaktion mit spezifischen Zielstrukturen in der Zelle dienten und dadurch Hinweise auf mögliche Wirkmechanismen der Substanzen ergaben. Um Proteomsignaturen zwischen unterschiedlichen antimikrobiellen Wirkstoffen zu vergleichen, sind reproduzierbare experimentelle Bedingungen erforderlich. Hierzu zählen die Wahl des Testorganismus, die bakteriellen Wachstumsbedingungen, sowie die experimentellen Bedingungen während der Proteomanalyse.

Durch die Studie von Bandow *et al.* wurde erstmals ein Referenzkompendium für 30 Antibiotika mit unterschiedlichsten antibakteriellen Wirkmechanismen auf der Basis der Proteinexpressionsanalyse des Modellorganismus *B. subtilis* 168 erarbeitet (Bandow *et al.*, 2003a). Hierfür wurden exponentiell wachsende Zellkulturen in einem definiert zusammengesetzten Nährmedium mit variablen Konzentrationen unterschiedlicher Antibiotika inkubiert und die zytoplasmatischen Proteine nach *pulse labeling* mit radioaktivem L-[³⁵S]-Methionin durch die 2D-PAGE aufgetrennt. Die differentielle Genexpressionsanalyse erfolgte durch eine Software-gestützte Überlagerung der mit Silber angefärbten Proteine, welche während der gesamten Wachstumsphase exprimiert wurden und der durch Autoradiographie erstellten Proteinkarte, die alle unter Antibiotikawirkung stehenden, exprimierten Proteine darstellte (Bernhardt *et al.*, 1999; Bandow *et al.*, 2003a). Ein Beispiel für die erfolgreiche Ermittlung des Wirkmechanismus einer neuen antimikrobiellen Substanz durch den Vergleich von Proteomsignaturen und der Ermittlung von überlappenden induzierten Markerproteinen mit bereits charakterisierten Antibiotika stellt das Pyrimidinon-Antibiotikum BAY 50-2369 dar. BAY 50-2369 zeigte überlappende Markerproteine mit den Peptidyltransferasinhhibitoren Chloramphenicol und Tetracyclin. Die Interaktion der Substanz

mit dem ribosomalen Peptidyltransferasezentrum wurde durch mechanistische Studien bestätigt (Bandow *et al.*, 2003a; Limburg *et al.*, 2004).

Auch mittels der auf der Gen-Array-Technologie basierenden Transkriptomanalyse wurde bereits ein aus 37 antibakteriellen Substanzen bestehendes Referenzkompendium zur Klassifizierung unterschiedlicher Wirkmechanismen erstellt (Hutter *et al.*, 2004).

Ein Vorteil der proteomanalytischen Genexpressionsanalyse in der antimikrobiellen Wirkstoffforschung im Gegensatz zur Transkriptomanalyse stellt die direkte Erfassung exprimierter Zielstrukturen dar. Zusätzlich erlaubt sie die Identifizierung vorhandener Proteinmodifikationen bzw. Proteinisoformen. Allerdings ermöglicht die Proteomanalyse, im Gegensatz zur Transkriptomanalyse, bis heute keine Darstellung aller Genprodukte des Genoms (Freiberg und Brötz-Oesterheld, 2005). Zur bestmöglichen Charakterisierung der Wirkmechanismen neuer antimikrobieller Substanzen sollte daher ein Kombinationsansatz aus klassischem zellbasiertem Screening, zielstrukturbasierten biochemischen Assays (z. B. ZFTT-Assay), sowie proteom- und transkriptomanalytischen Methoden gewählt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Methoden der proteomanalytischen Genexpressionsanalyse sind nachfolgend genauer beschrieben.

1.6.2 Die zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) ist eine routinemäßig angewendete Technik zur Auftrennung komplexer Proteinmischungen mit einer Trennkapazität von mehr als 5000 Proteinen auf einem Gel (Görg *et al.*, 2004). Die Proteine werden entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (pI) in der ersten Dimension und ihrer molekularen Masse (M_r) in der zweiten Dimension aufgetrennt.

1.6.2.1 Isoelektrische Fokussierung – 1. Dimension

Das Prinzip der isoelektrischen Fokussierung beruht auf den amphoteren Eigenschaften von Proteinen. Die pH-abhängige Nettoladung eines Proteins hängt von der Anzahl saurer bzw. basischer Gruppen im Molekül ab. Da die isoelektrische Fokussierung in einem pH-Gradienten durchgeführt wird, wandern die Proteine nach Anlegen einer elektrischen Spannung in Richtung der ihrer Nettoladung entsprechend entgegengesetzt geladenen Elektrode.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der im elektrischen Feld aufgetrennten Teilchen berechnet sich nach:

$$v = \mu \cdot E$$

v = Geschwindigkeit der elektrophoretischen Migration [cm / s]

μ = elektrophoretische Mobilität [cm² / V·s]

E = elektrische Feldstärke [V/cm].

Bei Erreichen des dem isoelektrischen Punkt entsprechenden pH-Wertes beträgt die Nettoladung des Proteins gleich Null, wodurch die Proteinmigration stoppt. Damit läßt sich durch die isoelektrische Fokussierung die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) erreichen (s. Abb. 1-12).

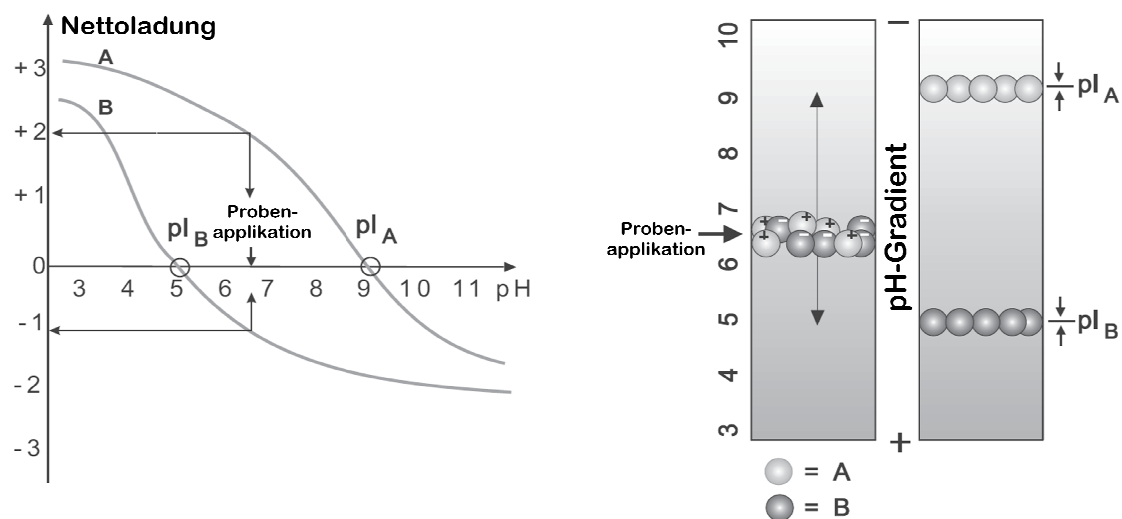


Abb. 1-12: Das Prinzip der isoelektrischen Fokussierung. Links: Nettoladungskurven zweier Modellproteine A und B. Rechts: Skizzierte Migration der Proteine A und B zum isoelektrischen Punkt (pI) während der isoelektrischen Fokussierung (modifiziert aus: Westermeier, 2001).

Die Entwicklung heterogener Mischungen aus niedermolekularen Puffersubstanzen mit hoher elektrischer Leitfähigkeit und Pufferkapazität am isoelektrischen Punkt, den sogenannten Trägerampholyten, ermöglichte erstmals die Ausbildung eines pH-Gradienten im elektrischen Feld zur isoelektrischen Fokussierung von Proteinen (Svensson, 1961; Vesterberg, 1969). Der Nachteil dieser Methode liegt allerdings in der Instabilität des ausgebildeten pH-Gradienten. Durch den auftretenden Effekt der Gradientenverschiebung (Kathodendrift) bei langen Fokussierzeiten kommt es daher häufig zum zeitabhängigen Verlust basischer und saurer Proteine und folglich besitzt damit diese Methode eine nur geringe Reproduzierbarkeit.

Dieses Problem wurde durch die Entwicklung von immobilisierten pH-Gradienten (IPG) weitgehend gelöst (Bjellqvist *et al.*, 1982). Das Prinzip der IPGs basiert auf der Copolymerisation von zehn chemisch genau definierten Amino- oder Carboxylgruppen

tragenden Acrylamidderivaten (Immobiline) mit der Trägermatrix, welche die Ausbildung stabiler reproduzierbarer pH-Gradienten von pH-Werten zwischen 2,5 und 12 ermöglicht. Weitere Vorteile sind die mögliche Nutzung (ultra)schmaler pH-Gradienten ($\Delta pI = 0,001$), die reproduzierbare Auftrennung basischer Proteine, sowie eine erhöhte Proteinladekapazität, verglichen mit der Anwendung von Trägerampholyten (Görg *et al.*, 1988; Bjellqvist *et al.*, 1993; Görg *et al.*, 2004).

1.6.2.2 SDS-PAGE bzw. PAGE – 2. Dimension

Durch die Anwendung der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Polypeptide nach ihrer molekularen Masse (M_r) aufgetrennt (Shapiro *et al.*, 1967; Lämmli *et al.*, 1970). Die Verwendung des anionischen Detergens SDS führt zur Ausbildung anionisch kettenartig organisierter mizellarer SDS-Proteinkomplexe in einem Verhältnis von 1,4 g SDS/g Protein. Diese anionischen Komplexe zeigen eine annähernd konstante negative Nettoladung pro Masseneinheit und führen damit zur Maskierung der individuellen Ladung der Proteine. Vorteile bei der Verwendung von SDS sind die hohe Löslichkeit vieler SDS-Proteinkomplexe, deren hohe elektrophoretische Mobilität und gute Anfärbbarkeit und die Minimierung der Proteindiffusion im Gel durch die Entfaltung der Polypeptide (Westermeier, 2001).

Die klassische Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) erfolgt durch Kombination zweier Gelbereiche: dem Sammelgel (pH = 6,8) und dem Trenngel (pH = 8,8). Grundsätzlich wird hier die elektrophoretische Trennung nach dem Prinzip der Isotachophorese in einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt. Diese als *Disc* Elektrophorese bezeichnete Methode ermöglicht zunächst die Auftrennung der Proteine durch die Ausbildung eines Feldstärkegradienten zwischen Folge- und Leitonen (z. B. Glycin- bzw. Chloridionen) des Sammelgels (Davis, 1964; Ornstein, 1964). Dadurch bilden sich distinkte gestapelte Zonen der Proteine aus (*stacking effect*). Nach Migration in das Trenngel kommt es zur Entstehung einer negativ geladenen Lauffront durch die höhere Mobilität der Folge- und Leitonen im Vergleich zu den Proteinen im nun homogen vorliegenden Puffersystem (pH = 9,5). Dies führt schließlich zur eigentlichen Trennung der Proteine nach dem Prinzip einer Zonenelektrophorese. Hierbei hängt die Auftrennung von der elektrophoretischen Mobilität bzw. der Ladung und Molekülgröße der Proteine ab.

1.6.3 Die Massenspektrometrie in der Bioanalytik

Das Grundprinzip der Massenspektrometrie (MS) ist die Auftrennung ionisierter organischer oder anorganischer Substanzen in der Gasphase nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z). Die dominante Rolle der Massenspektrometrie als Methode der Bioanalytik erwuchs durch die Entwicklung „weicher“ Ionisierungstechniken zur Überführung intakter Biomoleküle, wie z. B. Proteine, Nukleinsäuren und Zucker in das Vakuum des Massenspektrometers. Ionisierungstechniken, wie die Elektronenstoßionisation (EI) und die chemische Ionisation (CI), sind für die massenspektrometrische Analyse großer Biomoleküle aufgrund der hohen thermischen Belastung während des Ionisierungsprozesses und der daraus resultierenden starken Fragmentierung der Analytmoleküle ungeeignet. Die erste „weiche“ Ionisierungstechnik wurde 1981 durch Barber als *fast atom bombardement* (FAB) vorgestellt. Sie beruhte auf der Ionisierung polarer thermolabiler Biomoleküle (z. B. Peptide mit Molmassen von bis zu ca. 2 kDa) durch den Beschuss mit Neutralteilchen (z. B. Argon) hoher kinetischer Energie (Barber *et al.*, 1981). Die Entwicklung von MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*) durch Karas und Hillenkamp (Karas *et al.*, 1985) bzw. ESI (*electrospray ionization*) durch Fenn (Fenn *et al.*, 1989) und deren Nutzung zur schonenden Ionisierung nicht-flüchtiger, fragiler Biomoleküle revolutionierte das Methodenarsenal der Peptid- und Proteinanalytik. Diese Ionisierungstechniken ermöglichten den sensitiven massenspektrometrischen Nachweis intakter Proteine im hohen Massenbereich bis zu mehreren 100 kDa.

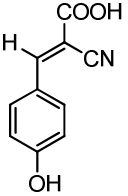
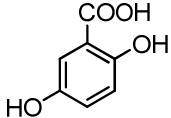
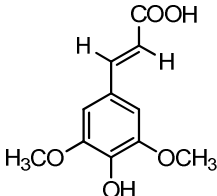
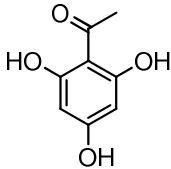
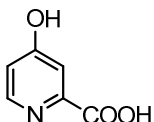
Grundsätzlich setzt sich ein Massenspektrometer aus drei Komponenten zusammen: der Ionenquelle, dem Massenanalysator und dem Detektor. Die Ionenquelle dient der Erzeugung ionisierter Analytmoleküle in der Gasphase. Zu den am häufigsten angewendeten Ionisierungstechniken in der Analyse von Biomolekülen gehören die bereits genannte ESI- bzw. MALDI-Technik. Der Massenanalysator dient der Auftrennung der erzeugten Ionen in Abhängigkeit ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses. Hierzu zählen Flugzeitmassenanalysatoren (*time-of-flight*; TOF), Quadrupole (Q), Quadrupol-Ionenfallen (*quadrupole ion traps*; QIT), lineare Ionenfallen (*linear ion trap*; LIT), Fourier-Transformations-Ionenzyklotronresonanz Analysatoren (FT-ICR) und die Orbitrap. Alle diese genannten Massenanalysatoren besitzen Vor- und Nachteile bezüglich der Massengenauigkeit, Massenauflösung, Sensitivität, dem nachweisbaren Massenbereich und ihrer Kosten. Als Detektoren in Massenspektrometern dienen beispielsweise Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) oder Mikrokanalplatten (*micro channel plates*). Da

im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit MALDI-TOF bzw. TOF/TOF-Massenspektrometern gearbeitet wurde, wird nachfolgend näher auf diese spezielle Kopplung der MALDI-Ionisierung und der Massenanalyse per TOF-MS eingegangen.

1.6.3.1 MALDI - *Matrix-assisted laser desorption/ionization*

Die Inkorporierung des zu untersuchenden Analyten in die Kristalle einer Matrixsubstanz stellt eine der notwendigen Voraussetzungen für die MALDI-Ionisierung dar (Strupat *et al.*, 1991). Nach der ersten publizierten Verwendung der Matrixsubstanz Typtophan durch Karas *et al.* (1985) zum massenspektrometrischen Nachweis der Aminosäure Alanin wurden bis heute weitere Matrixsubstanzen zum hochsensitiven Nachweis von Molekülen im hohen m/z -Bereich entwickelt (Karas *et al.*, 1988; Karas *et al.*, 1989; Karas *et al.*, 1990, Strupat *et al.*, 1991, Beavis *et al.*, 1992; Jaskolla *et al.*, 2008). Zwar zeigten alle Substanzen mit guten Eigenschaften einer MALDI-Matrix eine homogen verteilte Inkorporierung des Analyten (Strupat *et al.*, 1991; Beavis *et al.*, 1992; Horneffer *et al.*, 2003), der genaue Mechanismus und die Triebkraft dieses Inkorporierungsprozesses sind bis heute jedoch noch ungeklärt. Neue Untersuchungen legen nahe, dass die Inkorporierung des Analyten hauptsächlich über ionische Interaktionen zwischen der deprotonierten Matrix und dem protoniert vorliegenden Analyten erfolgen (Jaskolla *et al.*, 2008). Da es bisher keine universell anwendbare Matrixsubstanz für alle Arten von Analytmolekülen gibt, muss für jedes analytische Problem die dafür beste Matrix ausgewählt werden. Im Allgemeinen handelt es sich bei MALDI-Matrixsubstanzen um niedermolekulare organische aromatische Carbonsäuren, deren π -Elektronensysteme eine hohe Absorption im Wellenlängenbereich des angewendeten Lasers aufweisen.

Nachfolgend sind tabellarisch die am häufigsten angewendeten Matrixsubstanzen in der Bioanalytik dargestellt:

Matrix	Strukturformel	Wellenlänge	Anwendung	Referenz
α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (HCCA)		337 nm, 353 nm	Peptide aus Proteinverdau, Proteine (< 10 kDa)	Beavis <i>et al.</i> , 1992
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)		337 nm, 353 nm	Peptide aus Proteinverdau, Proteine, Kohlenhydrate	Strupat <i>et al.</i> , 1991
Sinapinsäure (SA)		337 nm, 353 nm	Proteine (> 10 kDa), Peptide	Beavis <i>et al.</i> , 1989
2,4,6-Trihydroxyacetophenon (THAP)		337 nm, 353 nm	Oligonukleotide (< 3 kDa)	Pieles <i>et al.</i> , 1993
3-Hydroxypicolinsäure (HPA)		337 nm, 353 nm	Oligonukleotide (> 3 kDa)	Taranenko <i>et al.</i> , 1994

Tab. 1-2: Häufig verwendete MALDI-Matrixsubstanzen für den massenspektrometrischen Nachweis von Biomolekülen (Beavis *et al.*, 1992).

Zur Präparation einer Mischung aus Matrix und Analyt wird üblicherweise die Matrixlösung im 1000 – 10000-fachen Überschuss mit der Analytlösung auf einem Metalltarget vermischt und das Lösungsmittel verdampft. Dadurch kristallisiert die Matrixsubstanz aus und der Analyt wird in die gebildeten Kristalle eingebaut. Nach dem Einschleusen des Metalltargets in das Hochvakuum der Ionenquelle des Massenspektrometers wird die präparierte Probe mit kurzen Laserimpulsen beschossen (Pulsdauer < 10 ns). Als Laser kommen v. a. UV-Laser, wie N₂-Laser (Emissionswellenlänge: 337 nm) oder Nd:YAG-Laser (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser; 355 nm bzw. 266 nm) zum Einsatz. Neben UV-Lasern werden auch IR-Laser (z. B. Er:YAG-Laser; 2,94 μ m) in der MALDI-MS in Verbindung mit IR-absorbierenden Matrixsubstanzen wie z. B. Glycerol eingesetzt.

Der Ionisationsmechanismus zur Bildung geladener Matrix- und Analytmoleküle im MALDI-Prozess ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Zurzeit existieren zwei Modelle zur Bildung von Ionen im MALDI-Prozess. Ersteres Modell stützt sich auf die Ergebnisse der Arbeit von Krüger *et al.*, in der durch Verwendung farbiger pH-Indikatoren nach Einbau in saure, basische und neutrale Matrixmoleküle keine Farbänderung auftrat, was auf den Erhalt des Ladungszustandes der Analytmoleküle im Matrixkristall hinwies (Krüger *et al.*, 2001). Nach diesem Cluster-Modell wird der Analyt im Matrix-Cluster desorbiert. Die Ionisation findet durch Photoionisationsprozesse bzw. durch Ladungstrennung statt. Die Mehrzahl vorhandener Ionen wird durch Protonen- bzw. Elektronentransfer im Cluster neutralisiert. Die detektierbaren letztlich vorhandenen Analytionen werden als *lucky survivors* bezeichnet. (Karas *et al.*, 2000; Karas und Krüger, 2003).

Das zweite Ionisationsmodell beschreibt die Bildung von Matrixradikalkationen, die durch Kollision mit neutralen Matrixmolekülen in der Gasphase protonierte Matrixspezies entstehen lassen. Die geringe Protonenaffinität protonierter Matrixmoleküle führt nach Kollision mit einem basischen Analyten höherer Protonenaffinität (wie z. B. Peptide oder Proteine) zur Übertragung des Protons von der Matrix auf den Analyten. Für diesen Ionisationsmechanismus sprechen aktuelle Ergebnisse, nach denen die Protonenaffinität einen entscheidenden Einfluss auf die effektive Ionenausbeute besitzt (Knochenmuss und Zenobi, 2003; Jaskolla *et al.*, 2008).

1.6.3.2 Der Flugzeitmassenanalysator – TOF (*time-of-flight*)

Einer der gebräuchlichsten Massenanalysatoren in der MALDI-MS ist der Flugzeitmassenanalysator oder TOF-Analysator (s. Abb. 1-13). Hauptvorteile dieser Art der Massenanalyse sind die hohe Massengenauigkeit und der theoretisch unbegrenzte Massenbereich. Die gepulste Erzeugung von Ionen durch die MALDI-Ionisierung ermöglicht die genaue Festlegung des Startzeitpunktes der zu messenden Flugzeit des Analyten. In axialen TOF-Analysatoren werden alle Ionen mit einer bestimmten Ladung durch eine Potentialdifferenz (typischerweise 20 – 25 kV) in die Richtung des Flugrohrs beschleunigt, um eine definierte kinetische Energie zu erhalten. Dabei treffen die Ionen in Abhängigkeit ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses mit unterschiedlicher Geschwindigkeit nach feldfreiem Driften durch das Flugrohr auf den Detektor. Dabei benötigen Ionen mit höheren m/z -Werten längere Zeit, um von der Ionenquelle zum Detektor zu gelangen, als Ionen mit geringeren m/z -Werten.

Die kinetische Energie der gebildeten Ionen berechnet sich nach:

$$E_k = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot U$$

- E_k = kinetische Energie
- m = Masse des Ions
- v = Geschwindigkeit des Ions
- z = Ladungszahl
- e = Elementarladung
- U = Potentialdifferenz.

Da die Flugzeit t nach:

$$t = L = L \sqrt{\frac{m}{2Ek}} = L \sqrt{\frac{m}{2zeU}}$$

ermittelt werden kann, lässt sich das m/z -Verhältnis des gemessenen Ions nach:

$$m/z = 2eU (t/L)^2 \text{ berechnen.}$$

L = Länge der Driftstrecke im Flugrohr

Die Kalibrierung, d. h. die Darstellung der Messzeit t als m/z -Skala erfolgt durch Anwendung zweier Kalibrierkonstanten A und B , welche durch Messung der Flugzeit t von Ionen bekannter m/z -Werte bestimmt wird. Danach berechnet sich m/z nach:

$$m/z = At^2 + B.$$

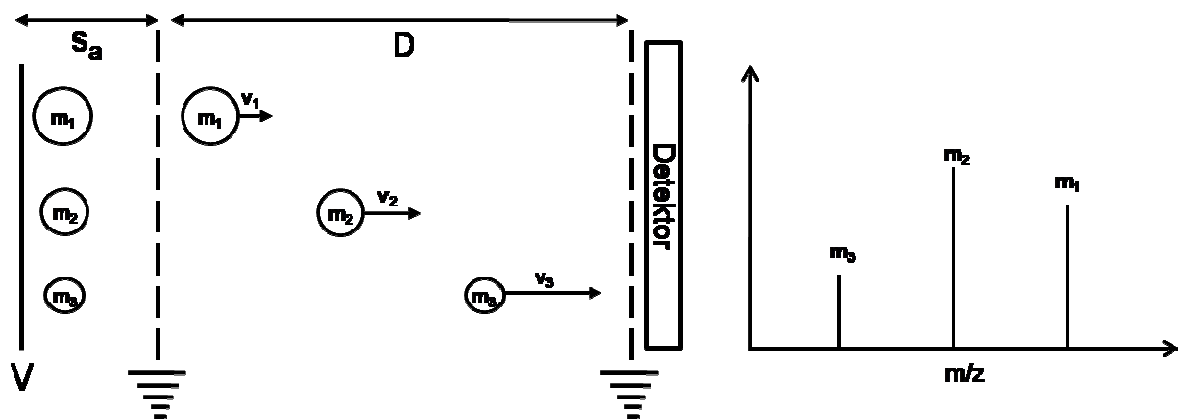


Abb. 1-13: Schematische Darstellung des Prinzips eines TOF-Massenspektrometers (ohne Laser). Dargestellt sind drei einfach geladene Ionen (m_1, m_2 und m_3) unterschiedlicher Masse ($m_1 > m_2 > m_3$) und Geschwindigkeiten ($v_1 < v_2 < v_3$). Rechts ist das theoretische Massenspektrum dargestellt. Weitere Abkürzungen: V = Quellenspannung; S_a = Beschleunigungsstrecke in der Quelle; D = feldfreie Driftstrecke.

Die Massenauflösung eines Ionensignals in der Massenspektrometrie kann aus dem Quotient von m (Masse des Peakzentrums) und Δm (Breite des Peaks des halben Peakmaximums;

FWHM = *full width at Half-Maximum*) berechnet werden. Negative Einflussgrößen auf die Massenauflösung von TOF-Analysatoren sind die initiale Geschwindigkeitsverteilung desorbierter Ionen gleicher Masse-zu-Ladungsverhältnisse, sowie die variable initiale Position dieser Ionen (Ortsverteilung). Dies führt zur Verminderung der Massenauflösung durch unterschiedliche Wegstrecken bzw. Entstehungszeitpunkte von Ionen gleicher m/z -Werte im Analysator. Durch die Einführung der gepulsten Ionenextraktion (DE, *delayed extraction*) ließen sich höhere Auflösungen mit TOF-Analysatoren erreichen (Wiley und McLaren, 1955; Brown und Lennon, 1995). Hierbei erfolgt eine zweistufige Extraktion der gebildeten Ionen in zwei Beschleunigungsphasen. In der ersten Phase wird die Beschleunigungsspannung nahe Null gehalten, um nach 10 – 100 ns durch Erzeugung eines elektrischen Feldes die Ionen in das Flugrohr zu extrahieren. Durch optimierte Einstellungen der Verzögerungszeit (*delay time*) und der Spannungsamplitude werden Unterschiede der Flugzeiten von Ionen gleicher m/z -Verhältnisse aufgrund ihrer initialen Geschwindigkeitsverteilung weitestgehend kompensiert.

Eine weitere Entwicklung zur Verbesserung der Massenauflösung stellt die Verwendung eines Ionenspiegels oder Ionenreflektors dar (Mamyryn *et al.*, 1973). Der Reflektor besteht aus mehreren Ringelektroden, die durch Ausbildung eines linearen Spannungsgradienten idealerweise ein konstantes elektrisches Feld erzeugen, in das die beschleunigten Ionen in Abhängigkeit ihrer kinetischen Energie unterschiedlich tief eindringen. Ionen mit höherer kinetischer Energie im Vergleich zu Ionen mit geringerer kinetischer Energie dringen hierbei tiefer in das elektrische Feld ein (s. Abb. 1-14). Da das elektrische Feld der Flugrichtung der Ionen entgegengerichtet ist, werden diese anschließend entgegen ihrer ursprünglichen Flugbahn beschleunigt. Durch die Optimierung der Spannung des Reflektors und der Geometrie des TOF-Analysators wird die Energieverteilung gebildeter Ionen durch Angleichung der Flugzeiten kompensiert und die Massenauflösung verbessert.

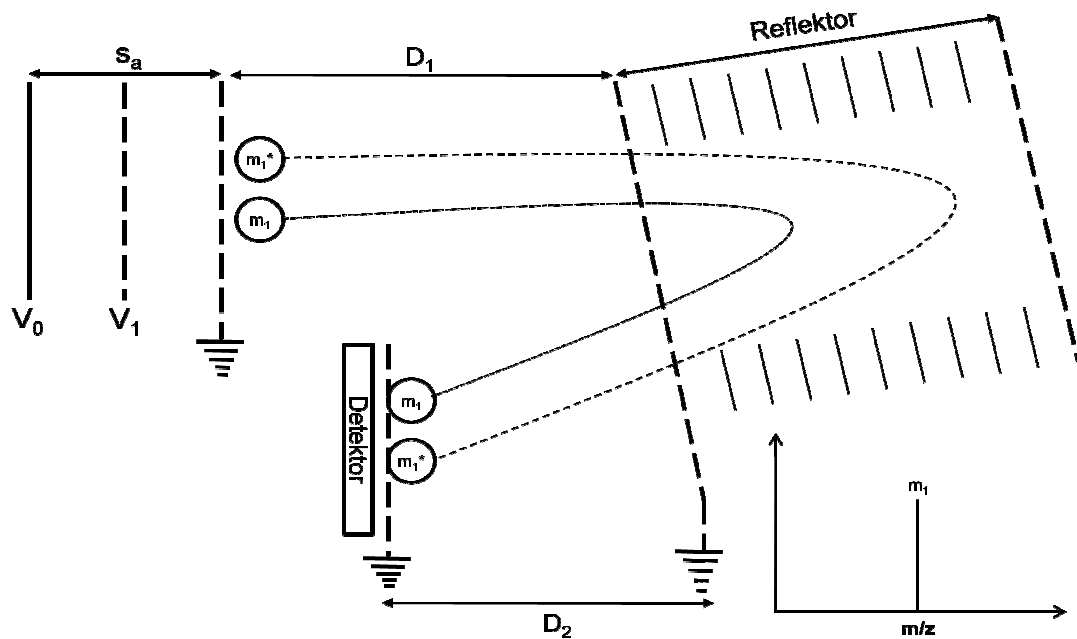


Abb. 1-14: Schematische Darstellung des Prinzips eines Reflektor-TOF-Massenspektrometers (ohne Laser). Dargestellt sind zwei Ionen mit gleichem Masse-Ladungsverhältnis (m/z), welche unterschiedliche kinetische Energie besitzen ($m_1^* > m_1$). Rechts ist das theoretische Massenspektrum dargestellt. Weitere Abkürzungen: V_0 = Erste Beschleunigungsspannung, V_1 = Zweite Beschleunigungsspannung; s_a = Beschleunigungsstrecke in der Quelle; D_1 und D_2 = feldfreie Driftstrecken.

Die Kombination beider Techniken führt in der MALDI-TOF-MS zu Massenauflösungen von über 20000 und Massengenauigkeiten von 5 – 10 ppm bei monoisotopischer Auflösung der Signale. Im höheren Massenbereich (ab ca. 5 kDa) sinken die Massenauflösung und Massengenauigkeit stetig.

1.6.4 *Bottom-up proteomics*

Grundsätzlich lassen sich Ansätze zur massenspektrometrischen Proteinidentifizierung in zwei Gruppen einteilen: den weit verbreiteten *bottom-up* Ansatz, welcher die Identifizierung des Proteins auf der Ebene von Peptiden impliziert und den weniger verbreiteten *top-down* Ansatz, welcher die Identifizierung durch Messung ganzer Proteine ohne vorherige enzymatische oder chemische Spaltung ermöglicht (Kelleher et al., 1999). Die in dieser Arbeit verwendete Methode der auf der MALDI-Massenspektrometrie basierenden Identifizierung von Proteinen auf der Ebene von Peptiden durch den Vergleich theoretisch und experimentell generierter Massenspektren wird als *peptide mass fingerprint* (PMF) bezeichnet. Dieser Ansatz wurde Anfang der 90er Jahre durch unterschiedliche Gruppen als Proteinidentifizierungsmethode vorgestellt (Henzel et al., 1989; Pappin et al., 1993; Mann et al., 1993; Henzel et al., 1993; James et al., 1993; Yates et al., 1993). Da die Identifizierung

einzelner Proteine in komplexen Proteinmischungen nur schwer realisierbar ist, muss dem PMF eine Methode zur Probenauftrennung vorgeschaltet werden. Die am häufigsten angewendeten Methoden zur Proteintrennung bzw. -identifizierung im Rahmen des PMF ist die Kombination aus 2-DE und MALDI-TOF-MS. Hierbei werden die Proteine nach der Auftrennung im Gel manuell oder automatisch ausgeschnitten, danach enzymatisch oder chemisch verdaut und damit in Peptide überführt. Die Identifizierung der Proteine auf der Ebene von Peptiden birgt grundsätzlich einige Vorteile, wie z. B. die höhere Sensitivität des massenspektrometrischen Nachweises, die potentiell höhere Löslichkeit von Peptiden und die Möglichkeit der Identifizierung von Peptidsequenzen durch den Einsatz von MS/MS-Techniken (Steen und Mann, 2004). Für die enzymatische Spaltung der Proteine wird hauptsächlich die Endopeptidase Trypsin eingesetzt, welche als Serinprotease hochspezifisch C-terminal zu den Aminosäuren Lysin und Arginin spaltet (Olsen *et al.*, 2004). Damit ermöglicht Trypsin die Generierung von Peptiden, die neben dem N-Terminus basische Aminosäuren am C-Terminus enthalten, welche durch die MALDI- bzw. ESI-Technik gut ionisierbar sind und im optimalen Massenbereich für den massenspektrometrischen Nachweis liegen. Im PMF-Ansatz wird das experimentell bestimmte Massenspektrum der Peptide mit *in silico* generierten theoretischen Massenspektren aller, in unterschiedlichen Proteindatenbanken enthaltenen, verdauten Proteinen verglichen und bewertet. Daher ist neben der effektiven Auftrennung komplexer Proteingemische das Vorhandensein der Proteine in Proteindatenbanken eine weitere Voraussetzung für ihre Identifizierung. Dies ist nur durch vorheriges Sequenzieren des Genoms des untersuchten Organismus, die *in silico* Translation in Genprodukte und der bereits genannte *in silico* Verdau der Proteine in Peptide möglich. Diese Voraussetzungen verdeutlichen die Begrenzungen des PMF-Ansatzes, denn Proteine, welche aufgrund von *splicing* oder anderen Mechanismen der Modifikation der Aminosäuresequenz (z. B. durch posttranslationale Modifikationen) von *in silico* generierten Peptidmassen abweichen, erschweren die Proteinidentifizierung, da keine ausreichende Übereinstimmung des theoretischen und des experimentellen Massenspektrums gegeben ist. Nach der Generierung des experimentellen Massenspektrums wird dieses durch Anwendung von softwarebasierten Suchprogrammen wie Mascot, MS-Fit, ProFound oder PeptIdent durch Abgleich der in den Datenbanken (wie z. B. SwissProt, NCBIInr) enthaltenen Proteinsequenzen bewertet. Hierbei sind unterschiedliche Suchparameter, wie z. B. das verwendete Proteinspaltungsreagenz, überlesene Schnittstellen des Enzyms, Modifikationen der Peptide (z. B. Oxidation von Methionin, Alkylierung von Cystein) und die Peptidmassentoleranz anzugeben (Thiede *et al.*, 2005). Das in dieser Arbeit für die

Proteinidentifizierung verwendete Suchprogramm Mascot (www.matrixscience.com) basiert auf dem MOWSE (Molecular Weight Search) Algorithmus (Pappin *et al.*, 1993).
 Nachfolgend ist der schematische Ablauf der Proteinidentifizierung mittels PMF dargestellt:

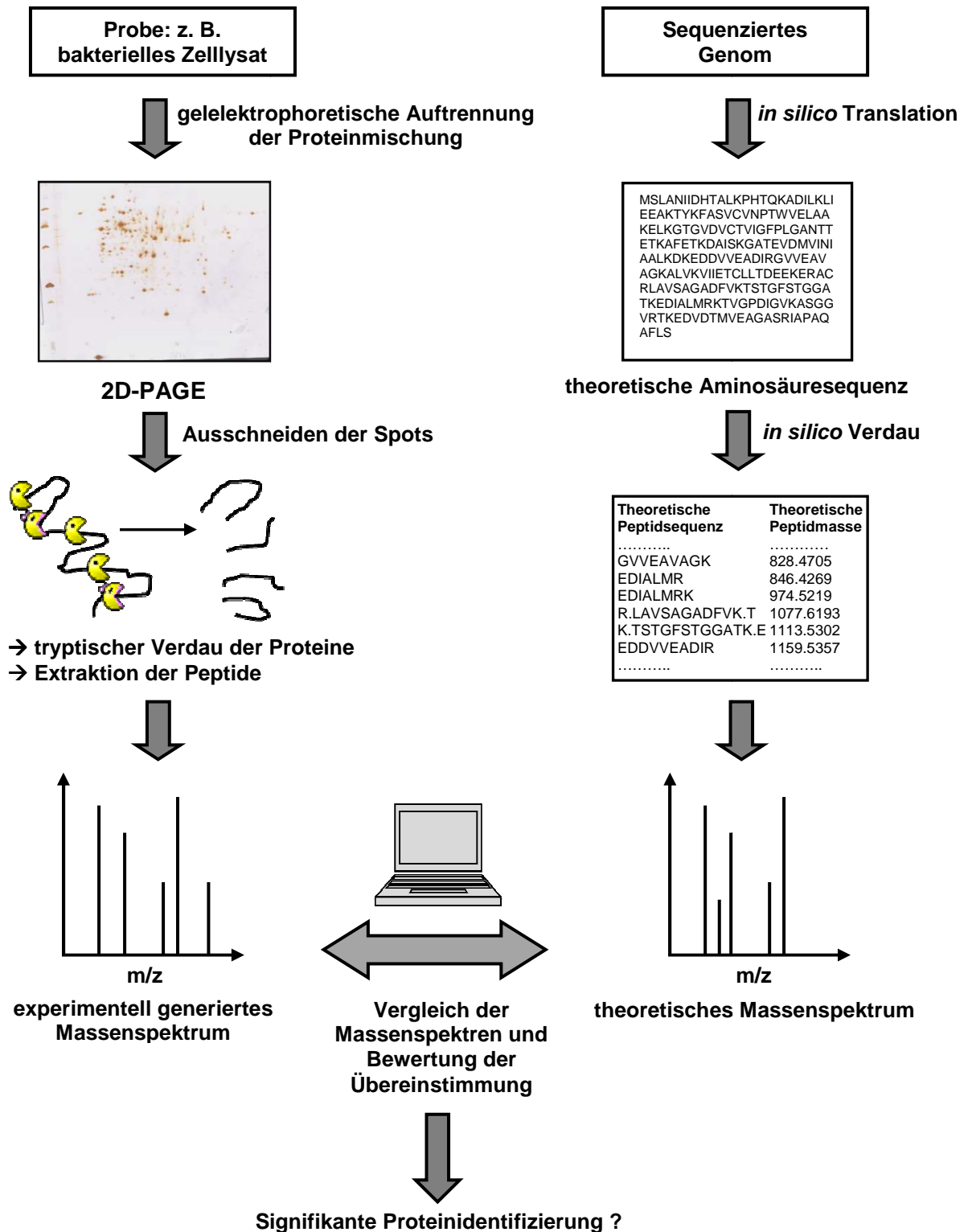


Abb. 1-15: Schematische Darstellung des Prinzips der Proteinidentifizierung durch PMF.
 Abkürzungen: 2D-PAGE: Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

1.6.5 Die gelbasierte proteomanalytische Quantifizierung

Neben der qualitativen Proteinidentifizierung stellt die Quantifizierung differentiell exprimierter Proteine biologischer Systeme unter dem Einfluss exogener Stimuli, wie z. B. durch die Behandlung mit pharmakologisch aktiven Substanzen, ein weiteres wichtiges Feld in der Proteomanalytik dar. Die Analyse quantitativer Unterschiede differentiell exprimierter Proteine ermöglicht das Auffinden spezifischer Biomarker oder Proteomsignaturen zur Beleuchtung möglicher pharmakologischer Wirk- oder Toxizitätsmechanismen in biologischen Systemen (z. B. in der Zelle, Geweben oder Körperflüssigkeiten). Da die Ausprägung des Phänotyps eines biologischen Systems vor allem auf der Ebene von Proteinen reguliert wird, ist deren quantitative Analyse zur Ermittlung veränderter Genexpressionsmuster (*proteomics*) besser geeignet als die ausschließliche Quantifizierung auf der Ebene der mRNA (*transcriptomics*). Im Bereich der quantitativen Proteomanalyse unterscheidet man basierend auf der Nachweismethode der Proteine den gelbasierten und den auf der Massenspektrometrie basierten Ansatz. Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Methoden der gelbasierten relativen Proteinquantifizierung angewendet wurden, wird nachfolgend nicht näher auf die Fülle unterschiedlicher auf der Massenspektrometrie basierender Quantifizierungsstrategien (z. B. durch metabolische oder chemische Proteinmarkierung mit stabilen Isotopen) eingegangen.

Gelbasierte Quantifizierungsansätze beinhalten die zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine und deren nachfolgende relative Quantifizierung durch den Vergleich unterschiedlich abundanter Proteine. Hierbei werden in Abhängigkeit des Auflösungsvermögens des Gels relevante Subproteome zweier Probengruppen des gleichen Organismus miteinander verglichen, welche unterschiedlichen experimentellen Bedingungen ausgesetzt waren (z. B. krank/gesund bzw. behandelt/unbehandelt). Ältere Quantifizierungsstrategien basieren auf dem Vergleich von Proteinkarten mehrerer 2D-Gele unterschiedlich behandelter Proben durch die softwaregestützte Überlagerung aufgenommener Gelbilder. Die relative Quantifizierung der aufgetrennten Proteinspots erfolgt hierbei nach dem Anfärben der 2D-Gele. Dafür werden meist Fluoreszenzfarbstoffe mit einem hohen linearen dynamischen Bereich zur verlässlichen Quantifizierung verwendet (z. B. Sypro[®] Ruby, Deep Purple[™]). Anschließend werden folgende Teilschritte zur relativen Quantifizierung der Proteine durchgeführt: Erzeugung eines elektronisch auswertbaren Gelbildes aller 2D-Gele (z. B. mittels Scanner oder CCD-Kamera), softwaregestützte Überlagerung der Gelbilder einer Versuchsgruppe (*image warping and fusion*), Detektion

aller Proteinspots, relative Quantifizierung der Proteinspots und der Abgleich der Spotmuster zwischen den jeweiligen 2D-Gelen einer Gruppe und Bestimmung differentiell abundanter Proteine (Marengo *et al.*, 2005; Berth *et al.*, 2007). Kommerziell verfügbare Bildanalyseprogramme zur relativen Quantifizierung sind z. B. PDQuest[®], ProteomWeaver[®] (BioRad Laboratories, München, Deutschland), Z3[®] (Compugen, Tel Aviv, Israel) und Delta2D[®] (DECODON GmbH, Greifswald, Deutschland). Ein Hauptnachteil dieser Quantifizierungsstrategie ist der große Arbeits- und Materialaufwand. Dieser ist nötig aufgrund der hohen Anzahl an zu vergleichenden 2D-Gelen zur Erzeugung einer ausreichenden Reproduzierbarkeit der Gele bzw. statistisch signifikanter Daten (i. Allg. sind 4 – 5 2D-Gele beider Gruppen anzufertigen). Daher ist diese Methode für die Quantifizierung geringer Probenmengen aufgrund des hohen Probenbedarfs ungeeignet.

Modernere gelbasierte relative Quantifizierungsstrategien mindern den hohen Arbeits- und Materialaufwand durch Verwendung fluoreszierender Farbstoffe, welche kovalent an Proteine binden und somit die Auftrennung mehrerer Proteinproben in einem Gel ermöglichen. Weiterhin werden die Nachteile der älteren Ansätze, wie Gel-zu-Gel-Variationen und die begrenzte Genauigkeit der Spotüberlagerung unterschiedlicher Gele verhindert. Dieser neue Ansatz wird als DIGE (*difference gel electrophoresis*) bezeichnet und wurde erstmals durch Ünlü *et al.* beschrieben (Ünlü *et al.*, 1997). Weiterer große Vorteile dieser Methode stellen der hohe lineare dynamische Bereich von 3 – 5 Größenordnungen und die geringe Nachweisgrenze von Proteinen im pg-Bereich dar (Tonge *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 2003). Im Rahmen einer DIGE-Analyse lassen sich je nach zu markierender Probenmenge und verwendetem Fluoreszenzfarbstoff zwei Arten der Farbstoffmarkierung (*labeling*) unterscheiden: das *Minimallabeling* und das *Sättigunglabeling*.

Die Färbemethode des *Minimallabelings* beruht auf der kovalenten Bindung N-hydroxysuccinimidester substituierter Cyaninfarbstoffe an die ϵ -Aminogruppen von ca. 3 % aller lysinhaltigen Proteine der zu markierenden Proben. Momentan werden kommerziell drei Cyaninfarbstoffe mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen angeboten (Cy2, Cy3, Cy5; siehe 2.2.14.1). Das *Minimallabeling* erlaubt somit die Auftrennung von bis zu drei unterschiedlich markierten Proben inklusive eines internen Standards, welcher durch Vereinigung gleicher Proteinmengen zweier unterschiedlich experimentell behandelter Probengruppen und anschließender Fluoreszenzmarkierung erzeugt wird. Die Verwendung eines internen Standards erlaubt die Normalisierung der gemessenen Proteinabundanzen und damit den vereinfachten Vergleich gleicher Proteine auf unterschiedlichen Gelen. Weiterhin verbessert der interne Standard das Ergebnis der Überlagerung verschiedener Gelbilder eines

Experiments (*inter-gel matching*), da alle zu analysierenden Proteine im internen Standard enthalten sind. Dadurch wird die experimentelle Gel-zu-Gel-Variation minimiert, die Genauigkeit der Proteinquantifizierung gleicher Proteine zwischen verschiedenen Gelen erhöht und ein statistisch signifikantes Ergebnis erreicht. Die Erhöhung der Molmasse fluoreszenzmarkierter Proteine um ca. 450 Da stellt allerdings auch einen Nachteil für die Identifizierung aus dem Gel ausgeschnittener Proteine im Rahmen eines proteomanalytischen Experiments dar. Die resultierende Massenverschiebung zwischen markierten und nicht markierten Proteinen nach der gelelektrophoretischen Auftrennung in der zweiten Dimension führt, v. a. im niedrigen Massenbereich, zum fehlerhaften Ausstechen massenspektrometrisch nachzuweisender Proteine. Eine Erhöhung des Anteils des Fluoreszenzfarbstoffes würde neben der Erhöhung der ohnehin schon relativ hohen Kosten der Farbstoffe zur Bildung stark verbreiteter Spotbereiche und zur Blockade der Trypsin katalysierten Verdaureaktion für die Proteinidentifizierung führen (Righetti *et al.*, 2004).

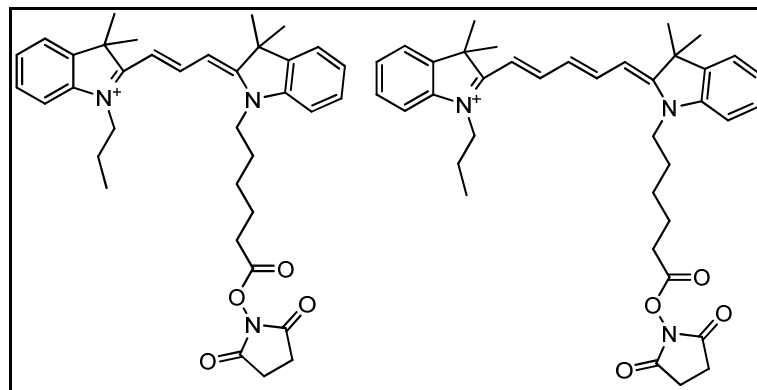


Abb. 1-16: Zwei Beispiele verwendeter Fluoreszenzfarbstoffe für das *Minimallabeling*. Links: Cy3 (Absorptionsmaximum: 550 nm / Emissionsmaximum: 570 nm); Rechts: Cy5 (649 nm / 670 nm).

Das *Sättigunglabeling* wird für die relative Quantifizierung von Proteinen bei Vorhandensein nur geringer Probenmengen (z. B. bei der Analyse von Proben aus Mikrodissenktionen) eingesetzt. Dieses maximale *labeling* beruht auf der kovalenten Bindung Maleinimid-substituierter Cyaninfarbstoffe an alle vorhandenen Cysteinreste der Proteine (Shaw *et al.*, 2003). Hierbei werden die vorhandenen Disulfidbrücken der Proteine durch Reduktion (z. B. durch Tris-(2-carboxethyl)phosphine (TCEP) bei pH = 8) in Cystein überführt und nachfolgend mit den Cyaninfarbstoffen markiert. Da kommerziell nur zwei Farbstoffe für das *Sättigunglabeling* erhältlich sind, kann die relative Quantifizierung zweier Proben inklusive internem Standard nur auf zwei getrennten 2D-Gelen durchgeführt werden. Dies bedeutet, dass im Gegensatz zum *Minimallabeling* keine Möglichkeit zur Auftrennung der Proteine beider Probengruppen auf einem Gel möglich ist, wenn ein interner Standard zur

Normalisierung der quantitativen Daten verwendet werden soll. Ein weiterer Nachteil des Sättigungslabelings besteht in der verminderten Löslichkeit markierter Proteine, was zur Präzipitation und zum Verlust schlecht löslicher Proteine in der ersten oder zweiten Dimension der gelelektrophoretischen Auftrennung führen kann. Nachfolgend sind schematisch die Strategien der gelbasierten relativen Proteinquantifizierung durch Anwendung der 2D-DIGE-Technik dargestellt:

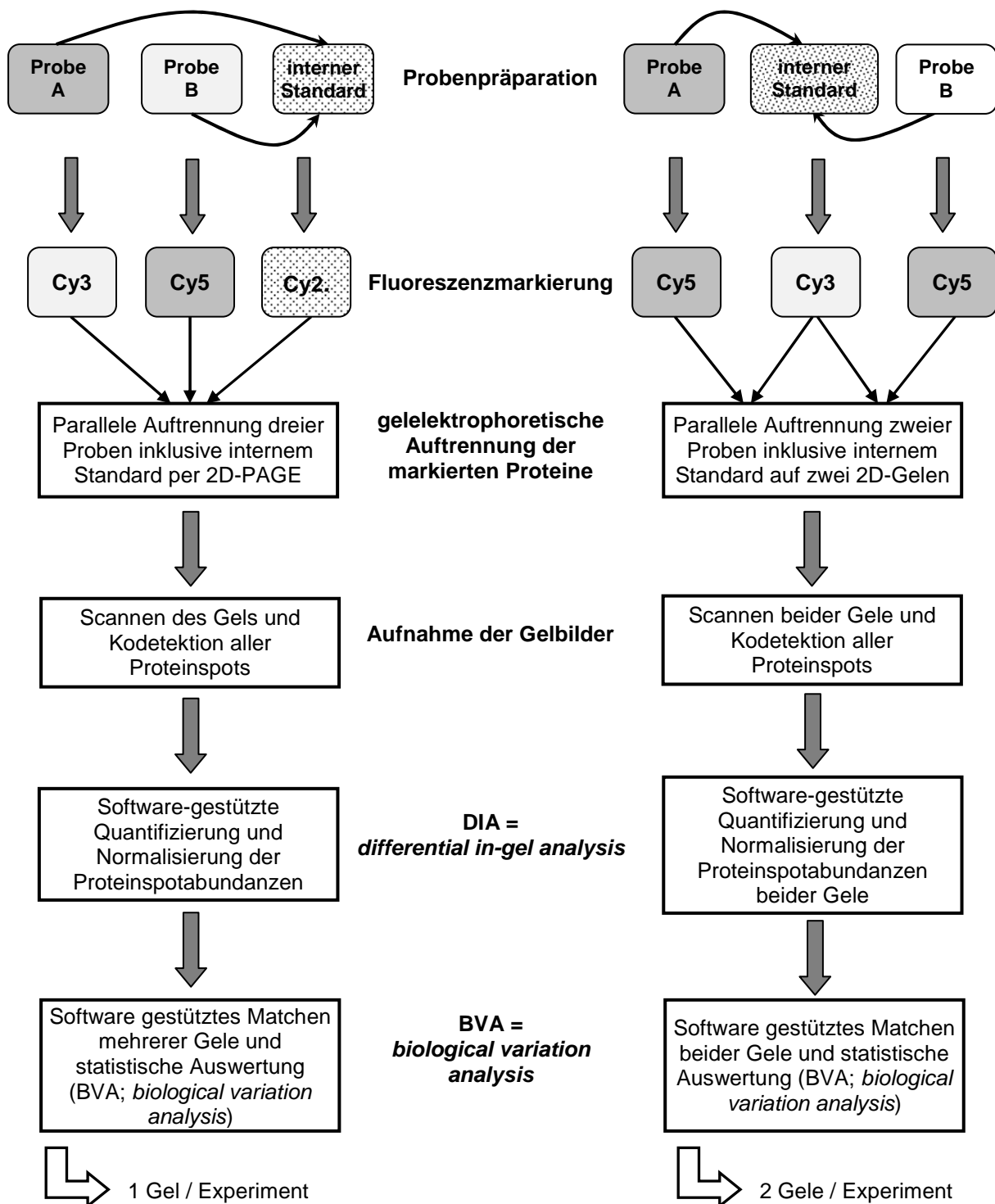


Abb. 1-17: Schematische Darstellung der relativen gelbasierten Proteinquantifizierungsstrategien per 2D-DIGE. Links: Proteinmarkierung mittels Minimallabeling. Rechts: Proteinmarkierung mittels Sättigungslabeling.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Vor dem Hintergrund weltweit steigender Zahlen Antibiotika-resistenter Krankheitserreger und der gleichzeitig geringen Anzahl potenter Therapeutika zur Behandlung komplizierter Infektionserkrankungen, stellt das Auffinden antimikrobieller Substanzen mit neuen Wirkmechanismen eine große Herausforderung für die Arzneimittelforschung dar.

Besonders prokaryotische Ribosomen sind als essentielle Bestandteile des Biosyntheseprozesses bakterieller Proteine attraktive Zielstrukturen für die Entdeckung und Charakterisierung neuer antibakterieller Substanzen.

Die Verwendung zellfreier prokaryotischer Genexpressionssysteme ermöglicht die direkte Analyse der Interaktion potentiell aktiver Substanzen mit allen essentiellen Zielstrukturen der Transkriptions-/Translationsmaschinerie unter Umgehung limitierender Penetrationsprozesse durch die bakterielle Zellwand bzw. Zellmembran.

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer antimikrobieller Inhibitoren der bakteriellen zellfreien Transkriptions-/Translationsreaktion (ZFTT-Reaktion) durch Nutzung eines nicht-kommerziellen zellfreien GFP-Expressionsassays. Nach dessen erfolgreicher Etablierung sollte eine Substanzbibliothek chemisch heterogenen Ursprunges untersucht werden, welche durch die Anwendung virtueller Screeningverfahren, etablierter Synthesestrategien und der Literaturrecherche zum Auffinden natürlicher und synthetischer antibakterieller Substanzen generiert wurde. Gleichzeitig wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere interdisziplinäre Forschungskooperationen mit unterschiedlichen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen aufgebaut, um vor dem Hintergrund wachsender Resistenzzahlen bakterieller Krankheitserreger, neue Quellen antimikrobieller Substanzen zu erschließen.

Im Rahmen einer Etablierungsphase sollte zunächst die Optimierung, Validierung und Charakterisierung des zellfreien prokaryotischen GFP-Expressionssystems als *Screening Assay* zum Auffinden neuer ZFTT-Inhibitoren durchgeführt werden.

Nachfolgend wurde die Aktivität unterschiedlicher Stoffklassen antimikrobieller Translationsinhibitoren in Abhängigkeit ihrer physikochemischen Substanzeigenschaften unter zellfreien Bedingungen und unter Ganzzellbedingungen durch parallele Verwendung des etablierten ZFTT-Assays mit Ganzzellassays untersucht.

Zur Charakterisierung des antimikrobiellen Potentials der analysierten Substanzen gegen bakterielle Krankheitserreger sollte neben der ZFTT-Aktivität auch die inhibitorische Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative humanpathogene und multiresistente Testorganismen bestimmt werden.

Weiterhin wurde die Zelltoxizität bzw. Selektivität ausgewählter antimikrobieller ZFTT-Inhibitoren gegenüber eukaryotischen Zellen durch die Analyse des inhibitorischen Einflusses auf das Zellwachstum humaner NALM-6-Zellen analysiert.

Der Einsatz proteomanalytischer Quantifizierungstechniken sollte schließlich Aufschlüsse über den Wirkmechanismus ZFTT-aktiver antimikrobieller Substanzen liefern.

Die Kombination der zweidimensionalen Gelelektrophorese unter Verwendung fluoreszierender Cyaninfarbstoffe (2D-DIGE-Ansatz) mit der MALDI-TOF-Massenspektrometrie ermöglicht die relative Quantifizierung und Identifizierung differentiell exprimierter Markerproteine behandelter Zellkulturen. Dies sollte die Formulierung der hypothetischen Wirkmechanismen der eingesetzten antimikrobiellen Substanzen durch den Vergleich mit bereits charakterisierten Markerproteinen erlauben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) untersuchter Substanzen wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

Stamm	Beschreibung	Herkunft
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Tryptophan-auxotropher Stamm (<i>trpC2</i>)	DSMZ
<i>Escherichia coli</i> A19	<i>rna-19, gdhA2, his-95, relA1, spoT1, metB1</i>	GSC, Yale University, (New Haven, USA)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Klinikisolat/ Kontrollstamm (entspr. DSMZ 1103)	DSMZ
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Kontrollstamm (entspr. DSMZ 2569)	DSMZ
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA, T2069	MRSA-Referenzstamm/ süddeutscher Epidemiestamm	Robert-Koch-Institut, Berlin
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Kontrollstamm (entspr. DSMZ 2570)	DSMZ
<i>Enterococcus faecium</i> VRE345	Klinikisolat	Universitätsklinik, Frankfurt am Main

Folgende Bakterienstämme wurden zur Gewinnung antimikrobieller bzw. ZFTT-aktiver roher Kulturüberstände verwendet:

Stamm	Beschreibung	Herkunft / Referenz
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Wildtyp	ATCC
<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 3258	Wildtyp	DSMZ
<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 6405	Wildtyp	DSMZ
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 39320	Wildtyp, Difficidinproduzent	DSMZ / Wilson <i>et al.</i> , 1987
<i>Bacillus subtilis</i> HS	Wildtyp, Naturisolat	DSMZ
<i>Bacillus subtilis</i> HI	Wildtyp, Naturisolat	DSMZ
<i>Bacillus subtilis</i> IP	Wildtyp, Naturisolat	DSMZ
<i>Bacillus subtilis</i> N5	Wildtyp, Naturisolat	DSMZ
<i>Bacillus subtilis</i> EN63	Wildtyp, Naturisolat	DSMZ
<i>Bacillus subtilis</i> A1/3	Wildtyp	DSMZ

Zur Transformation des verwendeten Plasmids pIVEX2.3-GFP wurde folgender Stamm verwendet:

Stamm	Beschreibung	Herkunft / Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F' j80d/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>lacU169 deoR recA1 endA1 hsdR17</i> <i>supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i>	DSMZ / Raleigh <i>et al.</i> , 1989

Tab. 2-1 – 2-3: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme. Abkürzungen: DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; ATCC = *American Type Culture Collection*, Manassas, USA

2.1.2 Eukaryotische Zelllinie

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft / Referenz
NALM-6	humane prä-B-Zellen (leukämisch)	DMSZ / Hurwitz <i>et al.</i> , 1979

Tab. 2-4 : In dieser Arbeit verwendete eukaryotische Zelllinie.

2.1.3 Nährmedien

Die Anzucht der *B. subtilis*- und *E. coli*-Stämme erfolgte je nach Versuch in TY- (*tryptone yeast*), Landy- oder Luria-Bertani-Medium. Das TY-Medium setzte sich aus den in Wasser gelösten Anteilen von 0,8 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt und 5 g/l NaCl zusammen. Zur Herstellung des Landy-Mediums wurden 5 g/l Glutaminsäure, 1 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l MgSO₄, 0,5 g/l KCl, 0,004 g/l FeSO₄, 0,005 g/l MnSO₄ und 0,00016 g/l CuSO₄ in 1 Liter Wasser gelöst und der pH-Wert mit KOH auf 7,5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurden 50 ml 40 % (w/v) Glucoselösung und 5 ml 20 % (w/v) KH₂PO₄-Lösung hinzugegeben. Zur Herstellung des LB-Mediums wurden 10 g/l Fertigmedium (Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland) in Wasser gelöst. Das zur Anzucht von *Bacillus subtilis* 168 verwendete Belitsky Minimalmedium (nach Stülke *et al.*, 1993) setzte sich folgendermaßen zusammen (s. Tab. 2-5):

Substanz	Substanzkonzentration
Tris	50 mM
Ammoniumsulfat	15 mM
Magnesiumsulfat	8 mM
Kaliumchlorid	27 mM
Natriumcitrat Dihydrat	7 mM
Calciumchlorid	2 mM
Eisen(II)-sulfat Heptahydrat	1 μ M
Mangan(II)-sulfat	10 μ M
Kaliumglutamat Monohydrat	4,5 mM
Glucose	0,1% (w/v)
Dikaliumhydrogenphosphat	600 μ M
alle 20 natürlichen L-Aminosäuren	160 μ g/ml

Tab. 2-5: Zusammensetzung des für die Anzucht von *B. subtilis* 168 verwendeten Belitsky Minimalmedium.

Die zugesetzten Komponenten des Mediums wurden in Wasser gelöst. Alle zubereiteten Nährmedien wurden durch Autoklavieren sterilisiert.

2.1.4 Plasmid

Das zur zellfreien Expressionsanalyse genutzte Plasmid pIVEX2.3-GFP zur Expression des Reporterproteins GFP (Grünes Fluoreszierendes Protein) trägt eine T7-Promotor und –Terminatorsequenz, sowie einen C-terminalen His₆-tag (s. Abb. 2-1; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

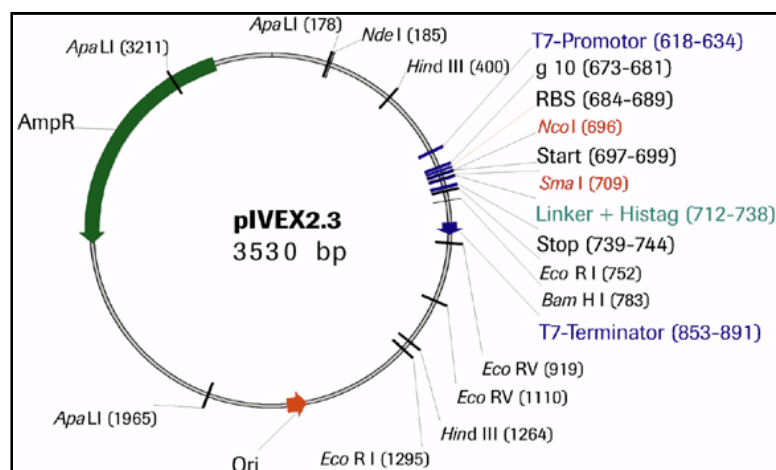


Abb. 2-1: Plasmidkarte des Plasmids pIVEX2.3 (Referenz: Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

2.1.5 Antibiotika

Alle in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Antibiotika sind nachfolgend tabellarisch aufgelistet:

Substanzbezeichnung	Stoffklasse
Ampicillin-Natrium	β -Laktamantibiotikum
Neomycintrisulfat	Aminoglykosid
Paromomycinsulfat	Aminoglykosid
Streptomycinsulfat	Aminoglykosid
Erythromycin	Makrolid
Josamycin	Makrolid
Oleandomycinriacetat	Makrolid
Chloramphenicol	Phenylpropanoid
Minocyclinhydrochlorid	Tetracyclin
Tetracyclinhydrochlorid	Tetracyclin
Surfactin	Lipopeptid
Nisin	Lantibiotikum

Tab. 2-6: Liste der verwendeten kommerziell erhältlichen Antibiotika. Alle Substanzen wurden bei der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland bezogen.

2.1.6 Naturstoffe

Alle in dieser Arbeit nachfolgend aufgelisteten verwendeten Substanzen aus der Gruppe der pentazyklischen Triterpene wurden mir freundlicherweise von Philip Krüger (Dr. M. Abdel-Tawab, Prof. Dr. M. Schubert-Zsilavec; Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker) überlassen:

Substanzbezeichnung	Abkürzung
3-O-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure	β -AKBA
11-Keto- β -boswelliasäure	β -KBA
3-O-Acetyl- β -boswelliasäure	β -ABA
β -Boswelliasäure	β -BA
3-O-Acetyl- α -boswelliasäure	α -ABA
α -Boswelliasäure	α -BA
18 α -Glycyrrhetinsäure	GS
Ammoniumglycyrrhizinat	AG
Asiatische Säure	AS
Betulinsäure	BS
Ursolsäure	US

Tab. 2-7: Liste der verwendeten pentazyklischen Triterpene.

2.1.7 Lösungsmittel und Chemikalien

Als „Wasser“ wurde ausschließlich MilliQ™ Reinstwasser (Millipore, Schwalbach, Deutschland) verwendet, welches durch Verwendung einer Wasseraufbereitungsanlage frisch hergestellt wurde. Alle verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien stammten, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsklasse bezogen.

2.1.8 Enzyme

Trypsin *sequencing grade* (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

RNase A (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

Pyruvatkinase (*from rabbit muscle*) (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

T7-RNA-Polymerase (GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland)

2.1.9 Kits

MagneHis™ Protein Purification System (Promega, Mannheim, Deutschland)

2-D Quant Kit (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland)

CyDye™ minimal labeling kit (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle durchgeführten Methoden, die steriles Arbeiten erforderten, wurden unter einer *Laminar-Flow-Box* durchgeführt, um durch Erzeugen eines durch Hochleistungsfilter geleiteten laminaren Luftstroms eine sterile Arbeitsweise zu gewährleisten. Alle verwendeten Geräte und Lösungen, die Sterilität erforderten, wurden vor der Verwendung durch Autoklavieren (121 °C, 2 bar, 20 Minuten) bzw. Sterilfiltration sterilisiert.

2.2.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde der Stamm *E. coli* DH5 α verwendet. Dieser wurde in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 165 rpm (Schüttler: Edmund Buhler GmbH, Tübingen, Deutschland) angezogen. Es folgte die Inokulation von 100 ml sterilem LB-Medium im Verhältnis 1:200 und eine Wachstumsphase bei 37 °C und 165 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,4 – 0,6. Anschließend wurde die Kultur in Zentrifugengläser überführt, 10-15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 15 min bei 4 °C und 10 000 rpm zentrifugiert (Heraeus Sepatech, Minifuge RF, Heraeus Holding, Hanau, Deutschland). Das Zellpellet wurde in 20 ml steriler Lösung (1209 mg RbCl₂, 809 mg MnCl₂ · 2 H₂O, 294 mg KOAc, 147 mg CaCl₂ · 2 H₂O, 15 g Glycerol; pH = 5,8 mit Essigsäure; auf 100 ml mit H₂O) resuspendiert und 1 – 2 h auf Eis inkubiert. Es folgte die Zentrifugation für 15 Minuten bei 10 000 rpm. Das Zellpellet wurde in 2 ml Lösung (121 mg RbCl₂, 209 mg MOPS, 1103 mg CaCl₂ · 2 H₂O und 15 g Glycerol; pH = 6,8 mit NaOH; auf 100 ml mit H₂O) resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Je 200 μ l Zellsuspension wurden in sterile Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei –80 °C gelagert.

2.2.1.2 Transformation von *E. coli* mit pIVEX2.3-GFP

Die Transformation von *E. coli* wurde nach Cohen *et al.*, 1972 durchgeführt. Zur Transformation der Zellen mit Plasmid-DNA wurden 50 μ l bei –80 °C gelagerte kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und 30 Minuten mit 20 – 30 ng Plasmid inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 60 Sekunden bei 42 °C auf dem Wasserbad erwärmt und wieder 5 Minuten auf Eis gegeben. Nachdem unter sterilen Bedingungen 500 μ l LB-Medium zugegeben wurde, folgte eine 60-minütige Inkubationsphase bei 165 rpm. Danach wurden 100 μ l Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit Ampicillin als Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Da das verwendete Plasmid pIVEX2.3-GFP ein Ampicillin-Resistenzgen trägt, konnte am nächsten Tag ein Zellklon entnommen werden und in sterilem LB-Ampicillin-Medium (500 μ g/ml Ampicillin) über Nacht auf dem Schüttler bei 37 °C bebrütet werden.

2.2.1.3 Präparative Plasmidisolierung (nach Birnboim und Doly, 1979, modifiziert)

Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde nach der Methode der alkalischen Lyse durchgeführt. Es wurden 800 ml Bakterienkultur der transformierten DH5 α -Zellen 20 Minuten bei 6000 g und 4 °C abzentrifugiert und der Kulturüberstand verworfen. Die Zellen wurden anschließend in 150 ml TE-Puffer (s. unten) unter Zugabe von RNase A (100 μ g/ml) vollständig resuspendiert. Durch die Zugabe von 200 ml des alkalischen SDS-haltigen Lysepuffers (s. unten) kam es zur Zellwandlyse und Denaturierung von Proteinen und Nukleinsäuren. Es wurde fünf Minuten auf Eis inkubiert und sechs Mal invertiert, wobei sich die Lösung klärte. Durch die anschließende Zugabe von 200 ml gekühltem 3 M Kaliumacetat (pH = 4,8) und 15-minütiger Inkubation auf Eis bildete sich ein Präzipitat aus Proteinen, genomischer DNA und RNA. Die Plasmid-DNA verblieb durch Renaturierung im gelösten Zustand. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (6000 g, 60 Minuten, 4 °C) abgetrennt. Anschließend wurde der Überstand durch Filtration über Glaswolle in ein *Falcon-Tube* überführt. Nach Versetzen mit 0,7-fachem Volumen Isopropanol wurde durch 5-minütige Inkubation die Plasmid-DNA gefällt und der Überstand nach erneuter Zentrifugation (6000 g, 60 Minuten, 4 °C) verworfen. Das resultierende Pellet wurde zwecks Entsalzung mit 125 ml kaltem Ethanol (70 %) versetzt und nach Zentrifugation (6000 g, 30 min, 4 °C) und Verwerfen des Überstandes bei Raumtemperatur getrocknet, in sterilem Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Verwendete Puffer:

TE-Puffer:

Tris·HCl (pH = 8,0)	50 mM
EDTA	10 mM
Glucose	50 mM

Lyse-Puffer:

SDS	1 % (w/v)
NaOH	200 mM

2.2.1.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung der Plasmid-DNA basiert auf der Absorption von UV-Licht bei 260 nm. Die Bestimmung der Plasmidkonzentration wurde am Spektrophotometer (Hitachi U-1100, Hitachi, Tokio, Japan) durchgeführt, indem 1 µl Plasmidpräparation in 1 ml TE-Puffer (pH = 8,0; s. 2.2.1.3) gelöst und unter Verwendung einer Quarzküvette nach Nullabgleich mit Puffer vermessen wurde. Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgte nach der Gleichung:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \cdot \text{VF} \cdot 50 \mu\text{g/ml}$$

A_{260} = Absorption der Probe bei 260 nm

VF = Verdünnungsfaktor (hier: 1000)

Für doppelsträngige Plasmid-DNA (dsDNA) gilt:

$$A_{260} = 1,0 \text{ entspricht } 50 \mu\text{g/ml Plasmid-DNA}$$

Weiterhin lässt sich durch Ermittlung des Quotienten der Absorptionen bei 260 bzw. 280 nm die Reinheit der Probe bestimmen, da bei 280 nm die Absorption aromatischer Aminosäuren das Ausmaß von Proteinverunreinigungen anzeigt. Das Verhältnis von A_{260} / A_{280} sollte einen Wert von größer 1,8 für eine ausreichend reine Probe betragen.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Bestimmung der MHK durch Anwendung der Bouillon-Mikrodilutionsmethode (nach Amsterdam, 1996)

Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) untersuchter Substanzen wurde die Übernachtskultur des Testkeims 1/100 mit Medium verdünnt und bis zu einer bei 600 nm photometrisch vermessenen optischen Dichte (OD_{600}) von 1,0 bebrütet. Als Testorganismen wurden der Gram-positive Modellorganismus *Bacillus subtilis* 168 (DSMZ 402) und der Gram-negative Stamm *E. coli* A19 verwendet. Die Zellkultur wurde vor der Inkubation im Verhältnis 1/10⁵ mit Medium verdünnt, um ein Inokulum von ca. 10⁵ Zellen/ml zu erhalten. Die Bebrütung der Testlösungen erfolgte in 96 Well Platten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland), die vor der Inkubation mit dem Testkeim und der Testsubstanz mit 100 µl Medium befüllt wurden. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in einem geeigneten

Lösungsmittel (Wasser bzw. DMSO) gelöst und 100 µl einer zweifach höheren Konzentration der gewünschten Startkonzentration der Probe in Well 1 pipettiert. Anschließend erfolgte die Zweifachverdünnung der Testsubstanz von Well 1 bis Well 10 durch neunmaliges Pipettieren der Lösung im jeweiligen Well und Transferieren der Lösung zum nächsten Well. Abschließend wurde jedes Well mit 5 µl verdünnter Testkeimlösung inkubiert und bei 37 °C über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurde das Zellwachstum durch Messung der Absorption bei 620 nm mittels eines *Microplate Readers* (Anthos LabTech Instruments GmbH, Wals, Österreich) bestimmt. Well 11 diente hierbei als Leerwertreferenz. Parallel wurden für jeden Testlauf als Negativkontrolle 10 Wells ohne Testsubstanz mit 5 µl Bakterienkultur inkubiert. Bei der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel wurde zusätzlich reines DMSO als Testsubstanz charakterisiert. Als MHK wurde die Konzentration definiert, bei der kein Zellwachstum mehr erkennbar war.

2.2.2.2 Bestimmung der MHK gegen humanpathogene und resistente Mikroorganismen

In Kooperation mit Dr. T. Wichelhaus (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Klinikum der Goethe-Universität, Frankfurt/Main) wurden die MHK-Werte potentieller antimikrobieller Substanzen gegen folgende Kontrollstämme bestimmt: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* (MRSA, T2069), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) und *Enterococcus faecium* (VRE345). Das Verfahren zur Bestimmung der MHK entspricht dem Prinzip der Mikrodilutionsmethode unter 2.2.2.1. Hierbei wurde nach den etablierten Standards des *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, Wayne, USA) verfahren. Als Nährmedium wurde Mueller-Hinton Medium (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Das Inokulum wurde durch Verdünnung der Kulturmedien mit NaCl (0,9 % (w/v)) auf 10^7 KBE / ml nach McFarland 0,5 standardisiert. Nach Beschickung der Wells 2 – 12 mit 100 µl Nährmedium wurden 100 µl einer „Antibiotika“-Stammlösung definierter Konzentration in das erste Well pipettiert und durch Transfer von 100 µl in das zweite Well im Verhältnis 1:1 verdünnt. Die Verdünnung der „Antibiotika“-Lösungen wurde bis zu Well 12 weitergeführt, wobei der 100 µl Lösungsüberschuss als Sterilitätskontrolle verwendet wurde. Durch Inokulieren jedes Wells mit 5 µl Bakteriensuspension wurde eine Startzellzahl von ca. $5 \cdot 10^4$ KBE / Well erhalten. Die Wachstumskontrolle entsprach der eines inokulierten

Wells ohne „Antibiotika“-Lösung. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die MHK entsprach der Substanzkonzentration, bei der kein Zellwachstum mehr visuell feststellbar war.

2.2.2.3 Bestimmung der IC₅₀ gegen *B. subtilis* 168 unter aeroben Wachstumsbedingungen

Zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes wurden *B. subtilis* 168-Kulturen in jeweils 5 ml Belitsky Minimalmedium (BMM) definierter Zusammensetzung (Stülke *et al.*, 1993) mit unterschiedlichen Konzentrationen des Inhibitors nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase des Testorganismus inkubiert. Die Bakterienkulturen wurden durch Inokulation von BMM mit einer 1:100 verdünnten Übernachtskultur des Testorganismus in Reagenzgläsern angesetzt. Das Zellwachstum wurde nach definierten Zeitpunkten durch Bestimmung der optischen Dichte bei 500 nm (OD₅₀₀) verfolgt. Nach Erreichen von OD₅₀₀-Werten größer als 0,75 (exponentielle Wachstumsphase) wurde die Inkubation der Kulturen durch Zugabe unterschiedlicher Mengen des Inhibitors gestartet. Als Wachstumskontrollen dienten Bakterienkulturen ohne Inhibitor (s. 3.4.5) bzw. mit DMSO inkubierte Zellen (s. 3.7.2.1). Die Bebrütung der Kulturen erfolgte bei 37 °C und 165 rpm im Brutraum. Der IC₅₀-Wert wurde anschließend durch lineare Regressionsanalyse bestimmt. Diese Konzentration wurde zur Gewinnung behandelter Zellen im Rahmen der DIGE-Experimente eingesetzt.

2.2.2.4 Gewinnung roher bakterieller Kulturüberstände

Die Gewinnung roher bakterieller Kulturüberstände unterschiedlicher *B. subtilis*-Stämme erfolgte durch Anzucht der verwendeten Zellkulturen über 24 Stunden in Landy Medium bei 37 °C. Nach Zentrifugation (12.000 g, 10 min bei 4 °C) der zellulären Bestandteile wurden die Kulturüberstände durch Sterilfiltration sterilisiert und vor der Verwendung im ZFTT-Assay bei -80 °C gelagert. 5 µl des Kulturüberstandes jedes untersuchten Stammes wurde in einer Verdünnung von 1/20 im ZFTT-Assay eingesetzt (s. 3.6.2).

2.2.3 Bestimmung der Zytotoxizität und Wachstumsinhibition gegen eukaryotische NALM-6-Zellen

Die Untersuchung der Zytotoxizität bzw. der verursachten Wachstumsinhibition ausgewählter Substanzen gegen eukaryotische NALM-6 Zellen (Hurwitz *et al.*, 1979) wurde in Kooperation

mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Rolf Marschalek (mit Jenny Merkens, Institut für Pharmazeutische Biologie, Goethe-Universität, Frankfurt/Main) durchgeführt. Hierzu wurden 4,95 ml Nährmedium in jedes Well einer 6-Well-Kulturschale (Corning Inc., Schiphol-Rijk, Niederlande) pipettiert. Das Nährmedium setzte sich folgendermaßen zusammen: 88 % (v/v) RPMI-1640; 10 % (v/v) FBS; 1 % (v/v) L-Glutamin; 1 % (v/v) Penicillin / Streptomycin. Nach Zugabe von 50 µl der zu untersuchenden Testlösungen definierter Konzentration begann die Bebrütung der Zellen im Brutschrank (HERAcell® CO₂-Inkubator, Heraeus Holding, Hanau, Deutschland) bei 37 °C unter 5 % CO₂. Die elektronische Zellzählung und Zellvolumenbestimmung erfolgte durch Anwendung des automatischen Zellzählgerätes *Casy® Model TT* (innovatis AG, Reutlingen, Deutschland), wobei jeweils 50 µl Zellsuspension in 10 ml *Casy® ton* Puffer (isotonische Elektrolytlösung) suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Messpore definierter Geometrie gesaugt wurde. Da an der Messpore ein mit 1 MHz getaktetes elektrisches Niederspannungsfeld anlag, konnte jede Zelle bei Passage der Messpore durch die verursachte Minderung des Stromflusses detektiert werden. Vitale Zellen, welche als elektrische Isolatoren wirken, generierten ein ihrem tatsächlichen Zellvolumen entsprechendes Signal. Tote Zellen mit permeabler und elektrisch durchlässiger Zellmembran, generierten ein deutlich kleineres Signal, dass dem Zellkern entsprach. Über den Anteil vitaler Zellen bezogen auf die Zahl aller detektierten Zellen, ließ sich somit die prozentuale Zellvitalität bestimmen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach dem Beginn der Bebrütung alle 24 Stunden über einen Zeitraum von vier Tagen. Nach Abschluss der Bebrütungsphase wurden fotografische Aufnahmen zur morphologischen Beurteilung der Zellen angefertigt.

Zur Bestimmung der Zytotoxizität des Tripeptids G12 gegen NALM-6-Zellen wurden Substanzkonzentrationen von 50, 100 und 150 µM in einer maximalen DMSO-Konzentration von 0,4 % im Assay eingesetzt. Weiterhin wurde der inhibitorische Einfluss des Lösungsmittels DMSO gegen NALM-6-Zellen in Konzentrationen von 0,25 %, 0,5 % und 1 % DMSO untersucht. Als Wachstumskontrolle wurden NALM-6 Zellkulturen ohne Inhibitor eingesetzt. Die in 4,95 ml Nährmedium ausgebrachte Zellzahl betrug $4,13 \cdot 10^5$ Zellen / ml. Zur Inkubation der Zellen mit Tripeptidlösung wurden dem Nährmedium jeweils 50 µl der vorher angesetzten Stammlösungen zugesetzt. Das zur elektronischen Zellzählung entnommene Probenvolumen wurde jeweils durch das gleiche Volumen an Nährmedium ersetzt. Die Zellvitalität der NALM-6-Zellen wurde berechnet nach:

$$\text{Zellvitalität} = n_v/n \cdot 100 (\%)$$

n_v = Anzahl vitaler Zellen

n = Gesamtzellzahl.

2.2.4 Der zellfreie gekoppelte prokaryotische Transkriptions-/Translationsassay (ZFTT-Assay)

Zur Charakterisierung der Aktivität analysierter Testsubstanzen im zellfreien Transkriptions-/Translationsassay (ZFTT-Assay) wurden diese bei schlechter Löslichkeit in Wasser in Konzentrationen bis zu 2,5 % (v/v) in DMSO eingesetzt. Der Assay wurde im *Batch*-Verfahren in einem Reaktionsvolumen von 100 µl bzw. 25 µl bei 30 °C durchgeführt. Als Reaktionsgefäße dienten Eppendorf *Micro Test Tubes* mit einem maximalen Volumen von 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Die Reaktion wurde unter Verwendung eines temperaturkontrollierbaren *Thermomixers* (*Eppendorf Thermomixer compact*, Eppendorf AG) bei 550 rpm mit Reaktionszeiten zwischen 3 bis 5 Stunden durchgeführt. Die verwendete Reaktionslösung des Assays setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Reaktionskomponente	Konzentration
<i>E. coli</i> MRE600 tRNA ²	500 µg/ml
Kaliumacetat ¹	220 mM*
Magnesiumacetat ¹	13 mM*
HEPES-KOH (pH = 8,0) ¹	100 mM
Folinsäure ¹	0,2 mM
Dithiothreitol ¹	2 mM
PEG 8000 ¹	2 %
ATP ¹	1,2 mM
CTP, GTP, UTP ¹	0,8 mM
Lithium-Kaliumacetylphosphat ¹	20 mM
Trinatriumphosphoenolpyruvat ¹	20 mM
Natriumazid ¹	0,05 %
Pyruvatkinase ²	40 µg/ml
<i>Complete Protease Inhibitor</i> ^{®2}	1 Tbl./10 ml Wasser
<i>RNasin</i> [®] Ribonuklease Inhibitor ³	0,3 U/µl
T7-RNA-Polymerase ⁴	3 U/µl
pIVEX2.3-GFP ²	30 – 60 ng/µl
<i>E. coli</i> A19 S30-Extrakt ⁵	30 %
L-Aminosäuren: R, C, W, M, D, E ¹	2 mM
alle natürlichen L-Aminosäuren ¹	1 mM
Testsubstanz	q.s.
Wasser	q.s.

Tab. 2-8: Zusammensetzung der *Batch*-Reaktionsmischung für den ZFTT-Assay. Abkürzung: q.s. = *quantum satis*

*teilweise abweichend, bei Verwendung unterschiedlicher S30-Extraktchargen

Anbieter: ¹Sigma-Aldrich Chemie Corp., Steinheim, Deutschland; ²Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland; ³Promega GmbH, Mannheim, Deutschland; ⁴GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland; ⁵AK Prof. Dr. Volker Dötsch, Dr. Frank Bernhardt, Inst. f. Biophysikalische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt

Der eingesetzte *E. coli* A19 S30-Extrakt wurde nach der modifizierten Zubay-Methode (Zubay *et al.*, 1973; Klammt *et al.*, 2004) am Institut für Biophysikalische Chemie der Goethe-Universität Frankfurt/Main hergestellt und mir freundlicherweise von Dr. Frank Bernhard überlassen.

Nachfolgend ist das Prinzip des gekoppelten zellfreien Transkriptions-/Translationsassays (ZFTT-Assay) unter Verwendung des Reporterproteins GFP schematisch dargestellt:

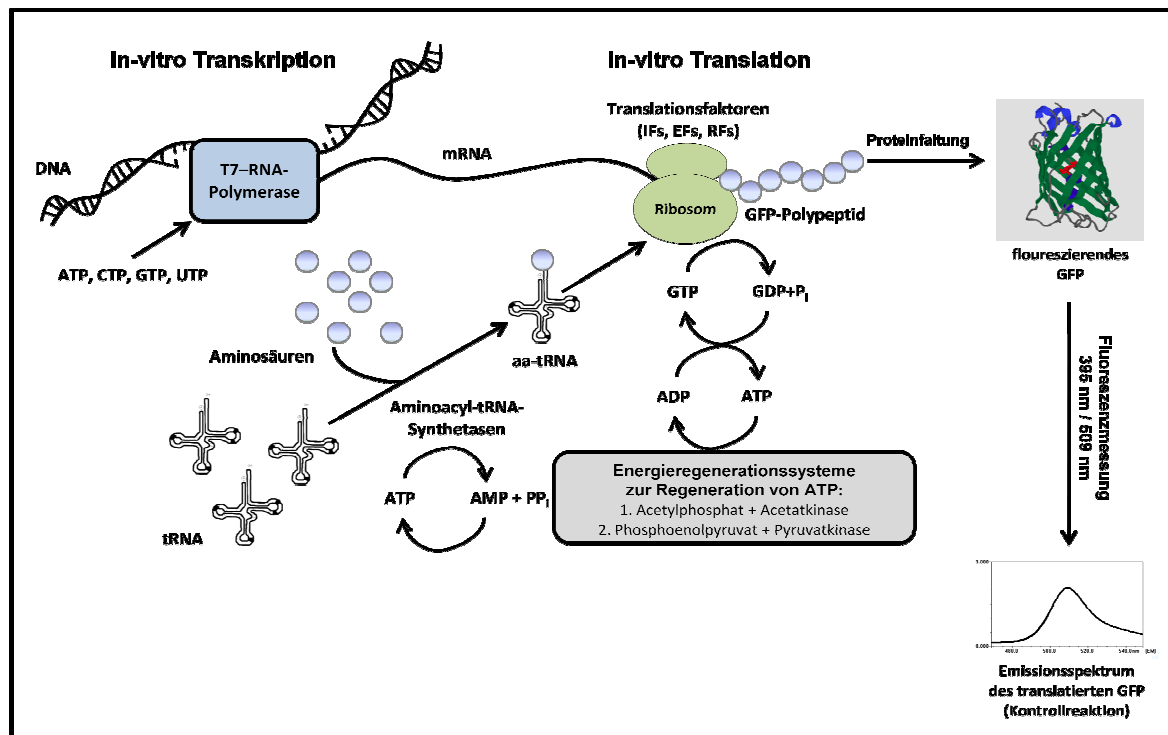


Abb. 2-2: Schematische Darstellung des gekoppelten ZFTT-Assays.

Der verwendete prokaryotische S30-Extrakt enthält die für die Translationsreaktion benötigten Ribosomen, Faktoren (Initiations-, Elongations-, Releasefaktoren) und Enzyme (z. B. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Acetatkinase). Durch die Zugabe von Plasmid-DNA, NTPs und der T7-RNA-Polymerase wurde die Transkription initiiert. Die Energie regenerierenden Systeme, welche auf der Bildung von ATP durch die enzymatische Reaktion von Pyruvatkinase und Acetatkinase beruhen, dienen zur Verlängerung der TT-Reaktion durch den Verbrauch von dephosphoryliertem Substrat und gleichzeitigem Auffüllen der ATP-Speicher. Das translatierte und gefaltete Reporterprotein GFP wurde mittels Fluorimetrie nachgewiesen. Inhibitoren der gekoppelten TT-Reaktion lassen sich durch die konzentrationsabhängige Minderung der GFP-Fluoreszenz identifizieren.

Die Charakterisierung der Aktivität analysierter Testsubstanzen durch Berechnung der relativen ZFTT-Assayinhibition (relative Assayinhibition; RAI (%)) erfolgte durch den Bezug der durchschnittlichen GFP-Fluoreszenzintensität der Reaktionsansätze einer Testsubstanz auf

die durchschnittliche GFP-Fluoreszenzintensität parallel reagierender Kontrollreaktionen (ohne Inhibitor). Die relative Assayinhibition wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{RAI} = \frac{\mu_i}{\mu_c} * 100 [\%]$$

RAI = relative Assayinhibition

μ_i = arithmetisches Mittel der absoluten GFP-Fluoreszenzintensität der inhibierten ZFTT-Reaktion einer Testsubstanz

μ_c = arithmetisches Mittel der absoluten GFP-Fluoreszenzintensität der Kontrollreaktion.

Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte aktiver Substanzen im ZFTT-Assay wurde die konzentrationsabhängige Minderung der GFP-Fluoreszenz unterschiedlicher Substanzkonzentrationen auf die durchschnittliche Fluoreszenz der Kontrollreaktionen bezogen. Als Inhibitionskontrolle zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz im Assay diente der Translationsinhibitor Streptomycinsulfat (10 μM). Die ermittelte Hintergrundfluoreszenz wurde zur Berechnung der IC_{50} -Werte von den Messwerten der Substanzen subtrahiert. Die IC_{50} -Werte der analysierten Substanzen wurden anschließend durch eine lineare Regressionsanalyse bestimmt.

2.2.5 Bestimmung der Assayqualität (nach Zhang *et al.*, 1999)

Ein wichtiger Faktor zur Beurteilung der Assayqualität ist der Z' -Faktor (Zhang *et al.*, 1999), der sowohl die dynamische Breite als auch die Standardabweichung der Messwerte des Assays berücksichtigt und sich daher zur Assayvalidierung bzw. -optimierung eignet. Die Validierung eines (HTS-)Assays wird durch parallele Messung der verwendeten Proben, positiver Referenzkontrollen, die dem Maximalsignal des Assays entsprechen und negativer Referenzkontrollen, die dem Minimalsignal (Hintergrund) entsprechen, durchgeführt (s. 3.1.5). Die Differenz des arithmetischen Mittels des Maximal- und Minimalsignals beschreibt die dynamische Breite des Assays. Zur Verwendung des Z' -Faktors als Validierungsparameter ist weiterhin die probenspezifische Messvariation durch Berechnung der Probandatenvariationsbreite nötig. Diese entspricht dem Abstand der dreifachen Standardabweichung der gemessenen Probe vom Mittelwert (entsprechend 99,73 % Konfidenz bei Gaußscher Normalverteilung; s. Abb. 2-3).

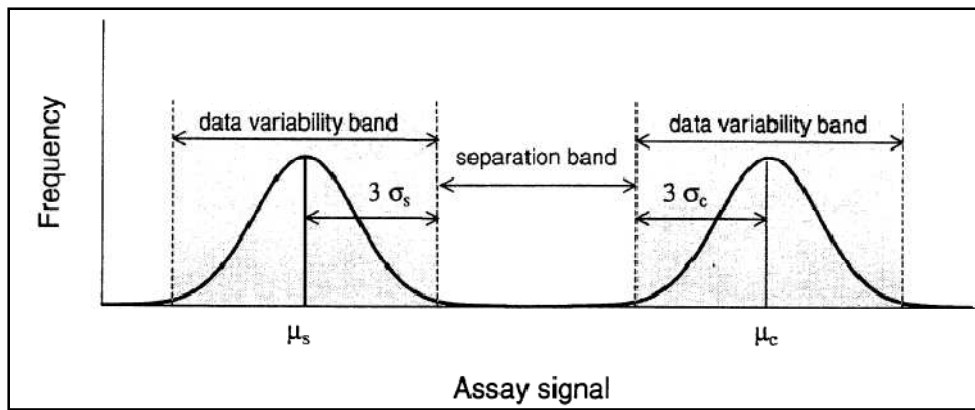


Abb. 2-3: Darstellung der Proben- bzw. Kontrolldatenvariationsbreite (*data variability band*), sowie der dynamischen Breite zwischen Probe und Kontrolle (*separation band*). Legende: μ_s , μ_c = Mittelwerte des Maximal- bzw. Minimalsignals; σ_s , σ_c = Standardabweichungen des Maximal- bzw. Minimalsignals (aus: Zhang *et al.*, 1999).

Die Berechnung des Z'-Faktors erfolgte nach:

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

- σ_{c+} = Standardabweichung der Positivkontrolle
- σ_{c-} = Standardabweichung der Negativkontrolle
- μ_{c+} = Mittelwert der Positivkontrolle
- μ_{c-} = Mittelwert der Negativkontrolle

Arithmetisches Mittel: $\mu = \bar{x} = \frac{\sum xi}{n}$

Standardabweichung: $\sigma = \sqrt{\frac{\sum(xi - \bar{x})^2}{n-1}}$

- \bar{x} = arithmetisches Mittel
- x_i = Messwert der *i*-ten Messung
- n = Anzahl der Messwerte.

Die Bewertung der Qualität der Assays erfolgte durch Kategorisierung nach Zhang *et al.*, 1999:

Betrag des Z'-Faktors	Struktur des Assays	Assaybewertung
1	STDEV = 0	ideal
$1 > Z' \geq 0,5$	große dynamische Breite	exzellent
$0,5 > Z' > 0$	geringe dynamische Breite	grenzwertig
0	keine dynamische Breite	nicht verwendbar

Tab. 2-9: Bewertung der Assayqualität nach Zhang *et al.*, 1999.

Die Berechnung des Variationskoeffizienten V_k erfolgte nach:

$$V_k = \frac{\sigma}{\mu} * 100 [\%]$$

σ = Standardabweichung der Messreihe

μ = Mittelwert der Messreihe.

2.2.6 Bestimmung der Linearität im Messbereich

Zur Validierung des ZFTT-Assays wurde die Linearität der im Assay verwendeten fluorimetrischen Nachweismethode des Reporterproteins GFP untersucht. Hierzu wurde rekombinant hergestelltes GFP (rGFP, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in sechs unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und die absolute Fluoreszenzintensität bestimmt. Die verwendete GFP-Konzentration erstreckte sich von 10 – 100 ng rGFP in jeweils 300 μ l MilliQ-Wasser. Dadurch wurde der Messbereich der Fluoreszenz des ZFTT-Assays zwischen 0 und 1,0 absoluter GFP-Fluoreszenz abgedeckt. Dieser Bereich erfasst die durchschnittlich exprimierte GFP-Menge einer nicht inhibierten ZFTT-Reaktion unter den Versuchsbedingungen des ZFTT-Assays¹. Die Erstellung der Kalibriergeraden aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten und die nachfolgend durchgeführte Regressionsanalyse, die Ermittlung der Geradensteigung, des y-Achsenabschnittes und des Korrelationskoeffizienten (R^2) ermöglichte die Bestimmung der Linearität der im ZFTT-Assay eingesetzten Messmethode (s. 3.1.6). Der Wert für R^2 , welcher zwischen 0 und 1 liegt, zeigt bei einem Wert von 1 einen exakten linearen Zusammenhang der Variablen x (hier: GFP-Konzentration) und y (hier: GFP-Fluoreszenzintensität) an.

¹ dieser Messbereich stellt die große Mehrheit der experimentell bestimmten GFP-Fluoreszenzintensitätswerte im ZFTT-Assay dar, welche unter optimierten Versuchsbedingungen hauptsächlich von der Qualität des präparierten S30-Extrakt abhängen

2.2.7 Fluoreszenzspektroskopie

Nach Beendigung der ZFTT-Reaktion wurde die Menge des gebildeten GFP in der Reaktionslösung in einer Verdünnung von 1/100 mit Wasser mittels Fluorimetrie bestimmt. Hierzu wurden 6 μ l der Reaktionslösung des Assays in Quarzküvetten mit 10 mm Schichtdicke (Hellma, Müllheim, Deutschland) pipettiert und auf ein Messvolumen von 600 μ l mit MilliQ-Wasser aufgefüllt. Die Fluoreszenzmessung wurde bei 395 nm Anregungs- und 509 nm Emissionswellenlänge unter Verwendung eines Fluoreszenzspektrophotometers (Hitachi F-4500, Hitachi, Tokio, Japan) durchgeführt. Alle Proben wurden, sofern nicht

anders angegeben, in mindestens drei unabhängigen Versuchen voneinander gemessen und jeweils auf die durchschnittlich gebildete GFP-Menge dreier Kontrollproben ohne Testsubstanz bezogen. Die Spektren wurden bei einer Zeitkonstante von 2,0 s und einer Spaltbreite bei Anregung und Emission von 5 nm aufgenommen. Die Scangeschwindigkeit betrug 240 nm/min bei einer PMT-Spannung von 400 V.

2.2.8 Absorptionsspektroskopie

Zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse im ZFTT-Assay durch fluoreszenzlöschende *Quenching*-Effekte der gemessenen Substanzen wurden aktive Inhibitoren der ZFTT-Reaktion durch Aufnahme ihres Absorptionsspektrums charakterisiert. Hierfür wurden die Substanzen in Wasser bzw. DMSO gelöst und ihre Absorption zwischen 300 und 600 bzw. 800 nm gemessen (Hitachi U-2000 Spektralphotometer, Hitachi, Tokio, Japan). Die Spektren wurden bei einer Zeitkonstante von 2,0 s und einer Scangeschwindigkeit von 400 nm/min unter Verwendung von Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm und einer Innenbreite von 2 mm (MT 2) aufgenommen (s. 6.1).

2.2.9 Affinitätschromatographische Aufreinigung (*MagneHisTM Protein Purification System*)

Das Aufreinigungsprinzip des zellfrei exprimierten Reporterproteins beruht auf der Affinität des C-terminalen GFP-His₆-Tags zu paramagnetisch geladenen Nickelpartikeln. Dies ermöglichte die Aufreinigung bzw. Anreicherung des Reporterproteins aus der Reaktionslösung des Assays. Die Aufreinigung wurde unter Anwendung des *MagneHisTM Protein Purification Systems* (Promega, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Der Aufreinigungsprozess bestand aus drei Teilschritten: Binden des Proteins, Waschen des gebundenen Proteins und Elution des aufgereinigten Proteins. Laut Herstellerangaben besitzen die verwendeten Nickelpartikel eine Ladekapazität von 1 mg His₆-markiertem Protein pro ml Partikellösung. Zur Aufreinigung der Reaktionslösung wurden 25 µl *MagneHisTM Ni-Partikel* zu 100 µl Reaktionslösung pipettiert und die Lösung zwei Minuten durch Pipettieren gemischt. Durch ein von außen angelegtes magnetisches Feld wurde die Lösung von den Nickelpartikeln getrennt und abpipettiert. Anschließend folgte die fünfmalige Inkubation der Partikel mit 75 µl Waschpuffer (300 mM NaCl; 50 mM NaH₂PO₄; 10 mM

Imidazol). Die Waschlösungen wurden verworfen und abschließend das gebundene Protein mit 100 µl Trifluoressigsäure (1 % TFA) eluiert.

2.2.10 2D-DIGE-Studien

Nachfolgend ist exemplarisch das 2D-DIGE-Experiment im Kontext der gesamten Identifizierungs- und Charakterisierungsstrategie zur Ermittlung des antimikrobiellen Wirkmechanismus für Substanz 31 dargestellt (s. Abb. 2-4):

Schritt 1:

Ligandenbasiertes virtuelles Screening potentieller antimikrobieller RNA-Liganden; Verwendung der Substanzdatenbank Specs (durch Dr. M. Nietert, AK Prof. Dr. Schneider)

Schritt 2:

Biochemische zielstrukturbasierte Aktivitätsbestimmung ausgewählter Substanzen (s. 3.3.2.1)

Schritt 3:

Identifizierung der aktivsten Substanz im ZFTT-Assay (hier: Substanz 31) und Bestimmung des antimikrobiellen Potentials (s. 3.7.2.1)

Schritt 4:

Anzucht behandelter und unbehandelter Zellkulturen von *Bacillus subtilis* 168 (s. 2.2.10.1)

Schritt 5:

Zellaufschluß durch Ultraschallbehandlung; Bestimmung der Proteinkonzentration (2D-Quant Kit™; GE Healthcare); (s. 2.2.10.2, 2.2.10.3)

Schritt 6:

Labelling der Proteine mit CyDye DIGE-Farbstoffen (Minimallabelling); 200 pmol Farbstoff / 50 µg Protein; 75 µg Protein / Gel; 4 Gele; „dye-flip“-Design (s. 2.2.10.4)

Schritt 7:

1. Dimension: IPG-Streifen; pH = 4 – 7; 24 cm; Reduzierung (DTT) und Alkylierung (Iodacetamid);
2. Dimension: SDS-PAGE (12,5 % T) (s. 2.2.12.1, 2.2.12.2)

Schritt 8:

Scannen der Gele und softwaregestützte differentielle Expressionsanalyse (s. 2.2.14.1, 2.2.14.2)

Schritt 9:

Anfertigung eines präparativen 2D-Gels* (250 µg Protein); Färbung mit kolloidalem CBB (s. 2.2.12.2, 2.2.13.2)

Schritt 10:

Tryptischer Verdau und massenspektrometrische Proteinidentifizierung per MALDI-TOF-MS (s. 2.2.16, 2.2.17)

Schritt 11:

Hypothese des antimikrobiellen Wirkmechanismus durch Vergleich vorhandener Markerproteine mit Referenzdatenbanken

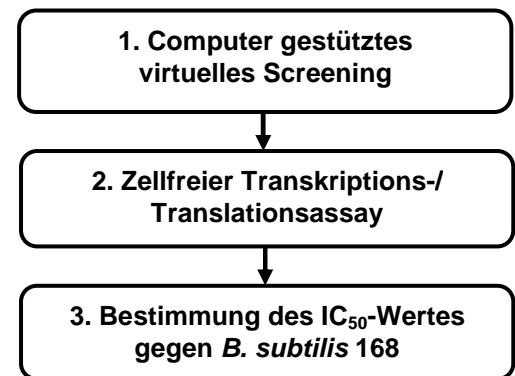
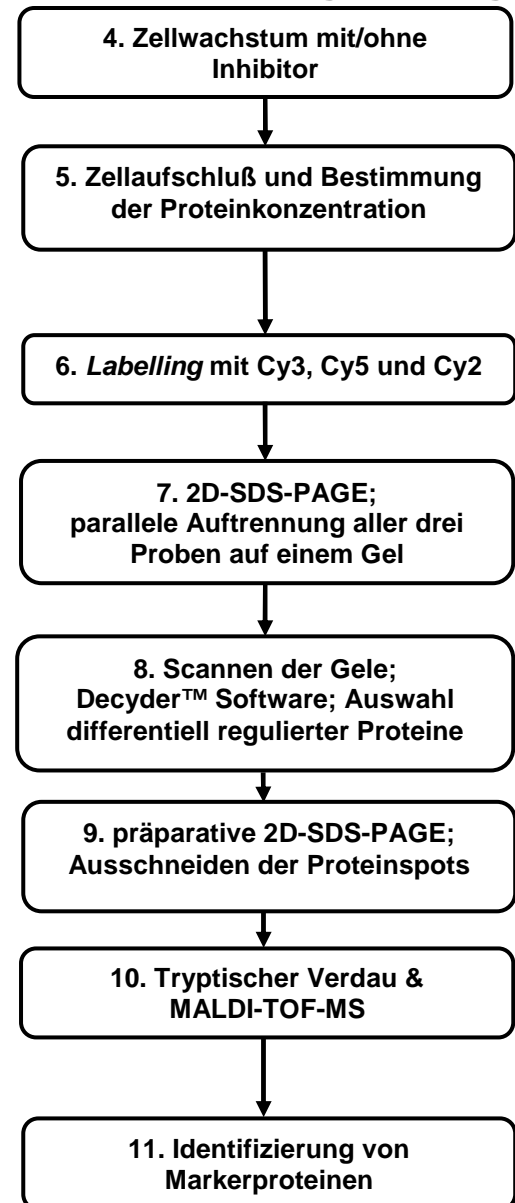
Identifizierungsstrategie**Charakterisierungsstrategie**

Abb. 2-4: Strategie zur Identifizierung und Charakterisierung des antimikrobiellen Wirkmechanismus von Substanz 31.

*nur im Rahmen der DIGE-Studie mit Substanz 31 durchgeführt

2.2.10.1 Anzuchtbedingungen (DIGE-Studien)

Anzuchtbedingungen – Substanz 31:

Zur Gewinnung der mit Substanz 31 behandelten bzw. unbehandelten Zellkulturen von *B. subtilis* 168 wurden jeweils 10 biologische Replikate in 5 ml Belitsky Minimalmedium bei 37 °C und 165 rpm angezogen. Die 30-minütige Inkubation mit 500 µM Substanz 31 (0,5 % DMSO) begann nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen ($OD_{500} > 0,75$). Den bakteriellen Kontrollkulturen wurde 25 µl DMSO zugesetzt (0,5 % DMSO), um den Lösungsmiteleinfluss der behandelten Proben zu berücksichtigen. Nach Abschluß der Inkubationsphase wurden die biologischen Replikate der behandelten bzw. unbehandelten Zellkulturen vereinigt und abzentrifugiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluß mittels Ultraschallbehandlung (s. 2.2.10.2)

Anzuchtbedingungen – Tripeptid G12:

Die Zellen wurden unter den Anzuchtbedingungen wie für Substanz 31 beschrieben kultiviert. Die Zellkulturen wurden mit einer Tripeptidkonzentration von 22,4 µM G12 inkubiert.

2.2.10.2 Herstellung des bakteriellen Zellysats

Die zur Gewinnung des Zellysats verwendeten Puffer richteten sich in ihrer Zusammensetzung nach der Kompatibilität mit den für die DIGE-Färbung verwendeten CyDye™ DIGE Farbstoffen (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland). Zur Herstellung des Lysats aus *B. subtilis*-Zellen wurden die in Belitsky Minimalmedium angezogenen Zellen der Kontroll- und Behandlungsgruppe jeweils vereinigt und abzentrifugiert (12.000 g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde das Zellpellet viermal in 1 ml Zellwaschpuffer (10 mM Tris · HCl, pH = 8,0; 5 mM Magnesiumacetat) gewaschen und abzentrifugiert (12.000 g, 10 min, 4 °C). Der Zellwaschpuffer wurde verworfen und die Zellen in Lyse-Puffer mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Hierfür wurden die Zellen in 0,75 – 1 ml Lyse-Puffer (s. unten) suspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss per Ultraschallbehandlung. Dazu wurde die Sonotrode des Ultraschallgerätes (Sonoplus HD 70, Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) mit 70 % Ethanol gereinigt und die Zellen auf Eis fünfmal mit Ultraschall behandelt (20 Sekunden, gepulst, 60 % Amplitude). Jeder Ultraschallbehandlung folgte eine einminütige Ruhephase, um ein Erwärmen der Probe zu vermeiden. Schließlich wurde der Überstand der behandelten Zellen nach Zentrifugation (12.000 g, 10 min, 4 °C) als Zellysat abgetrennt und

bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der verwendete Lyse-Puffer setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Lyse-Puffer:

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
Tris	30 mM
CHAPS	4 % (w/v)
HCl (verdünnt)	

Die Salzsäure wurde verwendet, um den pH-Wert des Puffers auf 8,5 einzustellen.

2.2.10.3 Proteinquantifizierung

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde durch die Anwendung eines kommerziell erhältlichen Kits zur Proteinquantifizierung (*2-D Quant Kit*, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) nach den Vorgaben des Herstellers bestimmt. Das Prinzip dieser Quantifizierungsmethode basiert auf der Proteinpräzipitation und einer nachfolgenden Resuspendierung der Proteine in alkalischer Kupfer(II)-Lösung. Die in der Lösung enthaltenen Kupfer(II)-Ionen binden an das Polypeptidrückgrat der Proteine, wobei ungebundene Kupfer(II)-Ionen nach Bindung an ein kolorimetrisches Agens durch Messung der Absorption bei 480 nm (Hitachi U-1100, Hitachi, Tokio, Japan) nachgewiesen wurden. Die ermittelten Absorptionswerte der Probenlösungen wurden auf eine parallel erzeugte Standardkurve, welche mittels Rinderserumalbuminlösung bekannter Konzentration (2 mg/ml) bestimmt wurde, bezogen. Damit konnte die Proteinkonzentration der Zelllysate durch die Messung zweier Konzentrationsreihen fünf unterschiedlicher Volumina zwischen 5 - 50 μl ermittelt werden. Hierbei ist die gemessene Absorption umgekehrt proportional zur Proteinkonzentration.

2.2.10.4 Fluoreszenzmarkierung der Proteine (*labeling*)

Die Markierung der Proteine, welche im Rahmen der DIGE-Studien analysiert wurden erfolgte durch Verwendung des kommerziell erhältlichen CyDye™ *minimal labeling kit* (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland). Vor dem Einsatz der DIGE-Farbstoffe (*CyDye DIGE fluor minimal dyes*) wurde eine Stammlösung jedes Farbstoffes (1 mM) in

wasserfreiem Dimethylformamid (DMF) hergestellt. Der pH-Wert der Proteinlösungen wurde mit 100 mM NaOH bzw. HCl auf 8,5 eingestellt und die Farbstoff-Stammlösungen nach Verdünnung mit DMF in einer Konzentration von 200 bzw. 400 pmol / 50 µg Protein eingesetzt. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten auf Eis im Dunkeln mit den Farbstoffen inkubiert. Die Färbereaktion wurde nachfolgend mit 10 mM Lysin (1 µl Lysin / 200 pmol CyDye) abgestoppt und die Lösungen 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden vor der Beladung der ersten Dimension der gelelektrophoretischen Auftrennung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.10.5 Versuchsaufbau der DIGE-Experimente

Zur Durchführung eines DIGE-Experiments wurden jeweils vier 2D-DIGE Gele angefertigt. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte nach folgendem Muster:

Gel #	Cy3	Cy5	Cy2
1	Behandelte Probe	Kontrollprobe	Interner Standard
2	Behandelte Probe	Kontrollprobe	Interner Standard
3	Kontrollprobe	Behandelte Probe	Interner Standard
4	Kontrollprobe	Behandelte Probe	Interner Standard

Tab. 2-10: Proben-Farbstoffkombination für das *labeling* der Proben im DIGE-Versuch.

Der verwendete interne Standard wurde durch die Vereinigung äquivalenter Proteinmengen der behandelten Probe und der Kontrollprobe angefertigt. Für jedes DIGE-Experiment wurde ein sogenanntes „*dye-flip*“ Design gewählt, um Variabilitäten aufgrund unterschiedlicher Färbungen der Farbstoffe Cy3 und Cy5 auszuschließen. Der interne Standard wurde stets mit Cy2 markiert. Vor dem Beladen der IPG-Streifen der ersten Dimension wurde jede Probe mit dem gleichem Volumen an 2-fach Probenpuffer ergänzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Der verwendete 2-fach Probenpuffer setzte sich folgendermaßen zusammen:

2-fach Probenpuffer:

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
DTT	20 mM
CHAPS	4 % (w/v)
IPG-Puffer pH = 4 – 7 ¹	2 % (v/v)

¹GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

2.2.11 1D-SDS-PAGE

Zur Analyse der zellfreien GFP-Expression unter dem Einfluss selektiver Translationsinhibitoren bzw. Nicht-Translationsinhibitoren wurden die nach der Affinitätschromatographie aufgereinigten Eluate der Reaktionsansätze der ZFTT-Reaktion durch die Anwendung der 1D-SDS-PAGE aufgetrennt (s. 3.1.4). Hierfür wurde ein Sammelgel (4 % T) und ein Trenngel (12,5 % T) eingesetzt. Als Elektrophoresesystem diente das *Protean™ II Xi cells*-System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

Verwendete Puffer- / Gießlösungen:

4-fach Sammelgelpuffer (pH = 6,8):

Tris·Cl (pH = 6,8)	0,5 M
SDS	0,4 % (w/v)
Wasser	

4-fach Trenngelpuffer (pH = 8,8):

Tris·Cl (pH = 8,8)	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)
Wasser	

Lösungen zum Gießen des Sammelgels (4 % T; 200 ml):

4-fach Sammelgelpuffer (pH = 6,8)	50 ml
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) ¹	26 ml
Wasser	122 ml
APOD (20 %)	1 ml
TEMED	0,1 ml

Lösungen zum Gießen des Trenngels (12,5 % T; 450 ml):

4-fach Trenngelpuffer (pH = 8,8)	119,5 ml
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) ¹	188 ml
Wasser	140 ml
APOD (20 %)	2,25 ml
TEMED	0,1 ml

¹Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Zuerst wurden die Gele nach den Angaben des Herstellers nach Zusammenfügen der Glasplatten und Einbau in den Gießstand (*Protean™ II Multi-Gel Casting-Chamber*, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gegossen. Die verwendeten Gießlösungen wurden ca. 30 Minuten durch Einbringen in ein Ultraschallbad entgast. Die Gießhöhe wurde durch den für die Ausbildung der Probestaschen verwendeten Kamm bestimmt. Die maximale Gießhöhe des Trenngels war ca. 2 cm von der Unterseite des verwendeten Kammes entfernt. Nach dem Gießen des Trenngels wurde auf die ausgebildete Geloberfläche Isobutanol aufpipettiert, um eine horizontale Grenzfläche des Gels zu erhalten. Anschließend wurde das Trenngel für 2 Stunden auspolymerisiert. Nach Aufnahme des Isobutanols mit Filterpapier erfolgte das Gießen des Sammelgels. Hierbei wurde ein Kamm zur Ausbildung der Probestaschen in das Sammelgel einpolymerisiert. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde mit Elektrodenpuffer aufgefüllt, der Kamm entfernt und die Probestaschen mit Probenlösung beladen. Die Gelelektrophorese wurde eine Stunde mit einer Stromstärke von 20 mA / Gel und anschließend mit 40 mA / Gel bis zur Beendigung der Proteintrennung durchgeführt. Hierbei wurde die Elektrophoresekammer durch den Anschluss eines Wasserkühlkreislaufes auf einer konstanten Temperatur von 12 °C gehalten.

2.2.12 2D-SDS-PAGE

2.2.12.1 Isoelektrische Fokussierung (IEF) – 1. Dimension

Die isoelektrische Fokussierung der Proteine wurde unter Verwendung kommerziell erhältlicher Gelstreifen mit immobilisierten pH-Gradienten (*Immobiline™ DryStrip*; IPG-Strip; GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. In dieser Arbeit wurden Gelstreifen mit einem pH-Gradienten von pH = 4 – 7 und einer Streifenlänge von 24 cm verwendet. Da zur Beladung das *Cup-Loading*-Verfahren angewendet wurde, mussten die Gelstreifen vor ihrer Beladung in einer Rehydrierschale (*Immobiline™ DryStrip Reswelling Tray*; GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) über Nacht rehydriert werden. Der verwendete Rehydrierpuffer setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Rehydrierpuffer:

Harnstoff	7 M
Thioharnstoff	2 M
CHAPS	4 % (w/v)
<i>DeStreak</i> ^{TM 1}	1,2 % (v/v)
<i>IPG Buffer</i> pH = 4 – 7 ¹	0,5 % (v/v)
Bromphenolblau	0,005 % (w/v)

¹GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland.

Für jeden IPG-Streifen wurden 450 µl Rehydrierpuffer gleichmäßig in die Streifeneinsätze der Rehydrierschale pipettiert. Anschließend wurden die Gelstreifen mit der Gelseite nach unten so in die Einsätze eingepasst, dass sich der Rehydrierpuffer gleichmäßig über den gesamten Gelbereich verteilte und sich gleichzeitig keine Blasen zwischen Puffer und Gel bildeten. Abschließend wurden die Gelstreifen mit Paraffinöl überschichtet und über Nacht rehydriert. Zur Beladung der IPG-Streifen durch das *Cup-Loading*-Verfahren wurde das *Ettan*TM *IPGPhor*TM *Cup Loading Manifold* (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) eingesetzt. Die rehydrierten IPG-Streifen wurden mit der Gelseite nach oben in die Aussparungen des *Manifolds* gelegt und die zur Beladung verwendeten Plastikprobentröge (*sample cups*) auf das anodische Ende der IPG-Streifen aufgesetzt. Nach dem Aufbringen der Elektroden wurde das gesamte *Manifold* mit ca. 120 ml Paraffinöl geflutet. Es folgte die Beladung der IPG-Streifen durch das Pipettieren der Proteinlösungen in die Probentröge und die anschließende Überschichtung der Proben mit ca. 25 µl Paraffinöl. Abschließend wurden die Proteine über Nacht mit einer Stromstärke von 50 µA pro Streifen bei konstanter Temperatur von 20 °C und folgenden weiteren Parametern fokussiert:

Schritt	Spannungsmodus	Spannung [V]	Betriebsdauer [h:min]	Kilovoltstunden [kVh]
1	<i>Step and Hold</i>	50	00:02	
2	<i>Step and Hold</i>	300	03:00	0,9
3	<i>Gradient</i>	1000	06:00	3,9
4	<i>Gradient</i>	8000	03:00	13,5
5	<i>Step and Hold</i>	8000	04:40	36,7
Summe:			16:42	55

Tab. 2-11: Geräteparameter am *IPGPhor*TM zur Fokussierung der Proteine in der 1. Dimension.

Nach der Beendigung der Fokussierung wurden die Gelstreifen bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.12.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) – 2. Dimension

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Proteine in der zweiten Dimension durch Anwendung der denaturierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Zur Herstellung der Gießlösungen der Gele wurde eine homogene Acrylamidkonzentration eingesetzt (12,5 % T; 3 % C). Die Gele wurden durch Verwendung des *Ettan™ DALTsix Gel Caster* (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) gegossen. Zur Analyse der DIGE-Proben mussten spezielle Glasplatten mit niedriger Eigenfluoreszenz verwendet werden. Außerdem wurde jeweils die hintere Glasplatte mit *PlusOne™ Bind Silan* (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) silanisiert, um ein Verrutschen der Gele beim automatischen Ausstechen der Proteinspots zu verhindern. Die Lösung zur Silanisierung der Glasplatten bestand aus 16 ml Ethanol ($\geq 99,8$ %), 3,6 ml Wasser, 400 μ l Eisessig und 20 μ l *Bind Silan*. Die jeweils vordere Glasplatte wurde zusätzlich mit *PlusOne™ Repel-Silane ES* (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) behandelt, um eine einfache Trennung der Glasplatten vom Gel zu ermöglichen. Weiterhin wurden vor dem Zusammenfügen der vorderen und hinteren Glasplatte zwei kreisförmige Referenzmarker auf der linken und der rechten Außenseite der mit *Bind Silan* behandelten Platte aufgebracht, um Referenzpunkte für das automatische Ausstechen zu erhalten. Zum Gießen von sechs homogenen SDS-Polyacrylamidgelen (12,5 % T) wurden 450 ml einer Lösung folgender Zusammensetzung eingesetzt:

Lösung zum Gießen der Gele (450 ml):

4-fach Trenngelpuffer (pH = 8,8)	119,5 ml
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	188 ml
Wasser	140 ml
APOD (20 %)	2,25 ml
TEMED	0,1 ml

4-fach Trenngelpuffer (pH = 8,8):

Tris·Cl (pH = 8,8)	1,5 M
SDS	0,4 % (w/v)
Wasser	

Die Lösung wurde vor dem Gießen der Gele durch Ultraschallbehandlung entgast. Beim Einfüllen der Gießlösungen wurde darauf geachtet, dass sich keine Blasen im entstehenden Gel bilden. Die Lösungen wurden anschließend mit Isobutanol überschichtet und zum Auspolymerisieren über Nacht stehen gelassen.

Die weiteren verwendeten Pufferlösungen zur Durchführung der SDS-PAGE setzten sich wie folgt zusammen:

SDS-Äquibrierpuffer (pH = 8,8); (zur Herstellung der Äquibrierpuffer I + II):

Harnstoff	6 M
Tris·Cl (pH = 8,8)	30 mM
Glycerol	30 % (w/v)
SDS	2 % (w/v)
Bromphenolblau	0,005 % (w/v)
Wasser	

Äquibrierpuffer I (DTT; 1 % (w/v)):

DTT	200 mg
SDS-Äquibrierpuffer (pH = 8,8)	20 ml

Äquibrierpuffer II (Iodacetamid; 4,5 % (w/v)):

Iodacetamid	900 mg
SDS-Äquibrierpuffer (pH = 8,8)	20 ml

Elektrodenpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Wasser	

Agarosegel:

Elektrodenpuffer	100 ml
Agarose	0,5 % (w/v)

Die auf den IPG-Streifen aufgetrennten Proteine wurden durch die Behandlung mit den Äquilibriumspuffern I und II aufeinanderfolgend mit DTT reduziert und mit Iodacetamid alkyliert. Hierzu erfolgte jeweils eine 15-minütige Inkubation der Streifen mit den Pufferlösungen auf einem Schüttler. Anschließend wurden die Streifen nach dem Spülen mit Elektrodenpuffer mit der Trägerfolie nach unten auf die hintere Glasplatte aufgelegt und vorsichtig unter Ausschluss von Luftblasen auf die Geloberkante transferiert. Schließlich wurden die Gelstreifen noch mit flüssiger Agarose überschichtet und die Glasplatten nach Erstarren der Agarose in die Elektrophoresekammer (*Ettan™ DALTSix*, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) eingesetzt. Nach dem Einfüllen des Elektrodenpuffers wurde die Proteintrennung in der zweiten Dimension begonnen, wobei die Temperatur des Puffers konstant auf 12 °C durch einen angelegten Kühlkreislauf gehalten wurde. Die Laufbedingungen der elektrophoretischen Trennung wurden für 30 Minuten auf 2,5 W pro Gel eingestellt. Anschließend wurde die Gesamtleistung auf 100 W bis zur Beendigung der Trennung erhöht.

2.2.13 Färbemethoden

2.2.13.1 Silberfärbung (nach Shevchenko *et al.*, 1996)

Die Silberfärbung als eine der sensitivsten Proteinnachweismethoden (ca. 0,05 – 0,1 ng/mm²) beruht hauptsächlich auf der elektrostatischen Interaktion der Silberionen mit den Seitenketten der Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure und Cystein. Die Verwendung von Formaldehyd führt zur Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber und damit zu einer Braun- bzw. Schwarzfärbung der Proteine im Gel. Durch die Verwendung des unten angegebenen Protokolls nach Shevchenko *et al.*, 1996 lassen sich die mit Silber angefärbten Proteine massenspektrometrisch identifizieren. Die Gele wurden nach der elektrophoretischen Trennung direkt der Färbeprozedur unterzogen.

Protokoll: Silberfärbung

1. Fixierung der Proteine:

Methanol	50 % (v/v)
Essigsäure	5 % (v/v)

Die Gele wurden 4 x 30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert.

2. Waschen der Gele:

Die Gele wurden 3 x 20 Minuten auf einem Schüttler mit Wasser gewaschen.

3. Sensibilisieren der Gele:

Natriumthiosulfat 0,02 % (w/v)

Die Gele wurden 1-2 Minuten auf einem Schüttler mit Sensibilisierungslösung inkubiert und anschließend 2 x 1 Minute mit Wasser gewaschen.

4. Silberfärbung der Gele:

Silbernitrat (4 °C) 0,1 % (w/v)

Die Gele wurden 30 Minuten auf einem Schüttler mit Färbelösung inkubiert und anschließend 2 x 1 Minute mit Wasser gewaschen.

5. Entwicklung der Silbergele:

Natriumcarbonat 1,25 % (w/v)

Formaldehyd 0,04 % (v/v)

Die Gele wurden wiederholend bis zur Gelbfärbung mit der Entwicklerlösung inkubiert.

6. Abstoppen der Entwicklung der Silberfärbung:

Essigsäure 5 % (v/v)

Die Gele wurden 2 x 2 Minuten zum Abstoppen der Entwicklerreaktion mit Essigsäure inkubiert.

2.2.13.2 Kolloidale Coomassiefärbung (nach Neuhoff *et al.*, 1988)

Die Färbung der Proteine mit dem anionischen Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) beruht auf der Bindung der Farbstoffmoleküle an die protonierten Aminogruppen der Proteine über elektrostatische und hydrophobe Interaktionen im sauren Medium. Die Anwendung der Färbemethode nach Neuhoff *et al.*, 1988 ermöglicht eine reproduzierbare Färbung der Proteine mit geringerer Hintergrundfärbung durch Ausnutzung der kolloidalen Eigenschaften des Farbstoffes. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei 8-10 ng Protein im Gel. Außerdem erlaubt diese Methode die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine nach enzymatischem Verdau ohne vorherige Entfärbung. Zur

Färbung der 2D-SDS-Gele mit kolloidalem CBB wurden folgende Lösungen mit MilliQ-Wasser als Lösungsmittel hergestellt:

Protokoll: Kolloidale Coomassiefärbung

1. Fixierung der Proteine:

Phosphorsäure	1,3 % (w/v)
Methanol	20 % (v/v)

Die Gele wurden 1 Stunde auf einem Schüttler in der Fixierlösung inkubiert.

2. Färbelösung I:

Ammoniumsulfat	10 % (w/v)
Phosphorsäure	2 % (w/v)

3. Färbelösung II:

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,5 % (w/v)
Essigsäure	3,5 % (v/v)
Methanol	20 % (v/v)
Aceton	35 % (v/v)
Ammoniumsulfat	30 % (w/v)

Zur Herstellung von Färbelösung II wurde der Farbstoff in der Essigsäure auf 60 – 70 °C erwärmt und mit festem Ammoniumsulfat bis zum Erreichen der vorgegebenen Konzentration versetzt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung filtriert und das sich bildende Sediment des Filtrats durch Zugabe von Methanol und Aceton aufgelöst.

Zur Färbung der Gele wurden 200 ml Färbelösung I mit 20 ml Färbelösung II gemischt, mit 30 ml Methanol versetzt und vor der Anwendung geschüttelt. Die Gele wurden mit dieser Lösung über Nacht inkubiert.

4. Neutralisieren (Tris/Phosphorsäure-Puffer, pH = 6,5):

Tris	1,2 % (w/v)
Phosphorsäure	pH-Wert auf 6,5 einstellen

Die Gele wurden 3 Minuten auf einem Schüttler mit Neutralisationslösung behandelt.

5. Waschen der Gele:

Methanol 25 % (v/v)

Die Gele wurden maximal 1 Minute mit Methanol gewaschen.

6. Stabilisierung der Proteine:

Ammoniumsulfat 20 % (w/v)

Durch Inkubation der Gele mit Ammoniumsulfatlösung wurden die Protein-Farbstoffkomplexe stabilisiert.

2.2.13.3 Fluoreszenzfärbung mit RuBPS

Die Färbung der 1D-SDS-Gele mit Ruthenium(II)-tris-bathophenanthrolindisulfonat (RuBPS) basiert auf der starken elektrostatischen Interaktion des fluoreszierenden Ruthenium-bathophenanthrolinchelatkompleses mit Proteinen. Diese Färbemethode zeichnet sich durch eine Nachweisgrenze von 5-10 ng Protein im Gel und die Kompatibilität mit der massenspektrometrischen Proteinidentifizierung aus. Zur Färbung der Proteine mit RuBPS wurde ein durch Lamanda *et al.* publiziertes Färbeprotokoll verwendet (Lamanda *et al.*, 2004).

Protokoll: Fluoreszenzfärbung mit RuBPS

1. Fixierung der Proteine:

Ethanol 30 % (v/v)

Essigsäure 10 % (v/v)

Die Gele wurden über Nacht auf einem Schüttler mit Fixierlösung inkubiert.

2. Waschen der Gele:

Ethanol 20 % (v/v)

Die Gele wurden 4 x 30 Minuten unter Austausch der Waschlösung gewaschen.

3. Färben der Gele:

RuBPS 500 nM

25 µl einer 10 mM RuBPS-Stammlösung wurde nach Zentrifugation (12.000 g; 3 min) in 500 ml Wasser gelöst und die Gele 6 Stunden in der Färbelösung geschüttelt. Die Herstellung der

RuBPS-Stammlösung erfolgte durch Dr. Martin Hampel nach den in seiner Dissertation angegebenen Arbeitsschritten (Hampel, 2006).

4. Waschen der Gele:

Die Gele wurden 2 x 10 Minuten mit Wasser auf einem Schüttler gewaschen.

5. Entfärben der Gele:

Ethanol 40 % (v/v)

Essigsäure 10 % (v/v)

Die Gele wurden 15 Stunden auf einem Schüttler entfärbt.

2.2.14 Elektronische Methoden

2.2.14.1 Scannen der Gele

Zur Bildaufnahme der mit Silbernitrat und Coomassie Brilliant Blue gefärbten Proteine wurden die Gele nach Abschluss der Färbeprozedur unter Verwendung eines Durchlichtscanners (Scanmaker i900, Mikrotek, Hoogvliet, Niederlande) abgebildet. Die erzeugten Gelbilder besitzen eine Auflösung von 600 x 600 dpi und wurden im JPEG bzw. TIFF-Dateiformat gespeichert.

Zur Aufnahme der mit RuBPS gefärbten Proteine wurde ein Fluoreszenzscanner (Fuji FLA 3000, Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland) verwendet. Zum Scannen der Gelbilder wurden folgende Parameter in der verwendeten Software (*BASReader* Version 3.01, raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt, Deutschland) eingestellt: Anregungswellenlänge = 473 nm; Sensitivität = 1000; 16 bit; Auflösung = 100 µm. Die erzeugten Gelbilder wurden im TIFF-Format gespeichert.

Zum Scannen der DIGE-Gele wurde der Fluoreszenzlaserscanner Typhoon™ 9400 (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) eingesetzt. Die Verwendung dieses Scanners ermöglichte die sequentielle Anregung der DIGE-Farbstoffe mit den Wellenlängen 488 nm, 532 nm und 633 nm. Dadurch emittierten die Farbstoffe Fluoreszenzlicht, welches durch Emissionsfilter der Wellenlängen 520 nm, 580 nm und 670 nm geleitet wurde. Durch die Verwendung eingebauter *photomultiplier tubes* (PMT) wurde das emittierte Fluoreszenzlicht verstärkt und in ein elektrisches Signal, welches proportional zur emittierten Lichtstärke war, umgewandelt.

Die Gele wurden direkt nach der Beendigung der elektrophoretischen Trennung der Scanprozedur unterzogen, da die Gefahr der Diffusion der fluoreszenzmarkierten Proteine bei längerer Lagerung der Gele bestand. Die Oberflächen der geltragenden Glasplatten wurden gründlich mit Wasser gereinigt und auf der Scanfläche ausgerichtet. Zuerst wurde ein Grobscan mit einer Auflösung von 1000 μm und einer PMT-Spannung von 500 V durchgeführt, um die Spannung bei etwaiger Signalsättigung zu reduzieren. Anschließend wurden die einzelnen Gele mit 100 μm Auflösung und folgenden weiteren Parametern gescannt:

Fluorophor	Absorptions- maximum [nm]	Anregungs- wellenlänge [nm]	Emissions- wellenlänge [nm]	Emissionsfilter (BP = Bandfilter)	PMT-Spannung [V]
Cy2	489	488	506	520 BP 40	400 - 700
Cy3	550	532	570	580 BP 30	400 - 700
Cy5	649	633	670	670 BP 30	400 - 700

Tab. 2-12: Eingestellte Geräteparameter am Typhoon 9400 zum Scannen der DIGE-Gele.

Als Software zur Falschfarbendarstellung der Gele wurde *ImageQuant* (Version 5.2, Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA) verwendet. Nach dem Scannen der Gele wurden diese in feuchte Tücher verpackt und bis zum Ausstechen der Proteine bei 4 °C gelagert.

2.2.14.2 Softwaregestützte Auswertung der 2D-DIGE-Gele

Zur Auswertung der DIGE-Gele wurde die Software *Decyder™ Differential Analysis 5.0* (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) verwendet. Die eingesetzte Software besteht aus zwei Hauptmodulen; dem DIA- (*differential in-gel analysis*) und dem BVA-Modul (*biological variation analysis*). Die Anwendung des DIA-Moduls ermöglicht das Laden der drei erzeugten Gelbilder jedes DIGE-Farbstoffes eines Gels in eine Bilddatei zur Co-Detektion der markierten Proteine. Weiterhin ließen sich gescannte Artefakte im Gel (z. B. Staubpartikel) durch Anwendung eines softwaregestützten Filters ausschließen (*exclusion filter*). Die Ausschlußparameter des Filters wurden folgendermaßen gewählt: Steigung der Spotflanke > 1,1; Spotfläche < 100; Spothöhe < 100; Spotvolumen < 10000. Das BVA-Modul ermöglichte den Abgleich der Lage der Proteinspots auf den unterschiedlichen Gelen (*matching*) durch manuelles Vorgeben von Referenzpunkten im Gel (*landmarking*). Anschließend erfolgte die relative Quantifizierung der Proteine durch die Ermittlung des Verhältnisses der normalisierten Spotvolumina der behandelten bzw. nicht-behandelten Probe

gegen den internen Standard. Als differentiell reguliert galten Proteine nur, wenn sie folgende Parameter erfüllten: Vorhandensein der Proteinspots in mindestens 3 von 4 DIGE-Gelen, ein Durchschnittsverhältnis der Proteinabundanzen von $> +1,5$ bzw. $< -1,5$ gegenüber dem internen Standard, sowie einen p -Wert $< 0,05$ im t -Test. Die entsprechend ausgewählten Spots wurden als zu „pickende“ Spots markiert und in Form einer „Pickliste“ in eine Textdatei exportiert. Anhand dieser „Pickliste“ wurden die Proteine anschließend automatisch aus dem Gel ausgeschnitten.

2.2.15 Ausstechen bzw. Ausschneiden der Proteinspots

Die mit Coomassie Brilliant Blue bzw. RuBPS angefärbten Proteine wurden auf einem Leuchttisch unter Verwendung eines Skalpellts ausgeschnitten. Im Falle der RuBPS gefärbten 1D-Gele wurden die zu untersuchenden Proteinbanden ausgeschnitten und in Gelpartikel von ca. 1 mm² Fläche zerkleinert. Die Proteinspots der mit Coomassie gefärbten 2D-Gele wurden mittels Skalpell kreisförmig entlang der Spotgrenzen ausgeschnitten und bei Bedarf zerkleinert. Die so gewonnenen Gelpartikel wurden in 96 Well Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt und bis zum tryptischen Verdau bei -20 °C gelagert. Die Proteine der DIGE-Gele wurden durch Anwendung eines automatischen *Spotpickers* (*Ettan™ Spot Picker*, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) aus dem Gel extrahiert. Hierzu wurde die mit *Repel-Silane ES* behandelte Glasplatte vom Gel getrennt und das an die hintere Glasplatte fixierte Gel in den Arbeitsbereich des *Spotpickers* eingebracht. Durch das Laden der per Software erstellten Picklisten ließen sich die ausgewählten Proteine durch Anwendung des mit einer Ausstanzvorrichtung ausgestatteten *Spotpickers* ausstechen. Die auf der Glasplatte aufgebrauchten Referenzmarker dienten als Orientierungspunkt für die Erstellung der Koordinaten der auszustechnen Proteinspots. Die ausgestochenen Proteine wurden automatisch in eine 96 Well Platte transferiert. Für den nachfolgenden tryptischen In-Gel-Verdau wurden gleiche Proteine unterschiedlicher Gele vereinigt und bis zur Durchführung des Verdau bei -20 °C gelagert.

2.2.16 Tryptischer Verdau der Proteine

Die zur Identifizierung aus den 1D- bzw. 2D-SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnittenen Proteine wurden standardmäßig einem tryptischen In-Gel-Verdau unterzogen (Shevchenko, 1996). Die Protease Trypsin schneidet hierbei die Proteine C-terminal an Lysin- und

Argininresten, sofern kein Prolin folgt. Die Verdauprozedur wurde für alle Proben automatisch unter Verwendung eines Pipettierroboters (*MicroLab Star 100*, Hamilton Robotics GmbH, Martinsried, Deutschland) durchgeführt. Der Proteinverdau erfolgte nach folgendem Protokoll:

Schritt #	Beschreibung	Vol. [μ l]	Zeit [min]	Temp [$^{\circ}$ C]	Zyklen
1	Entfernen vorhandener Flüssigkeit	200	---	21	1
2	Waschen (mit MilliQ-Wasser)	200	7	21	3
3	Waschen mit 50 % ACN in 25 mM NH_4HCO_3	150	7	21	3
4	Dehydrieren mit 100 % ACN	150	8	21	2
5	Trocknen der Gelstücke	---	20	56	---
6	Reduzieren mit DTT (10 mM in 100 mM NH_4HCO_3)	100	60	58	1
7	Alkylieren mit Iodacetamid (55 mM in 100 mM NH_4HCO_3)	100	45	21	1
8	Mit 100 mM NH_4HCO_3 waschen	150	5	21	2
9	Dehydrieren mit 100 % ACN	150	5	21	1
10	Gelstücke in 100 mM NH_4HCO_3 aufquellen	200	5	21	1
11	Dehydrieren mit 100 % ACN	200	10	21	2
12	Trocknen der Gelstücke	---	20	56	---
13	Trypsinlösung zufügen (12,5 ng/ μ l Trypsin, 10 mM CaCl_2 , 50 mM NH_4HCO_3)	17	35	4	1
14	Überschüssiges Trypsin entfernen	30	---	---	---
15	Verdaupuffer hinzufügen (50 mM NH_4HCO_3 ; 2,5 mM CaCl_2)	50	---	---	---
16	Tryptischer Verdau	---	720	38	1
17	0,1 % TFA zufügen (Beendigung des Verdaus)	40	---	---	1
18	Überstand in neues Well transferieren	110	---	21	---
19	Peptidextraktion 1 (70 % ACN, 5 % Ameisensäure hinzufügen); Transfer zu Verdauüberstand	70	20	21	1
20	Peptidextraktion 2 (100 % ACN); Transfer zu Verdauüberstand	70	20	21	2

Tab. 2-13: Protokoll des automatischen tryptischen In-Gel-Verdaus (Hamilton *MicroLab Star 100*) für CyDye gelabelte bzw. Coomassie Brilliant Blue gefärbte Proteinproben.

Für die mit RuBPS angefärbten Proteine gilt dieses Protokoll unter Austausch der in Schritt 3 beschriebenen Bedingungen: Ethanol (50 %); 60 min; 2 Zyklen. Die tryptisch verdauten Proteine wurden nach dem Trocknen in einer Vakuumzentrifuge bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -20° C gelagert.

2.2.17 Massenspektrometrische Proteinidentifizierung

Die durch den automatischen tryptischen In-Gel Verdau erhaltenen Peptide wurden vor dem Aufbringen auf den MALDI-Probenteller in 50-70 % (v/v) Acetonitril, 0,1 % (v/v) TFA resolubilisiert.

2.2.17.1 Aufreinigung per ZipTip[®]_{μ-C18}

Zur Entsalzung bzw. Aufkonzentrierung der ausgewählter Peptidproben wurde das kommerziell erhältliche ZipTip[®] System (Millipore Corp., San Francisco, USA) nach Vorgaben des Herstellers eingesetzt.

2.2.17.2 „Dried-droplet“-Präparation

Als MALDI-Matrixsubstanzen für die massenspektrometrische Proteinidentifizierung wurden α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (CHCA) und 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) verwendet (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Als Lösungsmittel wurde 50-70 % (v/v) Acetonitril / 0,1 % (v/v) TFA eingesetzt. Bei der Verwendung von CHCA als Matrixsubstanz wurden 10 mg/ml Substanz eingewogen und im oben angegebenen Lösungsmittel gelöst. Die Lösung wurde 20 Sekunden gevortext und anschließend 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Der Überstand der Lösung wurde abpipettiert und mit drei Teilen Lösungsmittel verdünnt. Zum Auftragen der tryptischen Peptide auf den MALDI-Probenteller wurden die eingetrockneten Peptidlösungen in 5 μ l des oben angegebenen Lösungsmittel rückgelöst und 0,5 μ l der Lösung auf den Probenteller aufpipettiert. Nachfolgend wurden 0,5 μ l Matrixlösung auf die gespottete Probe pipettiert. Der Probenspot wurde an der Luft bzw. unter Zuhilfenahme eines Kaltluftföns eingetrocknet und die Kristallisation per Mikroskop überprüft. Vor dem Einschleusen des MALDI-Probentellers wurden alle Proben zwecks Entsalzung bzw. Aufreinigung mit 1 μ l kalter Ameisensäure (5 %, v/v) gewaschen. Im Falle der DHB wurden 20 mg/ml Matrixlösung im oben angegebenen Lösungsmittel angesetzt. Alle Matrix- und Probenlösungen wurden vor jeder Messung frisch präpariert.

2.2.18 MALDI-TOF-MS

Zur Aufnahme der Massenspektren tryptisch verdauter Peptide wurde das Voyager-DE™ STR MALDI-TOF-Massenspektrometer und der 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer (beide Applied Biosystems, Foster City, USA) eingesetzt. Die Messungen wurden an beiden Massenspektrometern im Reflektormodus durchgeführt. Als Probenhalter wurden polierte Stahlteller mit 100 Probenpositionen zur Messung am Voyager-DE™ STR bzw. mit 384 Probenpositionen zur Messung am 4800 MALDI TOF/TOF™ Analyzer verwendet. Für jede Messreihe wurde eine externe Kalibrierung mit einer Peptidmischung (*Starter Kit for MALDI-TOF MS*, Applied Biosystems) folgender Zusammensetzung durchgeführt:

Peptid	Monoisotopische Masse [M+H] ⁺
des-Arg ¹ -Bradykinin	904,4681
Angiotensin I	1296,6853
Glu ¹ -Fibrinopeptid B	1570,6774
ACTH_clip (1-17)	2093,0867
ACTH_clip (18-39)	2465,1989
ACTH_clip (7-38)	3657,9294

Tab. 2-14: Zusammensetzung der Peptidmischung für die externe Kalibrierung.

Die softwaregestützte Bearbeitung bzw. Auswertung der aufgenommenen Massenspektren erfolgte unter Verwendung der Software Data Explorer Version 4.3 (Applied Biosystems). Die Identifizierung der Proteine erfolgte unter Anwendung von Spectrum Mill (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) und Mascot (Matrix Science Ltd., London, Großbritannien; www.matrixscience.com). Als Datenbanken zur Proteinidentifizierung wurden SwissProt (SwissProt Group; Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) and European Bioinformatics Institute (EBI), Genf, Schweiz) und NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) eingesetzt. Die eingestellten Suchparameter zur signifikanten Identifizierung der Proteine sind in den jeweiligen Kapiteln der verschiedenen Projekte angegeben.

2.3 Kooperationsprojekte

Die stetig steigende Zahl multiresistenter Bakterien und die parallel sinkende Bereitschaft der pharmazeutischen Industrie in den Forschungs- und Entwicklungsbereich der antimikrobiellen Wirkstofffindung zu investieren, läßt vor allem der Forschung außerhalb der profitorientierten Industrie eine Schlüsselrolle zur Identifizierung und Charakterisierung neuer antimikrobieller Wirkstoffe zukommen. Dafür ist der Aufbau interdisziplinärer Forschungsk Kooperationen zur optimalen Nutzung etablierter Arbeitstechniken und wissenschaftlichem *know-how* nötig. Nachfolgend soll ein Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Kooperationsprojekte interdisziplinärer Arbeitsgruppen und deren Rolle in den Phasen des antimikrobiellen Wirkstofffindungsprozesses beschrieben werden.

Die Phasen der in dieser Arbeit nachfolgend beschriebenen Studien ließen sich in eine Identifizierungs- und eine Charakterisierungsphase unterteilen (s. Abb. 2-5). Zentrale Methode zur Identifizierung neuer Inhibitoren der prokaryotischen zellfreien Transkriptions-/Translationsreaktion (ZFTT-Reaktion) war die Nutzung eines im Rahmen dieser Arbeit etablierten Reportergenexpressions-Assays (s. 2.2.4, 3.1). Die Identifizierungsstrategie umfaßte neben der Aktivitätsbestimmung ausgewählter synthetischer Substanzen, Naturstoffe und roher bakterieller Kulturüberstände im zellfreien Assay auch die Bestimmung des antimikrobiellen Potentials gegen Gram-positive und Gram-negative Modellorganismen. Parallel wurde durch die Etablierung einer Forschungsk Kooperation mit Dr. Thomas Wichelhaus (Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt/Main) die Untersuchung der antibakteriellen Aktivität ausgewählter Substanzen gegen humanpathogene und multiresistente Testorganismen möglich. Der Aufbau eines Substanzpools aktiver Verbindungen verschiedener Substanzklassen wurde im Rahmen interdisziplinärer Forschungsk Kooperationen mit Mitarbeitern der Arbeitsgruppen aus den Bereichen der Bioinformatik (Dr. M. Nietert, Y. Tanrikulu, AK Prof. Dr. Gisbert Schneider, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe-Universität Frankfurt/Main), der organischen Chemie (Dr. M. Suhartono, AK Prof. Dr. Michael W. Göbel, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe-Universität Frankfurt/Main) und der Mikrobiologie (AK Dr. Torsten Stein, Institut für Molekulare Biowissenschaften, Goethe-Universität Frankfurt/Main) geleistet. Diese Kooperationsprojekte ermöglichten die Generierung einer Substanzbibliothek, die zwar im Vergleich

zu industriellen Molekülbibliotheken klein erscheint, aber durch den vorgeschalteten Einsatz von wissenschaftlichem *know-how* zur Destillation einer Anzahl von Molekülen mit höherem Aktivitätspotential führte. Das wissenschaftliche *know-how* der beteiligten Arbeitsgruppen wurde u. a. durch den Einsatz virtueller Screeningverfahren unter Verwendung geeigneter Suchalgorithmen, der Nutzung etablierter Synthesestrategien und durch Literaturrecherche zum Auffinden aktiver antibakterieller synthetischer Substanzen oder natürlicher Extrakte genutzt. Es sollten folglich im Rahmen dieser Arbeit keine, mit der Industrie vergleichbaren, finanziell aufwendigen HTS-Kampagnen (HTS = *high-throughput screening*) unter Verwendung mehrerer Hunderttausend Substanzen aus (meist für andere therapeutische Bereiche geeignete) Molekülbibliotheken durchgeführt werden. Wie die Literatur zeigt, zeichneten sich diese, durch die Industrie durchgeführten *Screening*-Kampagnen bis heute nur durch geringen Erfolg zum Auffinden neuer antimikrobieller Leitstrukturen aus (Payne *et al.*, 2007).

Die Charakterisierungsphase identifizierter antibakterieller ZFTT-Inhibitoren beinhaltete zum einen die Bestimmung der Zytotoxizität aktiver Substanzen gegen eukaryotische NALM-6-Zellen (Forschungskooperation mit Jenny Merkens; AK Prof. Dr. Rolf Marschalek; s. 3.4.6). Zum anderen wurde die selektive Affinität der Substanzen zu den Zielstrukturen der prokaryotischen TT-Reaktion und der für die Tat-TAR-Interaktion relevanten Zielstruktur der TAR-RNA verglichen (mit Dr. M. Suhartono / AK Prof. Dr. Göbel und Dr. M. Nietert / AK Prof. Dr. Schneider). Die Charakterisierung des Wirkmechanismus ausgewählter identifizierter antimikrobieller Inhibitoren der ZFTT-Reaktion gegen den Modellorganismus *Bacillus subtilis* 168 erfolgte durch den proteomanalytischen Nachweis induzierter zytoplasmatischer Markerproteine und dem Abgleich mit publizierten Referenzkompendien antimikrobieller Wirkstoffe im Rahmen eines 2D-DIGE-Experiments (s. 3.7.2, 3.7.3).

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit beschriebenen Kooperationsprojekte in die jeweiligen Phasen der antimikrobiellen Wirkstoffsuche eingeordnet (s. Abb. 2-5):

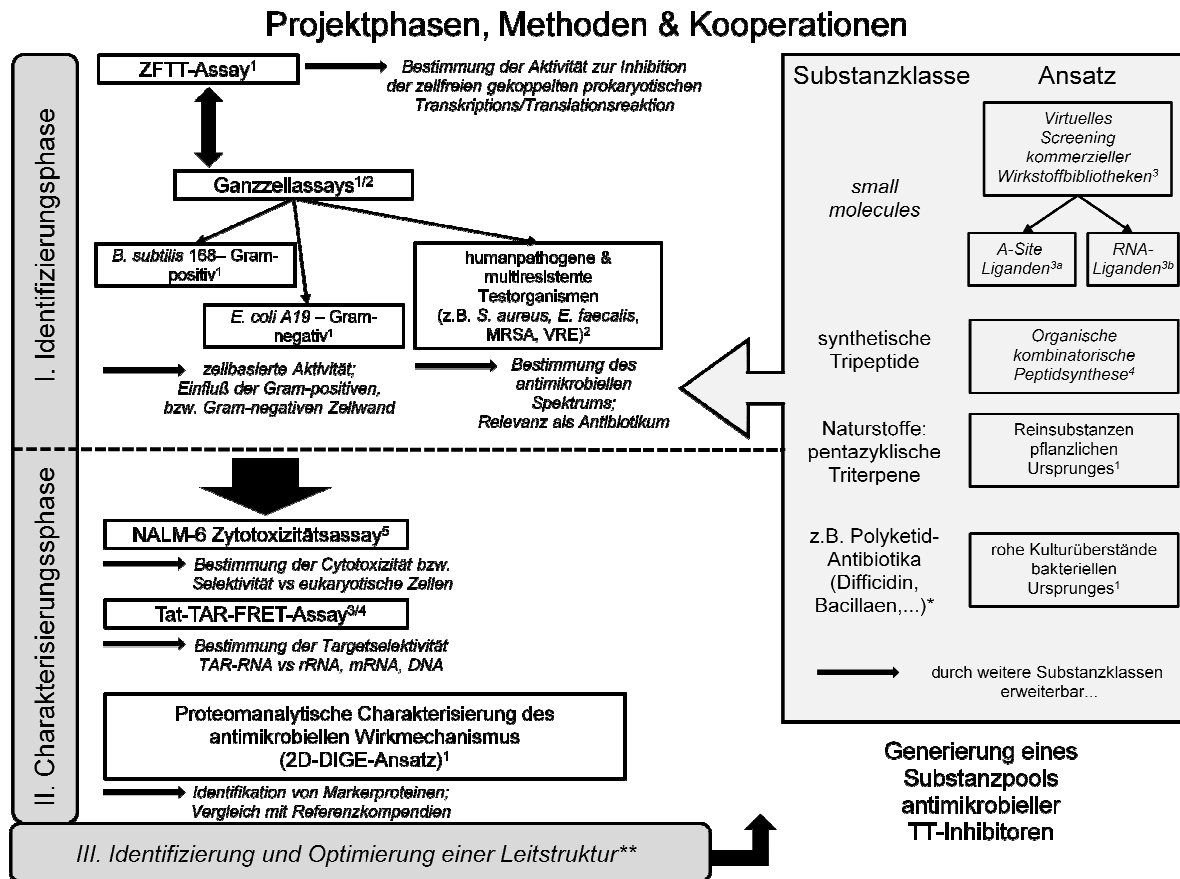


Abb. 2-5: Schematische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Forschungsk Kooperationen und der angewendeten Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung neuer antimikrobieller Inhibitoren der bakteriellen Transkriptions-/Translationsreaktion.

Die Etablierung, Durchführung und Auswertung der gezeigten Methoden wurde durch folgende Arbeitsgruppen geleistet: ¹ = M. Weidlich, AK Prof. Dr. M. Karas / Dr. T. Stein; ² = Dr. T. Wichelhaus (s. 2.2.2.2, 3.3.2.5, 3.3.2.7, 3.4.4, 3.6.3); ^{3a} = Y. Tanrikulu (s. 3.3.1) und ^{3b} = Dr. M. Nietert (s. 3.3.2), AK Prof. Dr. G. Schneider; ⁴ = Dr. M. Suhartono (s. 3.4), AK Prof. Dr. M. Göbel; ⁵ = J. Merkens (s. 3.4.6), AK Prof. Dr. R. Marschalek.

*es liegen teilweise noch keine strukturellen Daten der aktiven Metabolite der Kulturüberstände vor

**nur die Phasen I und II sind Bestandteil dieser Dissertation

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung, Validierung und Charakterisierung des ZFTT-Assays

3.1.1 Optimierung der Salzkonzentration

Zu Beginn dieser Arbeit wurden etablierte, auf der Diplomarbeit von Dr. Christian Klammt (Klammt, 2002) basierende Arbeitsprotokolle, die v. a. für die präparative Produktion von Proteinen im CECF-System (Dialyseverfahren) genutzt wurden, auf ihre Anwendbarkeit im *Batch*-Verfahren überprüft. Wie die Ergebnisse der Diplomarbeit zeigten, hatten die dem Assay zugesetzten Salzkonzentrationen (Mg^{2+} und K^+) und die im präparierten S30-Extrakt enthaltenen Salze einen sehr starken Einfluss auf die Proteinausbeute der zellfreien Transkription-/Translationsreaktion (TT-Reaktion). Da die folgend vorgestellten Ergebnisse des ZFTT-Assays mit unterschiedlich präparierten bakteriellen auf *E. coli* A19 basierenden S30-Extrakten durchgeführt wurden, musste die optimale Kalium- und Magnesiumionenkonzentration jeweils vor der Anwendung des Extraktes ermittelt werden.

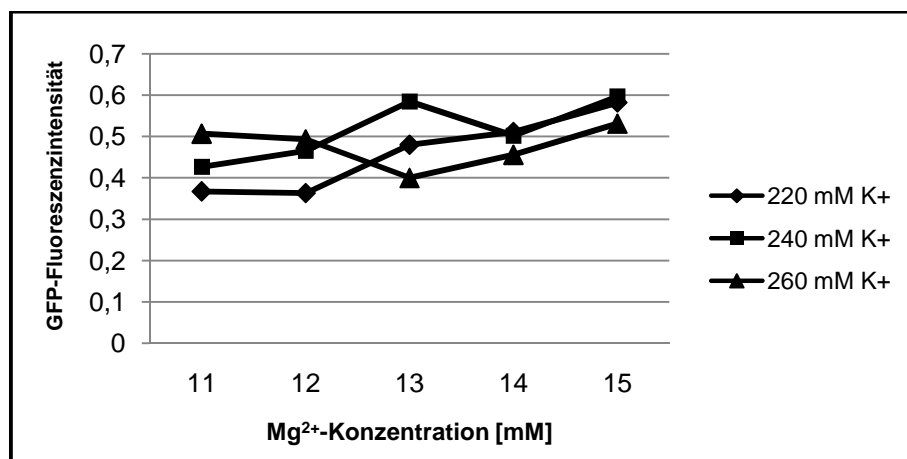


Abb. 3-1: Zellfreie Transkription-/Translation des Reporterproteins Grünes Fluoreszierendes Protein (GFP) in Abhängigkeit variabler Magnesium- und Kaliumionenkonzentrationen im *Batch*-Verfahren (100 μ l) des ZFTT-Assays (n = 3); Reaktionsbedingungen: 30 °C, 550 rpm, 5 h; S30-Extraktcharge: „DF1“. Dargestellt ist die gemessene absolute GFP-Fluoreszenzintensität einer 1/100-fachen Verdünnung (mit MilliQ-Wasser) des jeweiligen Reaktionsansatzes. Die maximale relative Standardabweichung der Messwerte betrug ± 2 %.

Die Titration der Magnesium- und Kaliumionenkonzentrationen zeigten für den ZFTT-Assay im *Batch*-Verfahren unter Verwendung der beispielhaft ausgewählten S30-Extraktcharge „DF1“ ein Optimum bei 240 mM K^+ und 15 mM Mg^{2+} . Der untersuchte Magnesium- und

Kaliumionenkonzentrationsbereich wurde basierend auf den Ergebnissen der Diplomarbeit von Dr. C. Klammt (Klammt, 2002) gewählt. Die TT-Reaktion unter 220 mM K⁺ und 11 bzw. 12 mM Mg²⁺ zeigte unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen eine bereits 40 % geringere nachweisbare Translation des Reporterproteins GFP. Weiterhin war zu erkennen, dass die Salzkonzentrationen voneinander abhingen und folglich das optimale Verhältnis der Kalium- und Magnesiumionenkonzentrationen vor der Verwendung einer neuen S30-Extraktcharge ermittelt werden musste. Gründe für die geringere Proteinausbeute unter bestimmten Ionenkonzentrationsverhältnissen könnte die geringere Aktivität unterschiedlicher für die Transkription und Translation wichtiger Enzyme (z. B. RNA-Polymerase; Kinasen) sein. Es ist jedoch kein so starker Einfluss variabler Salzkonzentrationen zu erkennen, wie es im CECF-Verfahren unter präparativen Bedingungen zu beobachten war (Klammt, 2002). Hauptgründe sind die kürzere Synthesezeit und die insgesamt geringere Proteinausbeute im *Batch*-Verfahren.

3.1.2 Optimierung der Plasmidkonzentration

Nach erfolgreicher Plasmidpräparation des pIVEX2.3-GFP mittels alkalischer Lyse aus transformierten *E. coli* DH5 α -Zellen (s. 2.2.1.3) wurde der Einfluss der Plasmidkonzentration auf die Translation im ZFTT-Assay überprüft. Die Möglichkeit vorhandener DNasen im verwendeten bakteriellen Extrakt, sowie die mögliche Interaktion einer zu hohen Plasmid-DNA-Konzentration mit essentiellen Komponenten des Reaktionsansatzes des Assays waren ausschlaggebend für die Optimierung der Plasmidkonzentration.

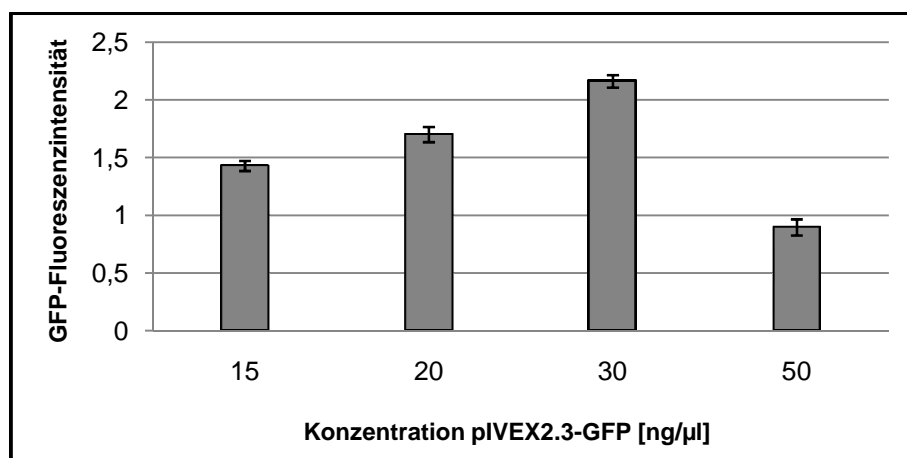


Abb. 3-2: Translation des Reporterproteins Grünes Fluoreszierendes Protein (GFP) nach Variation der Plasmidkonzentration (pIVEX2.3-GFP) im *Batch*-Verfahren (100 μ l) des ZFTT-Assays (n = 3). Reaktionsbedingungen: 30 °C, 550 rpm, 5 h. Dargestellt ist die gemessene absolute GFP-Fluoreszenzintensität einer 1/100-fachen Verdünnung (mit MilliQ-Wasser) des jeweiligen Reaktionsansatzes. Die maximale relative Standardabweichung der Messwerte betrug \pm 8 %.

Dieses Ergebnis zeigte die maximale Expression des Reporterproteins bei einer Plasmidkonzentration von 30 ng/ μ l (s. Abb. 3-2). Eine Plasmidkonzentration von 50 ng/ μ l ergab eine deutliche Reduktion der nachweisbaren Expression des Reporterproteins um knapp 60 %. Daher wurde in folgenden Experimenten eine Konzentration von 30 ng/ μ l Plasmid im ZFTT-Assay eingesetzt.

3.1.3 DMSO-Kompatibilitätsprüfung

Da eine Vielzahl der untersuchten Testsubstanzen eine schlechte Wasserlöslichkeit aufweisen, wurde häufig Dimethylsulfoxid (DMSO) als dipolares aprotisches Lösungsmittel mit guten Lösemitteleigenschaften eingesetzt. Um auszuschließen, dass DMSO selbst einen inhibierenden Einfluss auf die Aktivität der ZFTT-Reaktion besitzt, wurde das Lösungsmittel in verschiedenen Konzentrationen im Assay eingesetzt und die konzentrationsabhängige Inhibition der TT-Reaktion bestimmt.

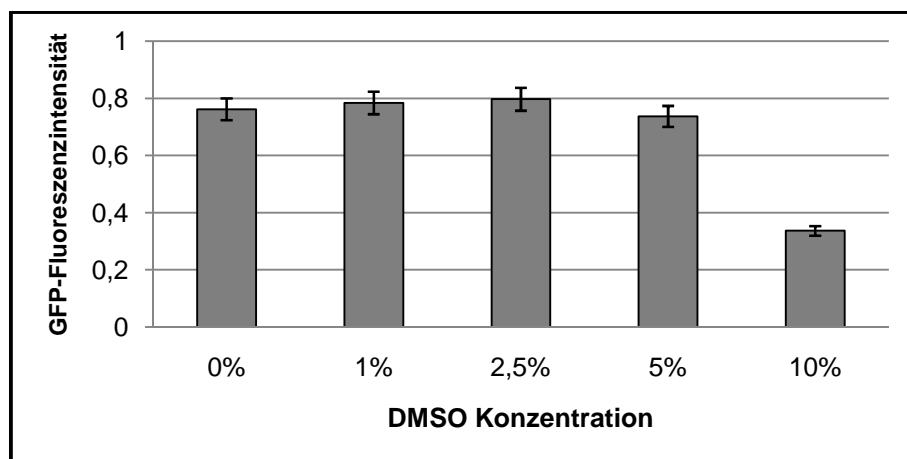


Abb. 3-3: Darstellung der Ergebnisse des DMSO-Einflusses auf die nachweisbare GFP-Ausbeute im 100 μ l ZFTT-Assay. Alle Messwerte wurden in drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Reaktionsbedingungen: 30 °C, 550 rpm, 5 h. Dargestellt ist die gemessene absolute GFP-Fluoreszenzintensität einer 1/100-fachen Verdünnung (mit MilliQ-Wasser) des jeweiligen Reaktionsansatzes. Die maximale relative Standardabweichung der Messwerte betrug ± 10 %.

DMSO zeigte ab Konzentrationen über 5 % (v/v) eine deutliche Inhibition der Translation des Reporterproteins GFP. Die Inkubation der Reaktionsansätze mit 10 % (v/v) DMSO führte zu einer Reduktion der über Fluoreszenz nachweisbaren GFP-Menge von über 50 %. Daher wurden alle in DMSO gelösten Proben in Konzentrationen von maximal 2,5 % (v/v) im ZFTT-Assay eingesetzt.

3.1.4 Identifizierung selektiver Inhibitoren der ZFTT-Reaktion (*proof of principle*)

Das Ziel dieser Studie war die Bestimmung der Selektivität des ZFTT-Assays zum Auffinden aktiver Inhibitoren der bakteriellen TT-Reaktion. Zuerst wurde die Aktivität der nachfolgend im ZFTT-Assay einzusetzenden Inhibitoren und Nicht-Inhibitoren der prokaryotischen Proteinbiosynthese im Ganzzellassay gegen *E. coli* A19 untersucht. Anschließend wurde die Expression des Reporterproteins GFP im ZFTT-Assay, unter dem Einfluss der im Ganzzellversuch ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) der antibakteriellen Translationsinhibitoren durchgeführt.

Als Translationsinhibitoren wurden Streptomycinsulfat¹ (Aminoglykosid-Antibiotikum) und Erythromycin² (Makrolidantibiotikum), als Nicht-Translationsinhibitoren Ampicillin-Natrium¹ (β -Laktamantibiotikum) und Ivermectin² (Anthelmintikum, Makrolid) verwendet.

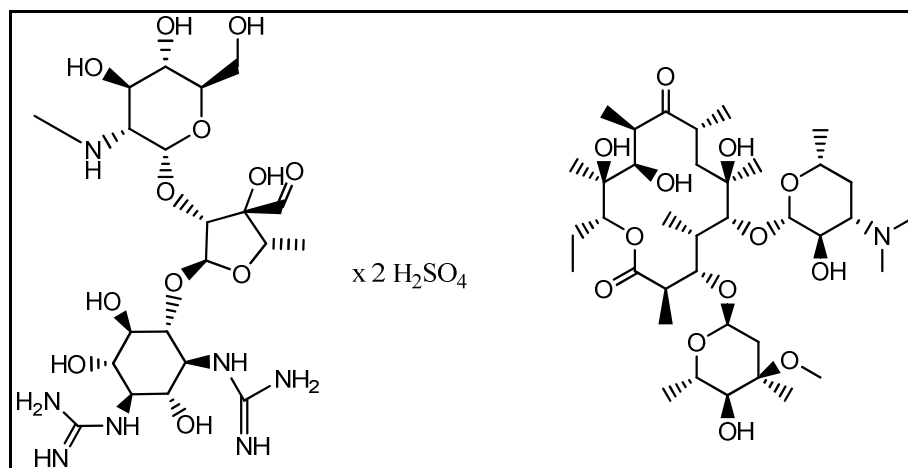


Abb. 3-4: Translationsinhibitoren: Streptomycinsulfat (links) und Erythromycin.

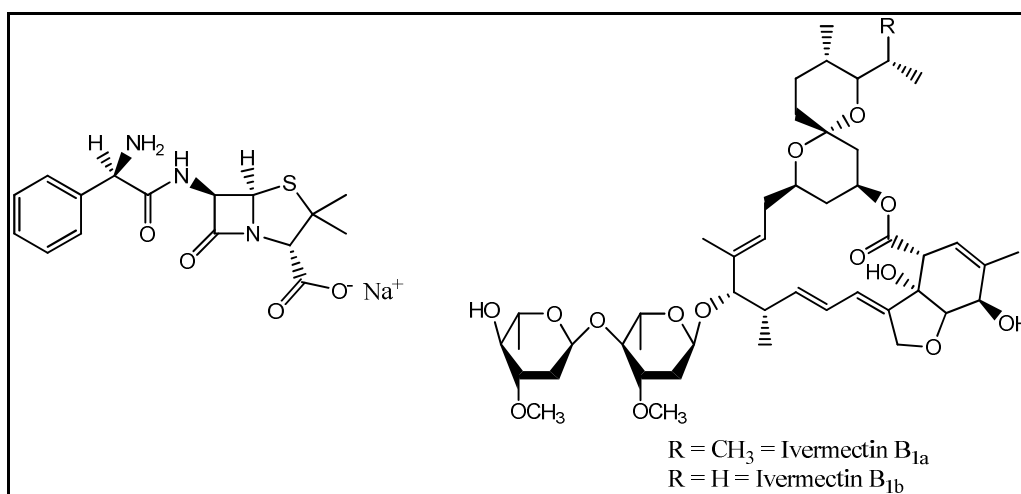


Abb. 3-5: Nicht-Translationsinhibitoren: Ampicillin-Natrium (links) und Ivermectin.

¹ MilliQ-Wasser als Lösungsmittel verwendet

² 2 % (v/v) DMSO als Lösungsmittel verwendet

Nachfolgend ist die Aktivität der analysierten Substanzen im Ganzzellassay (s. Abb. 3-6) und im ZFTT-Assay (s. Abb. 3-7) graphisch dargestellt:

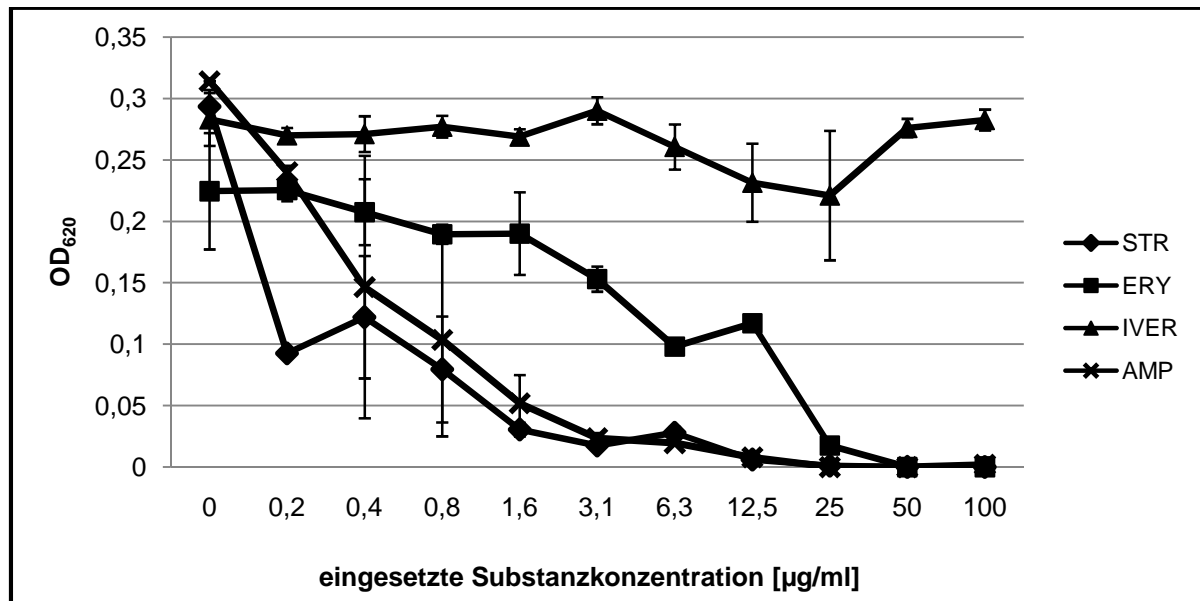


Abb. 3-6: Konzentrationsabhängige antimikrobielle Profile der verwendeten Translations- bzw. Nicht-Translationsinhibitoren gegen *E. coli* A19 (n = 2). Der Einfluss auf das bakterielle Wachstum ist durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 620 nm (OD₆₂₀) im Ganzzellassay dargestellt.

Abkürzungen: STR = Streptomycinsulfat; ERY = Erythromycin; IVER = Ivermectin; AMP = Ampicillin-Natrium; Inkubationszeit: 20 h; Inkubationstemperatur: 37 °C. Die durchschnittliche Standardabweichung der Messwerte lag bei ± 15 %.

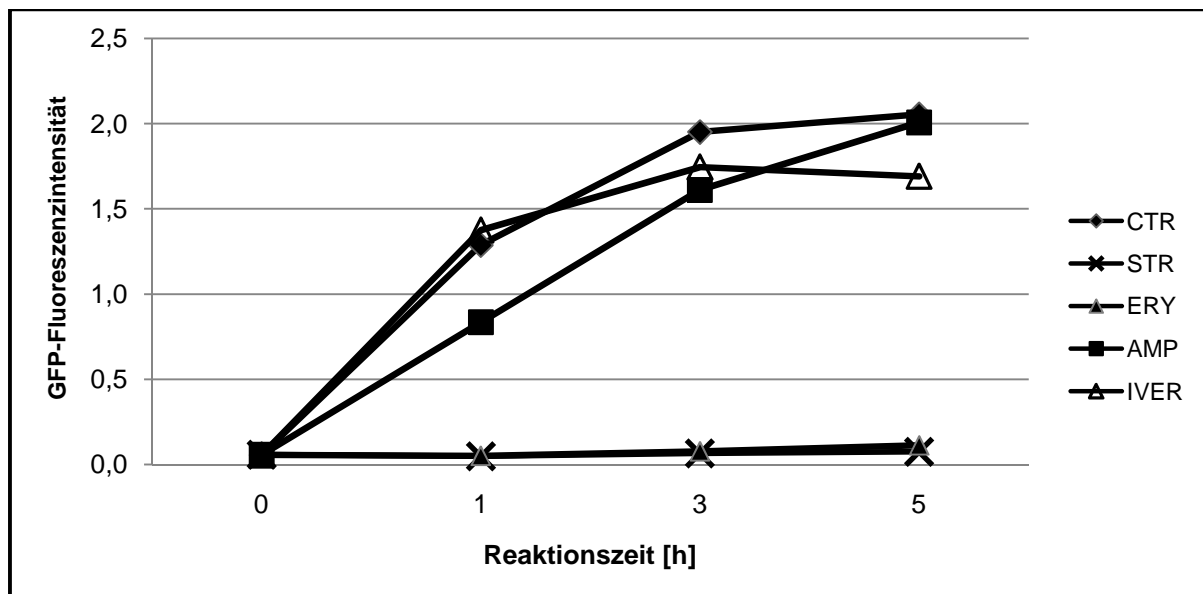


Abb. 3-7: Aktivität der verwendeten Translations- bzw. Nicht-Translationsinhibitoren im ZFTT-Assay (100 µl) (n = 2). CTR = Kontrollreaktion ohne Inhibitor; Substanzkonzentration aller Ansätze: 100 µg/ml; Reaktionszeit: 5 h bei 30 °C; 550 rpm; Dargestellt ist die Messung der Fluoreszenzintensität einer 1/100 Verdünnung des Reaktionsansatzes in MilliQ-Wasser bei Anregungs-/Emissionswellenlängen: 395 nm / 509 nm. Die durchschnittliche Standardabweichung der Messwerte lag bei ± 10 %.

Alle im Ganzzellassay eingesetzten antimikrobiellen Substanzen (Streptomycin, Erythromycin und Ampicillin) inhibierten in unterschiedlichen Konzentrationen das Zellwachstum des Testbakteriums *E. coli* A19 (s. Abb. 3-6). Nachfolgend wurde die Aktivität der Substanzen im zellfreien TT-Assay überprüft. Hier zeigten nur die Translationsinhibitoren Streptomycin und Erythromycin eine Aktivität durch die Inhibition der GFP-Expression (s. Abb. 3-7). Zur Bestätigung der selektiven Expression bzw. Nicht-Expression des C-terminal His₆-getaggtten Reporterproteins GFP wurden alle verwendeten Reaktionsansätze mittels Affinitätschromatographie (*MagneHisTM Protein Purification System*, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) zur Isolierung des Proteins aufgereinigt (s. 2.2.9). Die mit 1 % TFA eluierten Proteine der Reaktionsansätze wurden anschließend mittels 1D-SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ruthenium(II)-tris-bathophenanthrolindisulfonat (RuBPS) angefärbt (Färbemethode nach Lamanda *et al.*, 2004). Abbildung 3-8 zeigt das 1D-SDS-Gel der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine der unterschiedlichen ZFTT-Reaktionsansätze. Als Referenzsubstanz wurde rekombinantes GFP (rGFP) in variablen Proteinmengen eingesetzt.

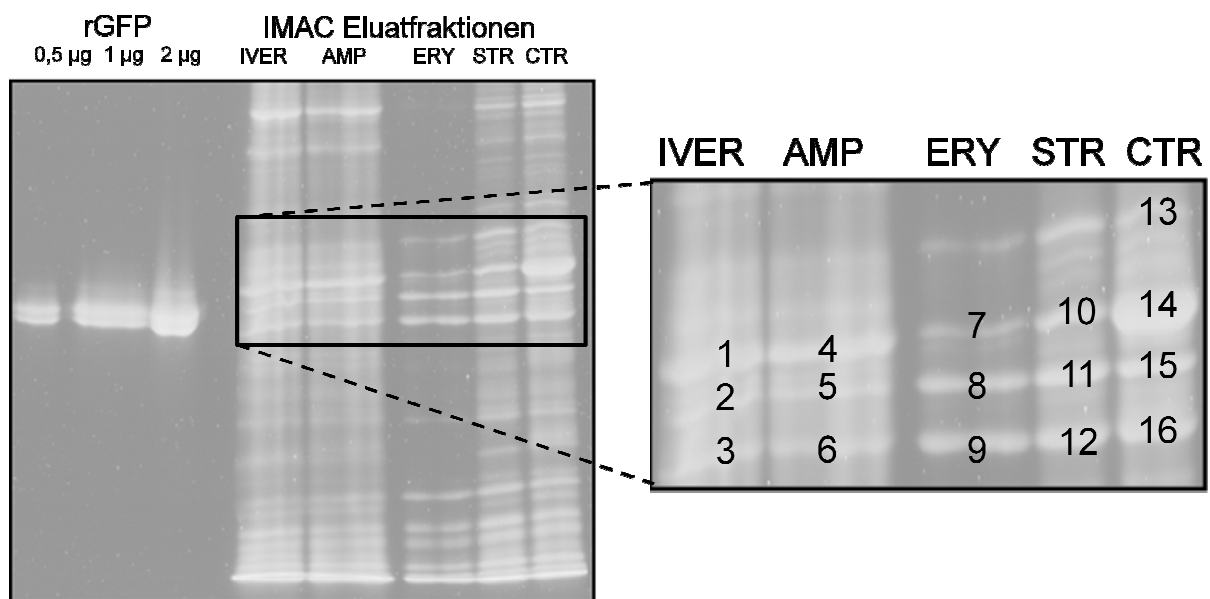


Abb. 3-8: links: 1D-SDS-PAGE des rekombinanten GFP-Standards (rGFP, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in verschiedenen Absolutmengen [μg] und der 10 μl IMAC-Fractionen der mit 1 % TFA eluierten Proteine; rechts: Ausschnitt des Gelbereiches, in dem Gelstücke für die massenspektrometrische Proteinidentifizierung ausgeschnitten wurden; die Ziffern beziehen sich auf die mittels MALDI-TOF-MS identifizierten Proteine (s. u.).

Abkürzungen: IMAC = *immobilized metal ion affinity chromatography*; CTR = Kontrollansatz; IVER = Ivermectinansatz; AMP = Ampicillinansatz; ERY = Erythromycinansatz; STR = Streptomycinansatz

Die ausgewählten Proteinbanden des markierten Bereiches wurden mittels Skalpell auf einem Fluoreszenztisch ausgeschnitten und nach tryptischem Verdau mittels MALDI-TOF-MS unter

Verwendung der Software Spectrum Mill (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) identifiziert. Nachfolgend sind die signifikant identifizierten Proteine der einzelnen Reaktionsansätze tabellarisch zusammengefasst (s. Tab. 3-1). Ein dynamischer p -Wert $< 0,05$ zeigte ein signifikant identifiziertes Protein an.

Protein bande #	ZFTT- Assayansatz	Identifiziertes Protein	Dynamischer p -Wert (Spectrum Mill™)	Sequenz abdeckung [%]	Protein masse [Da]
1	IVER	His₆-GFP	$3,58 * 10^{-11}$	52	28090
1	IVER	RP S2	$1,4 * 10^{-2}$	35	26744
2	IVER	RP S3	$1,22 * 10^{-13}$	36	25983
3	IVER	RP S4	$2,72 * 10^{-7}$	61	23469
4	AMP	His₆-GFP	$3,73 * 10^{-4}$	29	28090
4	AMP	RP S2	$3,86 * 10^{-2}$	32	26744
5	AMP	RP S3	$1,14 * 10^{-5}$	33	25983
6	AMP	RP S4	$1,16 * 10^{-7}$	52	23469
7	ERY	RP S2	$8,17 * 10^{-2}$	24	26744
8	ERY	RP S3	$4,09 * 10^{-15}$	42	25983
9	ERY	RP S4	$3,24 * 10^{-5}$	42	23469
10	STR	RP S2	$2,93 * 10^{-4}$	35	26744
11	STR	RP S3	$9,07 * 10^{-14}$	46	25983
12	STR	RP S4	$2,35 * 10^{-7}$	47	23469
13	CTR	RP L2	$2,01 * 10^{-2}$	52	29860
14	CTR	His₆-GFP	$9,41 * 10^{-4}$	24	28090
15	CTR	RP S3	$1,97 * 10^{-16}$	44	25983
16	CTR	RP S4	$1,01 * 10^{-14}$	62	23469

Tab. 3-1: In der Tabelle sind alle signifikant identifizierten Proteine angegeben; die Zuordnung der Peptide erfolgte nach folgenden Parametern: Proteindatenbank: NCBI; Taxonomie: *E. coli* mit integrierter His₆-GFP-Sequenz; Massengenauigkeit: ± 50 ppm; überlesene Schnittstellen: 1; der dynamische p -Wert (dynamic probability score) gab die Wahrscheinlichkeit eines zufällig zustande gekommenen Ergebnisses an (Bsp.: $p = 0,5$ entspricht 50 % Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Ergebnisses). Abkürzungen: RP = ribosomales Protein; CTR = Kontrollansatz; IVER = Ivermectinansatz; AMP = Ampicillinansatz; ERY = Erythromycinansatz; STR = Streptomycinansatz.

Das Ergebnis der Proteinidentifizierung zeigt, dass His₆-GFP nur in den Proteinelutionslösungen der ZFTT-Kontrollreaktion bzw. den ZFTT-Reaktionslösungen der Nicht-Translationsinhibitoren Ivermectin und Ampicillin-Natrium nachweisbar war. In den Elutionslösungen der ZFTT-Reaktionen der Translationsinhibitoren Streptomycin und Erythromycin war His₆-GFP nicht nachweisbar (s. Tab. 3-1). Dieses Ergebnis bestätigt die

Resultate des ZFTT-Assays und zeigt die selektive Nachweisbarkeit von Translationsinhibitoren durch Anwendung des ZFTT-Assays.

3.1.5 Bestimmung der Assayqualität (nach Zhang *et al.*, 1999)

Zur experimentellen Bestimmung der Qualität des ZFTT-Assays wurden fünf Kontrollreaktionen ohne ZFTT-Inhibitor, sowie fünf inhibierte ZFTT-Reaktionen (Translationsinhibitoren als ZFTT-Inhibitoren) eingesetzt. Als ZFTT-Inhibitoren wurden die Aminoglykosid-Antibiotika Streptomycinsulfat und Paromomycinsulfat in Konzentrationen von 10 µg/ml im Assayvolumen von 100 bzw. 25 µl eingesetzt. Damit lag die verwendete Konzentration der ZFTT-Inhibitoren weit über der MHK der Substanzen im ZFTT-Assay ($MHK_{STR} = 1,5 \mu\text{g/ml}$; $MHK_{PAR} = 0,7 \mu\text{g/ml}$; s. 3.2). Nachfolgend sind die für die Berechnung des Z'-Faktors relevanten Werte tabellarisch aufgeführt (s. Tab. 3-2).

100 µl Assay		25 µl Assay	
ZFTT-Reaktion	GFP FI	ZFTT-Reaktion	GFP FI
CTR 1	0,956	CTR 1	0,836
CTR 2	0,875	CTR 2	0,910
CTR 3	0,777	CTR 3	0,853
CTR 4	0,829	CTR 4	0,901
CTR 5	0,938	CTR 5	0,863
Mittelwert	0,875	Mittelwert	0,873
STDEV	0,0746	STDEV	0,0317
+3*STDEV	1,099	+3*STDEV	0,968
-3*STDEV	0,651	-3*STDEV	0,777
STR 1	0,144	PAR 1	0,135
STR 2	0,143	PAR 2	0,129
STR 3	0,165	PAR 3	0,127
STR 4	0,135	PAR 4	0,125
STR 5	0,135	PAR 5	0,136
Mittelwert	0,144	Mittelwert	0,130
STDEV	0,0123	STDEV	0,0049
+3*STDEV	0,181	+3*STDEV	0,145
-3*STDEV	0,108	-3*STDEV	0,116

Tab. 3-2: Ergebnisse der Kontrollreaktionen (CTR) und der Reaktionen unter Einfluss der Translationsinhibitoren Streptomycinsulfat (STR) im 100 µl, sowie Paromomycinsulfat (PAR) im 25 µl ZFTT-Assayformat. Angegeben ist die absolute GFP Fluoreszenzintensität (GFP FI) nach 5 h Inkubation bei 30 °C; 550 rpm. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in einer 1/100 Verdünnung des Reaktionsansatzes in MilliQ-Wasser. Abkürzung: STDEV = Standardabweichung.

Abbildung 3-9 stellt die für die Berechnung und Kategorisierung des Z' -Faktors relevanten Daten graphisch dar:

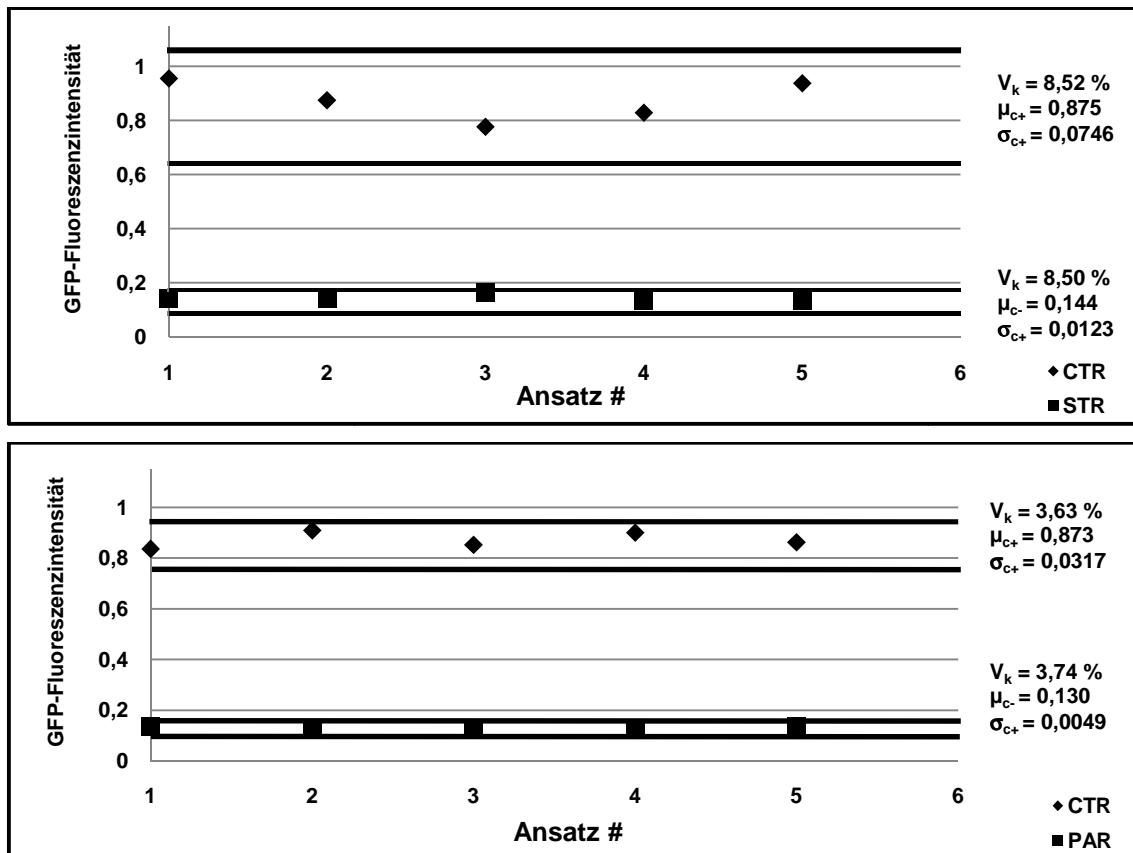


Abb. 3-9: Darstellung der Ergebnisse der ZFTT-Assayvalidierung im 100 µl- (oben) und im 25 µl-Format (unten); die schwarzen Linien zeigen den $\pm 3\sigma$ -Bereich um die Minimal- und Maximalwerte der gemessenen Fluoreszenz an. Der Bereich zwischen der Untergrenze der Maximalwerte (CTR) und der Obergrenze der Minimalwerte (STR / PAR) gibt den dynamischen Messbereich des Assays an; Abk.: V_k (%) = Variationskoeffizient, μ_{c+} bzw. μ_{c-} = arithmetisches Mittel der Kontrollreaktion bzw. der inhibierten Reaktion, σ_{c+} bzw. σ_{c-} = Standardabweichung der Messwerte der Kontrollreaktion bzw. der inhibierten Reaktion.

Die Berechnung des Z' -Faktors ergab für den 100 µl ZFTT-Assay einen Z' -Faktor von 0,744 und für den 25 µl Assay einen Wert von 0,891. Durch die Anwendung der Vorgaben nach Zhang *et al.*, 1999 ließen sich beide Assayformate in die Kategorie „exzellent“ einordnen (s. 2.2.5). Weiterhin kam es durch die Reduktion des Assayvolumens von 100 µl auf 25 µl zu einer Verbesserung der Assayqualität. Dies wurde durch die Erhöhung des Z' -Faktors gezeigt. Auch die berechneten Variationskoeffizienten (V_k) von 8,52 bzw. 8,50 % (CTR bzw. STR) im 100 µl Assay und 3,63 bzw. 3,74 % (CTR bzw. PAR) zeigten insgesamt eine geringe Variation der Messdaten.

3.1.6 Bestimmung der Linearität im Messbereich

Die zur Bestimmung der Linearität zwischen GFP-Konzentration und –fluoreszenz ermittelten Validierungsparameter sind nachfolgend tabellarisch dargestellt. Der methodische Ansatz der Bestimmung der Linearität ist unter 2.2.6 beschrieben.

Kalibriergerade #	rGFP-FI (10 ng/100 ng rGFP)	y-Achsenabschnitt	Steigung	Korrelationskoeffizient (R ²)
1	0,088/1,035	-0,029	0,01	0,998
2	0,095/1,054	-0,015	0,01	0,998
3	0,074/1,046	-0,019	0,01	0,996
4	0,081/1,021	0,001	0,01	0,994
5	0,092/1,022	-0,006	0,01	0,997
Mittelwert:	0,086/1,036			0,9966

Tab. 3-3: Tabellarische Übersicht der für die Linearität der Meßmethode angewendeten Validierungsparameter (n = 5). Abkürzungen: rGFP-FI = absolute rGFP-Fluoreszenzintensität.

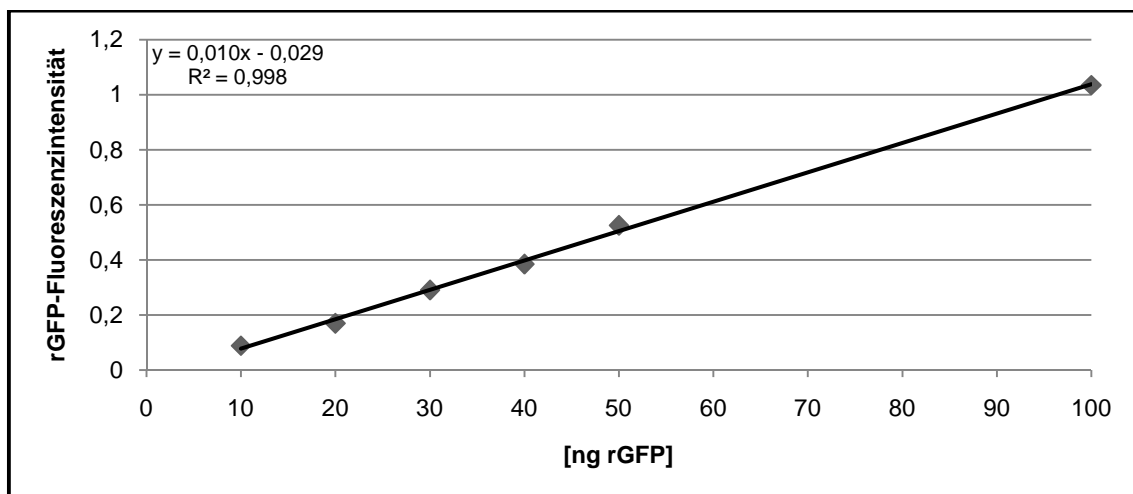
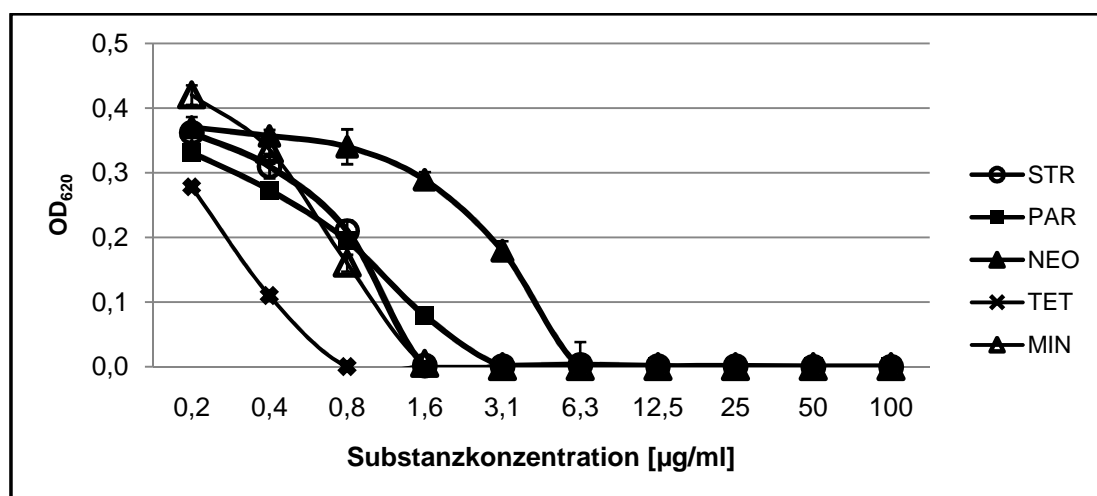


Abb. X: Exemplarische Darstellung einer Kalibriergeraden (# 1) zur Beurteilung der Linearität der Messmethode im Messbereich des ZFTT-Assays.

Der für die Messmethode des ZFTT-Assays ermittelte Zusammenhang zwischen eingesetzter GFP-Konzentration und gemessener GFP-Fluoreszenz ergab einen durchschnittlichen Korrelationskoeffizient von 0,9966. Dieser Wert zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter GFP-Konzentration und dem gemessenem Fluoreszenzsignal im Messbereich des ZFTT-Assays an.

3.2 Bestimmung unterschiedlicher Aktivitätsprofile von Translationsinhibitoren unter zellfreien und Ganzzellbedingungen (*cell-free versus whole cell*)

Zum Auffinden neuer antimikrobieller Translationsinhibitoren werden neben der klassischen Anwendung von Hemmhofstests bzw. Flüssigkulturverdünnungstests mit Bakterienzellen auch zellfreie TT-Assays eingesetzt. Im Rahmen dieser Studie sollte geklärt werden, ob physikochemische Unterschiede der Vertreter ausgewählter antimikrobieller Stoffklassen zu Aktivitätsunterschieden unter zellfreien bzw. Ganzzellbedingungen führen. Hierzu wurde die Aktivität von neun Translationsinhibitoren aus vier unterschiedlichen antimikrobiellen Stoffklassen unter Ganzzellbedingungen und unter zellfreien Bedingungen charakterisiert und miteinander verglichen. Die Aktivität der folgenden Translationsinhibitoren wurde durch die Bestimmung ihrer MHK charakterisiert: Neomycintrisulfat, Paromomycinsulfat, Streptomycinsulfat (Aminoglykosid-Antibiotika), Erythromycin, Josamycin, Oleandomycintriacetat (Makrolid-Antibiotika), Tetrazyklinhydrochlorid, Minozyklinhydrochlorid (Tetrazykline) und Chloramphenicol. Die MHK der Inhibitoren unter Ganzzellbedingungen wurde durch die Anwendung der Bouillon-Mikrodilutionsmethode (s. 2.2.2.1) in 96 Well Platten mit *E. coli* A19 als Testkeim durch Bestimmung der optischen Dichte bei 620 nm (OD_{620}) nach 20 Stunden Bebrütung bei 37 °C bestimmt (s. Abb. 3-10). Die MHK entsprach der Konzentration, die keinerlei messbares Wachstum des Testkeims mehr ermöglichte. Die MHK unter zellfreien Bedingungen entsprach der Konzentration des Antibiotikums, die die zellfreie Translation des fluoreszierenden Reporterproteins GFP unterband (s. Abb. 3-11). Die Ergebnisse beider Assays sind in Tabelle 3-4 zusammengefaßt.



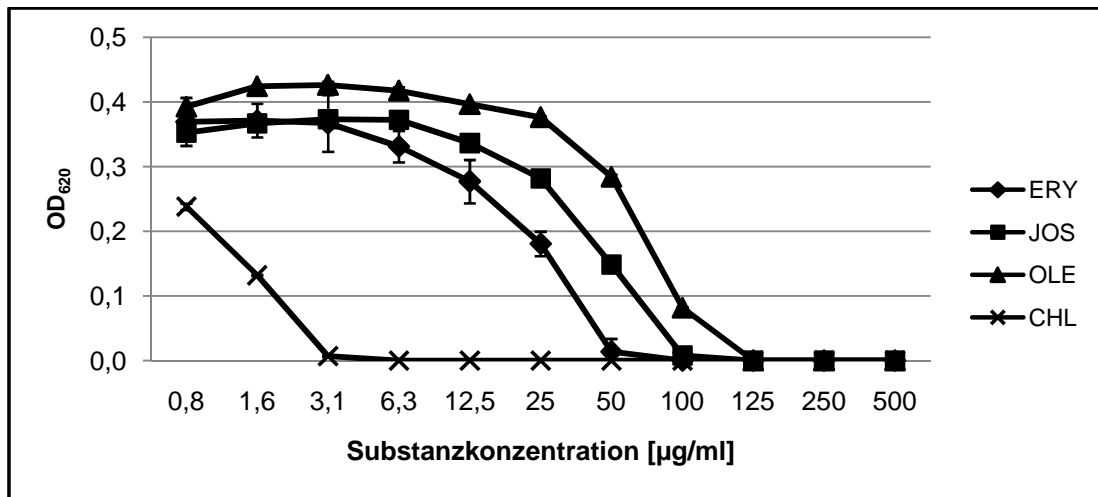


Abb. 3-10: Ergebnisse der MHK-Bestimmung unterschiedlicher Translationsinhibitoren unter Ganzzellbedingungen (n = 2). Obere Grafik: STR (Streptomycinsulfat), NEO (Neomycintrisulfat), PAR (Paromomycinsulfat), MIN (Minozyklinhydrochlorid), TET (Tetrazyklinhydrochlorid); untere Grafik: ERY (Erythromycin), JOS (Josamycin), OLE (Oleandomycintriacetat), CHL (Chloramphenicol). Die maximale relative Standardabweichung der Messwerte betrug $\pm 10\%$.

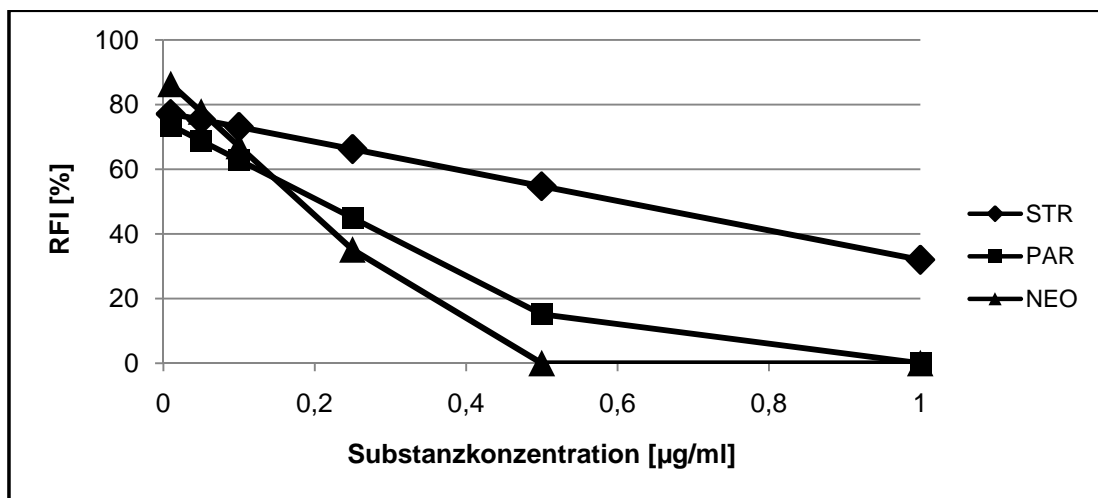
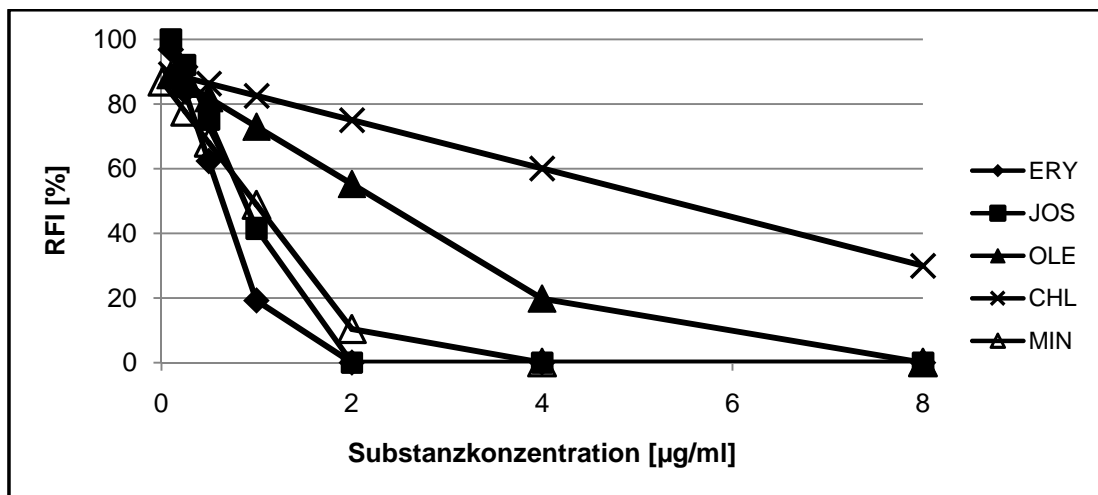


Abb. 3-11: Ergebnisse der MHK-Bestimmung unterschiedlicher Translationsinhibitoren unter zellfreien Bedingungen (n = 2). Die maximale relative Standardabweichung der Messwerte betrug $\pm 10\%$. RFI [%] = relative GFP-Fluoreszenzintensität gegen die eingesetzte ZFTT-Kontrolle (ohne Inhibitor).

Substanz	Stoffklasse	Molmasse [Da]	MHK GZA [$\mu\text{g/ml}$]	MHK GZA [μM]	MHK ZFTT-assay [$\mu\text{g/ml}$]	MHK ZFTT-assay [μM]
Neomycintrisulfat	Aminoglykosid	908,9	6,5	7,2	0,01	0,01
Paromomycinsulfat	Aminoglykosid	713,7	2,0	2,8	0,7	1,0
Streptomycinsulfat	Aminoglykosid	728,7	1,6	2,2	1,5	2,1
Erythromycin	Makrolid	733,9	57,0	77,7	1,5	2,0
Josamycin	Makrolid	828,0	87,8	106,0	1,6	1,9
Oleandomycintriacetat	Makrolid	814,0	100,1	123,0	5,1	6,3
Chloramphenicol	Phenylpropanoid	323,1	3,0	9,3	12,0	37,1
Tetrazyklinhydrochlorid	Tetrazyklin	480,9	0,6	1,3	n. best.	n. best.
Minozyklinhydrochlorid	Tetrazyklin	493,9	1,1	2,2	2,5	5,1

Tab. 3-4: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) unterschiedlicher Translationsinhibitoren unter zellfreien und Ganzzellbedingungen (modifiziert aus: Weidlich *et al.*, 2007). Abkürzungen: GZA = Ganzzellassay; n.best. = nicht bestimmt

Zum graphischen Vergleich der unterschiedlichen Aktivität der analysierten Translationsinhibitoren wurde der dekadische Logarithmus des Quotienten der MHK-Werte beider Assays ($\log(\text{MHK}_{\text{GZA}}/\text{MHK}_{\text{ZFTT}})$) berechnet. Hierbei zeigt ein positiver Wert eine höhere Aktivität des Translationsinhibitors unter zellfreien Bedingungen und ein negativer Wert eine höhere Aktivität im Ganzzellassay an (s. Abb. 3-12).

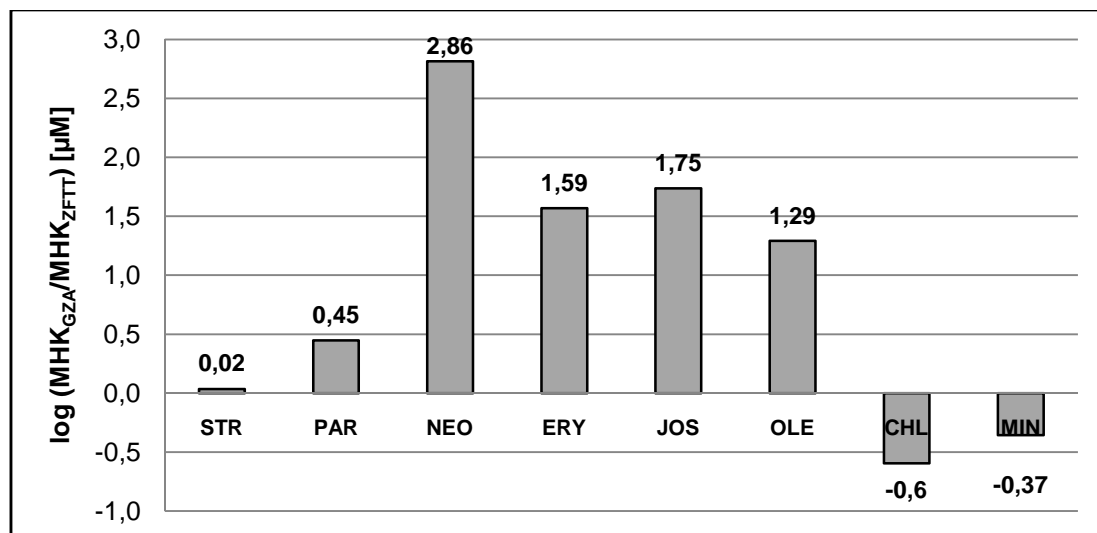
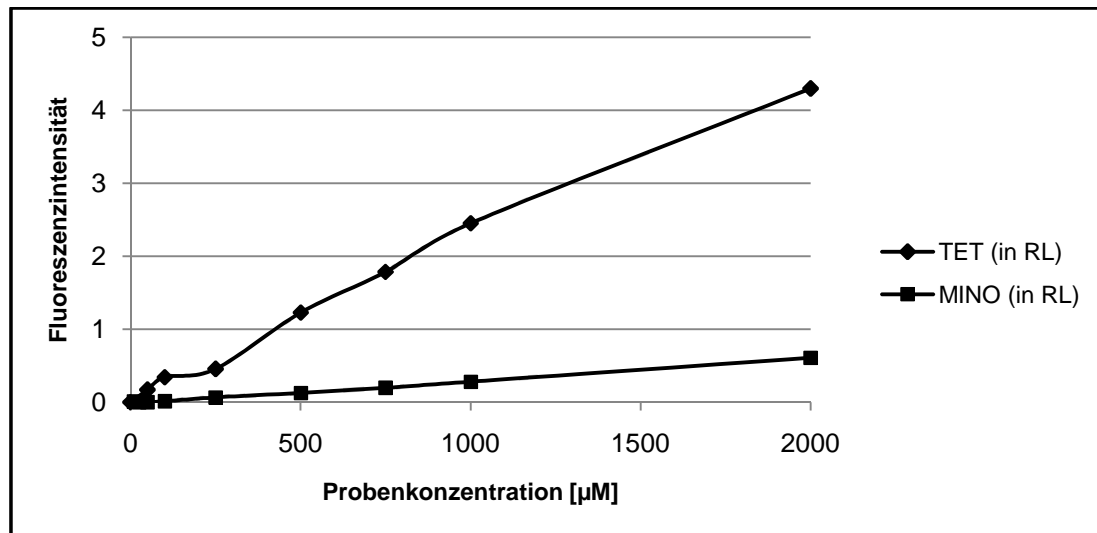


Abb. 3-12: Dekadischer Logarithmus des Quotienten der inhibitorischen Aktivität (MHK-Werte in μM) der verwendeten Translationsinhibitoren im Ganzzellassay und unter zellfreien Bedingungen. Abk.: GZA = Ganzzellassay; ZFTT = zellfreier Transkriptions-/Translationsassay; STR = Streptomycinsulfat, PAR = Paromomycinsulfat, NEO = Neomycintrisulfat, ERY = Erythromycin, JOS = Josamycin, OLE = Oleandomycintriacetat, CHL = Chloramphenicol; MIN = Minozyklinhydrochlorid

Die verwendeten Translationsinhibitoren zeigten in Abhängigkeit ihrer physikochemischen Eigenschaften substanzspezifische Aktivitätsprofile unter zellfreien bzw. Ganzzellbedingungen. Grundsätzlich ließen sich diese Profile in drei Gruppen unterteilen:

1. annähernd gleiche Aktivität unter zellfreien bzw. Ganzzellbedingungen (Streptomycinsulfat und Paromomycinsulfat), 2. eine deutlich stärkere Aktivität unter zellfreien Bedingungen (Neomycintrisulfat und die Gruppe der Makrolid-Antibiotika) und 3. eine stärkere Aktivität unter Ganzzellbedingungen (Chloramphenicol und Minozyklinhydrochlorid). Ein falsch-positives Ergebnis der inhibierten GFP-Expression im zellfreien Assay aufgrund der Absorption des Lichts der Anregungswellenlänge bei 395 nm durch die analysierten Substanzen (*Quenching*-Effekt) konnte durch die Aufnahme der Absorptionsspektren ZFTT-aktiver Antibiotika ausgeschlossen werden (s. 2.2.8, 6.1.1). Die Aktivitätsbestimmung von Tetrazyklinhydrochlorid war unter zellfreien Bedingungen mittels GFP als Reporterprotein, aufgrund einer starken überlappenden Emission des im Reaktionsansatz gebildeten Magnesium-Tetrazyklin-Chelatkomplexes bei einer Emissionswellenlänge von 509 nm nicht möglich. Die Bestimmung der Aktivität des zweiten verwendeten Tetrazyklins (Minozyklinhydrochlorid) war unter zellfreien Bedingungen möglich, da eine signifikante Fluoreszenz bei 509 nm erst ab einer Konzentration auftrat, die weit oberhalb der MHK der Substanz lag (ab ca. 250 μM Minozyklinhydrochlorid). Dieses Ergebnis wurde durch die Messung der Fluoreszenz der ZFTT-Reaktionslösungen, welche mit unterschiedlichen Konzentrationen beider Tetrazykline inkubiert wurden, nachgewiesen (s. Tab. 3-4 und Abb. 3-13). Die für die Messung der Reaktionslösungen eingestellten Anregungs- und Emissionswellenlängen von 395 nm bzw. 509 nm entsprachen denen für den Nachweis des GFP verwendeten Parametern.

Probenkonzentration [μM]	Fluoreszenzintensität ($\lambda_{\text{exc.}} = 395 \text{ nm} / \lambda_{\text{em.}} = 509 \text{ nm}$)	
	Tetrazyklin * HCl	Minozyklin * HCl
2000	4,297	0,613
1000	2,453	0,283
750	1,787	0,197
500	1,231	0,130
250	0,457	0,069
100	0,345	0,014
50	0,171	0,002
25	n.best.	0,001
0	0,003	0,001



Tab. 3-4 und Abb. 3-13: Fluoreszenzintensität der mit unterschiedlichen Tetrazyklin- bzw. Minozyklinkonzentrationen inkubierten ZFTT-Reaktionslösungen (Verdünnung der Messlösung: 1/30 in MilliQ-Wasser). Die Zusammensetzung der Messlösungen entsprach der für den ZFTT-Assay verwendeten Reaktionslösung (13 mM Magnesiumacetat; ohne T7-RNA-Polymerase, S30-Extrakt, RNase-Inhibitor, Plasmid). Abkürzungen: n.best. = nicht bestimmt; TET = Tetrazyklinhydrochlorid; MINO = Minozyklinhydrochlorid; RL = Reaktionslösung.

3.3 Identifizierung neuer antimikrobieller Inhibitoren der ZFTT-Reaktion unter Anwendung virtueller Screeningverfahren

3.3.1 Bestimmung der ZFTT-Assayaktivität potentieller ribosomaler *A-Site* Liganden

Die Kooperation mit Dipl.-Bioinformatiker Yusuf Tanrikulu (AK Prof. Dr. Gisbert Schneider, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe-Universität, Frankfurt/Main) ermöglichte den Einsatz eines ligandenbasierten virtuellen Screeningansatzes unter Anwendung des durch Y. Tanrikulu entwickelten Pharmakophormodells LIQUID („Ligand-based Quantification of Interaction Distributions“, Tanrikulu *et al.*, 2007) zur Identifizierung neuer ribosomaler *A-Site* Liganden angewendet. Das Ziel dieses Kooperationsprojektes war das Auffinden und experimentelle Charakterisieren neuer bioaktiver translationsinhibierender potentieller *A-Site* Liganden.

Die durch Y. Tanrikulu durchgeführten Arbeiten umfassten die Generierung potentiell aktiver Moleküle auf der Grundlage bekannter Strukturdaten der *A-Site* Liganden Chloramphenicol, Clindamycin und Tiamulin. Als Substanzdatenbank diente die über 230.000 Moleküle beinhaltende Specs Substanzdatenbank (Specs, Delft, Niederlande; Stand: 01/2008). Die 100 potentiell aktivsten Substanzen wurden mit der Software GOLD (Jones *et al.*, 1997) an die ribosomale *A-Site* gedockt. 21 der durch Y. Tanrikulu ausgewählten potentiellen *A-Site* Liganden wurden im Rahmen dieser Dissertation experimentell unter Anwendung des ZFTT-

Assays charakterisiert. Nachfolgend sind die Ergebnisse des ZFTT-Assays der analysierten Substanzen tabellarisch zusammengefaßt:

Substanzbezeichnung	Specs-Nummer	Konzentration [μM]	RAI ¹ [%]
Y1	AN-465/42834458	100	23,7 \pm 9,6
Y2	AG-690/15439072	100	15,6 \pm 6,4
Y3	AF-399/42017730	100	0 \pm 3,1*
Y4	AG-690/34865037	100	16,5 \pm 4,2
Y5	AG-690/08507016	100	25,8 \pm 8,6
Y6	AG-690/11451155	100	3,8 \pm 7,5
Y7	AM-807/37261003	100	0 \pm 2,1*
Y8	AN-919/14384247	100	8,6 \pm 5,2
Y9	AN-919/15527194	100	4,3 \pm 5,8
Y10	AN-023/14773005	100	0 \pm 6,7*
Y11	AQ-390/42698483	100	16 \pm 4
Y12	AQ-390/42708525	100	17 \pm 8,6
Y13	AN-652/43024810	100	0 \pm 7,1*
Y14	AG-690/40696285	100	18 \pm 3,4
Y15	AH-487/14755031	100	0 \pm 7,6*
Y16	AG-690/11451154	100	0 \pm 4,2*
Y17	AG-401/42873878	100	8 \pm 4
Y18	AJ-292/14559288	100	0 \pm 1,3*
Y19	AO-081/15245186	100	0 \pm 5,9*
Y20	AO-081/15043081	100	4,9 \pm 9,9
Y21	AP-906/41639080	100	25,7 \pm 9

Tab. 3-5: Ergebnisse der experimentellen Bestimmung der Aktivität potentieller *A-Site* Liganden im ZFTT-Assay.

Die relative Assayinhibition (RAI) entsprach der durchschnittlichen GFP-Fluoreszenz dreier durchgeführter Experimente, bezogen auf die durchschnittliche GFP-Fluoreszenz der Kontrollreaktionen (ohne Inhibitor). Alle Proben wurden in einer Probenkonzentration von 100 μM in DMSO (2 % (v/v)) eingesetzt. Die Reaktionsdauer des Assays (25 μl) betrug 5 h bei 30 °C und 550 rpm. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten nach Verdünnung der Reaktionsansätze (1/100) mit MilliQ-Wasser.

¹die angegebene relative Standardabweichung wurde aus drei Messwerten berechnet

*die absolute GFP-Fluoreszenz lag über der der Kontrollreaktion (Wert auf Null gesetzt)

Die im ZFTT-Assay aktivsten strukturell unterschiedlichen Substanzen Y1, Y5 und Y21 (s. 6.3.1) verursachten eine Reduktion der zellfreien Proteinbiosynthese von ca. 25 \pm 10 %. Da diese Substanzen weiterhin keinerlei Aktivität in einem zusätzlich durchgeführten Tat-TAR Interaktionsassay zeigten, kann auf eine relative Selektivität zu den Zielstrukturen der prokaryotischen Transkriptions-/Translationsreaktion geschlossen werden (Tanrikulu *et al.*, 2007).

3.3.2 Identifizierung neuer potentieller RNA-Liganden im ZFTT-Assay

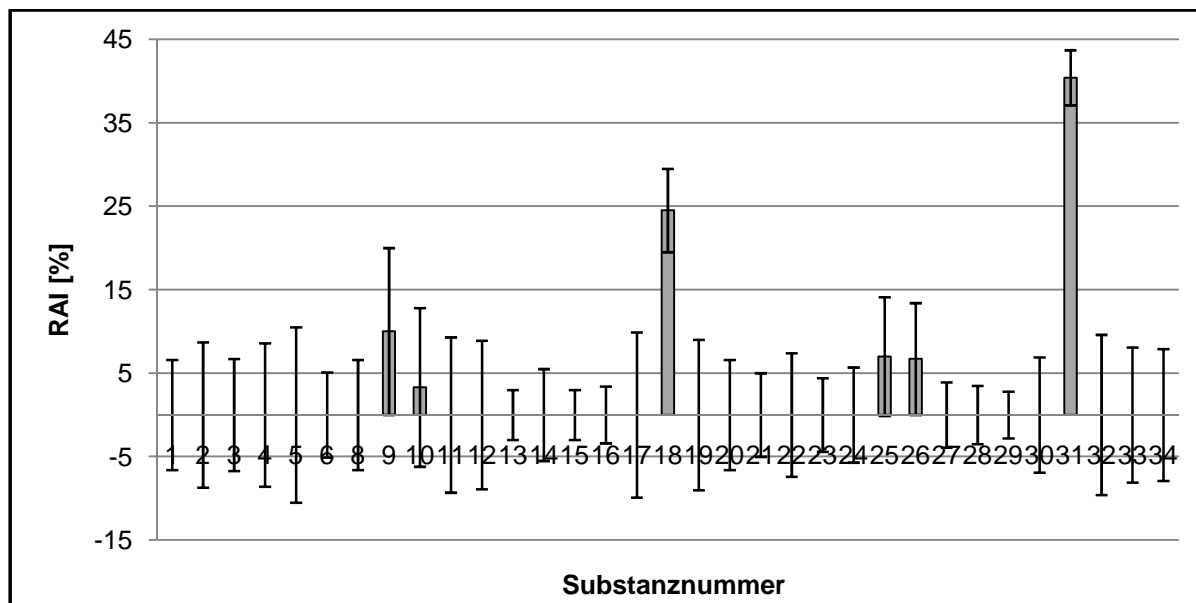
Die Kooperation mit Dipl.-Biochemiker Dr. Manuel Nietert (AK Prof. Dr. Gisbert Schneider, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe-Universität, Frankfurt/Main) ermöglichte die Identifizierung neuer potentieller RNA-Liganden unter Anwendung eines ligandenbasierten virtuellen Screeningansatzes. Die durch Manuel Nietert im Rahmen seiner Dissertation geleisteten Arbeiten (Niertert, 2008) innerhalb des beschriebenen Kooperationsprojektes umfassten neben der Durchführung eines virtuellen Screeningverfahrens unter Anwendung künstlicher neuronaler Netze (ANNs – *artificial neuronal networks*), das Docken der Liganden an die Zielstruktur und die Auswahl 56 potentiell aktiver Inhibitoren zur experimentellen Charakterisierung im ZFTT-Assay. Alle Substanzen stammten aus den kommerziellen Substanzdatenbanken der Anbieter Specs (Specs, Delft, Niederlande; ca. 230.000 Substanzen; Stand: 01/2008) und ASINEX (ASINEX, Moskau, Russland; ca. 300.000 Substanzen; Stand: 01/2008).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Identifizierung und Charakterisierung der ausgewählten Substanzen beinhaltete die Aktivitätsbestimmung im ZFTT-Assay, die Bestimmung des antimikrobiellen Potentials gegen den Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* 168 und gegen humanpathogene Bakterien (in Kooperation mit Dr. Thomas Wichelhaus, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Klinikum der Goethe-Universität, Frankfurt/Main), sowie die proteomanalytische Ermittlung des antibakteriellen Wirkmechanismus von „Substanz 31“ (s. 3.7.2). Eine zusätzliche experimentelle Charakterisierung der Substanzen erfolgte durch Manuel Nietert unter Anwendung eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Assays (FRET-Assay) zur Ermittlung der TAR-RNA-Affinität der eingesetzten Screeningsubstanzen (Niertert, 2008).

3.3.2.1 Bestimmung der ZFTT-Aktivität potentieller RNA-Liganden (Specs-Substanzen)

Die ZFTT-Assayaktivität der analysierten potentiellen RNA-Liganden der Specs-Substanzbibliothek ist nachfolgend tabellarisch bzw. graphisch dargestellt (s. Tab. 3.6 und Abb. 3-14; Strukturformeln unter 6.3.2):

Substanznummer	Specs-Nummer	Konzentration [μM]	RAI [%] ¹
1	AK-968/36914011	100	$0 \pm 6,6^*$
2	AE-842/34025005	100	$0 \pm 8,7^*$
3	AE-018/31856002	100	$0 \pm 6,7^*$
4	AN-604/14719010	100	$0 \pm 8,6^*$
5	AO-763/14814006	100	$0 \pm 10,5^*$
6	AK-968/41924780	100	$0 \pm 5,1^*$
7	AK-249/12981051	100	n. best.
8	AG-205/07944032	100	$0 \pm 6,3^*$
9	AG-690/40140152	100	10 ± 10
10	AK-249/11477004	100	$3,3 \pm 9,5$
11	AG-205/32622033	100	$0 \pm 9,3^*$
12	AO-476/40921651	100	$0 \pm 8,9^*$
13	AO-763/14815010	100	$0 \pm 3^*$
14	AG-205/14141002	100	$0 \pm 5,5^*$
15	AG-205/33125038	100	$0 \pm 3^*$
16	AK-777/37037060	100	$0 \pm 3,4^*$
17	AN-604/14719007	100	$0 \pm 9,9^*$
18	AA-516/33241059	100	$24,5 \pm 5$
19	AN-604/14719009	100	$0 \pm 9^*$
20	AE-848/33591030	100	$0 \pm 6,6^*$
21	AH-034/32855031	100	$0 \pm 5^*$
22	AM-814/41094635	100	$0 \pm 7,4^*$
23	AG-205/32979032	100	$0 \pm 4,4^*$
24	AG-664/32340028	100	$0 \pm 5,7^*$
25	AG-690/15427921	100	$7 \pm 7,1$
26	AG-205/33150021	100	$6,7 \pm 6,7$
27	AE-411/41415604	100	$0 \pm 3,9^*$
28	AG-205/07943064	100	$0 \pm 3,5^*$
29	AK-249/41069867	100	$0 \pm 2,8^*$
30	AN-329/41189583	100	$0 \pm 6,9^*$
31	AA-516/31407048	100	$40,4 \pm 3,3$
32	AG-690/13508188	100	$0 \pm 9,6^*$
33	AO-081/15569284	100	$0 \pm 8,1^*$
34	AG-205/33172033	100	$0 \pm 7,9^*$
35	AC-907/34122064	100	n. best.



Tab. 3-6 und Abb. 3-14: Ergebnisse der experimentellen Charakterisierung der Specs-Substanzen im ZFTT-Assay. Die relative Assayinhibition (RAI) entspricht der durchschnittlichen Fluoreszenz dreier Experimente, welche auf die maximale GFP-Fluoreszenz der Kontrollreaktionen (ohne Inhibitor) bezogen wurde. Alle Proben wurden in einer Probenkonzentration von 100 μM in DMSO (2 % v/v) eingesetzt. Die Reaktionszeit im 100 μl Assayformat betrug 5 h bei 30 $^{\circ}\text{C}$ und 550 rpm. Die Fluoreszenzmessung des Reporterproteins erfolgte nach Verdünnung der Reaktionsansätze (1/100) mit MilliQ-Wasser. Die Substanzen 7 und 35 konnten aufgrund vorhandener Fluoreszenz bei 509 nm durch Anregung bei 395 nm nicht im ZFTT-Assay bewertet werden.

*die absolute GFP-Fluoreszenz lag über der der Kontrollreaktion (Wert auf Null gesetzt)

¹die angegebene relative Standardabweichung wurde aus drei Messwerten berechnet

Als aktivste Inhibitoren der ZFTT-Reaktion unter den Specs-Substanzen konnten die Verbindungen 18 ($24,5 \pm 5$ % RAI) und 31 ($40,4 \pm 3,3$ % RAI) identifiziert werden. Beide Verbindungen besitzen ein substituiertes 1,3,5,7-Tetraaza-adamantan-Grundgerüst (s. Abb. 3-15) und zeigen keine Absorption bei 395 nm (s. 6.1.2).

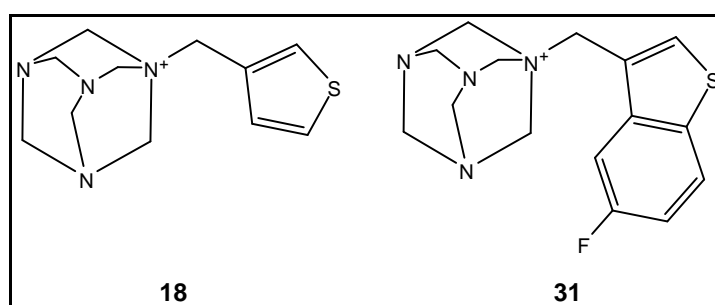


Abb. 3-15: Die aktivsten Inhibitoren der ZFTT-Reaktion.

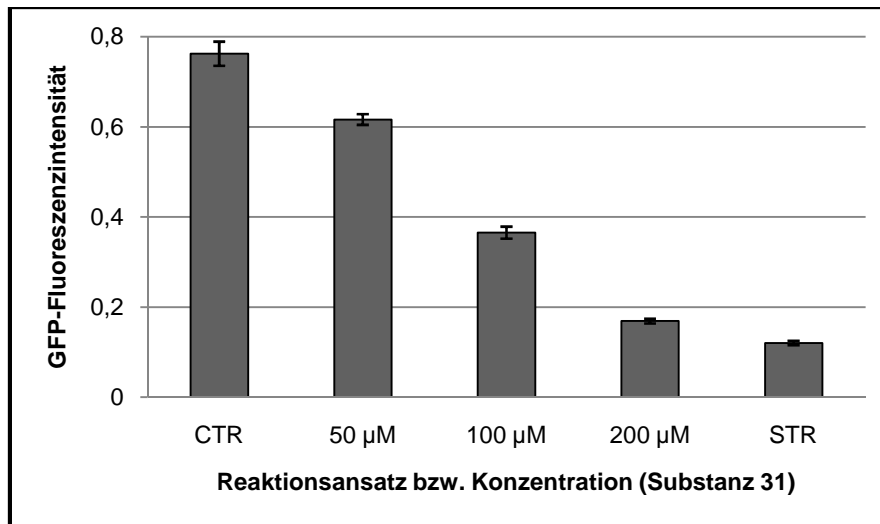
(18 = 1-(3-thienylmethyl)-3,5,7-triaza-1-azoniatricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dekan;

31 = 1-[(5-fluoro-1-benzothien-3-yl)methyl]-3,5,7-triaza-1-azoniatricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dekan)

Nachfolgend wird die Specs-Substanz 1-[(5-fluoro-1-benzothien-3-yl)methyl]-3,5,7-triaza-1-azoniatricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dekan als „Substanz 31“ bezeichnet.

3.3.2.2 Bestimmung des IC₅₀-Wertes von Substanz 31 im ZFTT-Assay

Zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes von Substanz 31 im ZFTT-Assay wurden unterschiedliche Konzentrationen der Substanz eingesetzt. Als Kontrollreaktion (CTR) wurde das Lösungsmittel von Substanz 31 verwendet (DMSO; 2,5 % (v/v)). Als Inhibitionskontrolle diente der Translationsinhibitor Streptomycinsulfat (STR) in einer Konzentration von 10 µM. (s. Abb. 3-16 und Tab. 3-7).



Substanz 31	
Konzentration [µM]	RAI [%] ¹
50	25,4
100	62,5
200	92,5
NK	100

Abb. 3-16 und Tab. 3-7: GFP-Fluoreszenzintensität unterschiedlicher Konzentrationen der Substanz 31 (50 – 200 µM) im ZFTT-Assay. Angegeben ist die absolute GFP-Fluoreszenzintensität (Abb. 3-16) und die relative Assayinhibition (RAI; Tab. 3-7) im 100 µl Assayvolumen (n = 3). Abkürzungen: STR = Streptomycin

Die Ermittlung des IC_{50} -Wertes von Substanz 31 erfolgte mittels Regressionsanalyse:

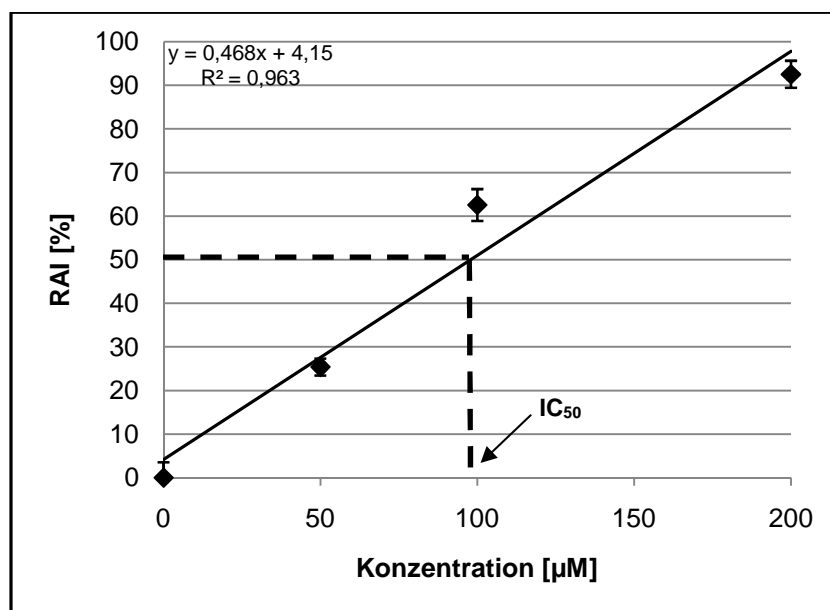


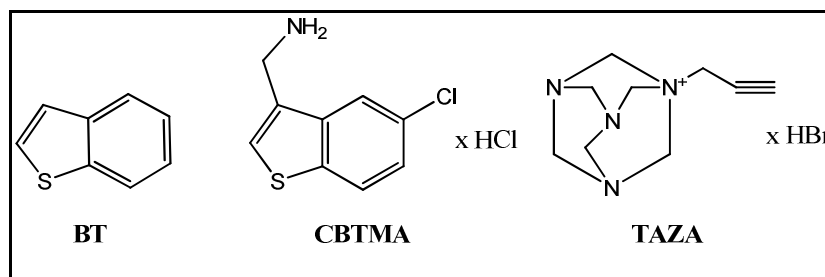
Abb. 3-17: Berechnung des IC_{50} -Wertes von Substanz 31 im ZFTT-Assay mittels linearer Regression. Abkürzungen: RAI = relative Assayinhibition

Die Berechnung des IC_{50} -Wertes für Substanz 31 im ZFTT-Assay ergab eine Konzentration von $98 \mu\text{M}$ ¹.

¹die maximale relative Standardabweichung der Messwerte lag bei $\pm 5 \%$

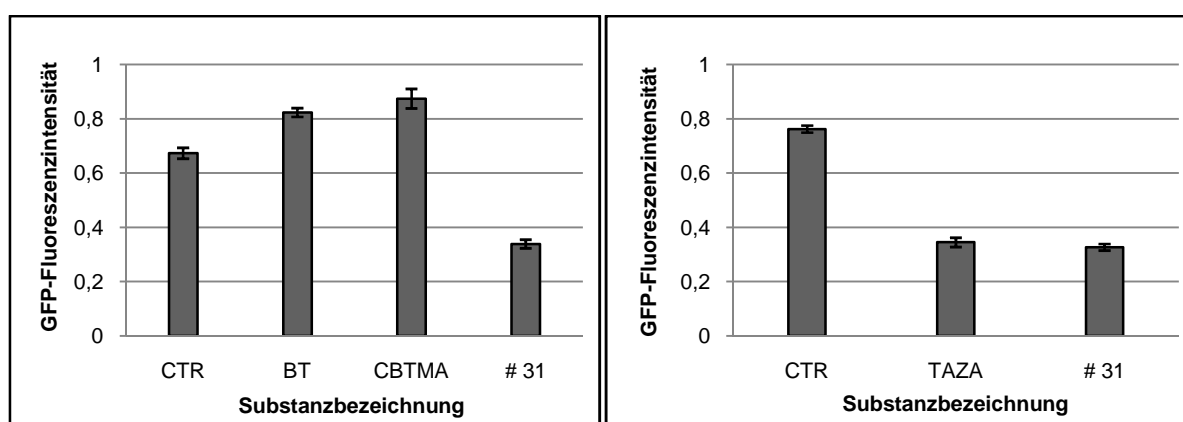
3.3.2.3 Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung von Substanz 31

Zur Untersuchung der inhibitorischen Aktivität von drei Substanzen mit Substrukturen von Substanz 31 wurden zwei Verbindungen mit Benzo[*b*]thiophen-Grundstruktur und ein Tetraaza-adamantanderivat zur Aktivitätsbestimmung im ZFTT-Assay eingesetzt. Als Vertreter der Benzo[*b*]thiophenderivate wurden die Substanzen BT und CBTMA (s. Abb. 3-18 und Tab. 3-8) ausgewählt. Die Substanzen wurden in reinem DMSO gelöst und in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ gegen DMSO als Kontrollreaktion (CTR) und gegen Substanz 31 ($100 \mu\text{M}$) als Inhibitionskontrolle im Assay eingesetzt (s. Abb. 3-19). Die Aktivität des Tetraaza-adamantanderivats (TAZA) wurde in einem zweiten Experiment sowohl gegen reines Lösungsmittel (DMSO; 2,5 % (v/v)) als auch mit Substanz 31 als Inhibitionskontrolle verglichen (s. Abb. 3-20). Beide Substanzen wurden in einer Stoffkonzentration von $100 \mu\text{M}$ analysiert. Die Lösungsmittelkonzentration der charakterisierten Substanzen lag bei 2,5 % DMSO (v/v).



Substanzbezeichnung	Chemische Bezeichnung	Anbieter
BT	Benzo[b]thiophen	Sigma Aldrich
CBTMA	(5-Chloro-1-benzothiophen-3-yl)methylaminhydrochlorid	Acros Organics
TAZA	1-Prop-2-ynyl-3,5,7-triaza-1-azoniaadamantanbromid	Sigma Aldrich

Abb. 3-18 und Tab. 3-8: Ausgewählte Substanzen zur Bestimmung der Struktur-Wirkungsbeziehung von Substanz 31.



Substanzbezeichnung	Konzentration [μM]	RAI [%] ¹
CTR (DMSO, 2,5 %)		0*
BT	100	0*
CBTMA	100	0*
Substanz 31	100	48,8
CTR (DMSO, 2,5 %)		0*
TAZA	100	52,9
Substanz 31	100	55,3

Abb. 3-19 (links), 3-20 (rechts) und Tab. 3-9: Ergebnisse der experimentellen Bestimmung von Struktur-Wirkungsbeziehungen von Substanz 31 (# 31) im ZFTT-Assay (n = 3). In der Tabelle ist die relative Assayinhibition (RAI) bezogen auf die parallel durchgeführten Kontrollreaktionen (CTR) angegeben.

¹die maximale relative Standardabweichung der Messwerte lag bei $\pm 5\%$; *die absolute GFP-Fluoreszenz lag über der der Kontrollreaktion (Wert auf Null gesetzt).

Die Ergebnisse der Experimente zur Untersuchung des Einflusses der Substrukturen von Substanz 31 (Benzo[b]thiophen- bzw. Tetraaza-adamantansubstruktur) auf die Aktivität im ZFTT-Assay zeigten, dass die Substanzen mit Benzo[b]thiophensubstruktur (BT, CBTMA) keinerlei Aktivität auf die TT-Reaktion im Assay aufweisen. Das verwendete Tetraaza-adamantanderivat (TAZA) zeigte hingegen eine inhibitorische Potenz, die mit der Aktivität von Substanz 31 vergleichbar ist.

3.3.2.4 Bestimmung des antimikrobiellen Potentials der Specs-Substanzen

Die antibakterielle Aktivität der Specs-Substanzen wurde durch Verwendung des Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* 168 unter Durchführung der Bouillon-Mikrodilutionsmethode im 100 µl-Maßstab in 96 Well Platten bestimmt (s. 2.2.2.1).

Zur Bestimmung des Einflusses des verwendeten Lösungsmittels DMSO wurden die mit Zellen angeimpften Wells mit 100 µl reinem DMSO versetzt und durch neunmalige Zweifachverdünnung von Well 1 bis Well 10 inkubiert. Dies ergab einen DMSO-Konzentrationsbereich zwischen 50 und 0,1 % (v/v). Als Wachstumskontrolle (WK) dienten 18 mit Zellen inokulierte Wells ohne Inhibitor (s. Abb. 3-21).

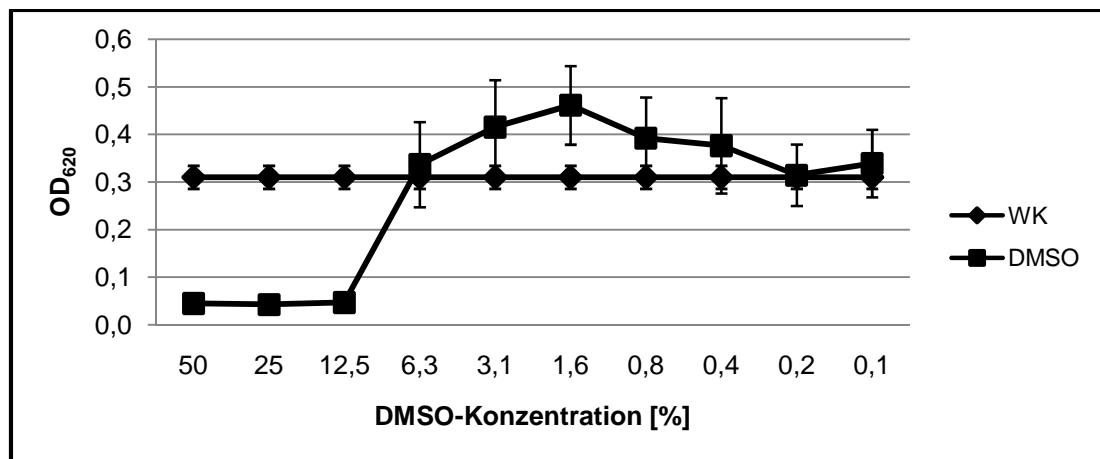


Abb. 3-21: Einfluss von DMSO auf das Zellwachstum von *B. subtilis* 168. Die Zelldichte wurde nach Bebrütung für 20 Stunden bei 37 °C durch Messung der optischen Dichte bei 620 nm (OD_{620}) bestimmt. Alle Messwerte wurden in drei Experimenten bestimmt. Die optische Dichte der Wachstumskontrolle (WK) entspricht jeweils dem arithmetischen Mittel der optischen Dichte aus 18 Kontrollkulturen und wurde als Referenz für jeden Konzentrationsmesspunkt angegeben. Die maximale relative Standardabweichung der Messwerte lag bei ± 15 %.

Das Ergebnis zeigte einen starken Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf das Zellwachstum von *B. subtilis* 168 in DMSO-Konzentrationen über 6,3 % (v/v).

Durch den identischen experimentellen Ansatz wurde die antimikrobielle Aktivität der Specs-Substanzen 1 – 35 (in DMSO gelöst) untersucht. Der analysierte Konzentrationsbereich der Substanzen lag zwischen 156 µM (6,3 % DMSO) und 2 µM (0,1 % DMSO). Als Wachstumskontrolle wurden 18 Wells ohne Testsubstanz mit Zellen inokuliert. Die Bebrütungsdauer bei 37 °C betrug 20 Stunden. Nachfolgend ist das antimikrobielle Profil der aktivsten Vertreter der Specs-Substanzen 7, 15, 18 und 31 gegen *B. subtilis* 168 dargestellt (s. Abb. 3-22). Die in der Abbildung gezeigte DMSO-Kurve (gestrichelte Linie) entspricht der

Inhibitionswirkung der in der Probe vorliegenden DMSO-Konzentration und dient als Referenz zur Unterscheidung zwischen antibakteriellem Lösungsmittel- und Substanzeffekt.

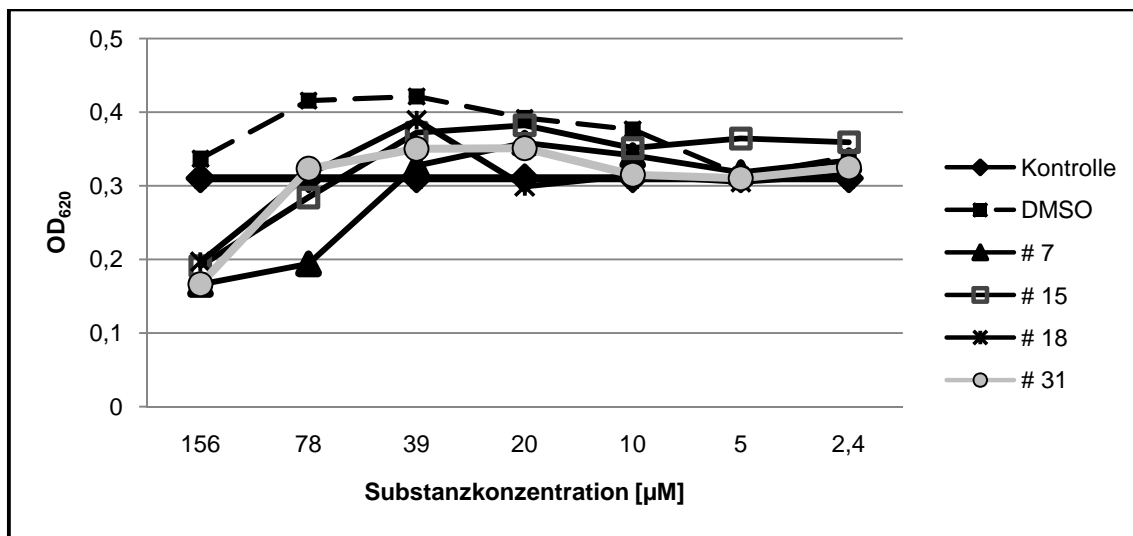


Abb. 3-22: Ergebnisse der Wachstumsinhibitionstests der Specs-Substanzen 7, 15, 18 und 31 gegen *B. subtilis* 168. Die dargestellte Kurve der Wachstumskontrolle entspricht dem arithmetischen Mittel der optischen Dichte (OD_{620}) aus 18 Kontrollkulturen und wurde jedem Messwert als Referenzpunkt zugeordnet. Die durchschnittliche relative Standardabweichung aller Messungen lag bei $\pm 15\%$.

Insgesamt zeigte keine der verwendeten Specs-Substanzen eine starke antibakterielle Wirkung gegen *B. subtilis* 168 in Substanzkonzentrationen bis $156\ \mu\text{M}$ (s. auch 6.4.1). Auch die aktivsten Vertreter der Specs-Substanzen (7, 15, 18 und 31) zeigten in dieser Substanzkonzentration lediglich OD_{620} -Werte von knapp unter 0,2. Eine maximale Inhibitionswirkung (MHK) hätte den OD_{620} -Werten der gemessenen Leerwerte der nicht angeimpften Wells von 0,04 – 0,05 entsprochen.

Zum Vergleich der antibakteriellen Aktivität von Substanz 31 und der im ZFTT-Assay vergleichbar aktiven Tetraaza-adamantanverbindung (TAZA) wurde die Bouillon-Mikrodilutionsmethode gegen *B. subtilis* 168 durchgeführt. Als Wachstumskontrolle wurden 10 Wells ohne Inhibitor mit Zellen inokuliert (s. Abb. 3-23).

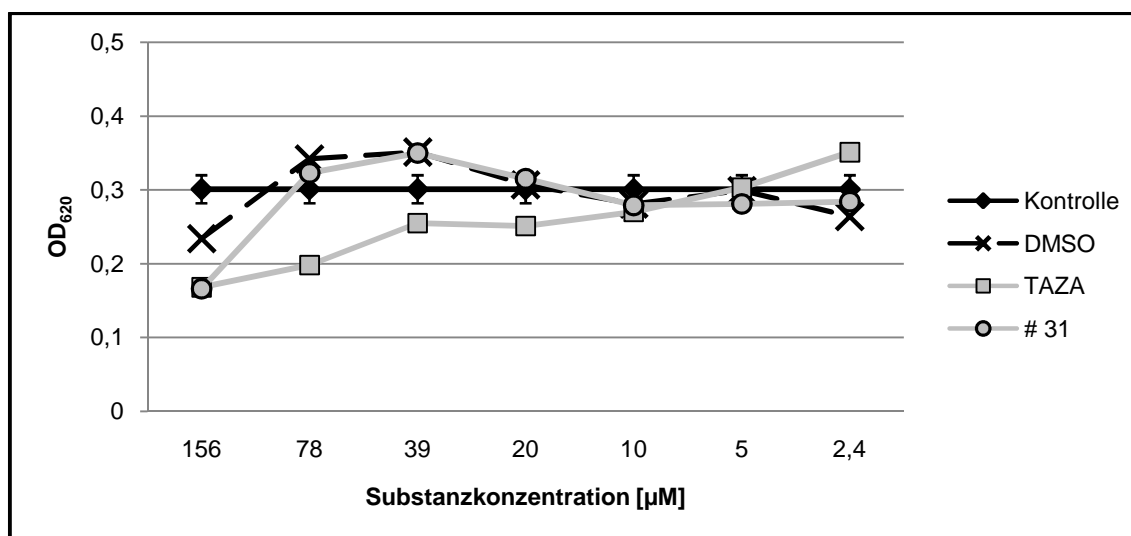


Abb. 3-23: Die antibakterielle Aktivität von Substanz 31 und dem Tetraaza-adamantanderivat (TAZA) gegen *B. subtilis* 168. Die dargestellte Linie der Wachstumskontrolle entsprach dem arithmetischen Mittel der optischen Dichte (OD_{620}) aus 10 Kontrollkulturen und diente als Referenzpunkt der Messwerte. Die gestrichelte Linie entsprach der in der jeweiligen Probe vorliegenden DMSO-Konzentration und stellte als Referenz den Einfluss des Lösungsmittels dar. Die durchschnittliche relative Standardabweichung aller Messungen lag bei $\pm 10\%$.

Substanz 31 und TAZA zeigten im Ganzzellassay in Konzentrationen von 156 μM eine vergleichbare antibakterielle Aktivität. Für die TAZA konnte in niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zu Substanz 31 eine bis zu 40 % höhere antibakterielle Aktivität nachgewiesen werden (OD_{620} zwischen 9,8 bis 78,1 μM). Substanz 31 ist in Substanzkonzentration ab 78 μM als inaktiv gegen *B. subtilis* 168 anzusehen.

3.3.2.5 Bestimmung des antimikrobiellen Potentials von Substanz 31 gegen humanpathogene Bakterienstämme

Die Forschungskooperation mit Dr. Thomas Wichelhaus ermöglichte die Bestimmung der MHK von Substanz 31 gegen die folgenden humanpathogenen Kontrollstämme: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922) und *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); (s. 2.1.1, 2.2.2.2). Als Referenz diente der Translationsinhibitor Chloramphenicol.

Testsubstanz	Molmasse [Da]	Lösungsmittel	Bakterielle Teststämme		
			<i>Staph. aureus</i> (ATCC 29213)	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)
			Minimale Hemmkonzentration [$\mu\text{g/ml}$] / [μM]		
Chloramphenicol	323,13	DMSO	8 / 25	4 / 12,5	4 / 12,5
Substanz 31	385,29	DMSO	128 / 332	128 / 332	128 / 332

Tab. 3-10: MHK-Werte von Substanz 31 gegen ausgewählte humanpathogene Kontrollstämme.

Die MHK-Werte von Substanz 31 (ca. 330 μM) zeigten eine nur schwache antibakterielle Aktivität gegen die eingesetzten Gram-positiven und Gram-negativen bakteriellen Teststämme.

3.3.2.6 Bestimmung der ZFTT-Aktivität potentieller RNA-Liganden (ASINEX-Substanzen)

Die ZFTT-Assayaktivität der analysierten potentiellen RNA-Liganden der ASINEX-Substanzbibliothek ist nachfolgend tabellarisch dargestellt (Strukturformeln: s. 6.3.3):

Substanzbezeichnung	ASINEX #	Konzentration [μM]	RAI [%]
AS1	ASN 02832805	500	0*
AS2	ASN 03019101	500	0*
AS3	ASN 03155390	500	0*
AS4	ASN 03155391	500	0*
AS5	ASN 03203608	500	0*
AS6	ASN 03367087	500	11,1
AS7	ASN 03581037	500	0*
AS8	ASN 03775927	500	0*
AS9	ASN 04365896	500	0*
AS10	ASN 04370277	500	37,1
		400	12,1
AS11	ASN 05303834	500	0*
AS12	ASN 05700308	500	28,2
		400	0*
AS13	ASN 05700533	500	6,2
AS14	ASN 06537061	500	n. best.
AS15	BAS 00140972	500	0*
AS16	BAS 00175970	500	35,4
		400	0*
AS17	BAS 00452693	500	0*
AS18	BAS 00665568	500	12
AS19	BAS 00919007	500	30,2
		400	0*
AS20	BAS 01367404	500	30
		400	17,7
AS21	BAS 02107985	500	20
		400	0*
AS22	BAS 02973798	500	44,5
		400	0*
AS23	BAS 04952689	500	29,2
		400	0*

Tab. 3-11: Experimentelle Charakterisierung der ASINEX-Substanzen im ZFTT-Assay. Angegeben ist die relative Assayinhibition (RAI), welche durch Bezug auf eine parallel verwendete Kontrollreaktion ohne Inhibitor bezogen wurde. Alle Messwerte wurden aufgrund relativ schwacher Aktivität der Substanzen (bezogen auf die eingesetzten Substanzkonzentration) nur einmal bestimmt. Substanz AS14 konnte aufgrund starker Eigenfluoreszenz bei 509 nm nach Anregung bei 395 nm nicht im ZFTT-Assay untersucht werden.

*die absolute GFP-Fluoreszenz lag über der der Kontrollreaktion (Wert auf Null gesetzt)

Aufgrund der schlechten Aktivität der ASINEX-Substanzen im Tat-TAR-FRET-Assay (pers. Kommunikation: Dr. M. Nietert) wurden diese in relativ hohen Konzentrationen von 500 μM im ZFTT-Assay eingesetzt. Die Substanzen mit relativen ZFTT-Inhibitionsraten von mehr

als 20 % wurden erneut in Konzentrationen von 400 μM im Assay getestet. Da nach Abschluss der Aktivitätsbestimmung nur Substanz AS20 eine schwache Hemmung der TT-Reaktion von 17,7 % relativer ZFTT-Inhibition bei 400 μM zeigte, wurden von der Durchführung weiterer zellfreier Assays abgesehen.

3.3.2.7 Bestimmung des antimikrobiellen Potentials der ASINEX-Substanzen gegen humanpathogene und multiresistente bakterielle Teststämme

Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivität der ASINEX-Substanzen gegen humanpathogene und multiresistente Teststämme wurde in Kooperation mit Dr. T. Wichelhaus durchgeführt (s. 2.2.2.2). Als antibakterielle Referenzsubstanz diente der Translationsinhibitor Chloramphenicol. Alle ASINEX-Substanzen wurden ausgehend von einer 10-fach konzentrierten Stammlösung (Konzentration: 1,28 bzw. 2,56 mg/ml in reinem DMSO) in Startkonzentrationen von 128 bzw. 256 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Dies entsprach einer maximalen Substanzkonzentration im Assay von 128 bzw. 64 $\mu\text{g/ml}$ (in Well 1).

Testsubstanz	LM	Verwendete Teststämme				
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213 MHK [$\mu\text{g/ml}$]	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 MHK [$\mu\text{g/ml}$]	<i>E. coli</i> ATCC 25922 MHK [$\mu\text{g/ml}$]	<i>S. aureus</i> MRSA, T2069 MHK [$\mu\text{g/ml}$]	<i>E. faecium</i> VRE345 MHK [$\mu\text{g/ml}$]
CHL	DMSO	8	4	4		
AS1	DMSO	>64	>64	>64	>64	>64
AS2	DMSO	>64	>64	>64	>64	>64
AS3	DMSO	>64	>64	>64	>64	>64
AS4	DMSO	>64	>64	>64	>64	>64
AS5	DMSO	>128	>128	>128		
AS6	DMSO	>128	>128	>128		
AS7	DMSO	>128	>128	>128		
AS8	DMSO	>128	>128	>128		
AS9	DMSO	>128	>128	>128		
AS10	DMSO	>128	>128	>128		
AS11	DMSO	>128	>128	>128		
AS12	DMSO	>128	>128	>128		
AS13	DMSO	>128	>128	>128		
AS14	DMSO	>128	>128	>128		
AS15	DMSO	>64	>64	>64		
AS16	DMSO	>64	>64	>64		
AS17	DMSO	>64	>64	>64	>64	>64
AS18	DMSO	>64	>64	>64	>64	>64
AS19	DMSO	>64	>64	>64		
AS20	DMSO	>64	>64	>64		
AS21	DMSO	>64	>64	>64	>64	>64
AS22	DMSO	>64	>64	>64		
AS23	DMSO	>64	>64	>64		

Tab. 3-12: Antibakterielle Aktivität der ausgewählten ASINEX-Substanzen gegen pathogene und multiresistente Teststämme. MHK-Werte über 64 bzw. 128 $\mu\text{g/ml}$ Substanzkonzentration zeigten die nicht nachweisbare antibakterielle Aktivität der Substanzen an. Abkürzungen: CHL = Chloramphenicol; LM = Lösungsmittel; MRSA = Methicillin-resistenter *S. aureus*-Stamm; VRE = Vancomycin-resistenter *Enterococcus*-Stamm

Bei keiner der verwendeten ASINEX-Substanzen konnte die MHK gegen die verwendeten bakteriellen Teststämme aufgrund zu geringer Aktivität bzw. Konzentration der Testlösungen bestimmt werden. Alle MHK-Werte lagen folglich über 64 bzw. 128 µg/ml Testsubstanz.

3.4 Identifizierung und Charakterisierung neuer antimikrobieller Tripeptide

Durch den Aufbau eines Kooperationsprojektes mit Dr. Marcel Suhartono (AK Prof. Dr. Michael W. Göbel, Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie, Goethe-Universität, Frankfurt/Main) konnte die Substanzbibliothek potentieller antimikrobieller Inhibitoren der prokaryotischen TT-Reaktion durch die Substanzklasse der antimikrobiellen Tripeptide erweitert werden. Die durch Dr. Marcel Suhartono synthetisierten, heterogen strukturierten Tripeptide waren aus natürlichen und nicht-natürlichen D- und L- α -Aminosäuren mit teilweise aromatischen und heteroaromatischen Seitenketten aufgebaut (Suhartono, 2008; Suhartono *et al.*, 2008).

3.4.1 Identifizierung aktiver Tripeptide im ZFTT-Assay

Zur Charakterisierung der Aktivität der 27 analysierten Tripeptide gegen den Prozess der zellfreien bakteriellen Transkriptions-/Translationsreaktion wurden die Proben in unterschiedlichen Konzentrationen in MilliQ-Wasser gelöst und im ZFTT-Assay eingesetzt (Strukturformeln: s. 6.3.4). Die verwendete Konzentration der Tripeptide richtete sich nach den durch Dr. M. Suhartono bestimmten IC_{50} -Werten im Tat-TAR-FRET-Assay (pers. Kommunikation: M. Suhartono; Suhartono, 2008), sowie nach der Konzentration der zur Verfügung stehenden Tripeptidstammlösungen. Die eingesetzten Tripeptidkonzentrationen lagen weit oberhalb der bekannten IC_{50} -Werte des Tat-TAR-FRET-Assays. Zur Vergleichbarkeit der Aktivität unterschiedlich konzentrierter Tripeptide im ZFTT-Assay wurde deren inhibitorische Aktivität durch Angabe des Quotienten aus relativer Fluoreszenzintensität inhibierter Reaktionen und der eingesetzten Tripeptidkonzentration beschrieben (RAI/c). Die angegebene relative Assayinhibition (RAI) wurde durch Doppelbestimmung zweier Messwerte und Bezug auf eine parallel durchgeführte Kontrollreaktionen ermittelt. Nachfolgend sind die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung analysierter Tripeptide im ZFTT-Assay tabellarisch (s. Tab. 3-13) und graphisch (s. Abb. 3-24) dargestellt:

Aminosäuresequenz / Tripeptidbezeichnung	IC ₅₀ -Wert [μ M] (Tat-TAR-Assay) ¹	Tripeptid- konzentration [μ M]	RAI ² [%]	RAI / c [% / μ M]
Arg-Arg-Arg / G1	4	500	10,7	0,02
		100	2,4	0,02
Lys-Arg-Lys / G2	400	800	18,6	0,02
Lys-Arg-Arg / G3	n. bek.	500	6,1	0,01
		100	0*	0
His-Arg-His / G4	250	500	0*	0
Lys-Lys-Lys / G5	1000	4000	40,1	0,01
NH ₂ -Arg-(L)Bim-His-CONH ₂ / G6	n. bek.	200	0*	0
NH ₂ -Arg-(L)Bim-Arg-CONH ₂ / G7	2	100	0*	0
NH ₂ -(D)Arg-(L)NaphtOMe(C ₃)-(D)Arg-CONH ₂ / G8	60	200	23,3	0,12
AcNH-(D)Arg-(L)NaphtOMe(C ₃)-(D)Arg-CONH ₂ / G9	80	200	11,8	0,06
NH ₂ -(D)Arg-(L)Phen(C ₂)-(D)Arg-CONH ₂ / G10	3	200	86	0,43
		100	71,2	0,71
		10	11,5	1,15
AcNH-(D)Arg-(L)Phen(C ₂)-(D)Arg-CONH ₂ / G11	n. bek.	200	84,3	0,42
		100	70,6	0,71
		10	21,2	2,12
NH ₂ -(D)Arg-(L)Pyrenyl(C ₂)-(D)Arg-CONH ₂ / G12	0,4	200	84,5	0,42
		100	70,7	0,71
		10	13,6	1,36
NH ₂ -(D)2Pyrimidinyl(C ₃)-(D)Arg-(D)Arg-CONH ₂ / G13	n. bek.	500	51,5	0,1
		200	21,3	0,11
(D)-Arg-(D)-Phe-(D)-Arg / G14	75	300	10,5	0,04
NH ₂ -(D)Arg-(D)Pyrazinyl(C ₃)-(D)Arg-CONH ₂ / G15	80	300	2	0
NH ₂ -(D)Arg-(D)3Pyridyl(C ₃)-(D)Arg-CONH ₂ / G16	20	200	6,7	0,03
NH ₂ -Arg-(L)Pyrazinyl(C ₃)-(D)Arg-CONH ₂ / G17	80	320	0*	0
AcNH-(L)-Phe-(D)-Arg-(D)-Lys / G18	350	1400	14,4	0,01
AcNH-(L)-Phe-(D)-Arg-(L)-Arg / G19	300	100	0*	0
AcNH-(D)-Arg-(D)-Arg-(D)-Lys / G20	80	300	0*	0
AcNH-(L)-Phe-(D)-Arg-(L)-Arg / G21	300	1200	55,1	0,05
NH ₂ -(D)Arg-(L)Chinoliny(C ₂)-(D)Arg-CONH ₂ / G22	30	200	14,1	0,07
(D)-Arg-(L)-Lys-(D)-Arg / G23	30	300	14,2	0,05
NH ₂ -(L)Pyrazinyl(C ₃)-(L)Naphthyl(C ₂)- (D)Pyrazinyl(C ₃)-CONH ₂ / G24	60	120	15	0,13
NH ₂ -(D)Arg-(D)2Pyrimidinyl(C ₃)-(D)Arg-CONH ₂ / G25	30	200	3,5	0,02
(Lac)-(D)Arg-(D)Arg-CONH ₂ / G26	n. bek.	n. best.	n. best.	n. best.
NH ₂ -(D)Arg-(L)Pyrenyl(C ₃)-(D)Arg-CONH ₂ / G27	n. bek.	100	76,1	0,76
		75	70	0,93
		50	57,8	1,16
		25	38,6	1,54

Tab. 3-13: Ergebnisse der ZFTT-Aktivitätsbestimmung der verwendeten Tripeptide (n = 2). Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach Verdünnung der Reaktionsansätze (1/100) mit MilliQ-Wasser. Die Substanz G26 konnte aufgrund vorhandener Fluoreszenz bei 509 nm durch Anregung bei 395 nm nicht im ZFTT-Assay analysiert werden.

Abkürzungen: RAI = relative Assayinhibition; n. bek. = nicht bekannt; n. best. = nicht bestimmt.

*die absolute GFP-Fluoreszenz lag über der der Kontrollreaktion (Wert auf Null gesetzt)

¹pers. Kommunikation: Dr. M. Suhartono

²die maximale relative Standardabweichung der Messwerte betrug ± 10 %

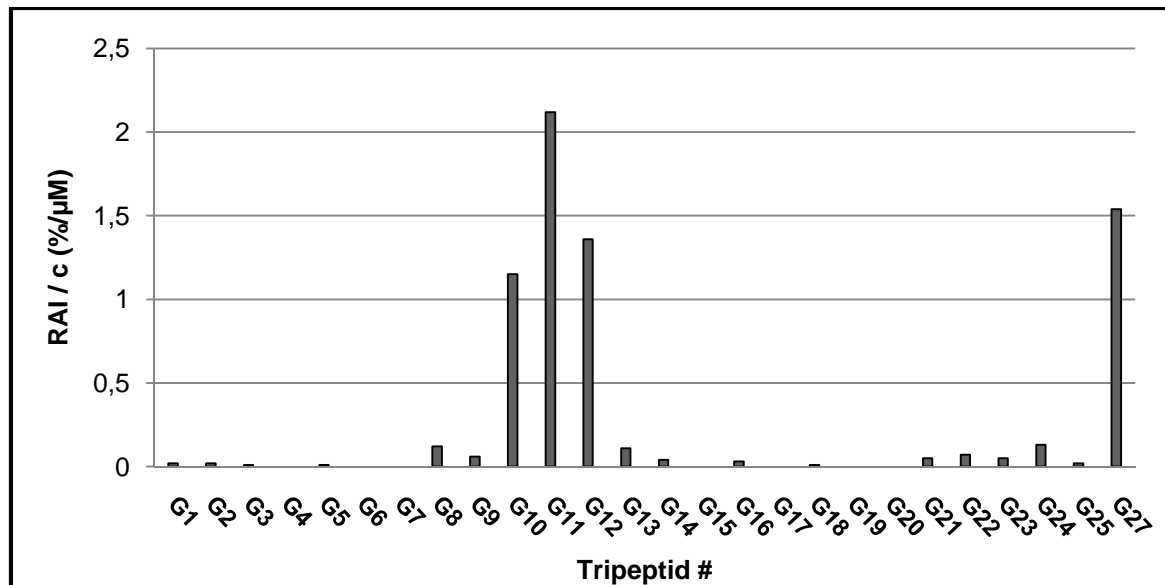


Abb. 3-24: Graphische Darstellung der ZFTT-Aktivität der eingesetzten Tripeptide im ZFTT-Assay nach Tab. 3-13. Bei mehreren bestimmten Aktivitätswerten (RAI / c) wurde der Maximalwert zur Darstellung verwendet.

Die hohe inhibitorische Aktivität des Tripeptids Arg-Arg-Arg (G1) im Tat-TAR-FRET-Assay ($IC_{50} = 4 \mu\text{M}$; Ludwig *et al.*, 2007) konnte gegen funktionell relevante Zielstrukturen der ZFTT-Reaktion nicht bestätigt werden. Die im Assay eingesetzte maximale Konzentration von $500 \mu\text{M}$ des Tripeptids G1 (Triple-Arginin) zeigte eine relative ZFTT-Assayinhibition (RAI) von nur 10,7 %. Insgesamt konnte für alle analysierten Tripeptide, welche ausschließlich aus den natürlichen Aminosäuren Arginin, Lysin, Histidin und Phenylalanin aufgebaut waren, eine nur geringe bzw. keine Aktivität gegen die ZFTT-Reaktion festgestellt werden (s. Tab. 3-13).

Auch die Tripeptide der Grundstruktur: $\text{NH}_2\text{-(D)-Arg-X-(D)-Arg-CONH}_2$ (X = nicht-natürliche Aminosäure mit heteroaromatischer Seitenkette) zeigten keine hohe Aktivität im ZFTT-Assay. Obwohl das hohe Potential für *Stacking*interaktionen des Benzimidazol tragenden Tripeptids G7 zur Inhibition der Tat-TAR-Reaktion gezeigt werden konnte ($IC_{50} = 2 \mu\text{M}$; Ludwig *et al.*, 2007), erzielte das Peptid in 50-fach höherer Konzentration keine inhibitorische Aktivität gegen die ZFTT-Reaktion. Obwohl alle Tripeptide dieser Grundstruktur mit zur Ausbildung von *Stacking*-Interaktionen und Wasserstoffbrücken geeigneten Heteroaromaten ausgestattet waren, zeigte überraschenderweise kein Tripeptid dieser Gruppe eine deutliche Inhibition des ZFTT-Assays im Konzentrationsbereich zwischen $100 - 320 \mu\text{M}$.

Die Tripeptide G10, G11, G12 und G27 wiesen die höchste Aktivität zur Inhibition der ZFTT-Reaktion auf und besaßen folgende Grundstruktur: $(\text{Ac})\text{NH}_2\text{-(D)-Arg-X-(D)-Arg-CONH}_2$ (X = nicht-natürliche Aminosäure mit polyaromatischer Seitenkette; G10/11 =

Phenanthrensubstituent; G12/27 = Pyrensubstituent). Ein falsch-positives Ergebnis im ZFTT-Assay aufgrund der Absorption von Licht der Wellenlänge bei 395 nm konnte ausgeschlossen werden (s. 6.1.3).

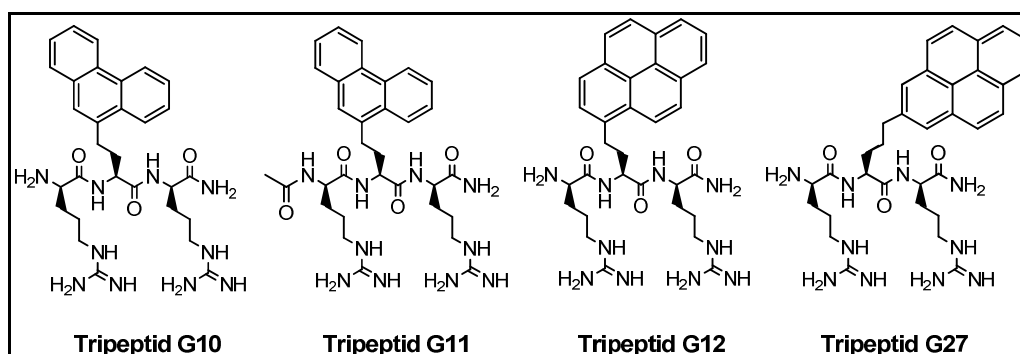


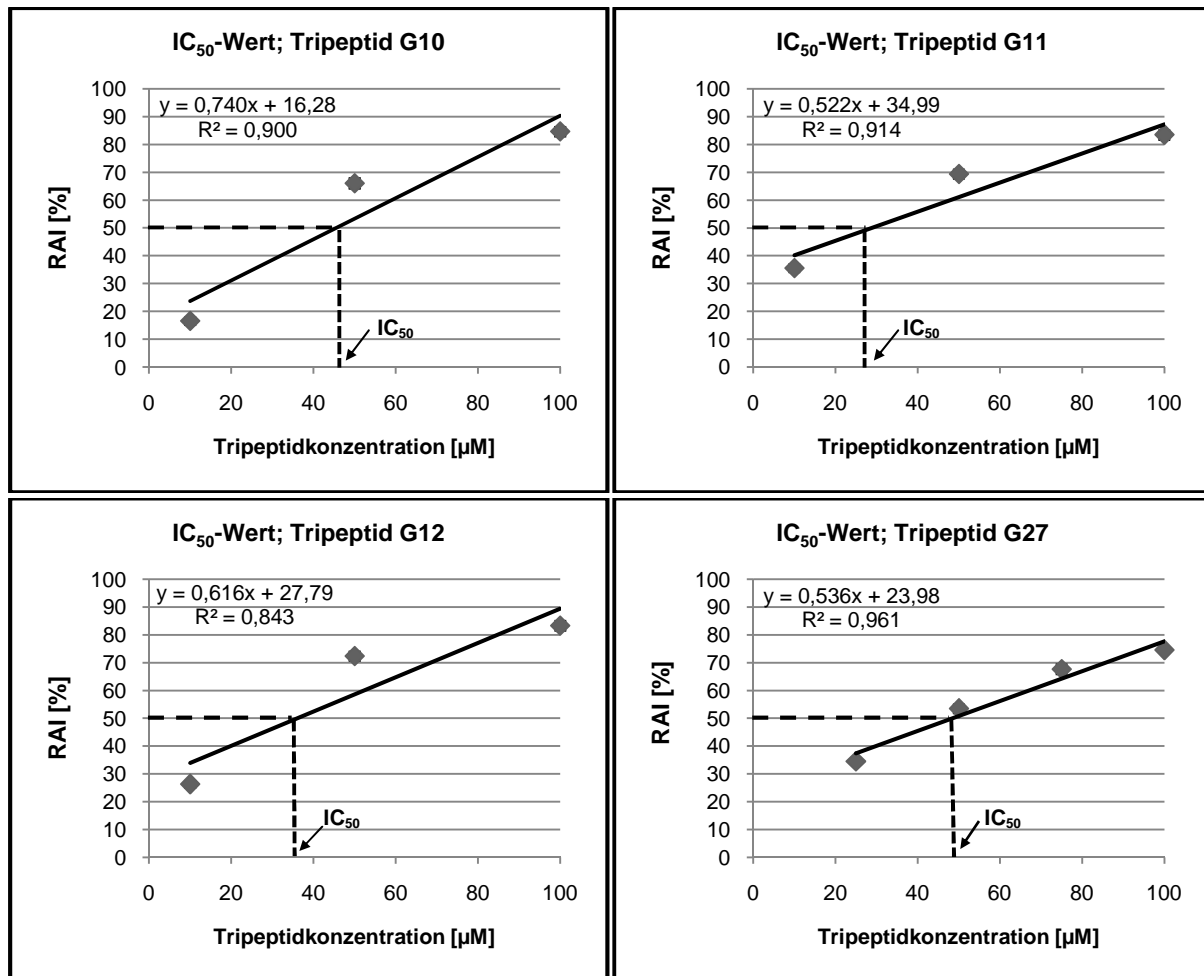
Abb. 3-25: Die aktivsten Tripeptide im ZFTT-Assay.

Offensichtlich boten nur die mit einem Phenanthren- bzw. Pyrensubstituent ausgestatteten Tripeptide ein gutes Verhältnis zwischen elektrostatischer Wechselwirkung, über die positiv geladenen Arginingruppen als affinitätsbestimmende Komponente zur polyanionischen RNA (bzw. DNA) und der großen Interaktionsoberfläche der polyaromatischen Substituenten für *Stacking*interaktionen mit den Basen der RNA (s. 4.5.1).

3.4.2 IC₅₀-Werte aktiver Tripeptide im ZFTT-Assay

Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte der aktivsten Tripeptide des ZFTT-Assays (G10, G11, G12, und G27) wurden unterschiedliche Konzentrationen der Substanzen im Assay eingesetzt und auf die durchschnittliche GFP-Fluoreszenz zweier Kontrollreaktionen ohne Inhibitor bezogen. Als Inhibitionskontrolle dienten zwei Reaktionsansätze unter dem Einfluß von 10 µM Streptomycinsulfat (s. Tab. 3-14 und Abb. 3-26).

Tripeptid	Tripeptidkonzentration [µM]	RAI [%] ³
G10 ¹	10	16,6
	50	66,1
	100	84,7
G11 ¹	10	35,6
	50	69,4
	100	83,5
G12 ²	10	26,3
	50	72,4
	100	83,3
G27 ²	25	34,5
	50	53,4
	75	67,6
	100	74,5



Tab.3-14 und Abb. 3-26: Konzentrationsabhängige relative Assayinhibition (RAI) der aktivsten Tripeptide des ZFTT-Assays (n = 2). Die Reaktionen wurden in einem Reaktionsvolumen von 100 µl durchgeführt. Jeder Messwert wurde in zwei voneinander unabhängige Experimenten bestimmt. Die Berechnung der IC₅₀-Werte erfolgte durch lineare Regression ($y = 50$). ¹Phenanthrenpeptid; ²Pyrenpeptid; ³die maximale relative Standardabweichung der Messwerte lag bei ± 10 %

Danach ergaben sich für die im ZFTT-Assay aktivsten Tripeptide folgende IC₅₀-Werte:

Tripeptid	IC ₅₀ -Wert [µM]
G10	45,6
G11	28,8
G12	36,1
G27	48,5

Tab. 3-15: IC₅₀-Werte der aktivsten Tripeptide im ZFTT-Assay.

3.4.3 Antimikrobielles Potential gegen *B. subtilis* 168

Zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität der Tripeptide gegen *B. subtilis* 168 wurde ein variabler Konzentrationsbereich der Substanzen von 1000 – 1,6 µM durch Anwendung der Bouillon-Mikrodilutionsmethode analysiert (s. 2.2.2.1 bzw. 6.4.2). Als Wachstumskontrolle

(Kontrolle) dienten mit Zellen inokulierte Wells ohne Testsubstanz. Nachfolgend ist exemplarisch die antimikrobielle Aktivität der Tripeptide G8, G10, G11, G12, G13, G16 und G27 dargestellt. Die Tripeptide G11 und G12 waren aufgrund geringerer Probenverfügbarkeit nur in Konzentrationen bis 250 μM einsetzbar.

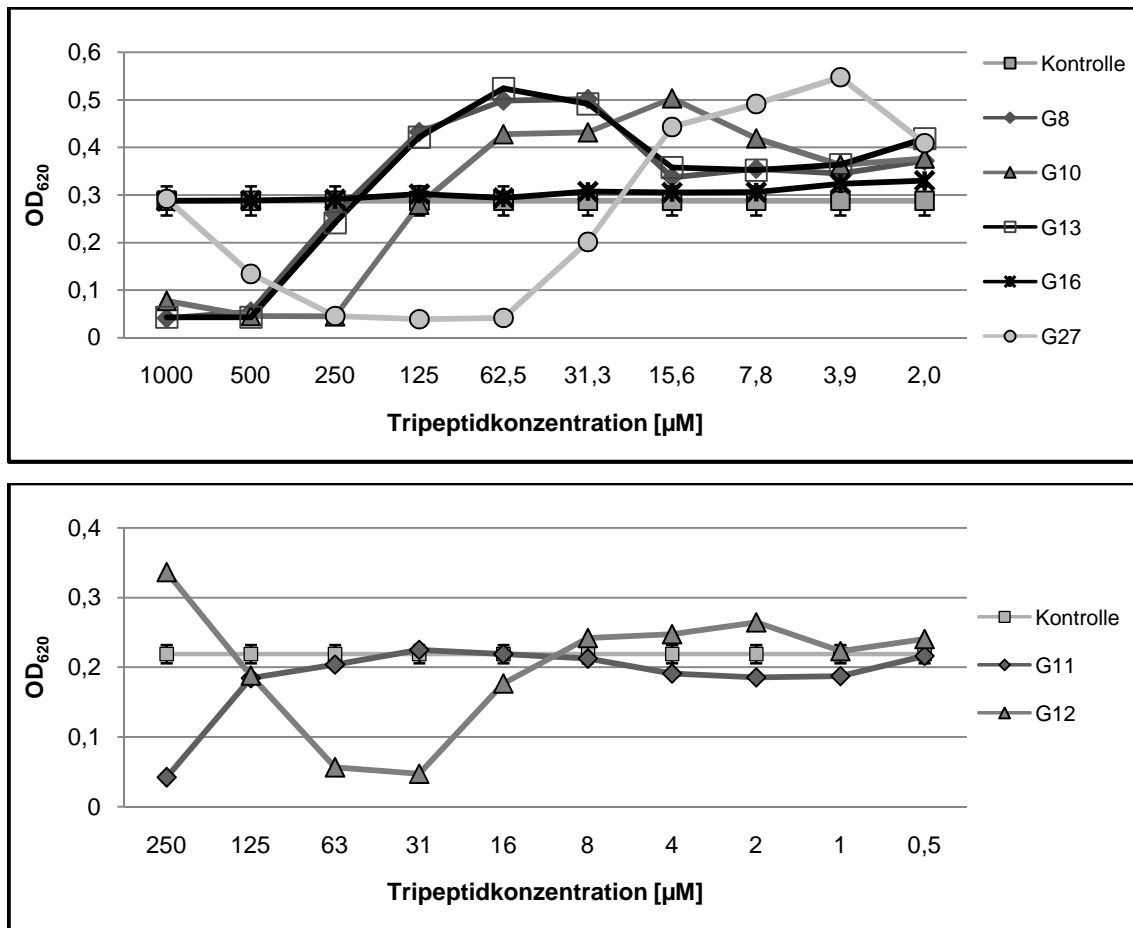


Abb. 3-27: Antimikrobielle Aktivität exemplarisch ausgewählter Tripeptide gegen *B. subtilis* 168 ($n = 2$). Die Wachstumskontrolle (Kontrolle) entspricht dem arithmetischen Mittel der optischen Dichte (OD_{620}) aus 10 Kontrollkulturen. Die maximale relative Standardabweichung der Messwerte lag bei $\pm 15\%$.

Eine antibakterielle Aktivität gegen *B. subtilis* 168 konnte für die Vertreter beider Gruppen ZFTT-aktiver Tripeptide (Phenanthren und Pyren substituierte Tripeptide) nachgewiesen werden: G10 (MHK ca. 250 μM), G11 (MHK ca. 250 μM), G12 (MHK ca. 31 μM) und G27 (MHK ca. 62,5 μM). Auch die Tripeptide G8 (MHK ca. 500 μM) und G13 (MHK ca. 500 μM) waren als Substanzen mit schwacher antimikrobieller Aktivität identifizierbar. Das Tripeptid G16 zeigte über den gesamten Konzentrationsbereich keine antimikrobielle Aktivität. Der Anstieg der optischen Dichte (OD_{620}) im höheren Probenkonzentrationsbereich der Tripeptide G12 und G27 wurde durch die im Nährmedium ungelösten Tripeptide verursacht (s. Abb. 3-27).

3.4.4 Antimikrobielles Potential ZFTT-aktiver Tripeptide gegen humanpathogene Teststämme

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration der ZFTT-aktiven Tripeptide wurde in Kooperation mit Dr. T. Wichelhaus nach der unter 2.2.2.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Die ausgewählten ZFTT-aktiven Phenanthren- und Pyrenpeptide wurden in unterschiedlichen Konzentrationen als zweifach konzentrierte Stammlösung in MilliQ-Wasser eingesetzt und anschließend in Well 1 im Verhältnis 1:1 mit Nährmedium verdünnt.

Tripeptid	Konzentration der Stammlösung [μM]	eingesetzte bakterielle Teststämme		
		<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)
		MHK [μM]	MHK [μM]	MHK [μM]
G10 ¹	800	400	400	> 400
G11 ¹	250	> 125	> 125	> 125
G12 ²	1000	31,3	500	250
G27 ²	1000	31,3	500	250

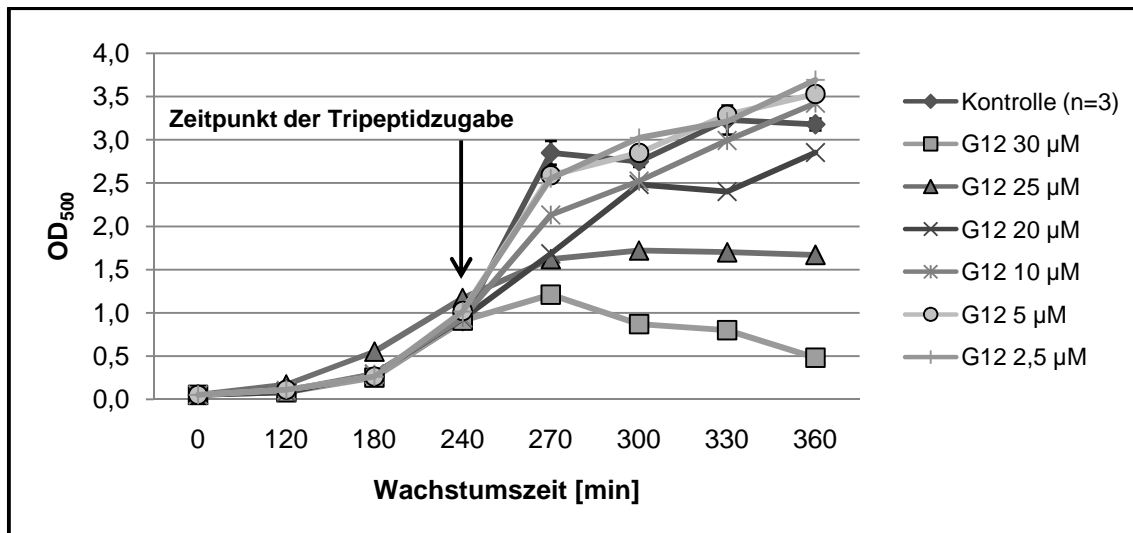
Tab. 3-16: MHK-Bestimmung ausgewählter Tripeptide gegen humanpathogene bakterielle Teststämme. MHK-Werte oberhalb der maximal einsetzbaren Tripeptidkonzentration waren nicht bestimmbar.

¹Phenanthrenpeptid; ²Pyrenpeptid

Eine deutliche antibakterielle Aktivität gegen den humanpathogenen Testorganismus *S. aureus* konnte mit MHK-Werten von ca. 30 μM nur für die mit einem Pyrensubstituenten ausgestatteten Tripeptide (G12 und G27) festgestellt werden (s. Tab. 3-16).

3.4.5 IC₅₀-Wert des Tripeptids G12 gegen *B. subtilis* 168

Der IC₅₀-Wert des Tripeptids G12 gegen *B. subtilis* 168 unter aeroben Bedingungen (5 ml Schüttelkulturen) wurde zur Bestimmung der für den DIGE-Versuch einzusetzenden subletalen Tripeptidkonzentration ermittelt (s. 2.2.2.3, 3.7.3). Die Inkubation der Zellen mit der Tripeptidlösung erfolgte über einen Zeitraum von 120 Minuten nach dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase des Organismus ($\text{OD}_{500} > 0,75$). Als Wachstumskontrolle dienten drei Bakterienkulturen ohne Inhibitor (CTR 1 - 3). Der Konzentrationsbereich des Tripeptids erstreckte sich von 30 – 2,5 μM G12 (s. Abb. 3-28 und Tab. 3-17).



Kultur	Tripeptid-konzentration [µM]	WZ [min]	0	120	180	240	270	300	330	360
			optische Dichte (OD ₅₀₀)							
CTR 1	0		0,05	0,12	0,29	0,87	3,09	2,79	2,86	3,17
CTR 2	0		0,05	0,08	0,24	0,9	2,55	2,85	3,32	3,05
CTR 3	0		0,05	0,09	0,26	0,94	2,91	2,61	3,51	3,32
		Mittelwert	0,05	0,10	0,26	0,90	2,85	2,75	3,23	3,18
		STDEV/2 ¹	0	0,01	0,02	0,02	0,137	0,06	0,17	0,07
		Vol. TPL [µl]								
G12.1	30	5,62	0,05	0,08	0,25	0,91	1,21	0,87	0,8	0,48
G12.2	25	4,69	0,05	0,17	0,55	1,17	1,62	1,72	1,7	1,67
G12.3	20	3,75	0,05	0,08	0,29	0,93	1,68	2,48	2,4	2,85
G12.4	10	1,88	0,05	0,1	0,29	0,94	2,13	2,52	2,99	3,42
G12.5	5	0,94	0,05	0,11	0,26	1,02	2,59	2,85	3,29	3,53
G12.6	2,5	0,47	0,05	0,11	0,26	1,01	2,55	3,02	3,21	3,69

Abb. 3-28 und Tab. 3-17: Antimikrobielles Profil des Tripeptids G12 gegen *B. subtilis* 168. Die Inkubation der Zellen mit der Tripeptidstammlösung erfolgte nach 240 Minuten Zellwachstum über einen Zeitraum von 120 Minuten. Die graphisch dargestellte optische Dichte der Wachstumskontrolle wurde als Mittelwert aus drei Kontrollkulturen (CTR 1-3) dargestellt. Abkürzungen: WZ = Wachstumszeit, TPL = Tripeptidlösung, CTR = Kontrolle, STDEV = Standardabweichung

¹die maximale relative Standardabweichung der Messwerte lag bei ± 10 %

Nachfolgend zeigt Tabelle 3-18 die absolute und relative Zu- bzw. Abnahme der optischen Dichte (OD₅₀₀) der Bakterienkulturen unter dem Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen des Tripeptids G12:

Probe	gemessene OD ₅₀₀ (WZ = 240 min)	gemessene OD ₅₀₀ (WZ = 360 min)	Zunahme der OD ₅₀₀ absolut ($\Delta t = 120$ min)	Zunahme der OD ₅₀₀ relativ [%] ($\Delta t = 120$ min)
Kontrollproben	0,9*	3,18*	2,28	100
G12 30 μ M	0,91	0,48	zytotoxisch	0
G12 25 μ M	1,17	1,67	0,5	21,93
G12 20 μ M	0,93	2,85	1,92	84,21
G12 10 μ M	0,94	3,42	2,48	108,77
G12 5 μ M	1,02	3,53	2,51	110,09
G12 2,5 μ M	1,01	3,69	2,68	117,54

Tab. 3-18: Ermittlung der absoluten und relativen Zu- bzw. Abnahme der optischen Dichte (OD₅₀₀) in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen von Tripeptid G12. Die relative Zunahme der optischen Dichte der unterschiedlich konzentrierten Substanzen wurde auf die Zunahme der OD₅₀₀ der Wachstumskontrolle bezogen. Die zytotoxische Wirkung von Tripeptid G12 ist durch die Abnahme der OD₅₀₀ charakterisiert.

Abkürzungen: WZ = Wachstumszeit; Δt = Inkubationszeit

*berechneter Mittelwert der optischen Dichte (OD₅₀₀) aus drei Kontrollproben

Tripeptidkonzentrationen unter 10 μ M übten keinen inhibitorischen Einfluß auf das Wachstum der Zellen aus. Konzentrationen ab 30 μ M zeigten eine zytotoxische Wirkung auf das Wachstum des Testorganismus. Dies ist an der Abnahme der optischen Dichte über den Inkubationszeitraum von 120 Minuten erkennbar (s. Tab. 3-18). Der IC₅₀-Wert wurde nachfolgend mittels Regressionsanalyse bestimmt (s. Abb. 3-29):

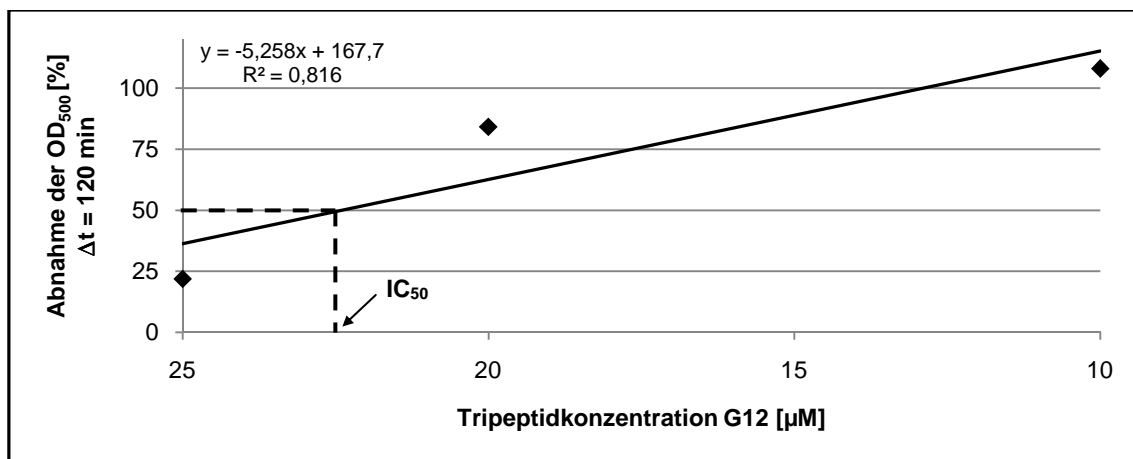


Abb. 3-29: Ermittlung des IC₅₀-Wertes von Tripeptid G12 gegen *B. subtilis* 168. Aufgetragen ist die relative Abnahme der OD₅₀₀ (in %) unter Inkubationsbedingungen (Wachstumszeit: 240 bis 360 min) gegen die Kontrollkultur in Abhängigkeit der Probenkonzentration.

Die durch lineare Regressionsanalyse bestimmte IC₅₀ des Tripeptids G12 lag bei 22,4 μ M. Aufgrund fehlender Probenverfügbarkeit konnte die antimikrobielle Potenz im Konzentrationsbereich zwischen 10 und 25 μ M nicht näher bestimmt werden.

3.4.6 Zytotoxizität der Tripeptide G10, G11, G12 und G27 gegen eukaryotische NALM-6-Zellen

Zur Untersuchung der Zytotoxizität der Tripeptide G10, G11, G12 und G27 gegen eukaryotische NALM-6-Zellen wurden Substanzkonzentrationen von 50, 100 und 150 μM in einer maximalen DMSO-Konzentration von 0,4 % (v/v) im Assay eingesetzt. Daneben wurde der Einfluß des Lösungsmittels DMSO auf das Wachstum der Zellen in Konzentrationen zwischen 0,25 – 1 % (v/v) analysiert (s. auch 6.5.1). Durch Anwendung des automatischen Zellzählgerätes *Casy[®] Model TT* (innovatis AG, Reutlingen, Deutschland) konnte die Zellzahl und –vitalität der NALM-6-Zellen bestimmt werden (s. 2.2.3). Der Probenzug erfolgte täglich über einen Zeitraum von vier Tagen. Nachfolgend ist exemplarisch der Einfluß des Tripeptids G12 auf das Zellwachstum und die Zellvitalität von NALM-6-Zellen gezeigt. Zuerst wurde das Zellwachstum unter dem Einfluß variabler Tripeptid- und DMSO-Konzentrationen ermittelt:

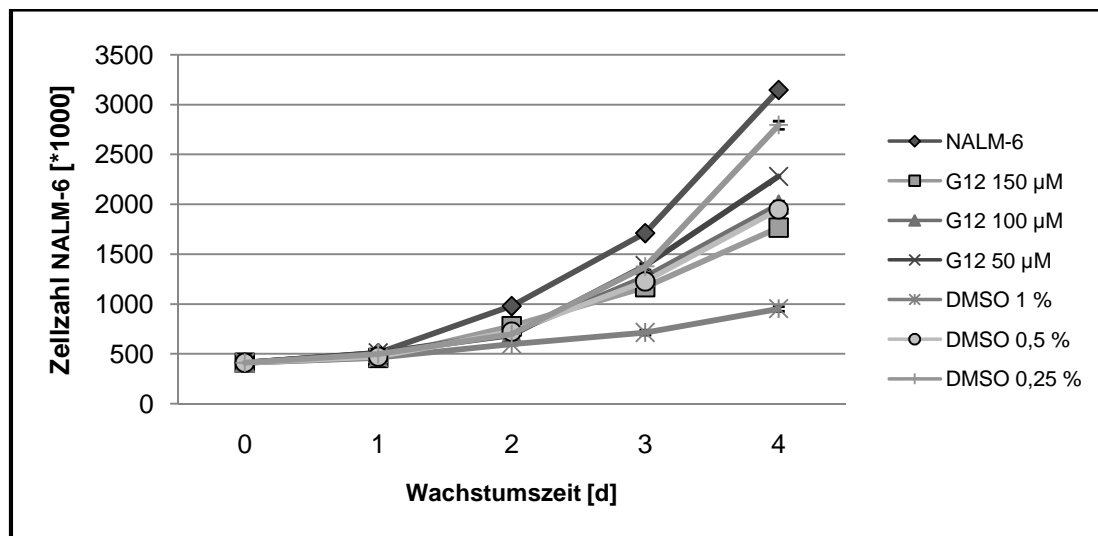


Abb. 3-30: Wachstumskurve der NALM-6-Zellen unter dem Einfluss variabler Konzentrationen von Tripeptid G12 (n = 2). Als Wachstumskontrolle dienten Zellkulturen ohne Inhibitor (NALM-6). Die mit DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen inkubierten Zellkulturen dienten der Bewertung des wachstumshemmenden Einflusses des Lösungsmittels DMSO. Die maximale relative Standardabweichung der Messwerte betrug $\pm 10\%$.

Zusätzlich wurde die relative Zellvitalität ermittelt (s. 2.2.3 und 6.5.2), die dem Anteil vitaler Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl entspricht und ein Maß für die Zytotoxizität der getesteten Substanzen darstellt. Nachfolgend ist exemplarisch die Zellvitalität der NALM-6-Zellen unter dem Einfluß des Tripeptids G12 und des Lösungsmittels DMSO dargestellt:

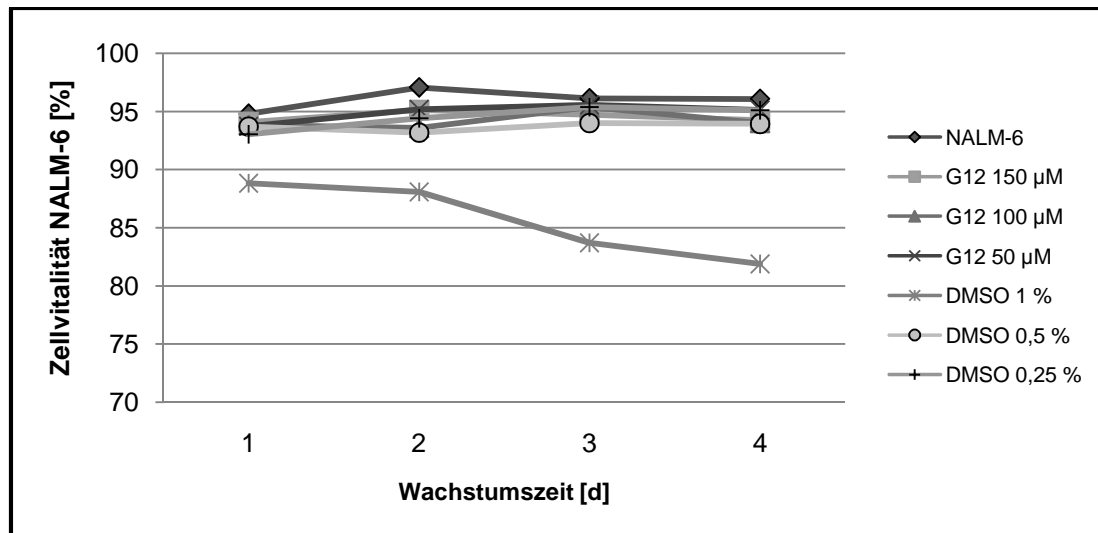


Abb. 3-31: Zellvitalität der NALM-6-Zellen unter dem Einfluß von Tripeptid G12 bzw. DMSO.

Substanzkonzentrationen des Tripeptids G12 bis 150 µM zeigten keinen Einfluß auf die Zellvitalität der NALM-6-Zellen. Der Einfluß des Tripeptids G12 und des verwendeten Lösungsmittels DMSO auf das Zellwachstum bzw. die Zellvitalität der NALM-6-Zellen ist nachfolgend tabellarisch zusammengestellt:

Tripeptid- bzw. DMSO-Konzentration	relative Zellzahl (%) ¹	Zellvitalität (%)
NALM-6 (WK)	100	96,1
G12 150 µM (0,4 %)	56,1	94,3
G12 100 µM (0,2 %)	63,5	94,0
G12 50 µM (0,1 %)	72,4	95,1
DMSO 1 %	30,3	81,9
DMSO 0,5 %	65,9	93,9
DMSO 0,25 %	88,9	91,1

Tab 3-19: Relative Zellzahl und -vitalität der NALM-6-Zellen. Die relative Zellzahl entspricht der durchschnittlichen Gesamtzellzahl nach 4 Tagen, welche auf die durchschnittliche Zellzahl der Wachstumskontrollen (WK) bezogen wurde. Die relative Zellvitalität entspricht dem Anteil vitaler Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl.

¹die maximale relative Standardabweichung der Messwerte betrug ± 10 %

Wie Abbildung 3-30 und Tabelle 3-19 zeigen, besitzt das Tripeptid G12 eine inhibitorische Aktivität auf das Zellwachstum der NALM-6-Zellen (zytostatische Wirkung). Zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes wurde die relative Zellzahl der NALM-6-Kulturen nach vier Tagen ermittelt, indem die durchschnittliche Gesamtzellzahl der mit Tripeptid G12 inkubierten Kulturen auf die der Wachstumskontrollen (WK) bezogen wurde (s. Abb. 3-31).

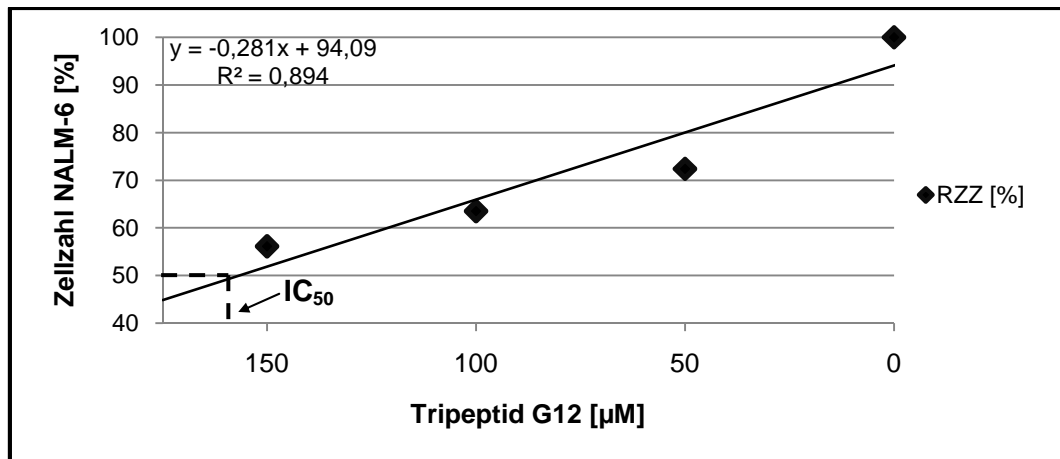


Abb. 3-31: IC₅₀ des Tripeptids G12 (in 0,4 – 0,1 % DMSO) gegenüber NALM-6 Zellen (n = 2). Die maximale Standardabweichung der Messwerte betrug ± 10 %. Abkürzungen: RZZ = relative Zellzahl

Da neben der wachstumsinhibitorischen Wirkung der Tripeptide auch DMSO als Lösungsmittel einen Einfluß auf das Zellwachstum zeigte, muß dieser Einfluß bei der Bewertung des IC₅₀-Wertes berücksichtigt werden. Zur Bestimmung des Lösungsmiteleinflusses auf das Zellwachstum der NALM-6-Zellen wurde die relative Zellzahl der mit DMSO inkubierten Kulturen auf die Zellzahl der entsprechenden NALM-6 Wachstumskontrollen bezogen. Mittels Regressionsanalyse konnte gezeigt werden, dass DMSO-Konzentrationen von über 0,7 % (v/v) bereits eine inhibitorische Aktivität von über 50 % auf das Zellwachstum von NALM-6 Zellen besitzen (s. 6.5.1, Abb. 6-12).

Nach der Auswertung des NALM-6-Zytotoxizitätsassays zeigte sich unter dem Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen der Tripeptide G10, G11, G12 und G27 eine konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition (zytostatischer Effekt). Der IC₅₀-Wert bezogen auf das Zellwachstum der NALM-6 Zellen lag für das Tripeptid G12 unter Einbeziehung des inhibitorischen Effektes des Lösungsmittels DMSO bei 156,9 µM (s. Abb. 3-31). Die Bestimmung der Zellvitalität, als Mass für die Zytotoxizität einer Substanz, zeigte einen nur minimalen Einfluss des Tripeptids G12. Die maximal eingesetzte Konzentration des Tripeptids G12 von 150 µM hatte keinen Einfluss auf die Zellvitalität der NALM-6-Zellen (s. Tab. 3-19). Nach Abschluss der elektronischen Zellzählung bzw. der Bestimmung der Zellvitalität wurden die Zellkulturen zur morphologischen Charakterisierung fotografiert:

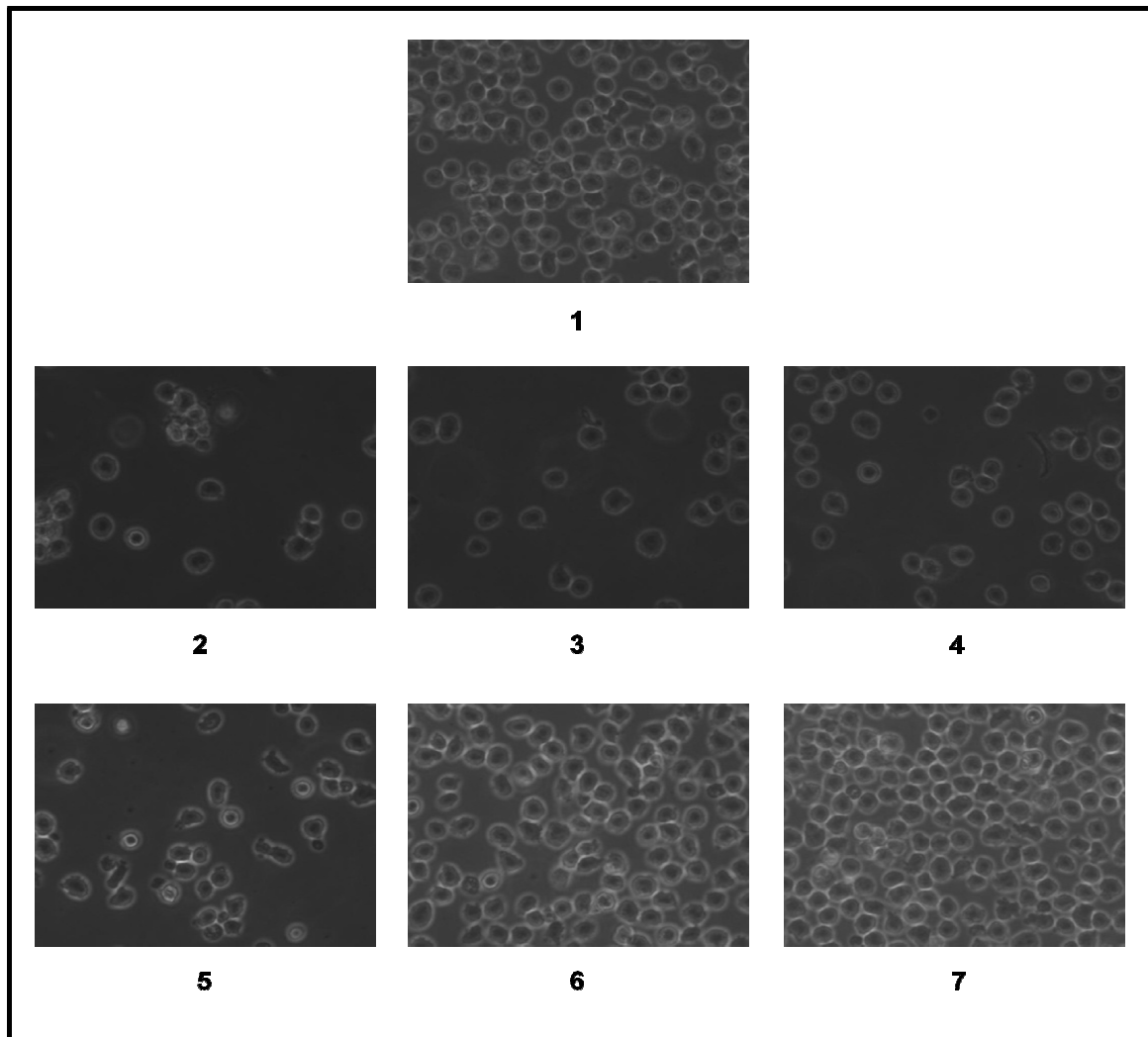


Abb. 3-32: Aufnahmen der Zellkulturen nach viertägiger Inkubation mit Tripeptid G12 bzw. DMSO (s. auch Tab. 3-19). 1 = NALM-6 Kontrollkultur, 2 = G12 (150 μM), 3 = G12 (100 μM), 4 = G12 (50 μM), 5 = DMSO (1 % (v/v)), 6 = DMSO (0,5 % (v/v)), 7 = DMSO (0,25 % (v/v))

Die fotografischen Aufnahmen der Zellkulturen zeigten bei den mit Tripeptid G12 inkubierten Zellen (Bild 2 – 4) eine deutlich geringere Zellzahl im Vergleich zur NALM-6-Kontrollkultur. Auch der Einfluss von DMSO (1 %, (v/v)) zeigte diesen Effekt (Bild 5). Deutliche morphologische Zellveränderungen (erkennbare zerstörte Zellmembranen bzw. isolierte Zellkerne) sind jedoch unter dem Einfluss von G12 durch die verwendeten Tripeptidkonzentrationen nicht erkennbar. Dies bestätigte den beobachteten Effekt von G12 auf das Zellwachstum, ohne Beeinflussung der Zellvitalität (s. Tab. 3-19). Die Definition der Zellvitalität als Maß für die Zytotoxizität einer Testsubstanz, beschreibt das Tripeptid G12 in Konzentrationen bis zu 150 μM als nicht zytotoxisch gegen eukaryotische NALM-6 Zellen. Durch den Vergleich der IC_{50} -Werte des Tripeptids G12 bezogen auf die Wachstumsinhibitionswirkung gegen prokaryotische Zellen (*B. subtilis* 168; s. 3.4.5, Abb. 3-

31) bzw. eukaryotische NALM-6-Zellen, konnte eine mehr als 7-fach höhere selektive inhibitorische Aktivität der Substanz gegen bakterielle Zellen nachgewiesen werden.

3.5 Pentazyklische Triterpene als antimikrobielle Inhibitoren der ZFTT-Reaktion

Zur Erweiterung der Substanzbibliothek potentieller antimikrobieller Inhibitoren der ZFTT-Reaktion wurde die Aktivität der Naturstoffgruppe der pentazyklischen Triterpene im zellfreien Assay und gegen unterschiedliche bakterielle Testorganismen charakterisiert. Das Ziel dieser Studie im Rahmen dieser Arbeit war die Ermittlung der antimikrobiellen Aktivität der analysierten Triterpenstandards, sowie die Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen, bezogen auf die inhibitorische Aktivität im ZFTT-Assay.

3.5.1 ZFTT-Aktivität von Boswelliasäuren

Die Bestimmung der Aktivität ausgewählter Boswelliasäurederivate aus *Boswellia serrata* (Familie: *Burseraceae*) im ZFTT-Assay erfolgte durch Verwendung der in DMSO gelösten Substanzen in einer Probenkonzentration von 500 μM . Nachfolgend ist die inhibitorische Aktivität der Substanzen durch Angabe der relativen Assayinhibition (RAI) dargestellt (s. Abbildung 3-34 und Tabelle 3-20).

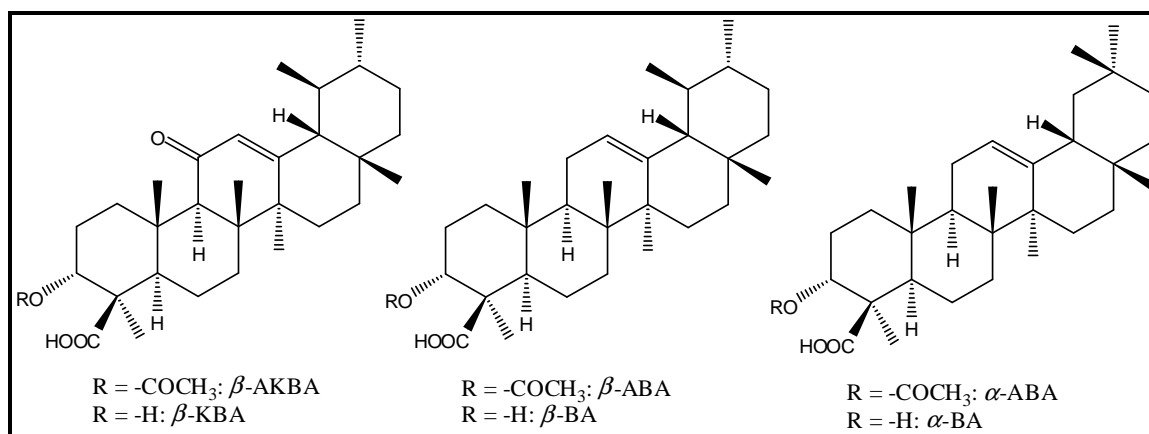
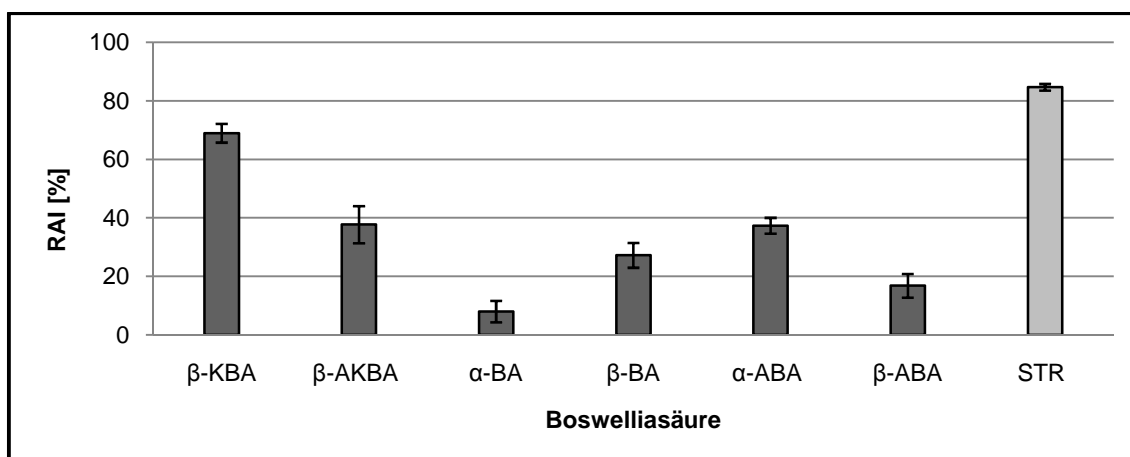


Abb. 3-33: Strukturformeln der analysierten Boswelliasäuren aus *B. serrata*. β -AKBA = 3-O-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure; β -KBA = 11-Keto- β -boswelliasäure; β -ABA = 3-O-Acetyl- β -boswelliasäure; β -BA = β -Boswelliasäure; α -ABA = 3-O-Acetyl- α -boswelliasäure; α -BA = α -Boswelliasäure



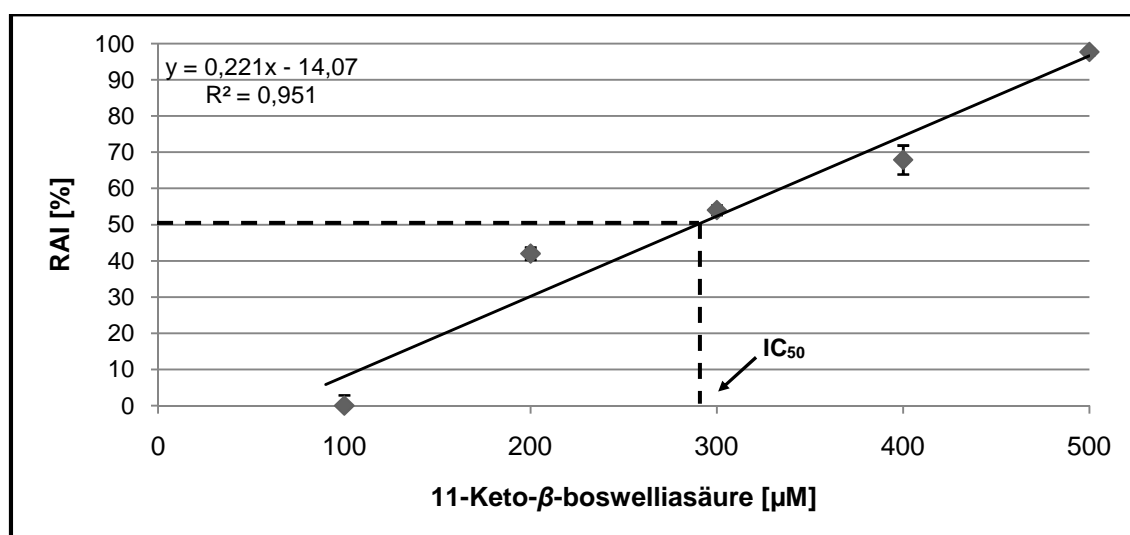
Boswelliasäure bzw. IK	Konzentration [µM]	RAI [%] ¹
β-KBA	500	68,9 ± 3,2
β-AKBA	500	37,7 ± 6,3
α-BA	500	8 ± 3,7
β-BA	500	27,2 ± 4,2
α-ABA	500	37,3 ± 2,7
β-ABA	500	16,8 ± 4
Streptomycin (STR)	10	84,7 ± 1,1*

Abb. 3-34 und Tab. 3-20: Inhibitorische Aktivität der Boswelliasäuren aus *B. serrata* im ZFTT-Assay (n = 3). Die relative Assayinhibition entspricht der ZFTT-Assayinhibition des Inhibitors bezogen auf die Kontrollreaktion (ohne Inhibitor). Streptomycinsulfat wurde als Inhibitionskontrolle eingesetzt. RAI = relative Assayinhibition

*die relative Assayinhibition entspricht der Komplettinhibition der TT-Reaktion

¹die angegebene relative Standardabweichung wurde aus drei Messwerten berechnet

Die höchste relative ZFTT-Assayinhibition zeigte mit einer RAI von knapp 70 % die Substanz 11-Keto-β-boswelliasäure (β-KBA). Zur näheren Charakterisierung des inhibitorischen Potentials dieser Verbindung wurde der IC₅₀-Wert von β-KBA im ZFTT-Assay bestimmt (s. Abb. 3-34 und Tab. 3-21):



11-Keto- β -boswelliasäure (β -KBA)	
Konzentration [μ M]	RAI [%]
500	97,7 \pm 0,84
400	67,9 \pm 4
300	54 \pm 1,3
200	42 \pm 1,7
100	0 \pm 2,9*

Abb. 3-34 und Tab. 3-21: IC₅₀ von β -KBA im ZFTT-Assay (n = 3). Die konzentrationsabhängige relative Assayinhibition (RAI) wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten gegen Kontrollreaktionen (ohne Inhibitor) bestimmt.

*die GFP-Fluoreszenz lag über der der Kontrollreaktion und wurde auf Null gesetzt

Danach ergab sich für β -KBA ein IC₅₀-Wert von 290 μ M im ZFTT-Assay.

3.5.2 Struktur-Wirkungsbeziehung ausgewählter pentazyklischer Triterpene

Wie der Literatur entnommen werden kann, zeigen hauptsächlich die mit einer 11-Ketogruppe ausgestatteten pentazyklischen Triterpene (z. B. β -KBA, β -AKBA) unterschiedlichste pharmakologische Wirkungen (Ammon, 2002; Weber *et al.*, 2006; s. 4.3). Zur Analyse des Einflusses der 11-Ketogruppe auf die inhibitorische Aktivität im ZFTT-Assay wurden ausgewählte pentazyklische Triterpene mit bzw. ohne 11-Ketogruppe im zellfreien Assay untersucht. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte durch Verwendung der in DMSO gelösten Substanzen in einer Probenkonzentration von 500 μ M. Nachfolgend ist die inhibitorische Aktivität der Substanzen durch Angabe der relativen Assayinhibition (RAI) dargestellt (s. Abb. 3-36 und Tab. 3-22).

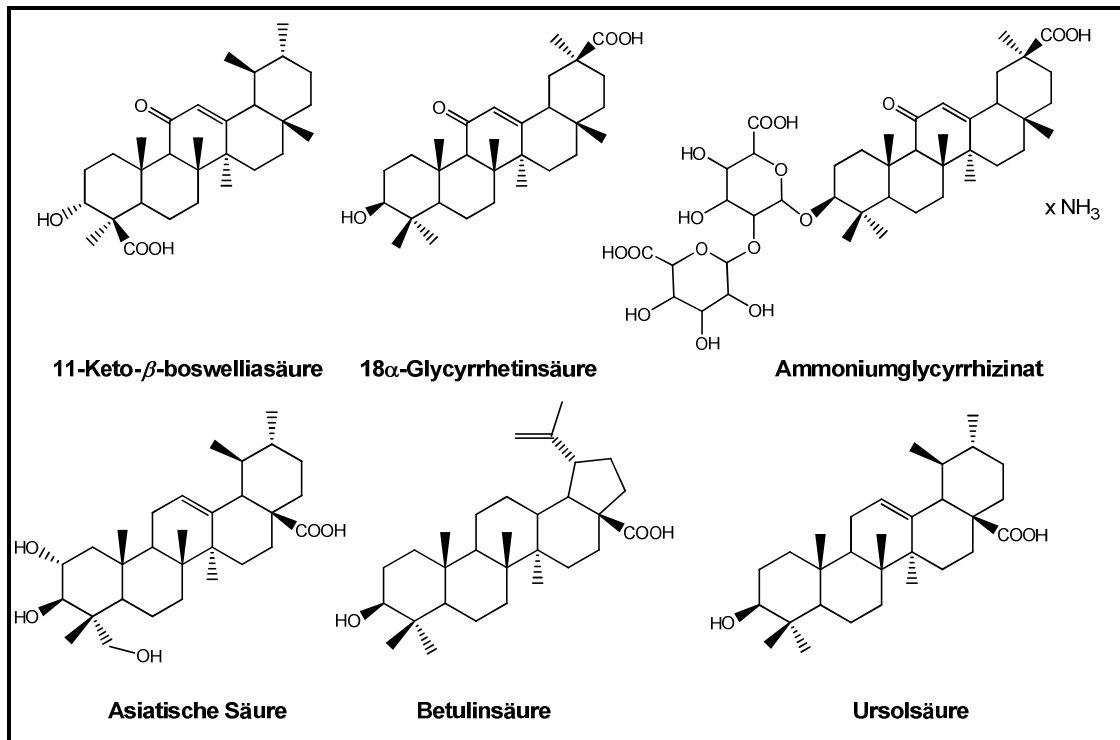
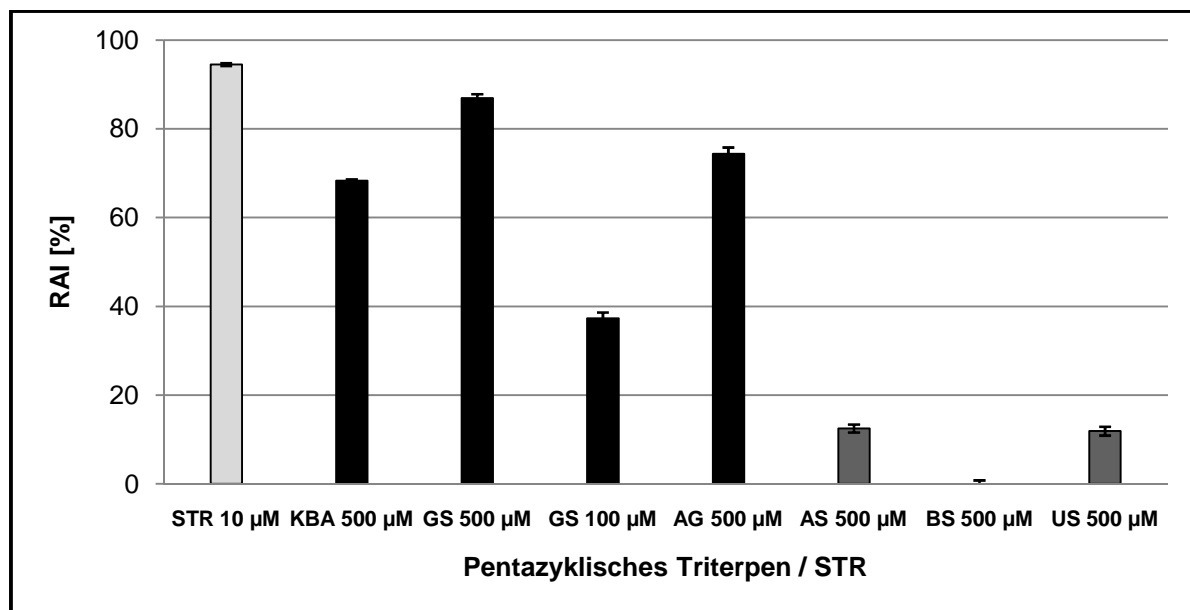


Abb.3-35: Pentazyklische Triterpene mit bzw. ohne 11-Ketogruppe.



Pentazyklisches Triterpen	11-Ketoverbindung	Konzentration [μ M]	RAI [%]
β -KBA (KBA)	+	500	68,3 \pm 0,3
Glycyrrhetinsäure (GS)	+	500	86,9 \pm 0,9
		100	37,3 \pm 1,3
Ammoniumglycyrrhizinat (AG)	+	500	74,4 \pm 1,4
Asiatische Säure (AS)	-	500	12,5 \pm 0,9
Betulinsäure (BS)	-	500	0 \pm 0,8*
Ursolsäure (US)	-	500	11,9 \pm 1,0
Streptomycin (STR)		10	94,5 \pm 0,3

Abb. 3-36 und Tab. 3-22: Die relative Assayinhibition (RAI) pentazyklischer Triterpene mit bzw. ohne 11-Ketogruppe im Molekül bzw. dem Translationsinhibitor Streptomycinsulfat (n = 3).

*Die GFP-Fluoreszenz lag über der der Kontrollreaktion und wurde auf Null gesetzt.

Das Ergebnis der Aktivitätsbestimmung pentazyklischer Triterpene im zellfreien TT-Assay zeigte eine deutlich höhere Aktivität der Substanzen mit 11-Ketogruppe (KBA, GS, AG). In Probenkonzentrationen von 500 μM wies Glycyrrhetinsäure (GS) mit über 85 % relativer Assayinhibition die höchste Aktivität auf. Daher wurde GS zusätzlich in einer Probenkonzentration von 100 μM im Assay eingesetzt. Auch in dieser wesentlich geringeren Konzentration zeigte sich noch eine annähernd 40 %-ige relative Assayinhibition durch GS. Insgesamt konnte für die analysierten pentazyklischen Triterpene mit 11-Ketogruppe eine durchschnittlich ca. 70 % höhere Inhibition der ZFTT-Reaktion im Vergleich zu den Vertretern ohne 11-Ketogruppe in Konzentrationen bis 500 μM nachgewiesen werden.

3.5.3 Antimikrobielles Profil ZFTT-aktiver pentazyklischer Triterpene (11-Ketoverbindungen)

Die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität pentazyklischer Triterpene erfolgte durch die Bestimmung der MHK gegen den Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* 168 (s. 2.2.2.1) in Probenkonzentrationen zwischen 250 μM und 0,5 μM .

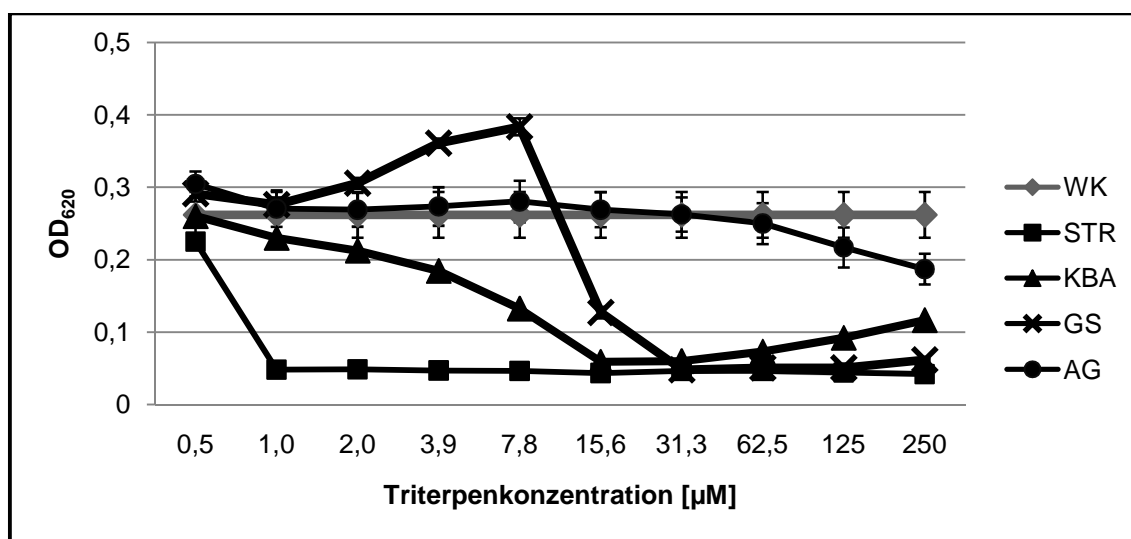


Abb. 3-37: Antimikrobielles Profil ausgewählter Triterpenstandards gegen *B. subtilis* 168. Die Wachstumskontrolle (WK) wurde als Referenz auf jeden Konzentrationsmesspunkt bezogen und entspricht einer durchschnittlichen optischen Dichte (OD_{620}) von 20 Kontrollkulturen (ohne Inhibitor). Als Inhibitionskontrolle wurde Streptomycinsulfat (STR) in einer Startkonzentration von 2 mg/ml eingesetzt. Die maximale relative Standardabweichung der Messwerte betrug $\pm 15\%$.

Abkürzungen: KBA = 11-Keto- β -boswelliasäure; GS = Glycyrrhetinsäure; AG = Ammoniumglycyrrhizinat.

Daneben wurde in Kooperation mit Dr. T. Wichelhaus die antimikrobielle Aktivität der ZFTT-aktiven Triterpenderivate β -KBA, Glycyrrhetinsäure und Ammoniumglycyrrhizinat gegen humanpathogene Testorganismen bestimmt (s. Tab. 3-23, 2.2.2.2).

Triterpenstandard	Molmasse [Da]	<i>Staph. aureus</i> (ATCC 29213)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)
		Minimale Hemmkonzentration - MHK [$\mu\text{g/ml}$] / [μM]		
β -KBA	470,7	32 / 68	>128 / > 272	16 / 34
Glycyrrhetinsäure	470,7	64 / 136	>128 / > 272	64 / 136
Ammoniumglycyrrhizinat	840	>128 / > 152	>128 / > 152	>128 / > 152

Tab. 3-23: Antimikrobielles Potential ausgewählter pentazyklischer Triterpene gegen humanpathogene Bakterienstämme. MHK-Werte, die über der maximalen eingesetzten Substanzkonzentration lagen waren nicht bestimmbar.

Die antimikrobielle Aktivität der im zellfreien TT-Assay aktiven pentazyklischen Triterpene mit einer 11-Ketogruppe zeigte sich nur für die Verbindungen β -KBA und Glycyrrhetinsäure. Für das Glucuronid der Glycyrrhetinsäure Ammoniumglycyrrhizinat konnte weder gegen *B. subtilis* 168 noch gegen die pathogenen Bakterienstämme eine messbare Wachstumsinhibition nachgewiesen werden. Als antimikrobiell potenteste Verbindung wurde das Boswelliasäurederivat β -KBA mit MHK-Werten zwischen 15,6 μM gegen *B. subtilis* 168 und 34 – 68 μM gegen die Gram-positiven Testorganismen *S. aureus* und *E. faecalis* ermittelt.

3.6 Bakterielle Kulturüberstände als Quelle antimikrobieller ZFTT-Inhibitoren

Neben der Verwendung definierter Naturstoffe und synthetischer Verbindungen sollte die Anwendbarkeit des ZFTT-Assays zum Auffinden antimikrobieller Substanzen aus rohen bakteriellen Kulturüberständen unterschiedlicher Stämme des Gram-positiven Bakteriums *B. subtilis* überprüft werden. Da *B. subtilis* mehr als zwei Dutzend strukturell heterogene antimikrobiell wirksame Substanzen produziert und diese an sein Kulturmedium abgibt, eignen sich die Kulturüberstände dieses Organismus besonders für den direkten Einsatz im Assay. Die Hauptfraktion dieser antimikrobiellen Substanzen stellen Peptidantibiotika aus den Gruppen der Lantibiotika (z. B. Subtilin, Ericin A und S, Mersacidin) und der Lipopeptide (z. B. Surfactin, Fengycin, Iturin) dar. Daneben werden antimikrobiell aktive Substanzen aus den Gruppen der Polyketide (z. B. Difficidin, Bacillaen), der antimikrobiellen Phospholipide (Bacilysozin) und Vertreter weiterer strukturell heterogener Substanzklassen synthetisiert (Stein, 2005). Die eingesetzten bakteriellen Kulturüberstände wurden nach Zentrifugation der verwendeten Zellkulturen gewonnen (s. 2.2.2.4). Zusätzlich wurde die Aktivität reiner Standardsubstanzen aus den Gruppen der Lipopeptide (Surfactin) und der Lantibiotika (Nisin aus *Lactococcus lactis*) als Referenzen im ZFTT-Assay untersucht. Zur Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität wurden schließlich ausgewählte aktive Kulturüberstände in unterschiedlichen Verdünnungen gegen humanpathogene und multiresistente Bakterien eingesetzt.

3.6.1 ZFTT-Aktivität von Nisin und Surfactin

Um die Aktivität von Vertretern antimikrobieller Lantibiotika bzw. Lipopeptide im ZFTT-Assay zu analysieren, wurden Nisin und Surfactin als Reinsubstanzen verwendet. Der antimikrobielle Wirkmechanismus des amphiphilen zyklischen Lipopeptids Surfactin (s. Abb. 3-38) besteht v. a. aus der Zerstörung der bakteriellen Phospholipid-Doppelschicht durch seine detergensartige Wirkung, aufgrund der hohen Oberflächenaktivität gegenüber biologischen Membranen (Carillo *et al.*, 2003).

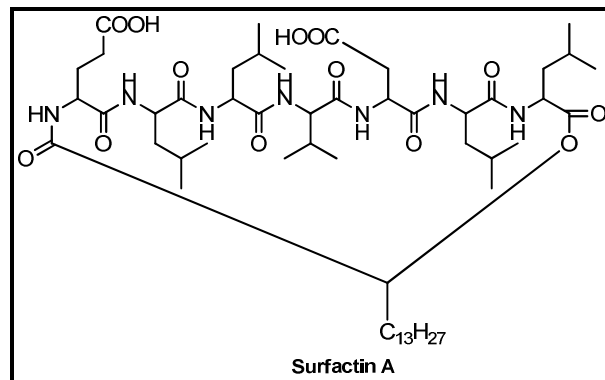


Abb. 3-38: Antimikrobielles Lipopeptid Surfactin A aus *B. subtilis*.

Das kationische Lantibiotikum Nisin aus *L. lactis* (s. Abb. 3-39) entfaltet seine antimikrobielle Wirkung v. a. durch Ausbildung spannungsabhängiger Poren in der bakteriellen Zytoplasmamembran durch spezifische Bindung an die Pyrophosphatgruppe der Zellwandbiosynthesevorstufe Lipid II (Hyde *et al.*, 2006; Breukink *et al.*, 2006). Für Nisin konnte eine antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich nachgewiesen werden (Thomas *et al.*, 2000).

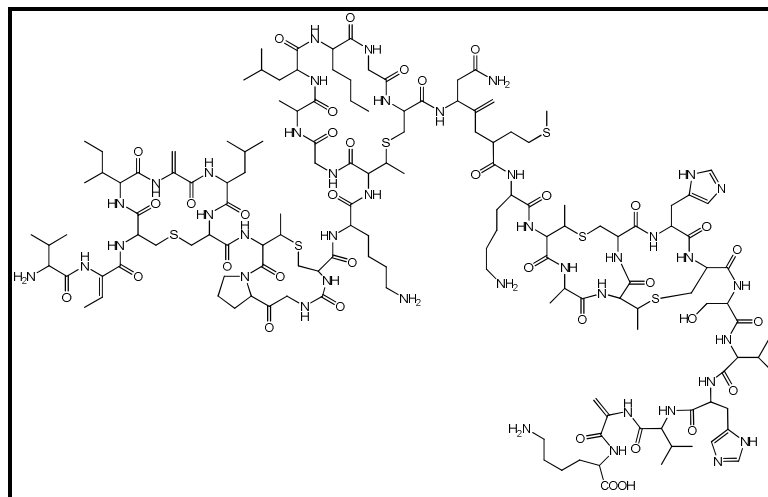
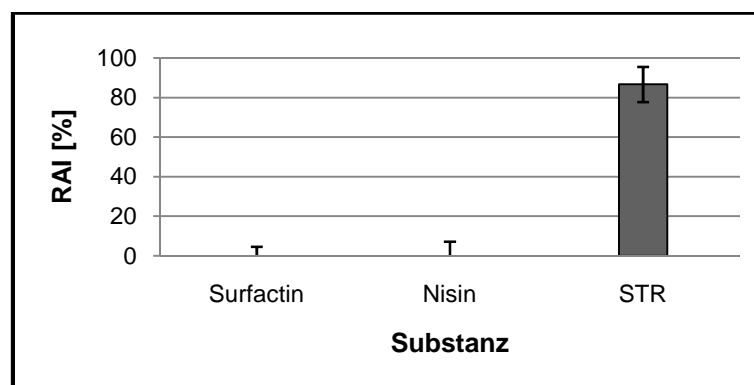


Abb. 3-39: Antimikrobielles Lantibiotikum Nisin aus *L. lactis*.

Nisin wurde in einer Konzentration von 1 mM (in 1 % DMSO (v/v)) im Assay eingesetzt. Für Surfactin wurde eine Konzentration von 9,7 μM (entsprechend: 10 $\mu\text{g/ml}$; in 1 % DMSO (v/v)) gewählt, da diese Konzentration im Bereich der kritischen Mizellbildungskonzentration ($\text{CMC}_{\text{Surfactin}} = 8 - 10 \mu\text{M}$) der Substanz liegt.

Nachfolgend ist die ZFTT-Aktivität von Surfactin und Nisin durch Angabe der relativen Assayinhibition (RAI) charakterisiert:

Probe	Konzentration	RAI [%] ¹
Surfactin	9,7 μM	0*
Nisin	1 mM	0*
Streptomycinsulfat	10 μM	86,6 ²



Tab. 3-24 und Abb. 3-39: Relative ZFTT-Assayinhibition (RAI) des Lipopeptids Surfactin (9,7 μM) und des Lantibiotikums Nisin (1 mM); (n = 2).

*die absolute GFP-Fluoreszenz lag über der der Kontrollreaktion (Wert auf Null gesetzt)

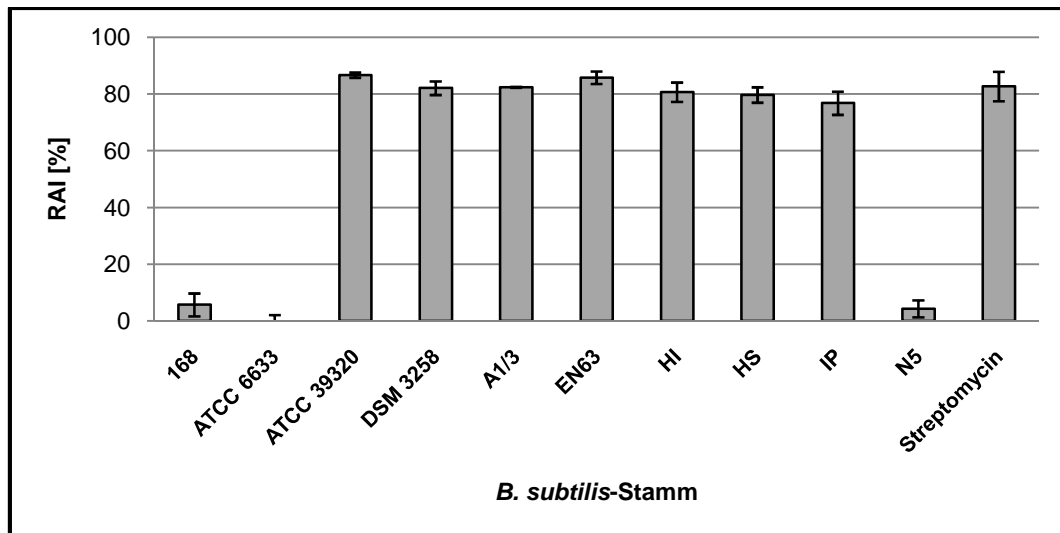
¹die maximale relative Standardabweichung lag bei $\pm 10 \%$

²der Messwert entsprach der Komplettinhibition der ZFTT-Reaktion

Für das Lantibiotikum Nisin und das Lipopeptid Surfactin konnte in den eingesetzten Konzentrationen keine Minderung der GFP-Expression im ZFTT-Assay nachgewiesen werden.

3.6.2 ZFTT-Aktivität bakterieller Kulturüberstände

Zur Analyse der ZFTT-Aktivität ausgewählter bakterieller Kulturüberstände unterschiedlicher *B. subtilis*-Stämme wurden die Überstände in einer Verdünnung von 1/20 im ZFTT-Assay eingesetzt. Nachfolgend ist die inhibitorische Aktivität der unterschiedlichen Kulturüberstände durch Angabe der relativen Assayinhibition (RAI) charakterisiert (s. Abb. 3-40 und Tab. 3-25):



Kulturüberstand (<i>B. subtilis</i> -Stamm)	synthetisierte antimikrobielle Stoffgruppe			RAI (%) ¹
	Lantibiotika	Lipopeptide	Polyketide	
168	+	-	-	5,7 ± 4,9
ATCC 6633	+	+	?	0 ± 2,1**
ATCC 39320	?	?	+	86,7 ± 5,8 ²
DSMZ 3258	-	+	?	82,1 ± 2,4 ²
A1/3	-	+	+	82,4 ± 0,9 ²
EN63*	?	?	?	85,8 ± 2,2 ²
HI*	-	+	?	80,7 ± 3,4 ²
HS*	+	+	?	79,7 ± 2,7 ²
IP*	-	+	?	76,8 ± 4,1 ²
N5*	+	+	?	4,3 ± 3,0
Streptomycin (IK)				82,7 ± 5,2 ²

Abb. 3-40 und Tab. 3-25: Graphische Darstellung des ZFTT-Inhibitions potentials analysierter bakterieller Kulturüberstände unterschiedlicher *B. subtilis*-Stämme (oben) und tabellarische Übersicht über das Spektrum bekannter synthetisierter antimikrobieller Substanzen der unterschiedlichen *B. subtilis*-Stämme, sowie deren ZFTT-Assayinhibitions potential (unten); (n = 3). Die relative Assayinhibition (RAI) wurde durch Bezug auf die durchschnittliche GFP-Fluoreszenz nicht inhibierter Kontrollreaktionen ermittelt. Streptomycinsulfat (10 µM) wurde als Inhibitionskontrolle (IK) eingesetzt.

Legende: + = Substanz(en) der Stoffgruppe wird/werden produziert; - = keine Produktion; ? = nicht bekannt; * Naturisolate; **die absolute GFP-Fluoreszenz lag über der der Kontrollreaktion (Wert auf Null gesetzt); ¹die relative Standardabweichung wurde aus drei Messwerten berechnet; ²der Messwert entsprach der Komplettinhibition der TT-Reaktion (keine Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz durchgeführt)

Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung zeigten einen überraschend hohen Anteil stark inhibitorisch wirkender bakterieller Kulturüberstände im Assay. Die RAI der ZFTT-aktiven Kulturüberstände entsprach der Aktivität des Translationsinhibitors Streptomycin (10 µM) und damit einer vollständigen Inhibition der TT-Reaktion.

Der Stamm *B. subtilis* 168, welcher nachweislich keine Polyketide produziert, wurde als ZFTT-inaktiver Referenzstamm eingesetzt. Als ZFTT-aktive Referenzstämme fanden

Produzenten der Polyketid-Antibiotika Difficidin, Oxydifficidin und Bacillaen Verwendung. Dazu gehörten die *B. subtilis*-Stämme ATCC 39320 (Zimmermann *et al.*, 1987) und A1/3 (Hofemeister *et al.*, 2004). Die inhibitorische Wirkung von Difficidin, Oxydifficidin und Bacillaen auf die prokaryotische Translationsreaktion wurde bereits durch den Einsatz der Substanzen in zellfreien Translationssystemen nachgewiesen (Zweerink und Edison, 1987; Patel *et al.*, 1995). Da für die Substanzklassen der Lipopeptide (Surfactin) und Lantibiotika (Nisin) keinerlei ZFTT-Aktivität nachgewiesen werden konnte (s. 3.6.1), liegt die Vermutung nahe, dass die ZFTT-aktiven Komponenten der bakteriellen Kulturüberstände anderen Stoffklassen angehören. Im Rahmen der beschriebenen Studie konnte somit die Eignung des ZFTT-Assays zur Identifizierung aktiver bakterieller Kulturüberstände zur Inhibition der bakteriellen TT-Reaktion nachgewiesen werden.

Ob die ZFTT-Inhibition aktiver Kulturüberstände von *B. subtilis* auf die Anwesenheit niedermolekularer Strukturen (z. B. Polyen-Antibiotika) zurückzuführen ist, wird zukünftig durch Forschungsarbeiten der Mitglieder des AK Prof. Dr. Karas untersucht. Dazu zählen neben der Erarbeitung von Protokollen zur Aufreinigung der Kulturüberstände auch der massenspektrometrische Nachweis vorhandener inhibitorisch wirkender Metaboliten.

3.6.3 Antimikrobielles Profil bakterieller Kulturüberstände

Bakterielle Kulturüberstände unterschiedlicher *B. subtilis*-Stämme, welche sich durch ihre inhibitorische Aktivität auf die prokaryotische zellfreie TT-Reaktion auszeichneten (s. 3.6.2), wurden in Kooperation mit Dr. Thomas Wichelhaus auf ihr antimikrobielles Potential gegen humanpathogene und resistente Bakterien hin untersucht (s. 2.2.2.2). Die Aktivität der eingesetzten Kulturüberstände wurde durch Angabe der noch vorhandenen Inhibition des Zellwachstums in Abhängigkeit der Verdünnung des Überstandes angegeben (s. Tab. 3-26). Kulturüberstände mit geringer antimikrobieller Aktivität gegen humanpathogene Testorganismen (Verdünnungsfaktor: 2 – 4) wurden nicht zusätzlich gegen multiresistente Organismen (MRSA bzw. VRE) eingesetzt.

Kulturüberstand (<i>B. subtilis</i> -Stamm)	ZFTT- Assay- aktivität (s. 3.6.2)	humanpathogene Stämme			resistente Stämme	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	MRSA	VRE
		ATCC 29213	ATCC 25922	ATCC 29212	T2069	VRE 345
Verdünnungsfaktor der minimalen Hemmkonzentration						
168	-	> 2	> 2	> 2		
ATCC 39320	+	16 - 32	8	16	16	64
DSMZ 3258	+	16	> 2	16	8	4 - 8
EN63*	+	2	2	4		
HI*	+	8 - 16	4	8	8	16 - 32
HS*	+	> 2	> 2	8		
IP*	+	8 - 16	2	32	8	n. a.

Tab. 3-26: Tabellarische Übersicht des antimikrobiellen Profils ausgewählter Kulturüberstände verschiedener *B. subtilis*-Stämme (n = 3). Verdünnungsfaktoren von Werten > 2 zeigen eine fehlende Wachstumsinhibition gegen den angegebenen Testorganismus an und können als inaktiv betrachtet werden.
Abkürzungen: MRSA = Methicillin-resistenter *S. aureus*-Stamm; VRE = Vancomycin-resistenter *Enterococcus*-Stamm; n. a. = nicht auswertbar; * = Naturisolate

Das Ergebnis der Bestimmung der MHK ausgewählter Kulturüberstände in Abhängigkeit der eingesetzten Verdünnung zeigte v. a. für die Stämme DSMZ 3258, HI und IP eine hohe antimikrobielle Potenz gegen humanpathogene und resistente Bakterien. Besonders der Kulturüberstand des Stammes *B. subtilis* HI (Naturisolat) besaß eine hohe inhibitorische Aktivität gegen die resistenten Bakterien VRE und MRSA. Gegen VRE zeigte der Überstand von *B. subtilis* HI eine MHK in einer 16 bis 32-fachen Verdünnung und gegen MRSA war die minimale Hemmkonzentration in bis zu 8-facher Verdünnung des Kulturüberstandes nachweisbar. Der Kulturüberstand des Naturisolates *B. subtilis* IP zeigte überraschend die höchste Aktivität gegen *E. faecalis* (in bis zu 32-facher Verdünnung) und eine zusätzliche Aktivität gegenüber MRSA. Die hohe Aktivität des Überstandes des Referenzstamm *B.*

subtilis 39320 (Difficidin-, Oxydifficidin- und Bacillaenproduzent) zeigte sich erwartungsgemäß gegen *S. aureus*, *E. coli*, MRSA und VRE.

3.7 Proteomanalytische Charakterisierung des antimikrobiellen Wirkmechanismus mittels 2D-DIGE

3.7.1 Ermittlung der Proteinbeladungsmenge für die 2D-SDS-PAGE

Die Anzahl der mittels 2-DE aufgetrennten und detektierbaren Proteine hängt von der aufgetragenen Proteinmenge und der Sensitivität der gewählten Proteinfärbemethode ab. Für die im 2D-DIGE Versuch eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe (CyDye™ DIGE Minimalfarbstoffe) ist eine Detektionsgrenze von 0,1 – 0,2 ng Protein beschrieben (Tonge *et al.*, 2001). Um Überladungseffekte auf dem Gel und eine daraus resultierende schlechtere Auflösung der einzelnen Proteinspots zu verhindern, wurde die optimale Proteinbeladungsmenge durch das Auftrennen unterschiedlicher Proteinmengen mittels 2-DE bestimmt. Als Proben dienten variable Mengen zytoplasmatischer Proteine des für den DIGE-Versuch ausgewählten Testorganismus *B. subtilis* 168 (s. 1.6.1). Die Proteine wurden in der ersten Dimension im *pI*-Bereich zwischen 4 und 7 aufgetrennt. Die Wahl dieses *pI*-Bereiches ergab sich aus der Möglichkeit der hoch aufgelösten Darstellung von 2/3 aller Proteine des ausgewählten Modellorganismus (Eymann *et al.*, 2004), sowie des möglichen Abgleiches mit bereits publizierten Referenzkompendien zur Analyse der Wirkmechanismen eingesetzter Testsubstanzen in den DIGE-Studien (s. 1.6.1, 3.7.2 und 3.7.3). Nachfolgend sind vier Gelbilder der mittels 2-DE aufgetrennten Proteine in Absolutmengen zwischen 10 und 100 µg und anschließender Proteinfärbung mit Silber (nach Shevchenko *et al.*, 1996) dargestellt (s. Abb. 3-41):

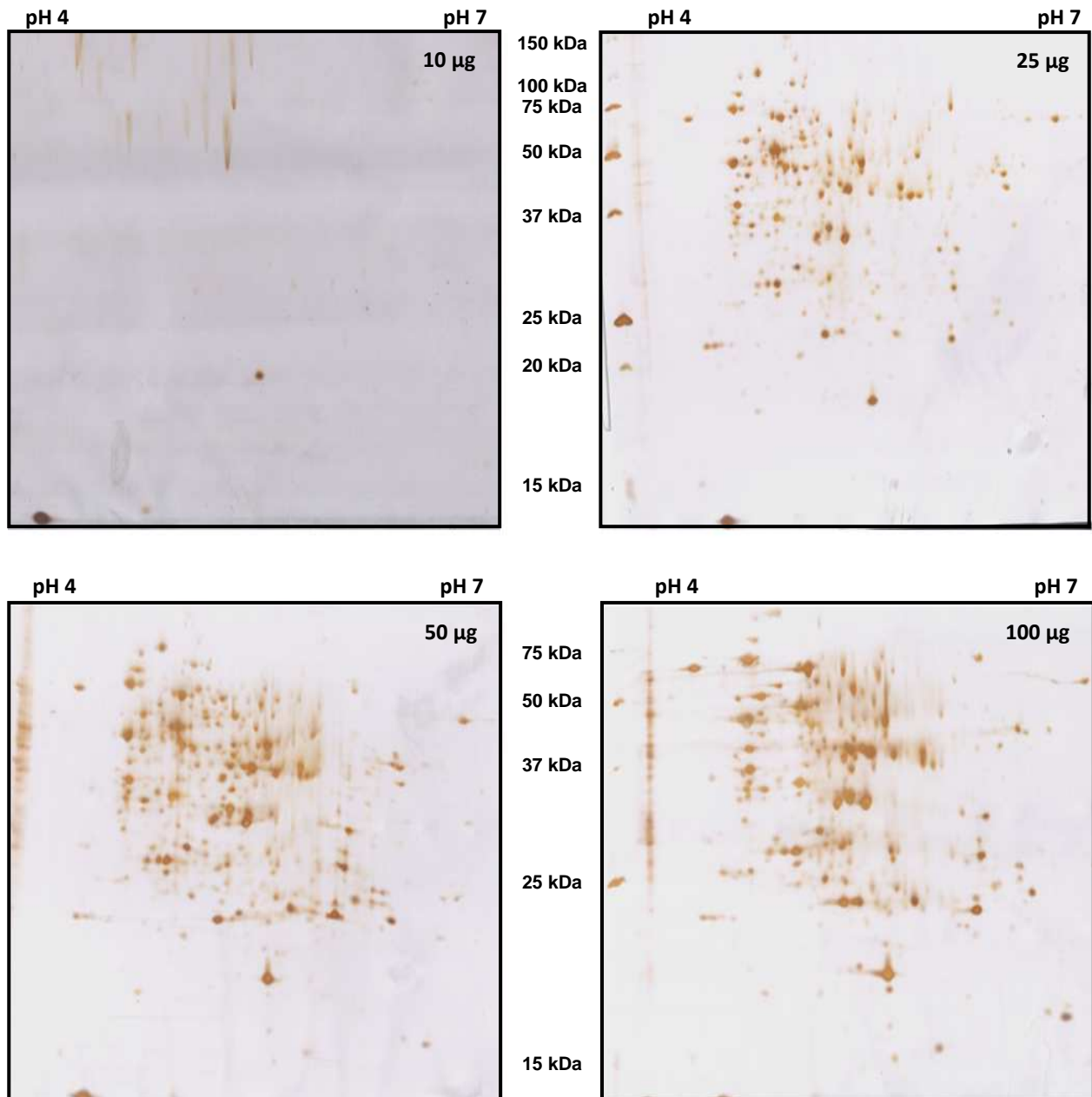


Abb. 3-41: Vier 2D-SDS-Gele mit steigender Proteinbeladung des Proteinlysats von *B. subtilis* (absolute Proteinmengen von links oben nach rechts unten: 10, 25, 50 und 100 µg). Bei allen 4 Gelen lagen folgende experimentelle Bedingungen vor: 1. Dimension: IPG-Streifen, pH-Bereich: 4 – 7; 2. Dimension: SDS-PAGE (12,5 % T); anodisches *Cup-Loading*; Silberfärbung nach Shevchenko *et al.*, 1996.

Die Silberfärbung wurde aufgrund einer mit den DIGE-Farbstoffen vergleichbaren Proteindetektionsgrenze von ca. 1 ng Protein ausgewählt (Nesterenko *et al.*, 1994). Die experimentellen Bedingungen (Proteinquantifizierungsmethode; Material und Methoden für die 1. und 2. Dimension der 2-DE) dieser Studie entsprachen denen, der nachfolgend beschriebenen 2D-DIGE-Versuche.

Abbildung 3-41 zeigt, dass bei einer Gesamtproteinmenge von 10 µg fast keine Proteinspots mehr erkennbar sind. Bei Proteinmengen ab 50 bis 100 µg Gesamtprotein sind bereits erste

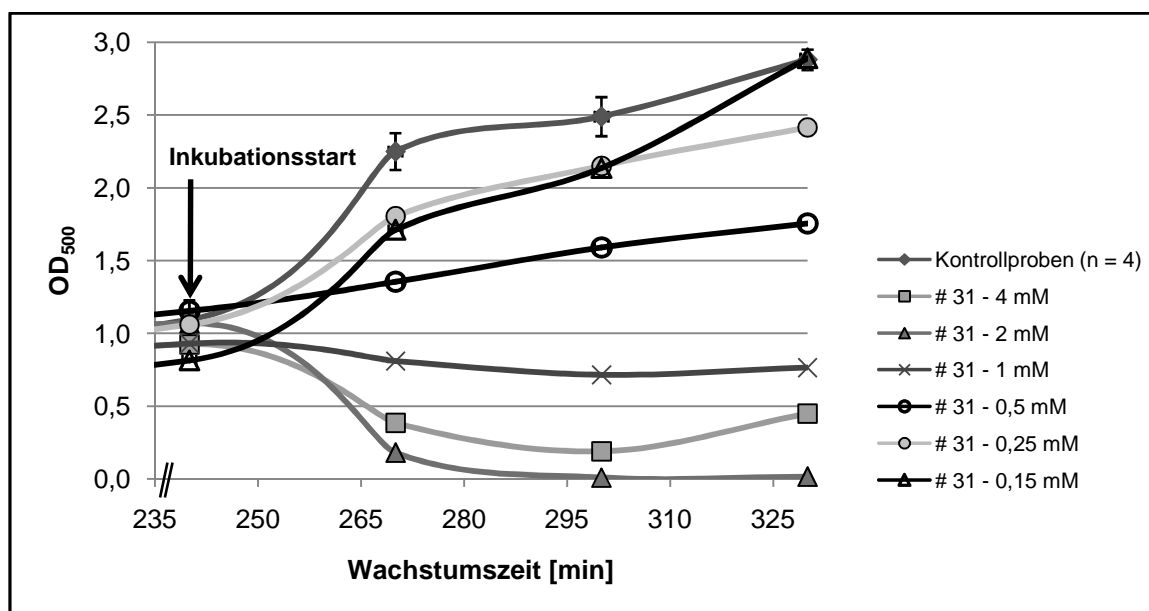
Überlagerungseffekte der Spotbereiche höher abundanter Proteine, sowie eine vertikale Streifenbildung durch eine zu hohe Proteinkonzentration im Gel erkennbar. Daher wurde für die nachfolgend durchgeführten 2D-DIGE-Versuche eine Proteinkonzentration von 25 µg Protein / CyDye ausgewählt.

3.7.2 Ergebnisse der 2D-DIGE-Studie von Substanz 31 (DIGE-Studie I)

Die durch ligandenbasiertes virtuelles Screening (Dr. Manuel Nietert, AK Prof. Dr. Schneider) aufgefundene und im ZFTT-Assay als aktiver Inhibitor der prokaryotischen ZFTT-Reaktion identifizierte Substanz 31 (s. 3.3.2.1, 3.3.2.2) zeigte auch in den durchgeführten Ganzzellassays eine schwache antimikrobielle Aktivität (s. 3.3.2.4, 3.3.2.5). Nachfolgend sind die Ergebnisse der DIGE-Studie zur Ermittlung des antimikrobiellen Wirkmechanismus von Substanz 31 beschrieben. Zur Gewinnung behandelter Zellen des Testorganismus *B. subtilis* 168 wurde zunächst die subletale IC_{50} von Substanz 31 bestimmt (s. 3.7.2.1).

3.7.2.1 Bestimmung des IC_{50} -Wertes gegen *B. subtilis* 168

Die Bestimmung des IC_{50} -Wertes von Substanz 31 gegen *B. subtilis* 168 erfolgte durch die unter 2.2.2.3 angegebenen Versuchsbedingungen. Substanz 31 wurde als Stammlösung in einer Konzentration von 50 mM in DMSO (50 % (v/v)) hergestellt und in Konzentrationen von 150 µM bis 4 mM (DMSO 0,25 – 4 % (v/v)) gegen den Testorganismus eingesetzt. Nachfolgend sind die Wachstumskurven und die ermittelten OD_{500} -Werte der mit variablen Konzentrationen von Substanz 31 inkubierten Zellkulturen dargestellt (s. Abb. 3-42 und Tab. 3-27).



Probe	DMSO [%]	WZ [min]	optische Dichte (OD ₅₀₀)					
			0	240	270	300	330	
CTR 1	4		0,04	1,16	1,97	2,26	2,73	
CTR 2	4		0,04	1,44	2,3	2,56	3,06	
CTR 3	4		0,04	0,96	2,57	2,84	2,82	
CTR 4	4		0,04	0,82	2,16	2,3	2,91	
		Mittelwert	0,04	1,10	2,25	2,49	2,88	
		STDEV/2¹	0	0,135	0,126	0,134	0,070	
	Substanz 31 [mM]	Vol. # 31 [µl]						
# 31.1	4	4	400	0,04	0,925	0,385	0,19	0,45
# 31.2	2	2	200	0,04	1,07	0,18	0,01	0,02
# 31.3	1	1	100	0,04	0,93	0,81	0,72	0,77
# 31.4	0,5	0,5	50	0,04	1,16	1,36	1,59	1,76
# 31.5	0,25	0,25	25	0,04	1,06	1,81	2,15	2,42
# 31.6	0,15	0,15	15	0,04	0,82	1,71	2,14	2,89

Abb. 3-42 und Tab. 3-27: Antimikrobielles Profil von Substanz # 31 gegen *B. subtilis* 168.

Die Inkubation mit Substanz # 31 erfolgte nach 240 Minuten Zellwachstum über einen Zeitraum von 90 Minuten. Die optische Dichte (OD₅₀₀) der Wachstumskontrolle ist als Mittelwert aus vier mit DMSO (4% (v/v)) inkubierten Kontrollkulturen dargestellt. CTR = Wachstumskontrolle; WZ = Wachstumszeit; Vol. = Volumen¹ die maximale relative Standardabweichung (STDEV/2) der Messwerte lag bei ± 10 %.

Zur Ermittlung der IC₅₀ von Substanz 31 wurde der relative Zuwachs der OD₅₀₀ durch den Bezug der absoluten OD₅₀₀-Werte auf die durchschnittliche optische Dichte der vier Kontrollkulturen (DMSO 4 % (v/v)) nach 90 Minuten Inkubation bezogen (s. Tab. 3-28).

Probe	OD ₅₀₀ (WZ = 240 min)	OD ₅₀₀ (WZ = 330 min)	Zunahme der OD ₅₀₀ ; absolut (Δt =90 min)	Zunahme der OD ₅₀₀ ; relativ, [%] (Δt =90 min)
Kontrollproben	1,1*	2,88*	1,18	100
# 31 - 4 mM	0,93	0,45	zytotoxisch	0
# 31 - 2 mM	1,07	0,02	zytotoxisch	0
# 31 - 1 mM	0,93	0,77	zytotoxisch	0
# 31 - 0,5 mM	1,16	1,76	0,6	50,8
# 31 - 0,25 mM	1,06	2,42	1,36	115,3
# 31 - 0,15 mM	0,82	2,89	2,07	175,4

Tab. 3-28: Berechnung der absoluten und relativen Zunahme der optischen Dichte (OD₅₀₀) in Abhängigkeit variabler Konzentrationen von Substanz # 31. Die zytotoxische Wirkung von Substanz 31 ist durch die Abnahme der OD₅₀₀ charakterisiert. Abkürzung: WZ = Wachstumszeit

*berechneter Mittelwert der optischen Dichte (OD₅₀₀) aus vier Kontrollkulturen (4 % DMSO)

Zur Behandlung der für das DIGE-Experiment zu verwendenden *B. subtilis*-Kulturen wurde eine subletale Konzentration von 500 μM der Substanz 31, welche annähernd dem IC₅₀-Wert entspricht ausgewählt.

3.7.2.2 2D-DIGE Experiment

Nach der Anzucht von *B. subtilis* 168 unter den angegebenen Versuchsbedingungen (s. 2.2.10.1) erfolgte die Gewinnung des Zellysats mittels Ultraschallbehandlung (s. 2.2.10.2) und die Bestimmung der Proteinkonzentration (s. 2.2.10.3). Die Fluoreszenzmarkierung der Proteine mit den unterschiedlichen CyDye DIGE-Farbstoffen erfolgte unter Verwendung von 200 pmol Farbstoff / 50 μg Protein. Somit wurden pro 2D-Gel insgesamt 25 μg Protein / CyDye aufgetrennt (75 μg Gesamtprotein). Das *Labelling*-Schema entsprach einem „*dye-flip*“-Design, um etwaige Einflüsse des *Labelling*-Prozesses in die Auswertung miteinzubeziehen (s. 2.2.10.5 bzw. Tab. 3-29).

	behandelte Probe (CyDye; Proteinmenge [μg]; Proteinvolumen [μl])	Kontrollprobe	interner Standard
Gel # 1	Cy3; 25; 13,2	Cy5; 25; 5,3	Cy2; 25; 9,2
Gel # 2	Cy3; 25; 13,2	Cy5; 25; 5,3	Cy2; 25; 9,2
Gel # 3	Cy5; 25; 13,2	Cy3; 25; 5,3	Cy2; 25; 9,2
Gel # 4	Cy5; 25; 13,2	Cy3; 25; 5,3	Cy2; 25; 9,2

Tab. 3-29: *Labelling*-Schema der behandelten bzw. unbehandelten Kontrollproben im „*dye-flip*“-Design.

Nach dem Abstoppen der *Labelling*-Reaktion (s. 2.2.10.4) wurden jeweils 25 μg der unterschiedlich markierten Proteine mittels 2D-SDS-PAGE aufgetrennt. Nachfolgend sind exemplarisch die Einzelaufnahmen und die Überlagerung der mit den drei DIGE-Farbstoffen in Gel 1 markierten bakteriellen zytoplasmatischen Proteine dargestellt (s. Abb. 3-43):

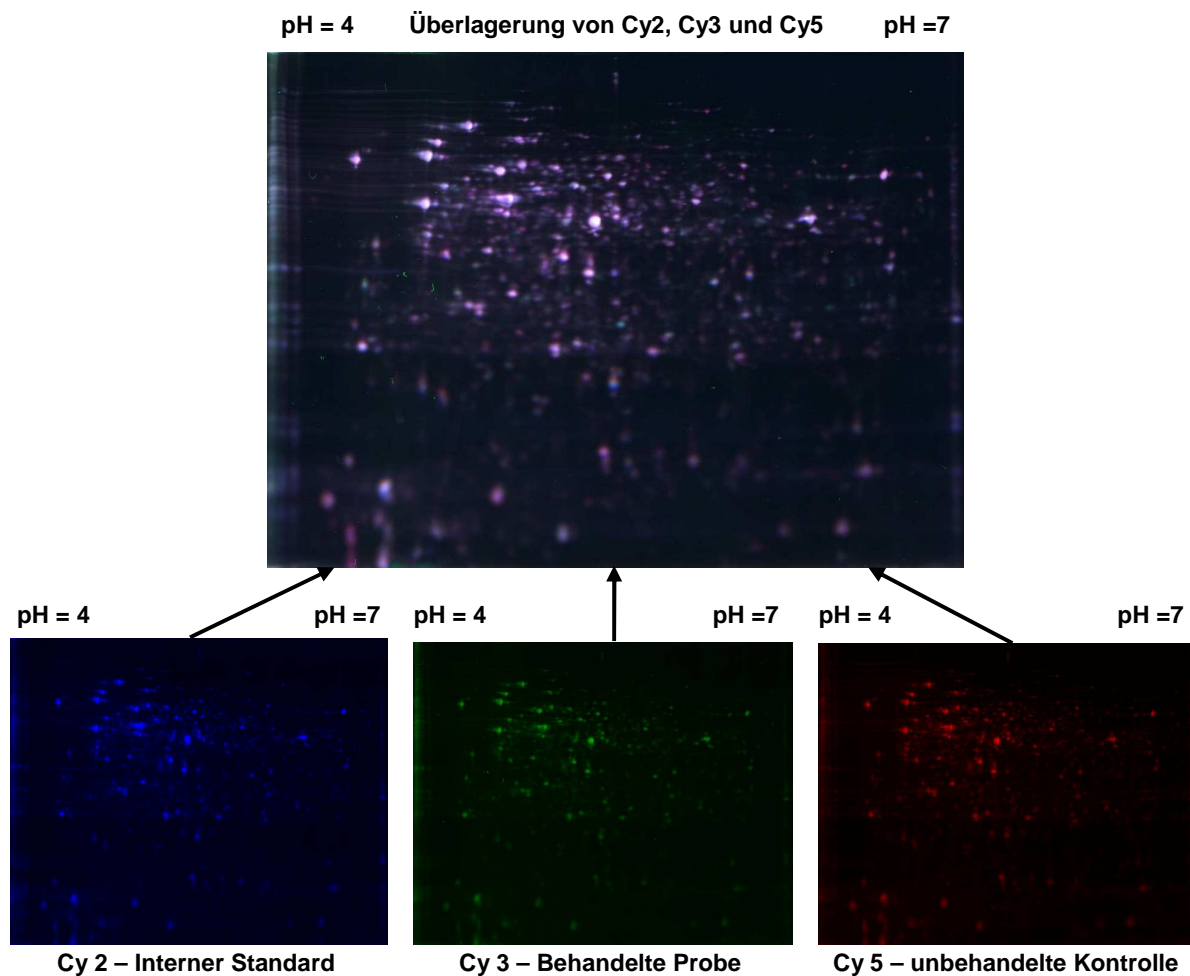
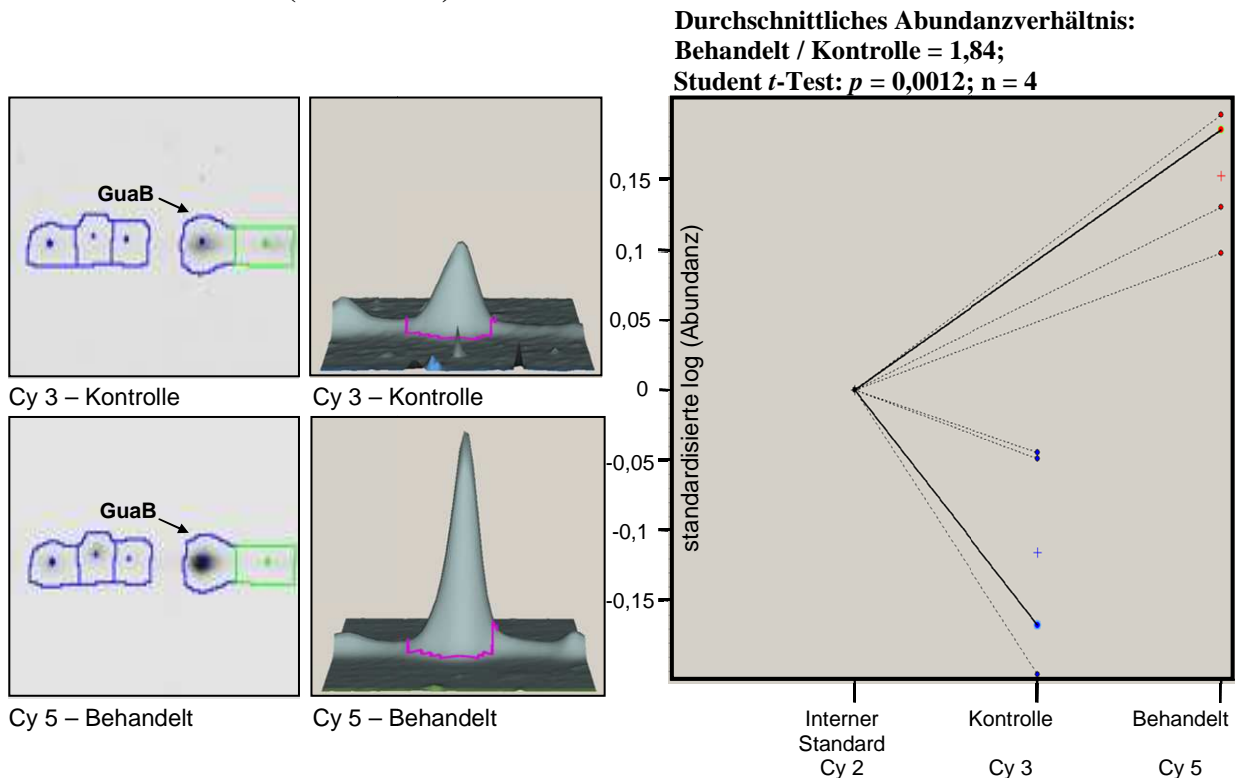


Abb. 3-43: Falschfarbendarstellung der mit den DIGE-Farbstoffen markierten mittels 2D-SDS-PAGE parallel aufgetrennten Proteine.

Nach der Detektion der Proteinspots aller vier Gele wurden die 12 erstellten Gelbilder der unterschiedlich markierten Proteine in das DIA-Modul (*differential in-gel analysis*) bzw. das BVA-Modul der Software Decyder™ geladen (s. 2.2.14.2). Insgesamt wurden nach Anwendung des Ausschlussfilters 784 Proteinspots auf dem als Referenzgel verwendeten „Mastergel“ detektiert. Von diesen 784 Proteinspots zeigten 728 (92,9 %) keine signifikante Hoch- bzw. Herunterregulation oder eine unzureichende Signifikanz (p -Wert $\geq 0,05$). Es wurden schließlich 56 Proteinspots, welche den vorgegebenen Auswahlkriterien entsprachen zur massenspektrometrischen Identifizierung aus dem Gel ausgeschnitten (s. 2.2.15). Die folgenden Abbildungen zeigen den Gelausschnitt zweier beispielhaft gewählter differentiell regulierter Proteine, die dreidimensionale Darstellung der Proteinabundanzen, sowie die Darstellung der statistischen Auswertung (s. Abb. 3-44 und 3-45):

Beispiel 1 – Inositol-5-monophosphate dehydrogenase (GuaB)

Accession # P21879 (Swiss-Prot)



Beispiel 2 – Heat shock protein-70 cofactor (GrpE)

Accession # P15874 (Swiss-Prot)

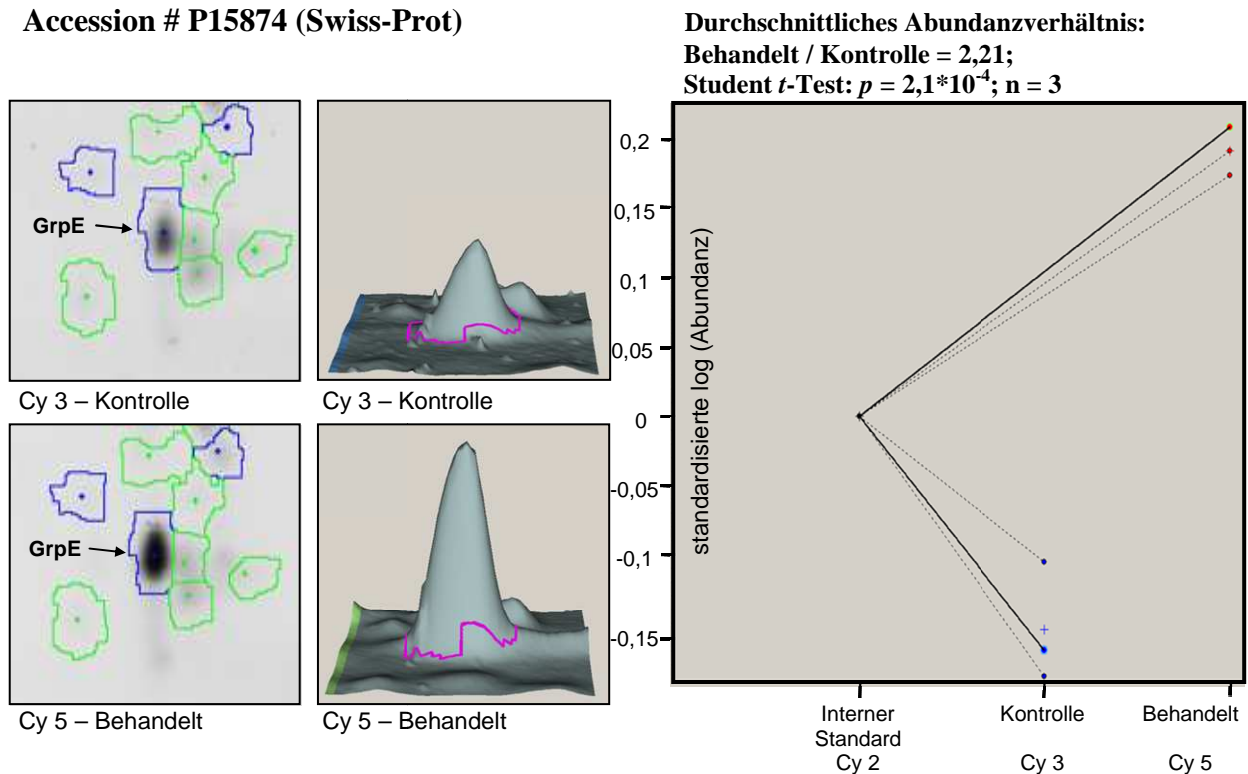


Abb. 3-44 und 3-45: Zwei exemplarisch ausgewählte durch Behandlung mit Substanz 31 signifikant hochregulierte Proteine. Links: Gelausschnitt des DIGE-Gels der mit Cy 3 und Cy 5 markierten Proteine; Mitte: Dreidimensionale Darstellung der Proteinabundanz; Rechts: Standardisiertes Proteinabundanzverhältnis der behandelten Proben bzw. Kontrollproben aller Gele bezogen auf die normalisierte Abundanz des internen Standards (Kreuz = Mittelwert der Messwerte).

Da die Mehrheit der aus dem DIGE-Gel ausgestochenen Proteine nicht signifikant identifiziert werden konnten, wurde ein präparatives 2D-SDS-Gel (250 µg Protein) unter gleichen experimentellen Bedingungen angefertigt und mit kolloidalem CBB angefärbt (s. 2.2.12, 2.2.13.2). Nachfolgend sind vergleichend die erzeugten Bilder des 2D-DIGE-Gels (oben) und des präparativen 2D-Coomassie-Gels (unten) dargestellt:

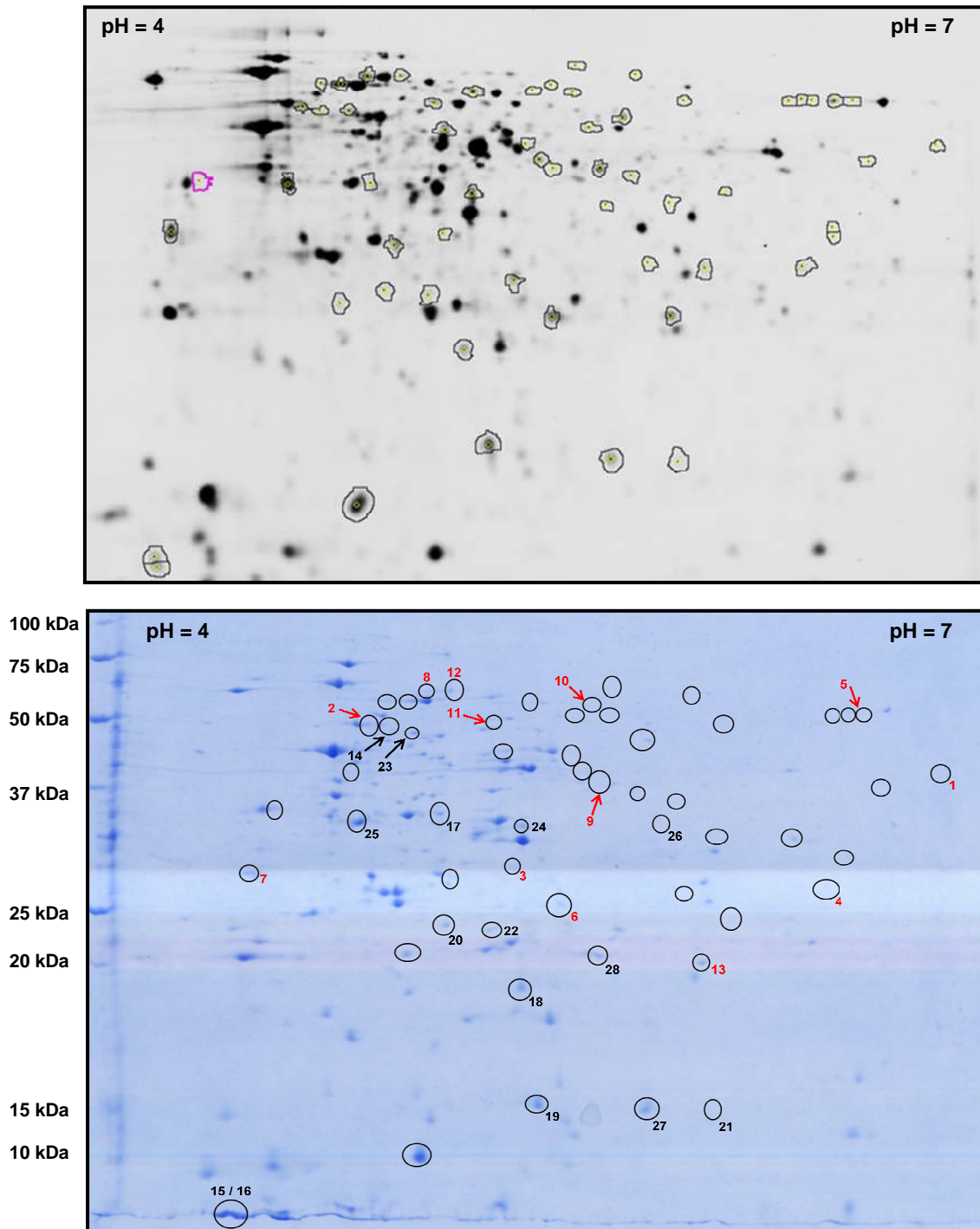


Abb. 3-46: Spotmuster der mit DIGE-Farbstoffen markierten (oben) bzw. mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blue angefärbten (unten) 2D-SDS-Gele. Die mit Kreisen markierten Bereiche der Gele zeigen die zur Identifizierung ausgewählten Proteine an. Die Zahlen der markierten Proteinspots im CBB-Gel geben die Nummer der ausgewählten Proteine in der Tabelle (3-30) an (Pick #). Rote Ziffern zeigen hochregulierte Proteine, schwarze Ziffern zeigen herunterregulierte Proteine an.

Nach Ausschneiden der Proteine (s. 2.2.15) und tryptischem Verdau (s. 2.2.16) erfolgte die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine mittels MALDI-TOF-MS bzw. MS/MS (s. 2.2.17). Die zur Identifizierung ausgewählten Proteine mussten folgende Vorgaben erfüllen: Spot in 3 von 4 Gelen vorhanden; relative differentielles Proteinabundanzverhältnis (behandelte Probe / Kontrollprobe) $\geq \pm 1,5$; p -Wert $\leq 0,05$. Die folgenden Tabellen zeigen die durch MALDI-TOF-MS und MS/MS signifikant identifizierten 28 Proteine:

Pick #	Acc. # (SwissProt)	Proteinbezeichnung [M _r / berechneter pI]	Gen	MOWSE Score	RPAV (B / K)	p-Wert (t-Test)
1	P18579	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase [32,9 / 6,1]	<i>murB</i>	99	11,4	$7,2 \cdot 10^{-6}$
2	O34824	Phosphoglucosamine mutase [48,6 / 4,9]	<i>glmM</i>	56	5,75	$5,4 \cdot 10^{-6}$
3	Q2B6H5	ATPase activator of MinC [29,5 / 5,2]	ORF: B14911_06391	72	4,78	$8,8 \cdot 10^{-6}$
4	P71018	Fatty acid/phospholipid synthesis protein plsX [35,8 / 5,6]	<i>plsX</i>	80	3,55	$1,1 \cdot 10^{-6}$
5	P21879	Inositol-5-monophosphate dehydrogenase [53,0 / 6,2]	<i>guaB</i>	77	2,85	$1,2 \cdot 10^{-7}$
6	P81100	Stress response protein SCP2 [21,8 / 5,5]	<i>yceC</i>	51	2,7	$2,4 \cdot 10^{-5}$
7	P15874	Protein grpE; Syn.: Heat shock protein-70 cofactor [21,6 / 4,5]	<i>grpE</i>	160*	2,21	$2,1 \cdot 10^{-4}$
8	P21880	Dihydrolipoamide dehydrogenase [49,7 / 5]	<i>pdhD</i>	131	2,19	$7,3 \cdot 10^{-6}$
9	P39912	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase [39,6 / 5,5]	<i>aroA</i>	113	1,78	$2,3 \cdot 10^{-4}$
10	P12048	Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase [32,9 / 6,1]	<i>purH</i>	272*	1,67	$7,6 \cdot 10^{-4}$
11	P37808	ATP synthase subunit alpha [54,6 / 5,2]	<i>atpA</i>	89	1,66	$3,7 \cdot 10^{-2}$
12	P21883	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex [47,5 / 5]	<i>pdhC</i>	54	1,64	$1,2 \cdot 10^{-2}$
13	P80876	General stress protein 18 [18,9 / 5]	<i>yfkM</i>	51	1,54	$4,3 \cdot 10^{-4}$

Tab. 3-30: Durch MALDI-TOF-MS bzw. MS/MS signifikant identifizierte hochregulierte Proteine.

Abkürzungen: RPAV = relatives Proteinabundanzverhältnis; B = behandelt; K = Kontrolle

*mittels MALDI-TOF MS/MS identifizierte Proteine

Pick #	Acc. # (SwissProt)	Proteinbezeichnung [M _r / berechneter pI]	Gen	MOWSE Score	RPAV (B / K)	p-Wert (t-Test)
14	P12039	Phosphoribosylamine--glycine ligase [45,3 / 4,8]	<i>purD</i>	111	-3,92	4,3 * 10 ⁻⁷
15	P51777	Cold shock protein cspD [7,3 / 4,5]	<i>cspD</i>	135*	-2,83	9,4 * 10 ⁻⁵
16	P32081	Cold shock protein cspB [7,4 / 4,5]	<i>cspB</i>	163*	-2,56	1,3 * 10 ⁻⁴
17	P80873	General stress protein 39 [31,1 / 5]	<i>ydaD</i>	120	-2,43	5,6 * 10 ⁻⁵
18	P19669	Transaldolase [22,9 / 5,9]	<i>tal</i>	54	-2,28	3,6 * 10 ⁻³
19	P26907	Glucose starvation- inducible protein B [13,7 / 5,3]	<i>gsiB</i>	399*	-2,03	1,2 * 10 ⁻⁴
20	P39121	Deoxyribose-phosphate aldolase [22,2 / 5,1]	<i>deoC</i>	88	-1,86	7,0 * 10 ⁻⁶
21	P54464	Uncharacterized protein yqeY [16,8 / 5,7]	<i>yqeY</i>	70	-1,79	3,2 * 10 ⁻³
22	O34925	Purine nucleoside phosphorylase deoD-type [25,5 / 5,2]	<i>deoD</i>	212	-1,74	3,3 * 10 ⁻⁵
23	P39142	Pyrimidine-nucleoside phosphorylase [46,2 / 5]	<i>pdp</i>	220	-1,73	4,8 * 10 ⁻⁵
24	P37527	Pyridoxal biosynthesis lyase [31,6 / 5,3]	<i>pdxS</i>	112	-1,71	1,6 * 10 ⁻³
25	P39646	Phosphate acetyltransferase [34,8 / 4,8]	<i>pta</i>	167	-1,7	6,8 * 10 ⁻⁴
26	P23966	Naphthoate synthase / Dihydroxynaphthoic acid synthetase [30,1 / 5,5]	<i>menB</i>	76	-1,69	1,2 * 10 ⁻⁴
27	P35137	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B [15,3 / 5,5]	<i>ppiB</i>	188*	-1,62	1,4 * 10 ⁻⁵
28	P81102	Putative NAD(P)H nitroreductase 12C [22,3 / 5,4]	<i>yodC</i>	56	-1,6	1,1 * 10 ⁻⁴

Tab. 3-31: Durch MALDI-TOF-MS bzw. MS/MS signifikant identifizierte herunterregulierte Proteine.

Abkürzungen: RPAV = relatives Proteinabundanzverhältnis; B = behandelt; K = Kontrolle

*mittels MALDI-TOF MS/MS identifizierte Proteine

Die Proteine wurden mit der Suchmaschine Mascot (www.matrixscience.com) und der Proteindatenbank SwissProt unter Vorgabe folgender Parameter signifikant identifiziert: Signifikanzgrenze: *protein score* > 51; *Taxonomy*: *B. subtilis* (MS-Suche) bzw. „all entries“ (MS/MS-Suche); erlaubte überlesene tryptische Schnittstellen: 1; Peptidtoleranz: ± 60 ppm; Fragmentmassentoleranz (MS/MS-Suche): ± 0,3 Da; *fixed modifications*: Carbamidomethyl (C); *variable modifications*: Oxidation (M).

3.7.3 Ergebnisse der 2D-DIGE-Studie von Tripeptid G12 (DIGE-Studie II)

Das durch Dr. Marcel Suhartono (AK Prof. Dr. M. W. Göbel) synthetisierte Tripeptid G12 zeigte eine hohe inhibitorische Aktivität im ZFTT-Assay (s. 3.4.1) und gegen pathogene bzw. nicht-pathogene Bakterien (s. 3.4.3, 3.4.4). Zur Bestimmung des antimikrobiellen Wirkmechanismus wurde die Anzucht der Zellkulturen nach den Angaben unter 2.2.10.1 durchgeführt. Für die Fluoreszenzmarkierung der Proteine wurde eine Farbstoffkonzentration von 400 pmol Farbstoff / 50 µg Protein verwendet, da von einer durch die Lagerung der Farbstofflösungen verursachten Minderung der Konzentration der CyDyes ausgegangen wurde (vgl. Farbstoffkonzentration: DIGE-Studie I). Die massenspektrometrische Identifizierung differentiell regulierter Proteine erfolgte nach Proteinanreicherung durch den Zusatz ungelabelter Proteine vor der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Die ungelabelte Probe bestand aus einer Proteinmischung der behandelten und der unbehandelten Probe zu gleichen Anteilen. Dadurch sollte eine ausreichend vorhandene Proteinmenge zur signifikanten Proteinidentifizierung sichergestellt werden. Die nachfolgende Tabelle zeigt das Labelling-Schema im „*dye-flip*“-Design (s. 2.2.10.5):

	Behandelte Probe	Kontrollprobe	interner Standard	ungelabeltes Protein
	(CyDye; Proteinmenge [µg]; Proteinvolumen [µl])			
Gel # 1	Cy3; 25; 12,3	Cy5; 25; 9,5	Cy2; 25; 10,9	150 µg
Gel # 2	Cy3; 25; 12,3	Cy5; 25; 9,5	Cy2; 25; 10,9	150 µg
Gel # 3	Cy5; 25; 9,5	Cy3; 25; 12,3	Cy2; 25; 10,9	150 µg
Gel # 4	Cy5; 25; 9,5	Cy3; 25; 12,3	Cy2; 25; 10,9	150 µg

Tab. 3-32: Labelling-Schema der behandelten bzw. unbehandelten Kontrollproben im „*dye-flip*“-Design.

Nachfolgend ist exemplarisch die Aufnahme eines 2D-DIGE-Gels der DIGE-Studie II dargestellt:

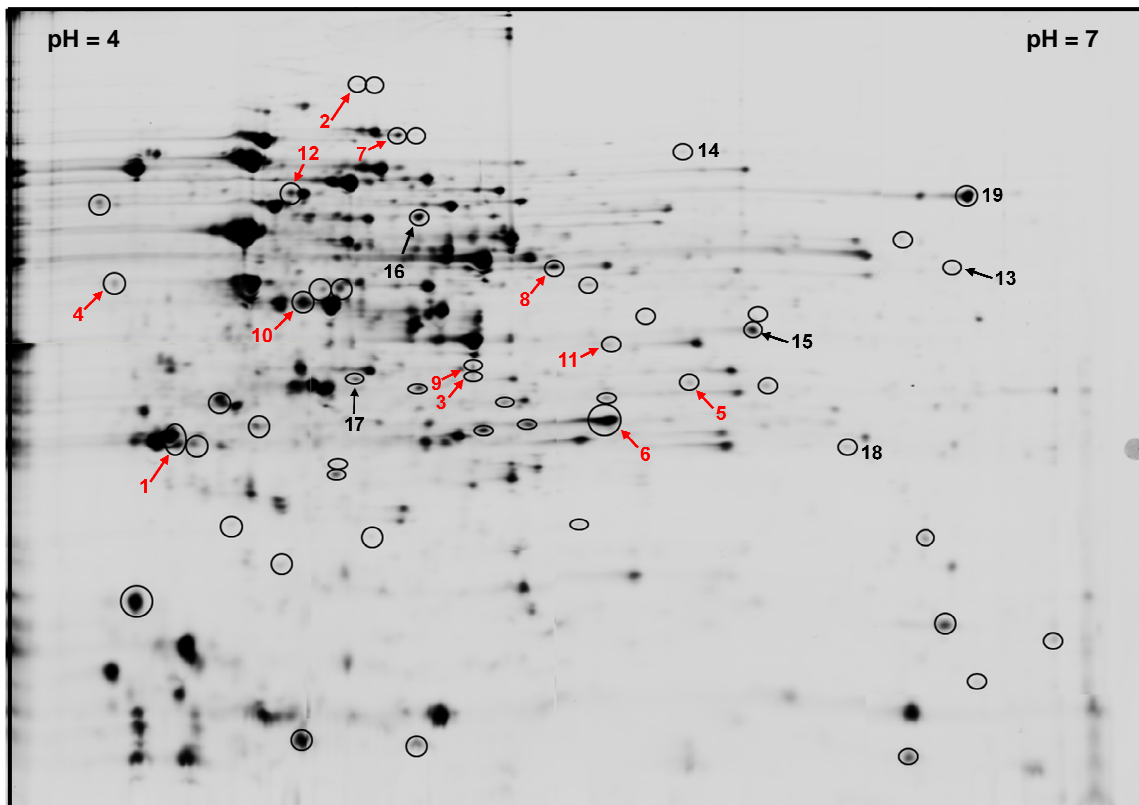


Abb. 3-47: Exemplarisch ausgewähltes 2D-DIGE Gel zur Darstellung aller zur massenspektrometrischen Identifizierung extrahierten Proteine (schwarze Kreise), sowie identifizierter hochregulierter (rote Ziffern) und herunterregulierter (schwarze Ziffern) Proteine.

Durch die Anwendung der Module der Software *Decyder™ Differential Analysis* (s. 2.2.14.2) wurden 1601 Proteinspots detektiert (im Mastergel der 4 DIGE-Gele des Experiments). Davon zeigten 1550 (96,8 %) entweder keine signifikante Hoch- oder Herunterregulation oder eine unzureichende Signifikanz (p -Wert $\geq 0,05$). Zur massenspektrometrischen Identifizierung wurden schließlich 51 Proteinspots in die Pickliste aufgenommen und für den tryptischen Verdau ausgeschnitten (s. 2.2.15, 2.2.16). Die Proteine wurden mit der Suchmaschine Mascot (www.matrixscience.com) und der Proteindatenbank SwissProt unter Vorgabe folgender Parameter signifikant identifiziert: Signifikanzgrenze: *protein score* > 47 ; *Taxonomy*: *B. subtilis* (MS-Suche) bzw. „*all entries*“ (MS/MS-Suche); erlaubte überlesene tryptische Schnittstellen: 1; Peptidtoleranz: ± 60 ppm; Fragmentmassentoleranz (MS/MS-Suche): $\pm 0,3$ Da; *fixed modifications*: Carbamidomethyl (C); *variable modifications*: Oxidation (M). Nachfolgend sind tabellarisch 20 hoch- bzw. herunterregulierte massenspektrometrisch signifikant identifizierte Proteine aufgeführt (s. Tab. 3-33 und 3-34):

Pick #	Acc. # (Swiss Prot)	Proteinbezeichnung [M _r / berechneter pI]	Gen	MOWSE Score	RPAV (B / K)	t-Test (p-Wert)
1	P80875	General stress protein 16U [20,7 / 4,5]	<i>yceD</i>	72	3,91	3,3*10 ⁻¹⁰
2	P09339	Aconitate hydratase [99,3 / 5,1]	<i>citB</i>	94	2,38	1,6*10 ⁻⁵
3	Q01464	Septum site-determining protein minD [29,4 / 5,2]	<i>minD</i>	90	2,22	1,9*10 ⁻⁵
4	P21882	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta [35,5 / 4,7]	<i>pdhB</i>	85	2,17	6,5*10 ⁻⁴
5	P54616	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] [27,9 / 5,7]	<i>fabI</i>	113	2,1	4,3*10 ⁻⁵
6	P81100	Stress response protein SCP2 [21,8 / 5,5]	<i>yceC</i>	115	2,1	1,6*10 ⁻⁴
7	P80885	Pyruvate kinase [62,2 / 5,1]	<i>pyk</i>	173	1,92	2,4*10 ⁻⁸
8	O05239	Probable NADH-dependent butanol dehydrogenase 1 [42,7 / 5,4]	<i>yugJ</i>	134	1,71	1,3*10 ⁻⁵
9	P13243	Probable fructose- bisphosphate aldolase 1 [30,4 / 5,2]	<i>fbaA</i>	99	1,71	2,1*10 ⁻⁶
10	P49814	Malate dehydrogenase [33,6 / 4,9]	<i>mdh</i>	148	1,61	1,6*10 ⁻⁵
11	P37887	Cysteine synthase [32,8 / 5,6]	<i>cysK</i>	73	1,57	5,9*10 ⁻⁴
12	P42974	NADH dehydrogenase [54,9 / 4,9]	<i>ahpF</i>	168	1,51	9,8*10 ⁻⁶

Tab. 3-33: Durch MALDI-TOF-MS signifikant identifizierte hochregulierte Proteine der mit Tripeptid G12 behandelten Zellkulturen

Abkürzungen: RPAV = relatives Proteinabundanzverhältnis; B = behandelt; K = Kontrolle

Pick #	Acc. # (Swiss Prot)	Proteinbezeichnung [M _r / berechneter pI]	Gen	MOWSE Score	RPAV (B / K)	t-Test (p-Wert)
13	P80861	NADH dehydrogenase-like protein yjID [41,9 / 6,3]	<i>yjID</i>	101	-2,76	3,1*10 ⁻⁴
14	P08065	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit [65,3 / 5,8]	<i>sdhA</i>	115	-1,96	2,4*10 ⁻⁴
15	P54382	Bifunctional protein folD [30,7 / 5,7]	<i>folD</i>	114	-1,74	4,4*10 ⁻⁷
16	P54572	Probable NAD-dependent malic enzyme 1 [45,9 / 5,1]	<i>yqkJ</i>	146	-1,71	4,7*10 ⁻⁷
17/18*	P23446	Triosephosphate isomerase [27,03 / 5,0] - Flagellar basal-body rod protein flgG [27,47 / 4,92]	<i>tpiA</i> - <i>flgG</i>	78 - 67	-1,71	1,7*10 ⁻⁶
19	P42085	Xanthine phosphoribosyltransferase [21 / 5,9]	<i>xpt</i>	114	-1,52	1,2*10 ⁻⁴
20	P21879	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase [53 / 6,2]	<i>guaB</i>	201	-1,51	9,0*10 ⁻⁷

Tab. 3-34: Durch MALDI-TOF-MS signifikant identifiziert herunterregulierte Proteine der mit Tripeptid G12 behandelten Zellkulturen.

Abkürzungen: RPAV = relatives Proteinabundanzverhältnis; B = behandelt; K = Kontrolle

*beide Proteine in einem ausgeschnittenen Proteinspot enthalten und signifikant identifiziert

4. Diskussion

4.1 Etablierung des ZFTT-Assays – Optimierung, Validierung und Charakterisierung

Der erste Schritt der Etablierung des ZFTT-Assays war das auf der Diplomarbeit von Dr. Christian Klammt basierende Protokoll der zellfreien präparativen Proteinbiosynthese, zur Anwendung im *Batch*format durch Variation essentieller Reaktionskomponenten des Assays zu optimieren (s. 3.1.1 und 3.1.2). Im Zuge der Optimierung des Assays wurden die Komponenten der Substrat- und Reaktionslösungen (s. 2.2.4) unter den Gesichtspunkten der Kosten *versus* Assayqualität beurteilt und mit kommerziell erhältlichen zellfreien Proteinexpressionssystemen verglichen. Die kostenintensivsten Komponenten der Reaktionslösung des Assays waren die für die *in-vitro* Biosynthese der mRNA verwendete T7-RNA-Polymerase (GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland) und der für die Verlängerung der TT-Reaktionszeit zugesetzte RNase-Inhibitor (*RNasin*[®] *Ribonuklease Inhibitor*, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Die anteilig berechneten Kosten aller weiteren Komponenten der Substrat- und Reaktionslösung betragen pro 25 µl Assayvolumen weit weniger als 0,01 € (Ausnahme: *E. coli* MRE600 tRNA; 0,02 €). Die Kosten für die im AK Prof. Dr. Dötsch durchgeführte Präparation des bakteriellen S30-Zellextraktes wurden mit 7,50 € pro ml Lysat veranschlagt (pers. Kommunikation: Dr. C. Klammt). Im Rahmen des Optimierungsprozesses des ZFTT-Assays konnten 75 % der Ausgangskosten (100 µl *Batch*format) durch Reduktion des Assayvolumens auf 25 µl bei sogar verbesserter Assayqualität erreicht werden (s. 3.1.5). Damit betragen die Ausgaben für alle Komponenten des ZFTT-Assays im 25 µl *Batch*format 0,75 € pro Reaktion. Die Kosten für Verbrauchsmaterialien und Geräte (Eppendorf-Cups, Wasserbad, Schüttler) wurden nicht mit eingerechnet. Nachfolgend sind tabellarisch kommerziell erhältliche zellfreie TT-Reaktionskits unterschiedlicher Hersteller mit dem in dieser Arbeit etablierten ZFTT-Assay verglichen (s. Tab. 4-1):

Anbieter	Produktbezeichnung	ZFTT-Prinzip	vom Anbieter angegebene Proteinsyntheseleistung	Gesamtkosten Reaktionen / Reaktionsvolumen	Kosten pro 25 µl
Roche Diagnostics - Applied Science, Mannheim	RTS 100 <i>E. coli</i> HY Kit	ZFTT; <i>Batch</i> ; T7; <i>E. coli</i> HY Lysat	400 µg / ml (präparatives System)	1.094 € 96 / 50 µl	5,70 €
Invitrogen GmbH, Karlsruhe	Expressway™ Mini Cell-Free Expression System	ZFTT; <i>Batch</i> ; T7; <i>E. coli slyD</i> -Extrakt	750 µg / ml (präparatives System)	322 € 20 / 50 µl	8,05 €
Merck KGaA - Novagen®, Darmstadt	EcoPro™ T7 System	ZFTT; <i>Batch</i> ; T7; <i>E. coli</i> S30-Extrakt	560 µg / ml (präparatives System)	413 € 50 / 50 µl	4,13 €
Promega GmbH, Mannheim	<i>E. coli</i> S30 Extract System for Circular DNA	ZFTT; <i>Batch</i> ; T7; <i>E. coli</i> S30-Extrakt	80 µg / ml (analytisches System)	381 € 30 / 50 µl	6,35 €
ZFTT-Assay, Goethe-Universität Frankfurt/Main		ZFTT; <i>Batch</i> ; T7; <i>E. coli</i> S30-Extrakt	20 - 25 µg / ml* (analytisches System)		0,75 €

Tab. 4-1: Übersicht über exemplarisch ausgewählte kommerziell angebotene ZFTT-*Batch*-Reaktionskits.

*basierend auf der durchschnittlich nachweisbaren GFP-Menge

Die hier exemplarisch gezeigten kommerziellen ZFTT-Kits werden sowohl zur präparativen Proteingewinnung als auch für analytische Zwecke (geringere Proteinausbeute) angeboten. Das in dieser Arbeit etablierte analytische Assaysystem zeigte zwar im Vergleich zu den kommerziellen Systemen eine geringere Proteinausbeute, es war jedoch durch die einfache Handhabbarkeit und den nicht-invasiven Nachweis des fluoreszenten Reporterproteins GFP für das Screening potentieller antimikrobieller Inhibitoren der bakteriellen TT-Reaktion optimal anwendbar. Die Konzentration des translatierten Reporterproteins GFP hängt neben der optimierten Zusammensetzung der Reaktionskomponenten auch von der Reaktivität des präparierten S30-Extraktes ab (Klammt, 2002). Die in dieser Arbeit angegebene, durch Fluorimetrie nachweisbare GFP-Ausbeute bezog sich auf eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität der nicht inhibierten Kontrollreaktionen von ca. 0,650 – 0,850 (die Messlösung entsprach einer 1/100 verdünnten Reaktionslösung des Assays). Die Berechnung der translatierten GFP-Konzentration erfolgte auf Grundlage einer vorher experimentell erstellten Kalibriergeraden unter Anwendung von rekombinantem GFP (rGFP, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bekannter Konzentration.

Im zweiten Schritt der Etablierungsphase sollte die Eignung des Assays zum selektiven Auffinden ZFTT-aktiver Translationsinhibitoren analysiert werden (s. 3.1.4). Damit sollte sichergestellt werden, dass der ZFTT-Assay als Werkzeug im Rahmen von

*Screening*projekten zur Identifizierung neuer ZFTT-Inhibitoren genutzt werden kann. Hierfür wurden jeweils zwei aktive und inaktive Inhibitoren der bakteriellen TT-Reaktion im Assay eingesetzt. Das antimikrobiell wirkende β -Laktamantibiotikum Ampicillin zeigte gegen *E. coli*-Zellen über den Wirkmechanismus der Inhibition der Zellwandbiosynthese eine mit Streptomycin vergleichbare Aktivität. Diese Aktivität von Ampicillin ist im ZFTT-Assay aufgrund fehlender Affinität zu den Komponenten der Transkriptions-/Translationsreaktion aufgehoben. Das aus der Gruppe der Avermectine stammende Ivermectin (Mischung aus Ivermectin B_{1a} und B_{1b}), welches als Anthelmintikum durch Bindung an Glutamat-aktivierte Chloridkanäle in Nematoden wirkt (Vassilatis *et al.*, 1997), wurde als Makrolid ohne antimikrobielle Aktivität in die Studie miteingeschlossen. Ivermectin zeigte weder antimikrobielle Aktivität noch war es aktiv im zellfreien Assay. Die selektive Inhibition des ZFTT-Assays durch die eingesetzten Translationsinhibitoren Streptomycinsulfat und Erythromycin konnte anschließend durch die Affinitätschromatographische Aufreinigung des zellfrei exprimierten His₆-getaggtten GFP, die gelelektrophoretische Auftrennung der eluierten Proteinlösungen und durch den massenspektrometrischen Nachweis des Reporterproteins GFP bewiesen werden.

Der dritte Schritt der Etablierungsphase des ZFTT-Assays beinhaltete die Validierung des Assays durch Bestimmung des Z'-Faktors (nach Zhang *et al.*) und der Linearität der Messmethode im Messbereich. Die Assayqualität zweier *Batch*formate (100 μ l bzw. 25 μ l Assayvolumen) konnte nach Zhang *et al.* als „exzellent“ eingestuft werden (s. 3.1.5). Durch Bestimmung der Linearität der Messmethode im Messbereich des Assays, wurde ein linearer Zusammenhang zwischen exprimierter Reporterproteinmenge und des gemessenen Fluoreszenzsignals nachgewiesen (s. 3.1.6).

Die erfolgreich abgeschlossene Etablierung des ZFTT-Assays ermöglichte schließlich dessen Anwendung in den nachfolgend diskutierten Studien.

4.2 Die Rolle der bakteriellen Zellwand im Prozess der antimikrobiellen Wirkstofffindung

Zur experimentellen Bewertung der Aktivität ausgewählter Translationsinhibitoren in Abhängigkeit ihrer substanzspezifischen physikochemischen Eigenschaften, wurden acht Vertreter aus vier repräsentativen Translationsinhibitor Klassen unter zellfreien Bedingungen und im Ganzzellassay gegen den Gram-negativen Stamm *E. coli* A19 untersucht (Weidlich *et al.*, 2007). Wie die Ergebnisse dieser Studie zeigten, konnten die Aktivitätsprofile der verwendeten Substanzen in drei Gruppen unterteilt werden (s. 3.2).

Die annähernd gleiche Aktivität der Aminoglykosid-Antibiotika Streptomycinsulfat und Paromomycinsulfat unter zellfreien und unter Ganzzellbedingungen (MHK: 0,7 – 2 µg/ml) lässt sich durch den Transportmechanismus dieser Verbindungen in die Gram-negative Zelle erklären. Der Aufnahmeprozess der Aminoglykoside beginnt mit der reversiblen konzentrationsabhängigen Bindung der polykationischen Substanzen, durch Ausbildung elektrostatischer Wechselwirkungen mit anionischen Bindungsstellen der Gram-negativen Zellwand (Lipopolysaccharide (LPS), polare Kopfgruppen der Phospholipide, Membranproteine). Anschließend erfolgt der konzentrationsabhängige selbstvermittelte Transport in die Zelle durch die Zerstörung zellwandstabilisierender elektrostatischer Interaktionen zwischen Magnesiumionen und Lipopolysaccharidmolekülen. Die so permeabilisierte LPS-Schicht der Außenmembran Gram-negativer Zellen führt schließlich zur gesteigerten Aufnahme polykationischer Substanzen in das Periplasma. Dort findet nach der Akkumulation der Aminoglykoside der energieabhängige unidirektionale Transport durch die Zytoplasmamembran in das Zellinnere statt. Die Geschwindigkeit des Transports ist vom Membranpotential abhängig, welches durch den vorliegenden Protonengradienten aufgebaut wird. Die Bindung der Aminoglykosid-Antibiotika an ribosomale Zielstrukturen bewirkt die Inhibition der Translation bzw. den Einbau falscher Aminosäuren in die wachsende Proteinkette (*misreading*-Effekt). Dies führt schließlich zu Inkorporation falsch translatierter Proteine in die Zytoplasmamembran, die als Kanäle zur gesteigerten Aufnahme weiterer Aminoglykosidmoleküle fungieren (Taber *et al.*, 1987; Hancock und Bell, 1988).

Die deutlich (700-fach) höhere Aktivität des Aminoglykosids Neomycintrisulfat unter zellfreien Bedingungen ist durch die erhöhte positive Ladungsdichte im Molekül, die durch eine zusätzliche primäre Aminogruppe an C6' von Ring 1 (s. Strukturformeln unter 1.3.2.1.1) verursacht wird und eine hieraus resultierende erhöhte Affinität zur polyanionischen Zielstruktur der ribosomalen RNA erklärbar (Tor *et al.*, 1998).

Die Gruppe der Makrolidantibiotika bestand aus den hydrophoben Verbindungen Erythromycin, Josamycin und Oleandomycintriacetat (s. Strukturformeln unter 1.3.2.1.2) und zeigte insgesamt eine ca. 40 – 110-fach höhere Aktivität unter zellfreien Bedingungen. Dies war durch die schlechte Penetration lipophiler Moleküle durch die Porin vermittelte Aufnahme vorwiegend hydrophiler kleiner Moleküle durch die Außenmembran Gram-negativer Bakterien erklärbar (Nikaido, 2003). Die Zellhülle Gram-negativer Bakterien spielte somit eine entscheidende Rolle als Penetrationsbarriere im Rahmen des passiven Aufnahmeprozess großer und relativ lipophiler Makrolidantibiotika.

Für das Tetrazyklinderivat Minozyklin und Chloramphenicol zeigte sich überraschend eine ca. 2 – 4-fach höhere Aktivität im Ganzzellassay als unter zellfreien Bedingungen. Dieses Phänomen könnte die relativ hohe Konzentration an Magnesiumionen (10 – 15 mM) im zellfreien System erklären. Tetrazyklinderivate bilden mit Magnesiumionen Chelatkomplexe aus, was zum einen zur Minderung der für das ZFTT-System optimierten Ionenkonzentration (s. 3.1.1) führt und zum anderen die über Magnesiumionen vermittelte Bindung an die ribosomale RNA durch Absättigung molekularer Ligandenbindungsstellen abschwächt (White und Cantor, 1971). Eine weitere Erklärung für die höhere Aktivität unter Ganzzellbedingungen sind Akkumulationseffekte des Inhibitors in der Zelle und dadurch ausgelöste verstärkende Einflüsse auf das Zellwachstum. Da auch die Bindung von Chloramphenicol an das Ribosom durch Magnesiumionen vermittelt wird, konnte damit dessen verminderte Wirkung im ZFTT-Assay erklärt werden (Schlünzen *et al.*, 2001).

Diese Studie ermöglichte somit die Darstellung der unterschiedlichen Aktivität repräsentativer Translationsinhibitoren in Abhängigkeit ihrer physikochemischen Eigenschaften unter zellfreien bzw. Ganzzellbedingungen. Damit konnte gezeigt werden, dass die gemessene Aktivität potentieller Translationsinhibitoren unter zellfreien Bedingungen zwar die generelle Affinität zur Zielstruktur beschrieb, diese Ergebnisse allerdings nur im Kontext mit MHK-Werten aus Ganzzellassays zur Beschreibung des antimikrobiellen Potentials interpretiert werden sollten.

Weiterhin zeigte diese Studie die Nachteile der Verwendung des Reporterproteins GFP. Die Analyse von Substanzen, welche mit den Reaktionskomponenten des ZFTT-Assays fluoreszente Komplexe bildeten, deren Emissionsmaximum im Wellenlängenbereich von GFP lagen, ließ sich unter den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsbedingungen (s. 2.2.4) nicht durchführen. Beispielsweise konnte die Wirkung von Tetrazyklinhydrochlorid unter zellfreien Bedingungen nicht nachgewiesen werden, da die Ausbildung stark fluoreszierender Magnesium-Tetrazyklin-Chelatkomplexe durch die Überlappung mit dem Emissionsspektrum

des Reporterproteins einen Nachweis von GFP unmöglich machte (Tjörnelund und Hansen, 1997). Die Aktivitätsbestimmung des Tetrazyklinderivats Minozyklin unter zellfreien Bedingungen war möglich, da fluoreszente Chelatkomplexe erst in Konzentrationen weit oberhalb der MHK (ca. 50-fache MHK) nachweisbar waren (s. 3.2).

Dieser Nachteil des Reporterproteins GFP könnte durch den Einsatz anderer Reporterproteine, wie z. B. β -Galactosidase oder der *firefly*-Luciferase umgangen werden. Jedoch sprachen die positiven Eigenschaften von GFP (Substratunabhängigkeit, Stabilität), welche anderen standardmäßig angewendeten Reporterproteinen überlegen sind (s. 1.5), für die Verwendung dieses Reporters im ZFTT-Assay.

4.3 Die Verwendung von Naturstoffen und rohen bakteriellen Kulturüberständen als Quelle neuer antimikrobieller Inhibitoren der ZFTT-Reaktion

Zur Untersuchung der Aktivität der Naturstoffgruppe der pentazyklischen Triterpene im ZFTT-Assay wurde zunächst das Inhibitionspotential unterschiedlicher Boswelliasäurederivate, als Inhaltsstoffe des Harzes von *Boswellia serrata* (Fam.: *Burseraceae*) im zellfreien Assay analysiert (s. 3.5.1). Zur Ermittlung von Struktur-Wirkungsbeziehung innerhalb dieser Naturstoffgruppe wurde anschließend die ZFTT-Aktivität und das antibakterielle Potential weiterer pentazyklischer Triterpene natürlichen Ursprungs untersucht (s. 3.5.2).

Ausgewählt wurde die Verbindungsklasse der Boswelliasäurederivate, da neben den beschriebenen pharmakologischen Wirkungen der antiinflammatorischen Aktivität (durch Hemmung der 5-Lipoxygenase) (Safayhi *et al.*, 1992), der Inhibition der humanen Leukozytenelastase (Safayhi *et al.*, 1997), der Topoisomerasen (Syrovets *et al.*, 2000), der I κ B-Kinasen (Syrovets *et al.*, 2005) und der inhibitorischen Aktivität gegen das P-Glykoprotein (Weber *et al.*, 2006) auch eine antimikrobielle Aktivität nachgewiesen wurde. Die publizierten Studien zur Bestimmung dieser antimikrobiellen Aktivität beinhalteten die Untersuchung wässriger, methanolischer und chloroformhaltiger Extrakte aus Pflanzenteilen unterschiedlicher *Boswellia*-Arten (*B. ameero*, *B. elongata*, *B. dalzielii*) durch Anwendung der Agardiffusionsmethode (Adelakun *et al.*, 2001; Mothana und Lindequist, 2005).

Im Rahmen der Studie dieser Arbeit konnte für die Verbindung 11-Keto- β -boswelliasäure (β -KBA) aus der Gruppe der Boswelliasäuren die deutlich höchste Aktivität zur Inhibition der ZFTT-Reaktion mit einem IC₅₀-Wert von knapp 290 μ M nachgewiesen werden.

Um den Aktivitätseinfluss der 11-Ketogruppe innerhalb der Stoffgruppe der pentazyklischen Triterpene zu untersuchen, wurden anschließend Substanzen mit bzw. ohne 11-Ketogruppe im ZFTT-Assay bzw. gegen bakterielle Testorganismen eingesetzt.

Das Ergebnis dieser Studie zeigte eine deutlich höhere Aktivität für Verbindungen, aus der Gruppe der 11-Ketogruppe tragenden Substanzen (s. 3.5.2). Hierbei konnte für die aktivste Verbindung Glycyrrhetinsäure (aus *Glycyrrhiza glabra*; Fam.: *Fabaceae*) eine knapp 40 %-ige Inhibition der ZFTT-Reaktion bei einer Probenkonzentration von 100 μM nachgewiesen werden.

Schließlich zeigte die Untersuchung des antimikrobiellen Potentials der ZFTT-aktiven Verbindung β -KBA gegen die humanpathogenen Erreger *E. faecalis* bzw. *S. aureus* eine minimale Hemmkonzentration zwischen 34 bzw. 68 μM (s. 3.5.3). Gegen *B. subtilis* 168 wurde sogar ein MHK-Wert von knapp 15 μM erreicht. Damit konnte für β -KBA als Inhaltsstoff von *B. serrata* die höchste antimikrobielle Aktivität gegen die eingesetzten Gram-positiven Teststämme nachgewiesen werden.

Die Nutzung bakterieller Kulturüberstände unterschiedlicher *B. subtilis*-Stämme ermöglichte die Erweiterung der Substanzbibliothek potentieller antimikrobieller TT-Inhibitoren und wies die Eignung des ZFTT-Assays als Screeningwerkzeug zum Auffinden aktiver Substanzen bakteriellen Ursprungs nach (s. 3.6). Die fehlende Aktivität der in *B. subtilis* produzierten Substanzklassen der Lipopeptide (wie Surfactin) und der Lantibiotika (wie Nisin) im ZFTT-Assay deutete auf die Inhibition der ZFTT-Reaktion durch potentielle TT-Inhibitoren anderer Substanzklassen in den untersuchten bakteriellen Kulturüberständen hin. Unterstützt wird diese Vermutung durch die hohe ZFTT-Aktivität der Difficidin-, Oxydifficidin-, und Bacillaen-Produzenten *B. subtilis* 39320 und A1/3, da für diese Substanzen bereits eine Inhibition der bakteriellen Proteinbiosynthese nachgewiesen wurde (Zweerink und Edison, 1987; Patel *et al.*, 1995). Zusätzlich konnte die antimikrobielle Potenz durch die Wachstumsinhibition humanpathogener und multiresistenter Bakterienstämme durch bis zu 32-fach verdünnte Kulturüberstände aus *B. subtilis*-Naturisolaten nachgewiesen werden (s. 3.6.3).

Zusammenfassend konnte somit die Verwendung von Substanzen bzw. Substanzgemischen pflanzlichen und bakteriellen Ursprungs im Rahmen des Wirkstofffindungsprozess zur Identifizierung neuer antimikrobieller Translationsinhibitoren durch die in dieser Arbeit etablierten Arbeitstechniken gezeigt werden.

4.4 Identifizierung und Charakterisierung neuer antimikrobieller Inhibitoren der bakteriellen ZFTT-Reaktion – Teil I: *small molecules*

Die Forschungsk Kooperation mit Dr. Manuel Nietert (AK Prof. Dr. G. Schneider) ermöglichte die Identifizierung und Charakterisierung eines neuen antimikrobiellen Inhibitoren der bakteriellen zellfreien Transkriptions-/Translationsreaktion. Das Kooperationsprojekt verfolgte das Ziel, durch Anwendung virtueller Screeningverfahren, auf der Basis einer überschaubaren Menge bekannter RNA-Liganden neue, von Proteinliganden unterscheidbare, potentiell aktive Strukturen aufzufinden und experimentell zu charakterisieren. Als Substanzbibliotheken dienten hierfür kommerzielle Datenbanken der Firmen Specs (Delft, Niederlande) und ASINEX (Moskau, Russland), welche über 500.000 Substanzen mit wirkstoffartigen Eigenschaften beinhalteten.

4.4.1 Identifizierung neuer Inhibitoren der ZFTT-Reaktion

Wie die Ergebnisse des ZFTT-Assays unter 3.3.2 zeigen, verursachten nur die Substanzen 18 ($24,5 \pm 5 \%$) und 31 ($40,4 \pm 3,3 \%$) eine deutliche Inhibition der zellfreien TT-Reaktion in einer Probenkonzentration von 100 μM . Beide Verbindungen besitzen ein substituiertes 1,3,5,7-Tetraaza-adamantgrundgerüst und damit eine fixierte positive Ladung im Molekül. Aufgrund des polyanionischen Charakters der RNA, die die Zielstruktur translationsinhibierender Substanzen darstellt, ist daher die hohe Aktivität der angegebenen Substanzen nicht überraschend. Strukturell unterschieden sich Substanz 18 und 31 lediglich durch die Erweiterung des heteroaromatischen Thienylsubstituenten (Substanz 18) zu einem 5-Fluorobenzo[*b*]thienylsubstituenten (Substanz 31).

Die Substanzen BT, CBTMA und TAZA (s. 3.3.2.3), welche zur Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehungen der ZFTT-aktiven Substanz 31 eingesetzt wurden, zeigten unterschiedliche Aktivitätsprofile im zellfreien Assay. Sowohl für das unsubstituierte Benzo[*b*]thiophengrundgerüst (BT), als auch für das im Assay bei pH = 8,0 protoniert vorliegende Benzo[*b*]thiophenderivat (CBTMA) konnte keinerlei Aktivität unter zellfreien Bedingungen nachgewiesen werden. Die mit Substanz 31 vergleichbare ZFTT-Aktivität des verwendeten Tetraaza-adamantanderivates (TAZA) deutet auf die dominante Rolle der fixierten positiven Ladung im Molekül, als aktivitätsbestimmenden Parameter, zur Inhibition der ZFTT-Reaktion hin.

Vergleicht man nun zusätzlich die Strukturelemente aller eingesetzten Substanzen im ZFTT-Assay, fällt auf, dass vier weitere analysierte Substanzen eine (Substanz 25 und 29) bzw. zwei (Substanz 20 und AS18) fixierte positive Ladungen im Molekül tragen. Bei den Substanzen 20, AS18 und 29 handelt es sich strukturell um einfach bzw. zweifach positiv geladene substituierte aromatische Bispyridinium- bzw. Chinoliniumionen. Die geringere ZFTT-Aktivität dieser Substanzen im Vergleich zu den Tetraaza-adamantanderivaten 18 und 31, die eine quartäre aliphatische positiv geladene Substruktur besitzen, ist durch die verminderte positive Ladungsdichte am Stickstoffatom erklärbar. Diese Minderung der positiven Ladungsdichte wird durch Mesomerieeffekte delokalisiert vorliegender Elektronen am heteroaromatischen Ringsystems verursacht und dadurch die Affinität zur polyanionischen RNA abgeschwächt.

Die geringere Aktivität von Substanz 25 ist mit der zu vergleichenden Tetraaza-adamantansubstruktur in den Verbindungen 18 und 31 erklärbar (s. Abb. 4-1 bzw. 4-2). Da diese Substruktur neben der fixierten positiven Ladung des quartären Stickstoffs zusätzlich drei basische tertiär substituierten Aminogruppen besitzt, wird das Interaktionspotential zur Bindung an die RNA gesteigert. Vor allem das hohe Potential zur Ausbildung elektrostatischer Interaktionen steigert die Affinität der Tetraaza-adamantane zur Zielstruktur.

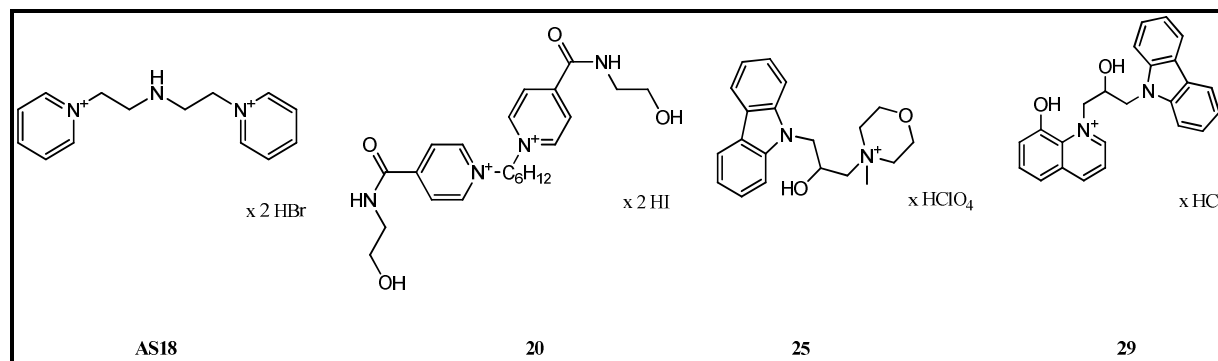


Abb. 4-1: Strukturformeln der Substanzen AS18, 20, 25 und 29.

Neben den genannten Tetraaza-adamantanderivaten wurden auch Substanzen mit Triaza-adamantangrundgerüst im ZFTT-Assay untersucht (s. Abb. 4-2). Allerdings zeigte keine dieser Verbindungen ein deutliches Inhibitionspotential gegen die zellfreie TT-Reaktion.

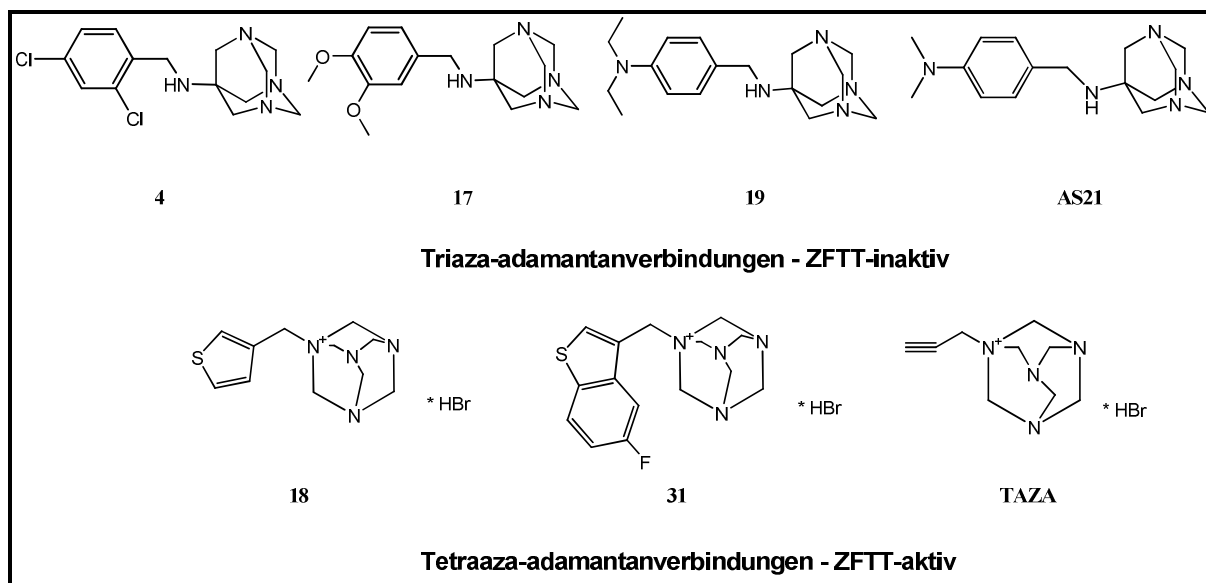


Abb. 4-2: Struktureller Vergleich der inaktiven Triaza-adamantanverbindungen und der aktiven Tetraaza-adamantanverbindungen im ZFTT-Assay.

Aus den Aktivitätsprofilen der im ZFTT-Assay analysierten Specs-Substanzen ließ sich schließen, dass eine fixierte positive Ladung eines aliphatischen quartären Amins und zusätzliche Strukturelemente zur Ausbildung nicht-kovalenter Interaktionen mit der RNA (z. B. durch drei tertiäre Aminogruppen) zur effektiven Inhibition der prokaryotischen TT-Reaktion im Molekül vorhanden sein müssen. Der Aktivitätsunterschied zwischen den Substanzen 18 und 31 zeigte, dass die Erweiterung des heteroaromatischen Thiophensystems zu einem Benzo[*b*]thiophensubstituent die Affinität zu Zielstrukturen der ZFTT-Reaktion erhöht. Eine Erklärung dieses Ergebnisses ist die verbesserte Möglichkeit *Base Stacking*-Interaktionen an funktionellen RNA-Strukturen einzugehen.

Auf der Basis der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Struktur-Wirkungsbeziehung aktiver *small molecules* gegen die prokaryotische zellfreie TT-Reaktion wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Manuel Nietert (Nietert, 2008) folgendes einfaches „Pharmakophormodell“ abgeleitet:

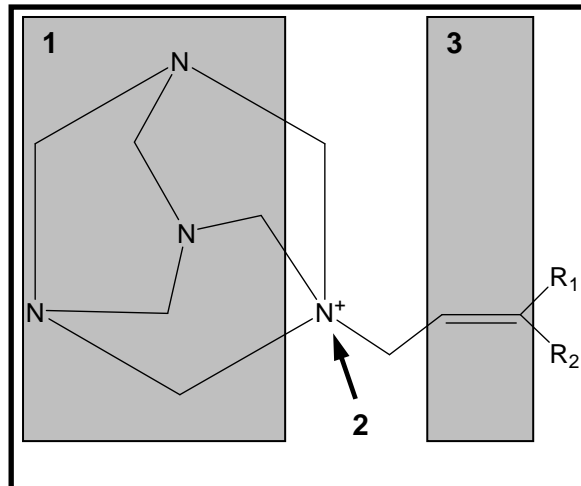


Abb. 4-3: Einfaches „Pharmakophormodell“ für aktive *small molecules* basierend auf den Ergebnissen des ZFTT-Assays. Die angegebenen Ziffern bezeichnen folgende mögliche essentielle Substrukturbereiche: 1 = Interaktionsbereich zur Ausbildung stabilisierender Wasserstoffbrücken an der RNA; 2 = fixierte positive Ladung des quartären Stickstoffatoms zur Steigerung der Affinität zur polyanionischen RNA; 3 = Interaktionsbereich für *Base Stacking* Interaktionen an der RNA.

Das in Abbildung 4-3 gezeigte einfache „Pharmakophormodell“ basiert auf den Ergebnissen der ersten Screeningrunde des Kooperationsprojektes mit Dr. Manuel Nietert und wird durch nachfolgende Projekte hinsichtlich der Analyse von Struktur-Wirkungsbeziehung potentieller Inhibitoren der ZFTT-Reaktion weiterentwickelt.

4.4.2 Antimikrobielles Potential und Beurteilung der RNA-Selektivität

Die Bestimmung des antimikrobiellen Potentials der unter 3.3.2 beschriebenen Substanzen gegen den Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* 168 führte zu enttäuschenden Ergebnissen. Die aktivste Substanz des ZFTT-Assays (Substanz 31) zeigte im 100 μ l Assayformat erst ab einer Substanzkonzentration von 156 μ M eine deutliche Inhibition des bakteriellen Wachstums (s. 3.3.2.4). Die Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität gegen *B. subtilis* 168 im 5 ml-Schüttelkulturvolumen ergab einen noch höheren IC₅₀-Wert für Substanz 31 von annähernd 500 μ M (s. 3.7.2.1). Eine Erklärung für diese unterschiedlichen IC₅₀-Werte boten die Reaktionsbedingungen der verwendeten Assays. Da das Wachstum des Testkeims im 100 μ l-Format nur unter anaeroben Bedingungen und in einem geringen Kulturvolumen stattfand, kam offensichtlich der antimikrobielle Effekt der analysierten Substanz stärker zum Tragen, als unter aeroben Bedingungen im 5 ml Kulturvolumen.

Hauptursache für die geringe antibakterielle Wirksamkeit von Substanz 31, scheint die fixierte positive Ladung im Molekül zu sein, welche die Penetration der Gram-positiven

Zellwand behindert. Auch gegen die verwendeten humanpathogenen Testorganismen (s. 3.3.2.5) wurde dieses Ergebnis mit MHK-Werten von über 300 μM Substanzkonzentration bestätigt.

Um die Affinität der getesteten Substanzen zu unterschiedlichen RNA-Strukturen zu beurteilen, wurden die Ergebnisse des ZFTT-Assays mit denen des Tat-TAR-FRET-Assays verglichen. Damit konnte eine Aussage hinsichtlich der selektiven Bindung an die Zielstrukturen der ZFTT-Reaktion (rRNA, mRNA, tRNA, DNA) im Vergleich zur Wirkung als TAR-RNA-Ligand getroffen werden. Als selektiv zu bezeichnende Substanzen entfalteten demnach ihre inhibitorische Aktivität nur in einem der beiden Assays.

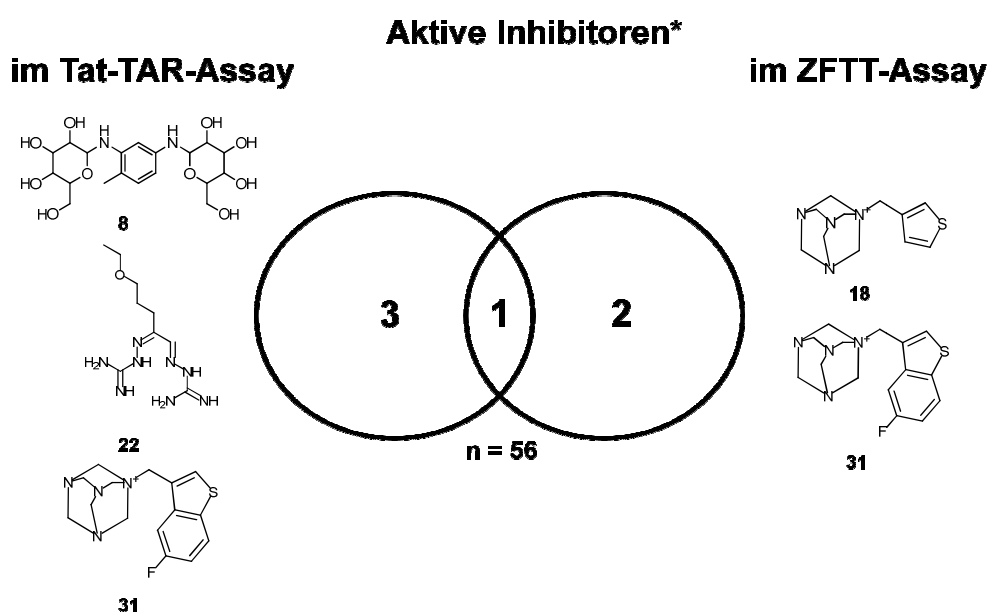


Abb. 4-4: Schematische Darstellung der Verteilung der Aktivität der getesteten Substanzen im ZFTT- und im Tat-TAR-FRET-Assay.

*als aktiv wurden Substanzen bezeichnet, die in einer Konzentration von 100 μM :

1. die relative Fluoreszenz im Tat-TAR-FRET-Assay um 20 % senkten (Nietert, 2008)
2. eine relative Assayinhibition (RAI (%)) im ZFTT-Assay von mindestens 20 % zeigten.

Der hier dargestellte Vergleich der Aktivität der aus den Datenbanken der Anbieter Specs und ASINEX ausgewählten Substanzen umfasst alle 56 in beiden Assays gemessene Substanzen. Abbildung 4-4 zeigt, dass Substanz 31 eine geringe Selektivität, aufgrund vorliegender Aktivität in beiden Assays aufwies. Substanz 18 zeigte im Tat-TAR-Assay keine Aktivität, obwohl im Molekül die Tetraaza-adamantangrundstruktur mit einer vorhandenen fixierten positiven Ladung vorlag. Möglicherweise war die Erweiterung des heteroaromatischen Systems um die Fluorobenzolfunktion für ein inhibitorisch wirkendes *Base Stacking* mit der spezifischen *bulge*-Region der TAR-RNA notwendig (persönliche Kommunikation: Dr. M. Nietert).

4.4.3 Proteomanalytische Identifizierung induzierter Markerproteine und Hypothese des antimikrobiellen Wirkmechanismus von Substanz 31 (DIGE-Studie I)

4.4.3.1 2D-DIGE

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2-DE) war aufgrund der hohen Trennkapazität die Methode der Wahl zur Auftrennung des analysierten Subproteoms von *B. subtilis* 168. Die Begrenzungen der 2-DE bezüglich des quantitativen Vergleichs nachweisbarer Proteinspots auf unterschiedlichen Gelen liegen in der geringen Reproduzierbarkeit dieser Technik und einer hieraus resultierenden Gel-zu-Gel Variation der Abundanz der zu quantifizierenden Proteine. Zur Ermittlung quantitativer Unterschiede der Proteinexpression, durch den Einfluss der angewendeten antimikrobiellen Substanzen mußten für allen Proben absolut gleiche experimentelle Bedingungen herrschen. Diese Voraussetzung war allerdings nur schwer erfüllbar, da sowohl die identische Probenpräparation (z. B. Zellwachstumsbedingungen, Zellaufschluss, Zentrifugation, Proteinquantifizierung), als auch identische Bedingungen während der gelelektrophoretischen Proteintrennung (z. B. Proteinpräzipitationseffekte, Temperaturunterschiede, Polymerisationsgrad der Gele) nur annähernd gleich für alle verwendeten Proben realisierbar waren. Die Anwendung der DIGE-Technik (*difference gel electrophoresis*) zur relativen Quantifizierung differentiell exprimierter Proteine unter dem Einfluss antimikrobiell wirkender Substanzen ermöglichte die parallele Auftrennung behandelter und unbehandelter Proben auf einem Gel (s. 1.6.5). Die individuelle Fluoreszenzmarkierung der parallel aufgetrennten Proteine unterschiedlicher Proben auf einem Gel durch das *Minimallabeling* mit DIGE-Farbstoffen führte zur Minimierung des Einflusses technisch bedingter Gel-zu-Gel Variationen und damit zur Reduktion der für ein signifikantes Ergebnis benötigten Anzahl an 2D-Gelen pro Experiment. Weiterhin erlaubte die Verwendung eines, aus gleichen Proteinmengen der aufgetrennten Proteinproben bestehenden, ebenfalls fluoreszenzmarkierten internen Standards, die relative Quantifizierung und statistische Bewertung, der auf den internen Standard bezogenen normalisierten Daten ausgewählter Proteinspots. Insgesamt ermöglichte damit die DIGE-Technik die differentielle Proteinexpressionsanalyse basierend auf dem Einfluss der pharmakologischen Wirkung der verwendeten antimikrobiellen Substanzen.

4.4.3.2 Biologische Funktionen induzierter Proteine und Vergleich mit Markern antimikrobieller Substanzen

Die Methoden der Proteomanalytik ermöglichen die Analyse des Wirkmechanismus antimikrobieller Substanzen (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten DIGE-Studien beinhalten die Charakterisierung differentiell exprimierter Proteine unter dem Einfluß identifizierter antimikrobieller ZFTT-Inhibitoren (s. auch 4.5.2). Zur Hypothese des antimikrobiellen Wirkmechanismus dieser Substanzen wurde neben der Beurteilung der biologischen Rolle der identifizierten Proteine auch ein Vergleich bereits charakterisierter Markerproteine unter dem Einfluß antimikrobieller Substanzen mit bekanntem Wirkmechanismus vorgenommen. Dies unterstützte die Formulierung einer Hypothese der Wirkmechanismen der analysierten Substanzen (s. 4.4.3.3; 4.5.2.2) im Kontext weiterer proteomanalytischer Studien (Apfel *et al.*, 2001; Gmuender *et al.*, 2001; Bandow *et al.*, 2003a; 2003b). Die publizierte Studie von Julia E. Bandow basiert auf dem „Markerprotein-Ansatz“ und wurde im Rahmen dieser Arbeit als bisher einzige veröffentlichte antimikrobielle Referenzdatenbank mehrerer charakteristischer Proteomsignaturen unterschiedlicher Antibiotikaklassen genutzt (s. 1.6.1). Dieser Ansatz definiert Markerproteine als mindestens zweifach induzierte und mittels Autoradiographie identifizierte Proteine unter dem Einfluß antimikrobieller Substanzen (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005; Bandow *et al.*, 2003a). Zur Formulierung der hypothetischen Wirkmechanismen der identifizierten ZFTT-Inhibitoren (Substanz 31 und Tripeptid G12) wurde zusätzlich ein Vergleich mit bereits identifizierten Markergenen antimikrobieller Substanzen durchgeführt (Cao *et al.*, 2002; Hutter *et al.*, 2004; Pietiäinen *et al.*, 2005; Pietiäinen *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005; Freiberg *et al.*, 2006). Obwohl im Rahmen dieser Arbeit eine proteomanalytische Strategie zur Charakterisierung des antimikrobiellen Wirkmechanismus verfolgt wurde, sind die Ergebnisse transkriptomanalytischer Studien als komplementäre Informationen zur Beleuchtung des antimikrobiellen Wirkmechanismus anzusehen (s. 1.6.1).

Identifizierte Proteine, welche unter dem Einfluß der analysierten antimikrobiellen ZFTT-Inhibitoren reprimiert vorlagen (s. 3.7.2.2, 3.7.3), wurden aufgrund fehlender Referenzen in der Literatur zur Formulierung der hypothetischen Wirkmechanismen nicht berücksichtigt.

Nachfolgend ist die biologische Funktion ausgewählter induzierter Markerproteine durch Substanz 31, sowie deren Überlappung mit antimikrobiellen Substanzen mit bekanntem Wirkmechanismus dargestellt:

a) UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase (MurB; Gen = *murB*):

Das unter dem Einfluss von Substanz 31 mehr als 11-fach induzierte Protein UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase (MurB) katalysiert zusammen mit der UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1 (MurA) die Synthese von UDP-N-acetylmuraminsäure (UDP-MurNAc) aus UDP-N-acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Anschließend erfolgt die Biosynthese der Peptidoglykanvorstufe UDP-MurNAc Pentapeptid durch vier Mur-Ligasen (MurC bis F). Die sich diesem Biosyntheseschritt anschließenden enzymatischen Reaktionen katalysieren den Aufbau von Lipid II über Lipid I als essentiellen Bestandteil zur Synthese des Peptidoglykangerüsts der bakteriellen Zellwand (Bugg und Walsh, 1993; Breukink und de Kruijff, 2006). Als nachgewiesen essentielles Gen bzw. Protein für den Aufbau der bakteriellen Zellwand in *E. coli* und *B. subtilis* stellt MurB eine attraktive antimikrobielle Zielstruktur dar. Nachfolgend ist der Aufbau von UDP-MurNAc aus UDP-GlcNAc als frühester Biosyntheseschritt der bakteriellen Zellwand dargestellt:

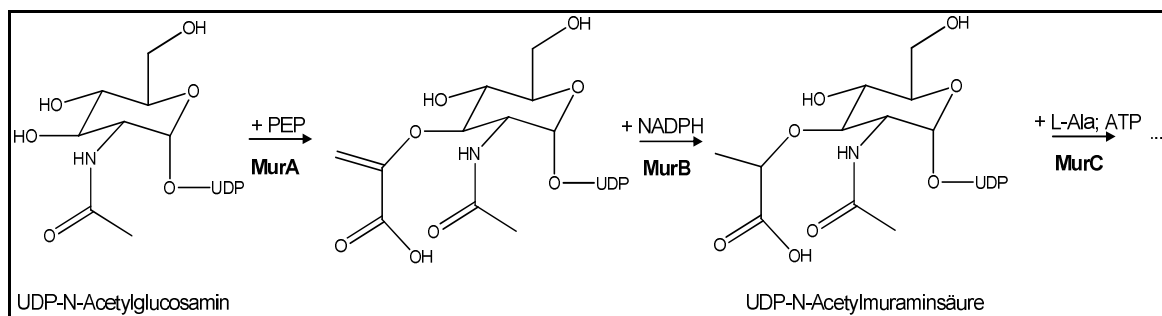


Abb. 4-5: Enzymatisch katalysierte Biosynthese von UDP-MurNAc durch MurA und B.

Eine auf DNA-Microarrays basierende Genexpressionsanalyse zeigte die 2–3-fache Induktion von *murB* durch den Zellwandbiosyntheseinhibitor Vancomycin (Cao *et al.*, 2002).

b) Phosphoglucosamine mutase (GlmM; Gen = *glmM*):

Auch das knapp 6-fach induzierte Protein GlmM kann ausgehend von Fructose-6-phosphat als essentielles Enzym angesehen werden, da es den Aufbau der Vorstufe des oben genannten UDP-GlcNAc im Rahmen der Zellwandbiosynthese katalysiert. GlmM trägt hierbei zur Umwandlung von Glucosamin-6-phosphat zu Glucosamin-1-phosphat bei, das nachfolgend über das Enzym UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (GlmU) in UDP-GlcNAc umgewandelt wird (Mengin-Lecreux und van Heijenoort, 1996).

c) Fatty acid/phospholipid synthesis protein PlsX (PlsX; Gen = *plsX*):

Das durch die Behandlung mit Substanz 31 knapp 3,6-fach hochregulierte Protein PlsX ist als Schlüsselenzym für die Verknüpfung der Fettsäurebiosynthese und der Phospholipidsynthese in *B. subtilis* verantwortlich. PlsX katalysiert als Acyltransferase die Bildung von Phosphatidylsäure durch die Synthese von Acylphosphat aus Acyl-ACP (Acyl-Acyl-Carrier-Protein). Nachfolgend wird über den PlsX/Y-Biosyntheseweg Phosphatidylsäure durch zweifache Acylierung von Glycerolphosphat gebildet (Paoletti *et al.*, 2007). Phosphatidylsäure stellt ein wichtiges Zwischenprodukt bei der Synthese von Phospholipiden zum Aufbau der bakteriellen Zellmembran dar.

d) Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (GuaB; Gen = *guaB*):

Die knapp 3-fach induzierte Inositolmonophosphatdehydrogenase (IMPDH) katalysiert als Enzym der *de novo* Biosynthese von Purinnukleotiden den oxidativen Aufbau von Xanthosin-5'-phosphat aus Inosin-5'-phosphat. Dieser Biosyntheseschritt stellt den begrenzenden Faktor für den Aufbau des Guaninnukleotidpools dar. Damit werden durch die IMPDH essentielle physiologische Prozesse, wie die Replikation, Transkription, Signalbildungsprozesse und die Glykosylierung kontrolliert (McLean *et al.*, 2004).

e) Stress response protein SCP2 (YceC; Gen = *yceC*):

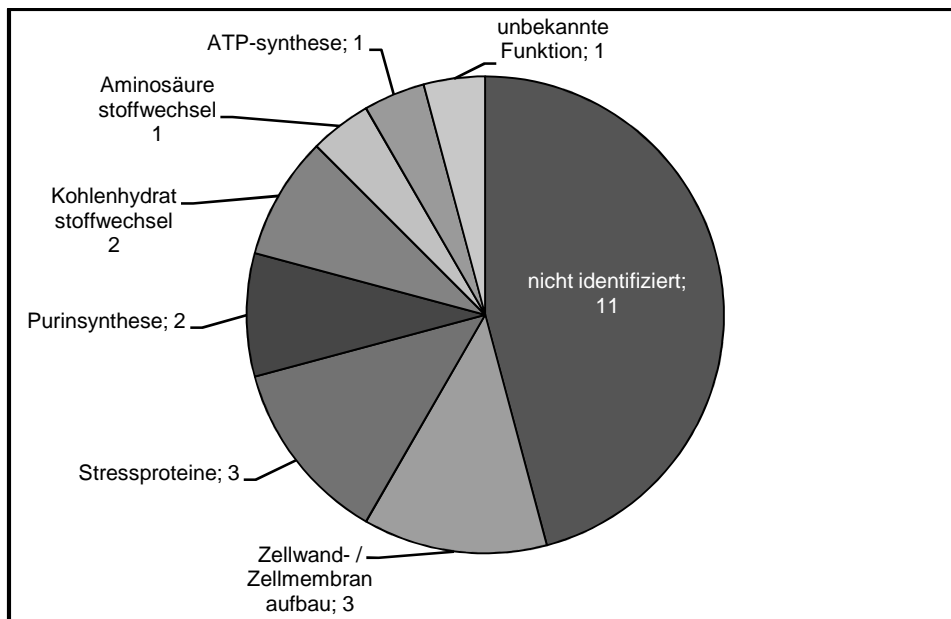
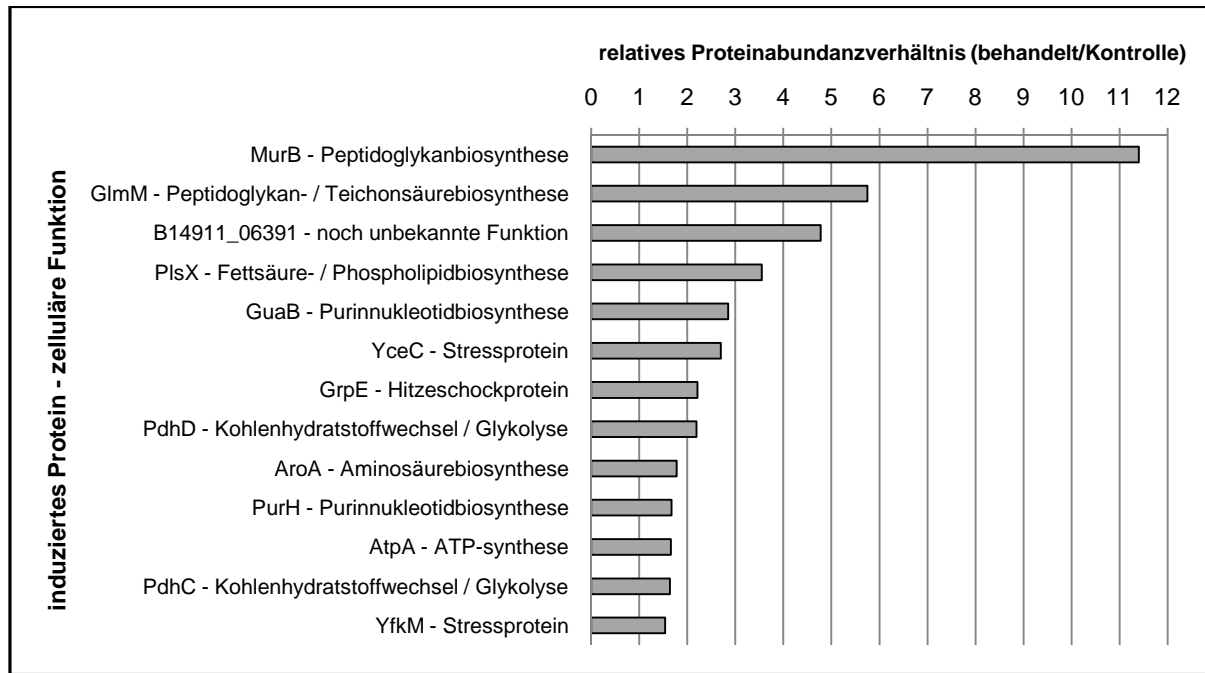
Dieses unter der Kontrolle des Sigma Faktors SigB als Regulator der generellen Stressantwort von *B. subtilis* stehende generelle Stressprotein YceC wurde bereits 2005 als potentieller Marker für die antimikrobielle Wirkung kationischer Peptide identifiziert. Die hierfür angewendete Transkriptionsanalyse zeigte nach der Behandlung von *B. subtilis* mit subinhibitorischen Konzentrationen unterschiedlicher membranaktiver kationischer antimikrobieller Peptide eine 2,1 – 3,7-fache Induktion von *yceC* (Pietiäinen *et al.*, 2005). Weiterhin bewies die proteomanalytische Studie zur Aufklärung antimikrobieller Wirkmechanismen durch Bandow *et al.* die Induktion von YceC bei der Behandlung mit den Zellwandbiosyntheseinhibitoren Bacitracin (Peptidantibiotikum) und dem an der Zellmembran angreifenden Makrolidantibiotikum Valinomycin (Bandow *et al.*, 2003a). Daneben konnte YceC durch eine Studie zur Identifizierung spezifischer induzierter Markerproteine in *B. subtilis* als Marker für Salzstress in 6 % NaCl nachgewiesen werden (Tam *et al.*, 2006).

f) HSP-70 cofactor (GrpE; Gen = *grpE*):

Das Gen *grpE* ist Bestandteil des heptacistronisch aufgebauten *dnaK*-Operons, welches eines der beiden Operons der Klasse I Hitze-Schock-Gene des HrcA-Regulons in *B. subtilis* darstellt. Die Expression des Cochaperons GrpE und dessen anschließender Bindung an die Nukleotidbindungsstelle von DnaK (Hitze-Schock-Protein 70; HSP-70) führt dort zu einer verstärkten Dissoziation von ADP zugunsten von ATP. Dadurch kontrolliert GrpE im Rahmen der Hitze-Schock-Antwort als Nukleotidaustauschfaktor in *B. subtilis* zusammen mit dem Protein DnaJ den Substratfluss ungefalteter Polypeptide zur Substratbindungsstelle von DnaK (Schumann, 2003; Harisson, 2003). Frühere Studien zeigten, dass neben der Hitze-Schock-Antwort auch die Behandlung mit dem Translationsinhibitor Puromycin zur Induktion der Gene des HrcA-Regulons bzw. speziell des Proteins GrpE führten (Mogk *et al.*, 1998; Bandow *et al.*, 2003a). Das Aminonukleosid Puromycin führt als Strukturanalogon der Aminoacyl-tRNA durch Bindung an die wachsende translatierte Peptidkette zur Bildung von Peptidyl-Puromycin und damit zur Inhibition der Translation und zur Bildung verkürzter Peptidketten. Bereits 1990 wurde durch die Inkubation mit Puromycin GrpE als Marker der Hitze-Shock-Antwort von *E. coli* identifiziert (VanBogelen und Neidhardt, 1990).

4.4.3.3 Hypothese des antimikrobiellen Wirkmechanismus

Für Substanz 31 konnte in dieser Arbeit eine deutliche Aktivität gegen essentielle Komponenten der zellfreien prokaryotischen TT-Reaktion nachgewiesen werden. Die geringe Aktivität gegen pathogene bzw. nicht-pathogene bakterielle Organismen beruhte wahrscheinlich auf der geringen Penetrationsmöglichkeit der Substanz durch die Gram-positive bzw. Gram-negative Zellwand aufgrund der fixierten positiven Ladung im Molekül. Zur Hypothese des antimikrobiellen Wirkmechanismus von Substanz 31 wurden die induzierten Markerproteine ihren Stoffwechselwegen zugeordnet und mit Markern antimikrobieller Substanzen mit bekanntem Wirkmechanismus verglichen. Nachfolgend sind die identifizierten induzierten Markerproteine ihren zellulären Stoffwechselwegen zugeordnet (s. Tab. 4-2 und Abb. 4-6):



Tab. 4-2 und Abb. 4-6: Identifizierte und durch Substanz 31 induzierte Proteine unter Angabe der Anzahl und zugehörigen zellulären Funktion.

Oben: Darstellung der relativen Induktion identifizierter Proteine. Unten: Zuordnung und Verteilung der Stoffwechselwege bzw. Funktionen der induzierten Proteine (Gesamtzahl induzierter Proteine = 24).

Folgende induzierten Markergene bzw. -proteine wurden bereits in anderen Transkriptom- bzw. Proteomanalysen antimikrobieller Substanzen identifiziert:

Markergen- bzw. protein	relative Induktion durch Substanz 31	Überlappung mit:	Wirkmechanismus	Referenz
<i>murB</i>	11,4	Vancomycin (Glykopeptidantibiotikum)	Inhibition der Zellwandbiosynthese	Cao <i>et al.</i> , 2002
YceC	2,7	Bacitracin (Polypeptidantibiotikum)	Inhibition der Zellwandbiosynthese	Bandow <i>et al.</i> , 2003a
YceC	2,7	Valinomycin (Makrolidantibiotikum)	Ionophor; Angriff an der Zellmembran	Bandow <i>et al.</i> , 2003a
<i>yceC</i>	2,7	LL-37, PG-1, PLL (natürliche und synthetische antimikrobielle Peptide)	Angriff an der Zellmembran	Pietiäinen <i>et al.</i> , 2005
GrpE	2,2	Puromycin (Nucleosidantibiotikum; aa-tRNA-Analogen)	Translationsinhibitor; Kettenabbruch der Peptidkette	Bandow <i>et al.</i> , 2003a

Tab. 4-3: Durch Substanz 31 induzierte Markergene bzw. -proteine, welche auch durch die Wirkung antimikrobieller Substanzen mit bekanntem Wirkmechanismus induziert wurden.

Schritt 1 – Interaktion mit der bakteriellen Zellwand:

Die Zellwand von *B. subtilis* besteht hauptsächlich aus einer dicken Peptidoglykanschicht mit kovalent gebundenen anionischen Polymeren. Diese anionischen Polymere setzen sich aus Teichonsäuren und den strukturell verwandten Lipoteichonsäuren zusammen, welche in der Plasmamembran bzw. der Peptidoglykanschicht der Zelle verankert sind (s. Abb. 4-7). In *B. subtilis* bilden Teichonsäuren den Hauptanteil anionischer Polymere in der Zellwand. Sie bestehen aus Monomeren substituierter 1,3-Glycerolphosphateinheiten, welche über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft sind und über eine Verbindungseinheit (*linker*) an die N-Acetylmuraminsäure des Peptidoglykangerüsts der Zellwand gebunden sind. Auch die strukturell ähnlich aufgebauten Lipoteichonsäuren bestehen aus monomeren Einheiten von 1,3-Glycerolphosphat, welche über eine Gentibiosyldiacylglycerolfunktion an die Zytoplasmamembran der Zelle gebunden sind. Damit bilden Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren als polymere anionische Phosphodiester eine hohe negative Ladungsdichte auf der Zellwandoberfläche von *B. subtilis* aus. Die Bindung der positiv geladenen Substanz 31 an diese negativ geladenen Strukturelemente der bakteriellen Zellwand über elektrostatische Interaktionen ist daher sehr wahrscheinlich.

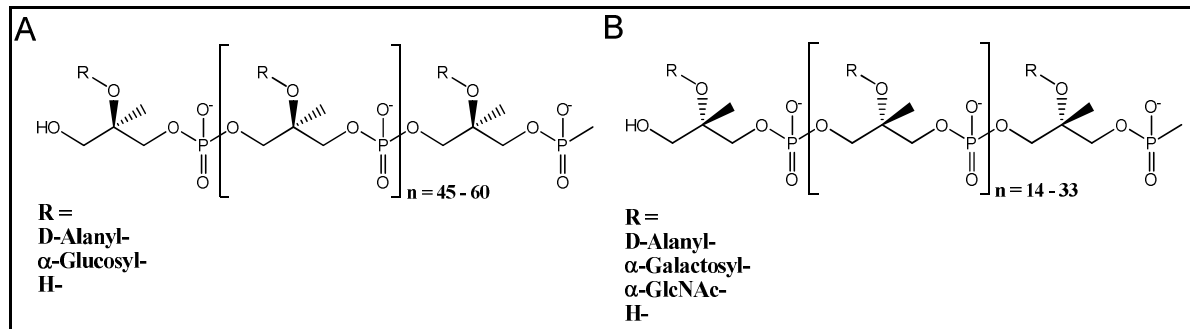


Abb. 4-7: Strukturen monomerer Einheiten der anionischen Polymere der Zellwand von *B. subtilis*.
A: Grundstruktur der Teichonsäure bzw. B: der Lipoteichonsäure mit variablen Substituenten
(modifiziert aus: Neuhaus und Baddiley, 2003).

Die starke Induktion des Markerproteins MurB, welches ein essentielles Protein zur Biosynthese der bakteriellen Zellwand darstellt, deutet zum einen auf die Inhibition der Peptidoglykanbiosynthese bzw. zum anderen auf die Zerstörung von Zellwandstrukturelementen durch Substanz 31 hin. Für die Inhibition der Zellwandbiosynthese spricht weiterhin die Überlappung des Markerproteins MurB mit dem antimikrobiellen Zellwandbiosyntheseinhibitor Vancomycin. Außerdem zeigt die Induktion des Proteins GlmM eine Interaktion von Substanz 31 mit Bestandteilen des Peptidoglykangerüsts und der anionischen Polymere der Zellwand an, da GlmM als essentielles Enzym des ersten Schrittes der Biosynthese von UDP-GlcNAc gilt. UDP-GlcNAc stellt sowohl die Vorstufe für den Aufbau des Peptidoglykangerüsts, als auch für die Biosynthese der anionischen Teichonsäuren dar. Auch die Induktion des Stressproteins YceC, das als Markerprotein der antimikrobiellen Wirkung des Polypeptidantibiotikums Bacitracin identifizierbar war, weist auf die Interaktion von Substanz 31 mit der bakteriellen Zellwand hin. Bacitracin inhibiert die Zellwandbiosynthese durch Bindung an die Undecaprenylpyrophosphateinheit von Lipid II, welches das Carriermolekül der monomeren Einheiten des Peptidoglykangerüsts darstellt (Breukink *et al.*, 1999).

Schritt 2 – Interaktion mit der Zytoplasmamembran:

Die Oberfläche der Zytoplasmamembran von *B. subtilis* ist genau wie die Zellwand negativ geladen. Diese negative Ladung wird hauptsächlich durch die polaren Kopfgruppen der Phospholipidschicht, welche aus mit Fettsäuren substituierten Phosphatidylethanolamin-, Phosphatidylglycerol- und Cardiolipinmolekülen bestehen, verursacht. Damit standen der kationischen Substanz 31 weitere elektrostatische Bindungs- bzw. Interaktionsareale zur Verfügung. Der hohe MHK-Wert zur Inhibition des Wachstums von *B. subtilis* deutet, im Gegensatz zu anderen kationischen antimikrobiellen Substanzen (z. B. Aminoglykosid-

Antibiotika), auf eine eher unspezifische Interaktion mit der Zytoplasmamembran der Zelle hin, welche schließlich zur Zerstörung der Membran und zur Aufnahme der Substanz in das Zellinnere führt. Die Penetration der kationischen Substanz 31 durch die Zytoplasmamembran wäre mechanistisch so erklärbar, dass aggregierte Substanzmoleküle Membranporen ausbilden, welche in Abhängigkeit des vorliegenden Membranpotentials den Einstrom des Inhibitors und den parallelen Ausstrom essentieller wasserlöslicher Bestandteile der Zelle (z. B. K^+ -Ionen, Protonen) ermöglichen. Weiterhin ist die strukturelle Destabilisierung der Phospholipiddoppelschicht der Membran durch Verdrängung stabilisierender divalenter Kationen (wie z. B. Ca^{2+} -Ionen) denkbar. Diese hypothetische Interaktion von Substanz 31 mit der Zytoplasmamembran wird gestützt durch die starke Induktion (ca. 3,6-fach) des Markerproteins PlsX, welches das Schlüsselenzym der Biosynthese der Phospholipide darstellt. Die nachgewiesene Induktion des Stressproteins YceC in Bakterien, die mit dem Peptidantibiotikum Valinomycin behandelt wurden, deutet zusätzlich auf die Interaktion der Substanz 31 mit der bakteriellen Zellmembran hin. Valinomycin wirkt als Ionophor an Zellmembranen und führt durch selektiven Kaliumtransport zum Zusammenbruch des Membranpotentials der Zelle (Seshachalam *et al.*, 1973). Zusätzlich zeigte die DNA-Macroarrayanalyse von *B. subtilis*-Zellen, die mit drei unterschiedlichen membranaktiven kationischen antimikrobiellen Peptiden inkubiert wurden, eine 2,1 – 3,7-fache Induktion des Gens *yceC* (Pietiäinen *et al.*, 2005).

Schritt 3 – Interaktion mit intrazellulären Strukturen:

Die Affinität von Substanz 31 zu funktionellen Strukturen der prokaryotischen zellfreien Transkriptions-/Translationsreaktion konnte im ZFTT-Assay nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine hohe Affinität der Substanz zur TAR-RNA im Tat-TAR-FRET-Assay nachgewiesen (Nietert, 2008). Intrazellulär würde die elektrostatische Bindung der Substanz an polyanionische Strukturen, wie der DNA, mRNA, tRNA und v. a. der rRNA zur Inhibition der Transkriptions- bzw. Translationsreaktion führen. Die Hochregulation des Proteins GrpE als Markerprotein für die zelluläre Hitze-Schock-Antwort und dessen Überlappung als Marker des Translationsinhibitors Puromycin weist auf die funktionelle Inhibition des bakteriellen Ribosoms durch die Interaktion mit Substanz 31 hin. Weiterhin könnte die Induktion des Markerproteins GuaB, welches den begrenzenden Faktor der *de novo* Biosynthese von Guaninnukleotiden (GMP, GDP, GTP) darstellt, einen Einfluss der Substanz auf den Translationsprozess bedeuten. GTP dient den GTP-bindenden Proteinen EF-Tu und EF-G, die als Elongationsfaktoren der prokaryotischen Translation fungieren, in Form von dimeren und

ternären Komplexen als Energiequelle für die Akkomodation und Translokation während der Elongationsphase (s. 1.3.1). Daher könnte eine verstärkte GTP-Synthese auf die Inhibition des Translationsprozesses hinweisen. Da GTP im Rahmen der Transkription als Substrat für die Biosynthese der mRNA dient, ist auch ein Einfluss der Substanz auf diesen Stoffwechselprozess der Zelle denkbar.

Substanz 31 zeigte insgesamt die Eigenschaften klassischer kationischer quartärer Ammoniumverbindungen (QAVs), welche seit über 50 Jahren als antimikrobielle Desinfektionsmittel eingesetzt werden. Prominente Vertreter dieser Stoffklasse stellen die Verbindungen Benzalkoniumchlorid bzw. Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) dar (s. Abb. 4-8), welche ihre antimikrobielle Wirkung durch die Interaktion der positiven Ladung im Molekül mit den negativ geladenen Bestandteilen der Zellwand bzw. der Zytoplasmamembran ausüben. QAVs integrieren hierbei ihren hydrophoben Molekülteil in die Zellmembran und führen damit zu deren struktureller Zerstörung (Gilbert und Moore, 2005).

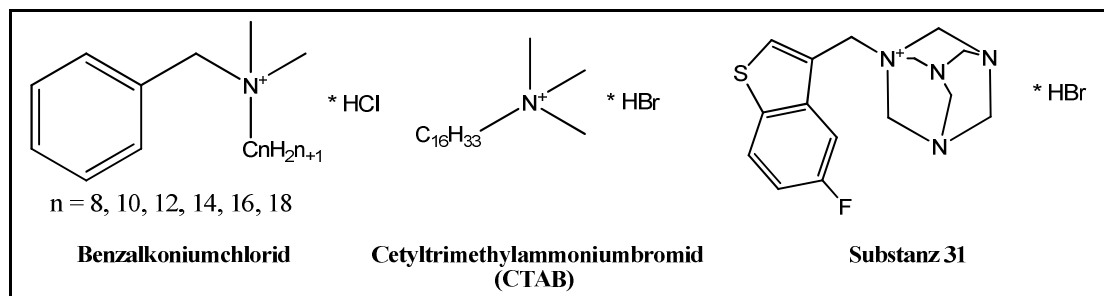


Abb. 4-8: Zwei Vertreter aus der Stoffklasse der QAVs und Substanz 31.

Diese antimikrobielle Stoffklasse zeichnet sich weiterhin durch eine relativ geringe Toxizität und ein breites antimikrobielles Spektrum aus (Kourai *et al.*, 2006). Strukturell unterscheidet sich die Stoffgruppe der QAVs von Substanz 31 durch die lange hydrophobe n-Alkylkette mit Kettenlängen zwischen acht bis 18 Kohlenstoffatomen. Das Fehlen dieses Strukturelementes in Substanz 31 wäre eine Erklärung für die geringe antimikrobielle Aktivität dieser Substanz. Die im Vergleich hierzu wesentlich höhere ZFTT-Aktivität von Substanz 31, durch Bindung an funktionelle Strukturen der TT-Reaktion spricht für den parallelen Einsatz antimikrobieller Substanzen, die durch Zerstörung der Zellwand bzw. Zellmembran den Einstrom von Molekülen der Grundstruktur von Substanz 31 in das Zellinnere erleichtern. Denkbar sind Verbindungen, die durch Komplexbildung divalenter Kationen die strukturelle Integrität der Zellwand bzw. Zellmembran vermindern (z. B. EDTA). Auch die parallele synergistische

Anwendung porenbildender Antibiotika, wie dem Lantibiotikum Nisin oder antimikrobiellen Peptiden wäre sinnvoll. Nachfolgende Arbeiten auf der Basis der gezeigten Ergebnisse sollten im Rahmen weiterer *Screeningansätze* Strukturen auffinden, die eine verbesserte Penetration durch die bakterielle Zellwand bzw. Zellmembran zeigen und damit eine erhöhte antimikrobielle Aktivität aufweisen.

4.5 Identifizierung und Charakterisierung neuer antimikrobieller Inhibitoren der bakteriellen ZFTT-Reaktion – Teil II: antimikrobielle Tripeptide

Das gemeinsame Kooperationsprojekt mit Dr. Marcel Suhartono (AK Prof. Dr. Michael W. Göbel) ermöglichte die Identifizierung und Charakterisierung vier neuer antimikrobieller ZFTT-Inhibitoren einer Peptidbibliothek aus 27 Tripeptiden (s. 3.4). Damit konnte die Substanzbibliothek potentieller antimikrobieller RNA-Liganden um eine attraktive Substanzklasse erweitert werden. Zusätzlich erlaubte die durch M. Suhartono bestimmte Aktivität der Tripeptide im Tat-TAR-FRET-Assay eine Selektivitätsaussage hinsichtlich der Affinität der Substanzen zur TAR-RNA und zu funktionellen Strukturen der zellfreien Transkriptions-/Translationsreaktion (Suhartono, 2008).

4.5.1 Identifizierung neuer Inhibitoren der ZFTT-Reaktion und Beurteilung der RNA-Selektivität

Die im zellfreien Assay analysierten Tripeptide waren heterogen aus natürlichen und nicht-natürlichen Aminosäuren mit aliphatischen, aromatischen und heteroaromatischen Seitenketten zusammengesetzt (s. 6.3.4). Durch die Variation der Aminosäurezusammensetzung konnte der Einfluss elektrostatischer Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und Stapelwechselwirkungen zur Bindung der Peptidliganden an die TAR-RNA und an funktionelle RNA-Strukturen der ZFTT-Reaktion analysiert werden. Aufgrund des polyanionischen Charakters der RNA wurden hauptsächlich natürliche basische Aminosäuren (Arginin, Lysin und Histidin) zur Synthese der zuerst im Tat-TAR-FRET-Assay untersuchten Tripeptide eingesetzt (Suhartono *et al.*, 2008; Krebs *et al.*, 2004). Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass v. a. Arginin, Argininamid und argininreiche Peptide eine hohe Affinität zur viralen TAR-RNA besitzen (Calnan *et al.*, 1991; Puglisi *et al.*, 1993). Zusätzlich wurde der Einfluss der aromatischen Aminosäure Phenylalanin, sowie nicht-natürlicher Aminosäuren mit heteroaromatischen und polyaromatischen Seitenketten

hinsichtlich ihrer Affinität zur RNA untersucht. Da die im Tat-TAR-Assay bestimmten IC_{50} -Werte der Tripeptide stark variierten (0,8 – 1000 μM) wurden die im ZFTT-Assay eingesetzten Tripeptidkonzentrationen daran orientierend gewählt. Sie entsprachen bei bekannten IC_{50} -Werten im Tat-TAR-Assay in Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden Probenkonzentration der doppelten bis 125-fachen bekannten inhibitorischen Konzentration. Grundsätzlich ließen sich die im ZFTT-Assay eingesetzten Tripeptide nach ihrer Zusammensetzung in drei Gruppen einteilen:

Gruppe 1: Tripeptide, die ausschließlich aus den natürlichen Aminosäuren Arginin, Lysin, Histidin und Phenylalanin aufgebaut waren – G1, G2, G3, G4, G5, G14, G18*, G19*, G20*, G21*, G23;

Gruppe 2: Tripeptide, folgender Grundstruktur: $\text{NH}_2\text{-(D)-Arg-X-(D)-Arg-CONH}_2$;
X = nicht-natürliche Aminosäure mit heteroaromatischer Seitenkette – G7, G15, G16, G17, G22, G25;

Gruppe 3: Tripeptide, folgender Grundstruktur: $\text{NH}_2\text{-(D)-Arg-X-(D)-Arg-CONH}_2$;
X = nicht-natürliche Aminosäure mit polyaromatischer Seitenkette – G8, G9*, G10, G11*, G12*, G27.

(* = acetylierter N-Terminus)

Die aktivsten Tripeptide zur Inhibition der ZFTT-Reaktion gehörten zur Gruppe 3 und trugen eine zentrale nicht-natürliche Aminosäure mit einer polyaromatisch substituierten Seitenkette zwischen zwei flankierenden Argininen. Die aktivsten Vertreter G10, G11, G12 und G27 zeigten IC_{50} -Werte zwischen 29 und 49 μM im ZFTT-Assay (s. 3.4.1, 3.4.2). Diese Ergebnisse zeigten, dass unter den analysierten Tripeptiden nur Vertreter mit Phenanthren bzw. Pyren als Substituent der Seitenkette der nicht-natürlichen zentral ständigen Aminosäure ein ausreichendes Interaktionspotential zur Inhibition der ZFTT-Reaktion aufweisen.

Zur Beurteilung der unterschiedlichen Aktivität der Tripeptide im ZFTT-Assay und im Tat-TAR-FRET-Assay mussten beide Assaysysteme bzw. die dem potentiellen Liganden angebotenen Interaktionsoberflächen verglichen werden.

Der im AK Prof. Dr. Göbel durchgeführte Tat-TAR-FRET-Assay basierte auf einem fluorimetrischen Verdrängungsassay (Matsumoto *et al.*, 2000; Suhartono *et al.*, 2008). Zur Inhibition der Tat-TAR-Interaktion musste der potentielle RNA-Ligand das mit Fluoreszein bzw. Rhodamin markierte Tat-Peptid von seiner Bindungsstelle im *bulge*-Bereich der RNA verdrängen (s. Abb. 4-9). Die Bindung eines Inhibitors der Tat-TAR-Interaktion ließ sich durch die Abnahme des FRET und einer hieraus resultierenden Minderung der Emission bei 590 nm durch Konformationsänderung des von der RNA verdrängten Tat-Peptids bestimmen.

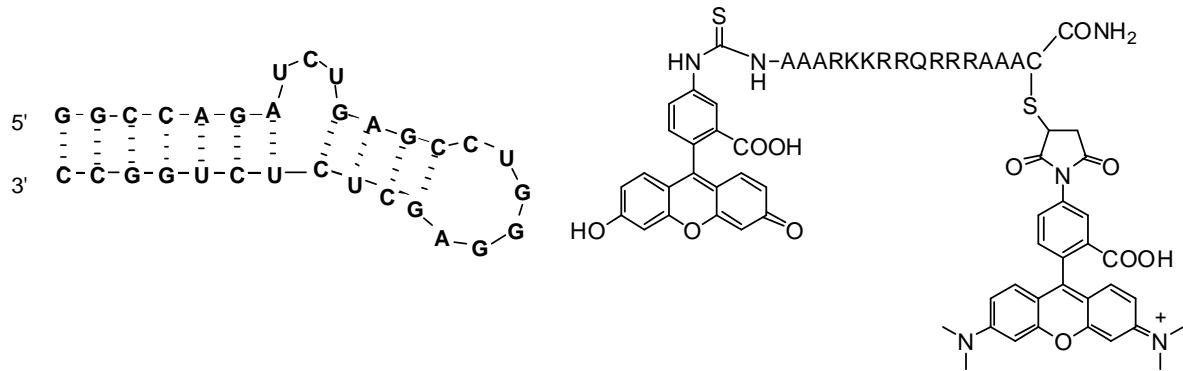


Abb. 4-9: Strukturen der HIV-1 TAR RNA (links) und des FRET-markierten Tat-Peptids (rechts).
Referenz: Suhartono *et al.*, 2008

Zur Inhibition der ZFTT-Reaktion standen den potentiellen Liganden alle an der bakteriellen zellfreien Transkriptions-/Translationsreaktion beteiligten funktionellen Strukturen, d. h.:

- Transkriptionsreaktion: Plasmid-DNA, mRNA
- Translationsreaktion: rRNA, tRNA, ribosomale Proteine, Translationsfaktoren
- Enzyme (z. B. RNA-Polymerase, Pyruvatkinase, Acetatkinase)

als zu inhibierende Interaktionsoberflächen zur Verfügung. Diese wesentlich höhere Komplexität des ZFTT-Assays und die im Vergleich zur TAR-RNA wesentlich größere Interaktionsoberfläche der prokaryotischen ribosomalen RNA könnte die allgemein geringere inhibitorische Aktivität der untersuchten Substanzen im ZFTT-Assay erklären. Die große Interaktionsoberfläche des Ribosoms (riesiger Ribonukleoproteinkomplex; ca. 2,3 MDa) könnte weiterhin zur unspezifischen Bindung positiv geladener Tripeptide an die polyanionische rRNA führen, die aber aufgrund fehlender Interaktion mit funktionellen ribosomalen Strukturen (z. B. *A-Site*, Peptidyltransferasezentrum) nicht zu einer Inhibition der Translation führen würde.

4.5.2 Proteomanalytische Identifizierung induzierter Markerproteine und Hypothese des antimikrobiellen Wirkmechanismus von Tripeptid G12 (DIGE-Studie II)

4.5.2.1 Biologische Funktionen induzierter Proteine und Vergleich mit Markern antimikrobieller Substanzen

Nachfolgend werden die biologischen Funktionen ausgewählter durch Tripeptid G12 induzierter Markerproteine, sowie deren Überlappung mit bereits identifizierten Markern antimikrobieller Substanzen diskutiert:

a) General stress protein 16U (YceD; Gen = *yceD*):

Als generelles Stressprotein von *B. subtilis* wird YceD durch unterschiedliche Stimuli induziert. Dazu zählen neben Hitze-, Salz- und oxidativem Stress auch eine verminderte Verfügbarkeit von Glukose bzw. Sauerstoff im Nährmedium. Das unter der Kontrolle des σ^B - bzw. σ^W -Regulon stehende YceD zeigte in dieser Arbeit eine fast 4-fache Induktion unter der Einwirkung von 22,4 μM Tripeptid G12. Die Studie von L. T. Tam zur proteomanalytischen Ermittlung stressabhängiger Proteomsignaturen in *B. subtilis* zeigte für YceD eine bis zu 5,6-fache spezifische Induktion durch Hitze (Zellwachstum bei 48 °C) (Tam *et al.*, 2006). Die Microarray-basierte Transkriptomanalyse durch C. Freiberg untersuchte die globale Genexpression von *B. subtilis* unter dem Einfluss von 112 antimikrobiellen Substanzen mit unterschiedlichsten Wirkmechanismen zur Ermittlung spezifischer antimikrobieller Biomarker (Freiberg *et al.*, 2006). Für *yceD* konnte in dieser Studie eine 3,6-fache Induktion unter dem Einfluss des Lantibiotikums Mersacidin (8 $\mu\text{g/ml}$) nachgewiesen werden. Der antimikrobielle Wirkmechanismus von Mersacidin besteht aus der Inhibition der Zellwandbiosynthese durch Komplexierung von Lipid II (Brötz *et al.*, 1997). Weiterhin wurde im Rahmen dieser Studie eine 3,4-fache Induktion von *yceD* durch den Zellwandbiosyntheseinhibitor Vancomycin (0,5 $\mu\text{g/ml}$) nachgewiesen.

b) Aconitate hydratase (CitB; Gen = *citB*):

Die in dieser Studie durch Tripeptid G12 knapp 2,4-fach hochregulierte Aconitathydratase katalysiert als Enzym des Tricarbonsäurezyklus die reversible Isomerisierung von Citrat über cis-Aconitat zu D-Isocitrat. CitB wird v. a. durch den Mangel an Nährstoffen durch Inaktivierung der DNA-bindenden Proteine CcpC und CodY induziert. Diese Induktion führt zur Biosynthese von ATP, Reduktionsäquivalenten, sowie von biosynthetischen Zwischenprodukten ausgehend von 2-Ketoglutarat (Kim *et al.*, 2003; Serio *et al.*, 2006). Die Studie von Tam *et al.* (2006) wies CitB als spezifisches Markerprotein für Ammoniummangel im Nährmedium nach. Aber auch als Markerprotein für den Zellwandbiosyntheseinhibitor D-Cycloserin konnte CitB bereits ermittelt werden (Bandow *et al.*, 2003a). D-Cycloserin wirkt gegen empfindliche Gram-positive und negative Stämme bzw. gegen Mycobakterien durch Inhibition der D-Alanin-Racemase und der D-Alanyl-D-Alanin-Synthetase. Die DNA-Microarrayanalyse von Lin *et al.* (2005) zur Analyse des Einflusses subinhibitorischer Konzentrationen unterschiedlicher Translationsinhibitoren gegen *B. subtilis* ergab eine 2,7-fache Induktion von *citB* unter dem Einfluss des Makrolidantibiotikums Erythromycin (0,5-fache MHK). Weiterhin zeigte die

Transkriptomanalyse von *B. subtilis* nach Inkubation mit dem amphiphilen kationischen antimikrobiellen Peptid LL-37 aus der Familie der Cathelicidine eine 2,4-fache Induktion von *citB* (Pietiäinen *et al.*, 2005).

c) Septum site-determining protein MinD (MinD; Gen = *minD*):

Für die symmetrische Zellteilung bakterieller Zellen ist die Ausbildung eines aus polymerisierten Einheiten des tubulinartigen Proteins FtsZ bestehenden Z-Ringes nötig. Das v. a. aus den Min-Proteinen bestehende Min-System der Zelle stellt hierbei einen negativen Regulator zur Ausbildung des Septums an unerwünschten Stellen im Rahmen des Zellteilungsprozesses dar. Die Min-Proteine MinC und MinD werden in *B. subtilis* durch DivIVA (*Cell-division initiation protein*) reguliert. Das in dieser Studie durch die Inkubation mit Tripeptid G12 2,2-fach hochregulierte MinD interagiert als ATPase über seinen amphiphilen positiv geladenen C-Terminus durch reversible Assoziation mit anionischen Stellen der Zytoplasmamembran und führt dadurch zur Interaktion mit DivIVA. Dies führt schließlich zur Ausbildung eines Konzentrationsgradienten des Zellteilungsinhibitors MinC, dessen Konzentrationsminimum am Mittelpunkt der Zelle erreicht ist und damit zur Ausbildung des Z-Ringes und zur symmetrischen Zellteilung beiträgt (Barák *et al.*, 2008; Szeto *et al.*, 2002). Die Transkriptionsanalyse von Tam *et al.* (2006) zeigte eine 3 bis 8-fache Induktion von *minD* durch Phosphat-, Ammonium- und Tryptophanmangel im Nährmedium von *B. subtilis* an. Weiterhin ergab die Studie von Freiberg *et al.* (2006) eine deutliche Induktion von *minD* durch die Behandlung von *B. subtilis* mit dem Translationsinhibitor Chloramphenicol. Desweiteren konnte MinD als induziertes Markerprotein durch den Inhibitor der Isoleucyl-tRNA-Synthetase (IRS) Mupirocin nachgewiesen werden (Bandow *et al.*, 2003a). Mupirocin (Pseudomoninsäure A) inhibiert als Proteinbiosyntheseinhibitor die IRS Gram-positiver und Gram-negativer pathogener Mikroorganismen und wird als Lokalantibiotikum zur Bekämpfung multiresistenter Keime eingesetzt.

d) Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta (PdhB; Gen = *pdhB*):

Das in dieser Studie knapp 2,2-fach hochregulierte Protein PdhB ist in *B. subtilis* Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes (PDH-Komplex), der die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A katalysiert. Damit verknüpft der PDH-Komplex die Biosynthesewege der Glykolyse und des Tricarbonsäurezyklus. Weiterhin zeigten Studien, dass PdhB zusammen mit PdhC die Sporulation von *B. subtilis* reguliert (Gao *et al.*, 2002). In der Posterpräsentation von Binh *et al.* ergab die Proteomanalyse des humanpathogenen

Erregers *S. aureus* eine Induktion von PdhB unter dem Einfluss des Translationsinhibitors Puromycin.

e) Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] (FabI; Gen = *fabI*; Syn.: *yjBW*):

Das unter dem Einfluss von Tripeptid G12 2,1-fach induzierte Protein FabI ist eine Enoyl-[Acyl-Carrier-Protein] Reduktase, die am Elongationszyklus der Fettsäurebiosynthese beteiligt ist. FabI und FabL katalysieren den letzten Schritt jedes Elongationszyklus der Fettsäurebiosynthese (Heath *et al.*, 2000). FabI stellt weiterhin das Zielprotein für die antimikrobiell wirkende Verbindung Triclosan dar. Die Transkriptomanalyse von *B. subtilis* unter dem Einfluss von 37 antibakteriellen Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen durch Hutter *et al.* (2004) bestätigte die starke Induktion von *fabI* durch die antimikrobiellen Fettsäurebiosyntheseinhibitoren Triclosan und Cerulenin. Überraschenderweise zeigte die Transkriptomstudie von Freiberg *et al.* (2006) die eindeutig stärkste Induktion von *fabI* durch den Translationsinhibitor Kanamycin.

Durch Proteomanalysen von *B. subtilis* konnte nach meinem Wissen FabI bisher noch nicht als Markerprotein nachgewiesen werden.

f) Stress response protein SCP2 (YceC; Gen = *yceC*):

Die Eigenschaften und überlappenden Markergene bzw. -proteine des in dieser Studie 2,1-fach induzierten Stressproteins YceC entsprechen den Angaben unter 4.4.3.2 e).

g) Cysteine synthase (CysK; Gen = *cysK*):

Die Cysteinsynthase, welche in dieser Studie in den behandelten Zellen knapp 1,6-fach hochreguliert war, katalysiert den letzten Schritt der Biosynthese von L-Cystein aus *O*-acetyl-L-Serin. In der Studie von Tam *et al.* wurde CysK als spezifisches Markerprotein für die zelluläre Reaktion auf oxidativen Stress durch die Wirkung von Paraquat nachgewiesen. Zusätzlich wurde CysK als Markerprotein für die zelluläre Reaktion von *B. subtilis* auf Disulfidstress, der durch die nicht-native Oxidation freier Thiole zu Disulfiden unter dem Einfluss des Oxidationsmittels Diamid hervorgerufen wurde, charakterisiert. Begründet wurde die Induktion der Cysteinsynthase als einziges Markerprotein aus dem Biosyntheseweg der Aminosäuren durch die Rolle von Cystein als antioxidativ wirkendes Agens (Leichert *et al.*, 2003). Die Überlappung des induzierten Protein CysK mit dem Antibiotikum Nitrofurantoin, dessen toxische Nebenwirkungen auf die oxidative Zerstörung von Proteinen zurückgeführt werden, untermauert die Rolle der Cysteinsynthase als Markerprotein für oxidativen Stress

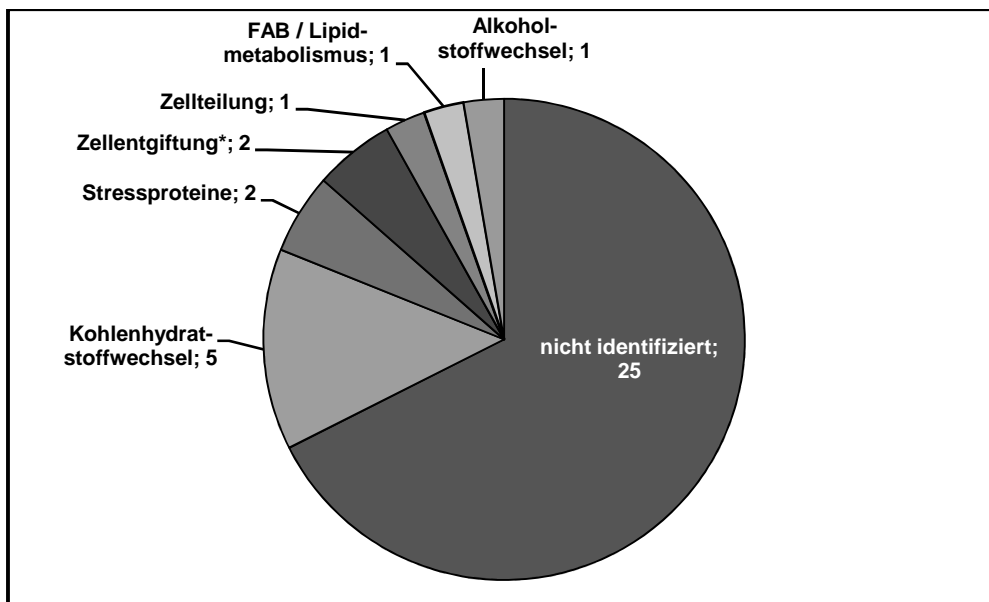
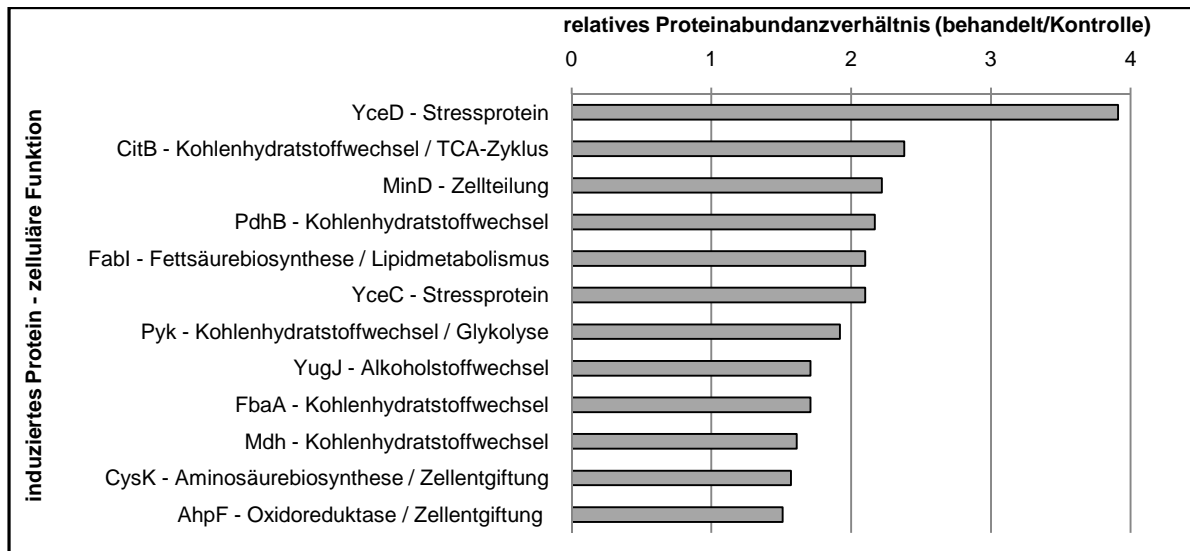
(Bandow *et al.*, 2003a). Die Transkriptomanalyse von *B. subtilis* 168 durch Freiberg *et al.* (2006) wies eine maximale Induktion von *cysK* unter dem Einfluss des Translationsinhibitor Mupirocin nach.

h) Alkyl hydroperoxide reductase (AhpF; Gen = *ahpF*):

Das unter der Kontrolle des unter oxidativen Stressbedingungen aktiven Regulon PerR stehende Protein AhpF zeigte unter dem Einfluss von Tripeptid G12 in dieser Arbeit eine 1,51-fache Induktion im Vergleich zur nicht-inkubierten Kontrollgruppe. Die Studie von Tam *et al.* (2006) konnte in *B. subtilis* eine 3-fache Induktion von AhpF unter der Einwirkung von Wasserstoffperoxid, sowie eine bis zu 12-fache Induktion durch Paraquat nachweisen. Damit stellt AhpF ein spezifisches Markerprotein für oxidativen Stress in *B. subtilis* dar. Weiterhin konnte eine Induktion von AhpF durch Behandlung von *B. subtilis* mit dem Basenanalogen 5-Fluorodeoxyuridin und der Substanz Nitrochinolinoxid gezeigt werden (Bandow *et al.*, 2003a). 5-Fluorodeoxyuridin inhibiert als Zytostatikum in Form des 5-Fluordesoxyuridin-Monophosphat die Biosynthese der DNA durch Blockade der Thymidilatsynthetase. Nitrochinolinoxid zerstört als Mutagen die DNA durch deren kovalente Modifikation.

4.5.2.2 Hypothese des antimikrobiellen Wirkmechanismus

Zur Hypothese des antimikrobiellen Wirkmechanismus des Pyren-Peptids G12 werden nachfolgend die identifizierten hochregulierten Markerproteine ihren jeweiligen zellulären Stoffwechselwegen zugeordnet und mit identifizierten Markergenen bzw. -proteinen von Antibiotika mit bekanntem Wirkmechanismus verglichen (s. Tab. 4-4, Abb. 4-10 und Tab. 4-5):



Tab. 4-4 und Abb. 4-10: Identifizierte induzierte Proteine unter Angabe der Anzahl und zugehörigen zellulären Funktion.

Oben: Darstellung der relativen Induktion identifizierter Proteine unter dem Einfluss von Tripeptid G12.

Unten: Zuordnung und Verteilung der Stoffwechselwege bzw. Funktionen der induzierten Proteine

(Gesamtzahl induzierter Proteine = 37). FAB = Fettsäurebiosynthese

*induziertes Protein CysK (auch im Stoffwechselweg: Aminosäurebiosynthese; s. Tab. 4-4)

Markergen- bzw. protein	relative Induktion	Überlappung mit	Wirkmechanismus	Referenz
<i>yceD</i>	3,9	Vancomycin (Glykopeptidantibiotikum)	Inhibition der Zellwandbiosynthese	Freiberg <i>et al.</i> , 2006
<i>yceD</i>	3,9	Mersacidin (Lantibiotikum)	Inhibition der Zellwandbiosynthese	Freiberg <i>et al.</i> , 2006
CitB	2,4	D-Cycloserin	Inhibition der Zellwandbiosynthese	Bandow <i>et al.</i> , 2003a
<i>citB</i>	2,4	Erythromycin (Makrolidantibiotikum)	Inhibition der Proteinbiosynthese	Lin <i>et al.</i> , 2005
<i>citB</i>	2,4	LL-37 (natürliches antimikrobielles Peptid)	Angriff an der Zellmembran	Pietiäinen <i>et al.</i> , 2005
MinD	2,2	Mupirocin (Ile-tRNA-Synthetaseinhibitor)	Inhibition der Proteinbiosynthese	Bandow <i>et al.</i> , 2003a
<i>minD</i>	2,2	Chloramphenicol	Inhibition der Proteinbiosynthese	Freiberg <i>et al.</i> , 2006
<i>fabI</i>	2,1	Triclosan / Cerulenin	Inhibition der Fettsäurebiosynthese	Hutter <i>et al.</i> , 2004
<i>fabI</i>	2,1	Kanamycin (Aminoglykosidantibiotikum)	Inhibition der Proteinbiosynthese	Freiberg <i>et al.</i> , 2006
YceC	2,7	Bacitracin (Polypeptidantibiotikum)	Inhibition der Zellwandbiosynthese	Bandow <i>et al.</i> , 2003a
YceC	2,7	Valinomycin (Makrolidantibiotikum)	Ionophor; Angriff an der Zellmembran	Bandow <i>et al.</i> , 2003a
<i>yceC</i>	2,7	LL-37, PG-1, PLL (natürliche und synthetische antimikrobielle Peptide)	Angriff an der Zellmembran	Pietiäinen <i>et al.</i> , 2005
CysK	1,6	Nitrofurantoin (antimikrobielles Nitrofuran)	oxidative Zerstörung essentieller Zellbestandteile	Bandow <i>et al.</i> , 2003a
<i>cysK</i>	1,6	Mupirocin (Ile-tRNA-Synthetaseinhibitor)	Inhibition der Proteinbiosynthese	Freiberg <i>et al.</i> , 2006

Tab. 4-5: Durch Tripeptid G12 induzierte Gene bzw. -proteine, welche bereits durch die Wirkung von Antibiotika mit bekanntem Wirkmechanismus als Marker identifiziert wurden.

Aus den Ergebnissen der biochemischen, mikrobiologischen und proteomanalytischen Experimente zur antimikrobiellen Aktivität von Tripeptid G12 gegen *B. subtilis* 168 lässt sich somit folgender hypothetischer Wirkmechanismus ableiten:

Schritt 1 – Interaktion mit der bakteriellen Zellwand:

Der unter 4.4.3.3 beschriebene Aufbau der Gram-positiven Zellwand gibt für die erste Phase des antimikrobiellen Wirkmechanismus Anlaß zur Hypothese einer möglichen Assoziation des kationischen Tripeptids über elektrostatische Interaktionen mit den anionischen Bestandteilen der bakteriellen Zellwand. Die Überlappung induzierter Markergene bzw.

–proteine mit den Zellwandbiosyntheseinhibitoren Vancomycin und Mersacidin (*yceD*), D-Cycloserin (CitB) und Bacitracin (YceC) untermauert diese Hypothese.

Schritt 2 – Interaktion mit der Zytoplasmamembran:

Die Studien zur Interaktion kationischer antimikrobieller Peptide (AMPs) mit Modellmembransystemen oder Ganzzellsystemen, unter Nutzung Membranpotential sensibler Farbstoffe und Fluoreszenz markierter Peptide zeigten, dass sich die Interaktion der AMPs mit bakteriellen Membranen grundsätzlich in zwei Klassen einteilen lassen: Membran zerstörend und nicht Membran zerstörend (Powers und Hancock, 2003). Beiden Mechanismen geht eine Assoziation kationischer Peptide mit der negativ geladenen Oberfläche der Zytoplasmamembran voraus. Der Membran zerstörende Mechanismus läßt sich in drei weitere Modelle unterteilen: das *barrel-stave*-Modell, das mizellare Aggregationsmodell und das *carpet*-Modell. Das *barrel-stave*-Modell beschreibt die senkrechte Insertion und Aggregation einer relativ kleinen Anzahl einzelner Peptide in die Zytoplasmamembran. Dies führt zur Ausbildung von transmembranen Poren bzw. Kanälen zylindrischer Struktur, die zum Austritt essentieller zytoplasmatischer Bestandteile und zum Zusammenbruch des Membranpotentials führen (Ehrenstein *et al.*, 1977). Das alternative mizellare Aggregationsmodell beinhaltet die Ausbildung peptidischer Mizellen, welche sich entlang der gesamten Zytoplasmamembran in das Zellinnere erstrecken und dadurch wassergefüllte Kanäle ausbilden. Dadurch werden Ionen und andere wasserlösliche zytoplasmatische Bestandteile aus der Zelle transportiert (Hancock und Chapple, 1999). Das *carpet*-Modell beschreibt die Zerstörung der Zellmembran durch flächiges Abdecken der Membranoberfläche durch die Interaktion der Peptide mit den negativ geladenen Kopfgruppen der Membranphospholipide. Hieraus resultiert die Störung der Membranintegrität und die Ausbildung von Rissen in der Membran (Pouny *et al.*, 1992). Alle drei Mechanismen führen letztendlich zum Zelltod durch die Depolarisation der bakteriellen Zelle aufgrund der Zerstörung der Zellmembran. Einen weiteren Penetrationsmechanismus kationischer Peptide stellt die Passage der Zytoplasmamembran ohne deren Permeabilisierung und die Entfaltung der antimikrobiellen Hauptwirkung durch Interaktion mit Bestandteilen des Zytoplasmas dar. Vor allem argininreiche Peptide zeigten ihre antimikrobielle Hauptwirkung auf der Ebene zytoplasmatischer Zielstrukturen, wie z. B. durch Interaktion mit der DNA oder der RNA (Futaki *et al.*, 2001). Für eine Membran zerstörende Penetration des argininhaltigen antimikrobiellen Tripeptids G12 spricht die Überlappung des induzierten Markerproteins YceC mit dem Peptidantibiotikum Valinomycin, welches durch seine

Wirkung als Ionophor an bakteriellen Zellmembranen zum Zusammenbruch des Membranpotentials führt. Auch die Überlappung der induzierten Markergene *yceC* und *citB* des antimikrobiellen humanen Peptids LL-37 (Piettiäinen *et al.*, 2005) mit den in dieser Studie identifizierten Translationsprodukten deutet auf eine Membran zerstörende Interaktion des Tripeptids G12 hin. LL-37 stammt als AMP aus der Familie der Cathelicidine und zerstört als α -helikales amphiphiles Peptid die mikrobielle Membran durch die Ausbildung von Poren (Henzler-Wildman *et al.*, 2003). Die hohe Zahl überlappender induzierter Markergene bzw. –proteine mit Proteinbiosyntheseinhibitoren, sowie der relativ geringe Unterschied der IC_{50} -Werte im zellfreien System verglichen mit dem Ganzzellassay (IC_{50} zellfrei: 36 μ M / IC_{50} Zelle: 23 μ M) deutet auf einen geringen Einfluss der Gram-positiven Zellwand zur Entfaltung der antimikrobiellen Hauptwirkung durch Interaktion des Peptids mit funktionellen Strukturen im Zytoplasma hin.

Schritt 3 – Interaktion mit intrazellulären Strukturen:

Die inhibitorische Aktivität des Tripeptids G12 im Tat-TAR-Assay und im ZFTT-Assay, bewies die Affinität zur TAR-RNA bzw. zu den funktionellen Strukturen der prokaryotischen Transkriptions-/Translationsreaktion. In diversen Studien wurde bereits festgestellt, dass AMPs unterschiedlicher Struktur und Aminosäuresequenz intrazellulär an die DNA und RNA binden und dadurch ihren antimikrobiellen Wirkmechanismus entfalten. Das hauptsächlich aus den Aminosäuren Arginin und Prolin aufgebaute AMP PR-39 inhibiert nach nicht Membran zerstörender Penetration im Zytoplasma die DNA- und Proteinbiosynthese von *E. coli* (Boman *et al.*, 1993). Auch das aus 21 Aminosäuren bestehende AMP Buforin II zeigt eine hohe Affinität zu DNA und RNA und übt seinen antimikrobiellen Wirkmechanismus durch intrazelluläre Bindung an diese Zielstrukturen aus (Park *et al.*, 1998). Die durch die Studien von Lin *et al.* (2005) bzw. Freiberg *et al.* (2006) nachgewiesene Induktion der Markergene *citB* (Erythromycin), *minD* (Chloramphenicol) und *fabI* (Kanamycin) und deren Überlappung mit den in dieser Arbeit identifizierten Markerproteinen für das Tripeptid G12, untermauert die Ergebnisse des ZFTT-Assays. Weiterhin konnten in der Studie dieser Arbeit zwei überlappende Markergene bzw. –proteine (MinD und *cysK*) des Translationsinhibitors Mupirocin (Inhibitor der Isoleucyl-tRNA-Synthetase) nachgewiesen werden.

Neben der Analyse des antibakteriellen Wirkmechanismus des Tripeptids G12 gegen den bakteriellen Modellorganismus *B. subtilis* 168 wurde zusätzlich das Zytotoxizitätspotential des Peptids gegen eukaryotische NALM-6-Zellen untersucht. Für die maximal eingesetzte Peptidkonzentration von 150 μ M konnte in dieser Studie kein zytotoxischer Effekt gegen

NALM-6-Zellen festgestellt werden (s. 3.4.6). Weiterhin zeigte der mehr als 7-fach höhere IC_{50} -Wert zur Wachstumsinhibition eukaryotischer NALM-6-Zellen ($IC_{50 \text{ NALM-6}}$: 156,9 μM / $IC_{50 \text{ B. subtilis}}$: 22,4 μM) einen selektiven zytostatischen Einfluss auf bakterielle Zellen.

Kationische antimikrobielle Peptide werden als neue vielversprechende Stoffgruppe zur Bekämpfung bakterieller Infektionserkrankungen bewertet. Vor allem durch das allgemeine Wirkspektrum kationischer Peptide gegen Gram-positive, Gram-negative Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren stellen diese Verbindungen eine attraktive Stoffklasse für die antibiotische Wirkstoffforschung dar (Hancock und Sahl, 2006). Die Peptidbank des medizinischen Institutes der Universität von Nebraska (Dr. G. Wang, University of Nebraska Medical Center; <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) verzeichnet momentan 852 Einträge antibakterieller Peptide (Stand: 07.08.2008). Das in dieser Studie untersuchte Tripeptid G12 ist als artifizielles Mikropeptid mit keinem bisher bekannten antimikrobiellen Peptid strukturell vergleichbar und stellt damit den Ausgangspunkt für die Entwicklung einer neuen Gruppe aktiver peptidischer Inhibitoren der prokaryotischen Translationsreaktion mit antibakteriellem Potential gegen humanpathogene Keime dar.

5. Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ermöglichten die Identifizierung neuer Inhibitoren der bakteriellen Transkriptions-/Translationsreaktion durch den Einsatz eines eigenständig etablierten nicht-kommerziellen zellfreien prokaryotischen GFP-Expressionsassays (ZFTT-Assay) als *Screening* Werkzeug. Die Optimierung der Salz- und Plasmidkonzentrationen im Rahmen der Etablierung des Assays ermöglichte die Translation von bis zu 25 µg/ml des Reporterproteins GFP im *Batch*-Verfahren. Die Bestimmung der Assayqualität (nach Zhang *et al.*, 1999) ergab für Assayvolumina von 25 µl bzw. 100 µl Z'-Faktoren von über 0,74 und damit eine exzellente Assayqualität. Der Nachweis der selektiven Inhibition der ZFTT-Reaktion durch antimikrobielle Translationsinhibitoren im Vergleich zu Antibiotika anderer Wirkmechanismen gelang im Rahmen einer proteomanalytischen Studie. Die parallele Anwendung des etablierten ZFTT-Assays und standardisierter Ganzzellassays ermöglichte die Charakterisierung der Aktivitätsprofile neun antimikrobieller Substanzen aus vier repräsentativen Translationsinhibitorclassen unter zellfreien und Ganzzellbedingungen in Abhängigkeit ihrer physikochemischen Substanzeigenschaften (Weidlich *et al.*, 2008).

Der Aufbau mehrerer interdisziplinärer Forschungskooperationen mit unterschiedlichen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen wurde genutzt, um eine Substanzbibliothek chemisch heterogener Verbindungen als Quelle potentieller antimikrobieller Inhibitoren der bakteriellen Transkriptions-/Translationsreaktion zu generieren. Im Rahmen der Forschungskooperationen mit Dr. Manuel Nietert und Yusuf Tanrikulu (AK Prof. Dr. Gisbert Schneider) wurden zwei unterschiedliche virtuelle *Screening*ansätze zur Identifizierung aktiver *small molecules* eingesetzt, welche im ZFTT-Assay auf ihre inhibitorische Aktivität analysiert wurden. Dadurch konnten drei aktive potentielle *A-Site* Liganden (Tanrikulu *et al.*, 2007) und zwei aktive Inhibitoren der ZFTT-Reaktion mit Tetraaza-adamantan-Grundstruktur identifiziert werden. Das Tetraaza-adamantan-Derivat 1-[(5-fluoro-1-benzothien-3-yl)methyl]-3,5,7-triaza-1-azoniatricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dekan („Substanz 31“) wurde als aktivste Substanz im ZFTT-Assay mit einer IC₅₀ von 98 µM nachgewiesen. Weiterhin ermöglichte die Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen des Tetraaza-adamantan-Derivates den Nachweis des aktivitätsbestimmenden Einflusses des Tetraaza-adamantansubstituenten im ZFTT-Assay und erlaubte die Formulierung eines einfachen Pharmakophormodells dieser Substanzklasse.

Im Rahmen des Kooperationsprojektes mit Dr. Marcel Suhartono (AK Prof. Dr. Michael W. Göbel) wurden 27 heterogen strukturierte Tripeptide als potentielle antimikrobielle Inhibitoren der ZFTT-Reaktion untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass nur Tripeptide der Grundstruktur $\text{NH}_2\text{-(D)-Arg-X-(D)-Arg-CONH}_2$, die mit einer polyaromatisch substituierten Seitenkette ausgestattet waren ($X = \text{Pyren- bzw. Phenanthren-substituierte nicht-natürliche Aminosäure}$) eine signifikante Aktivität zur Inhibition der ZFTT-Reaktion aufwiesen. In der Studie wurden vier aktive polyaromatisch substituierte synthetische Tripeptide identifiziert, die im ZFTT-Assay IC_{50} -Werte zwischen 30 – 50 μM zeigten (Suhartono *et al.*, 2008). Für das Tripeptid „G12“ konnte neben der Aktivität im ZFTT-Assay eine MHK von knapp 30 μM gegen den humanpathogenen Testorganismus *S. aureus* nachgewiesen werden. Weiterhin war für das Tripeptid „G12“ im Rahmen einer Toxizitätsstudie keine Zytotoxizität gegen eukaryotische NALM-6-Zellen in Substanzkonzentrationen bis zu 150 μM nachweisbar. Außerdem zeigte das Tripeptid „G12“ eine mehr als 7-fach höhere selektive Wachstumsinhibition gegen prokaryotische Zellen im Vergleich zu eukaryotischen Zellen.

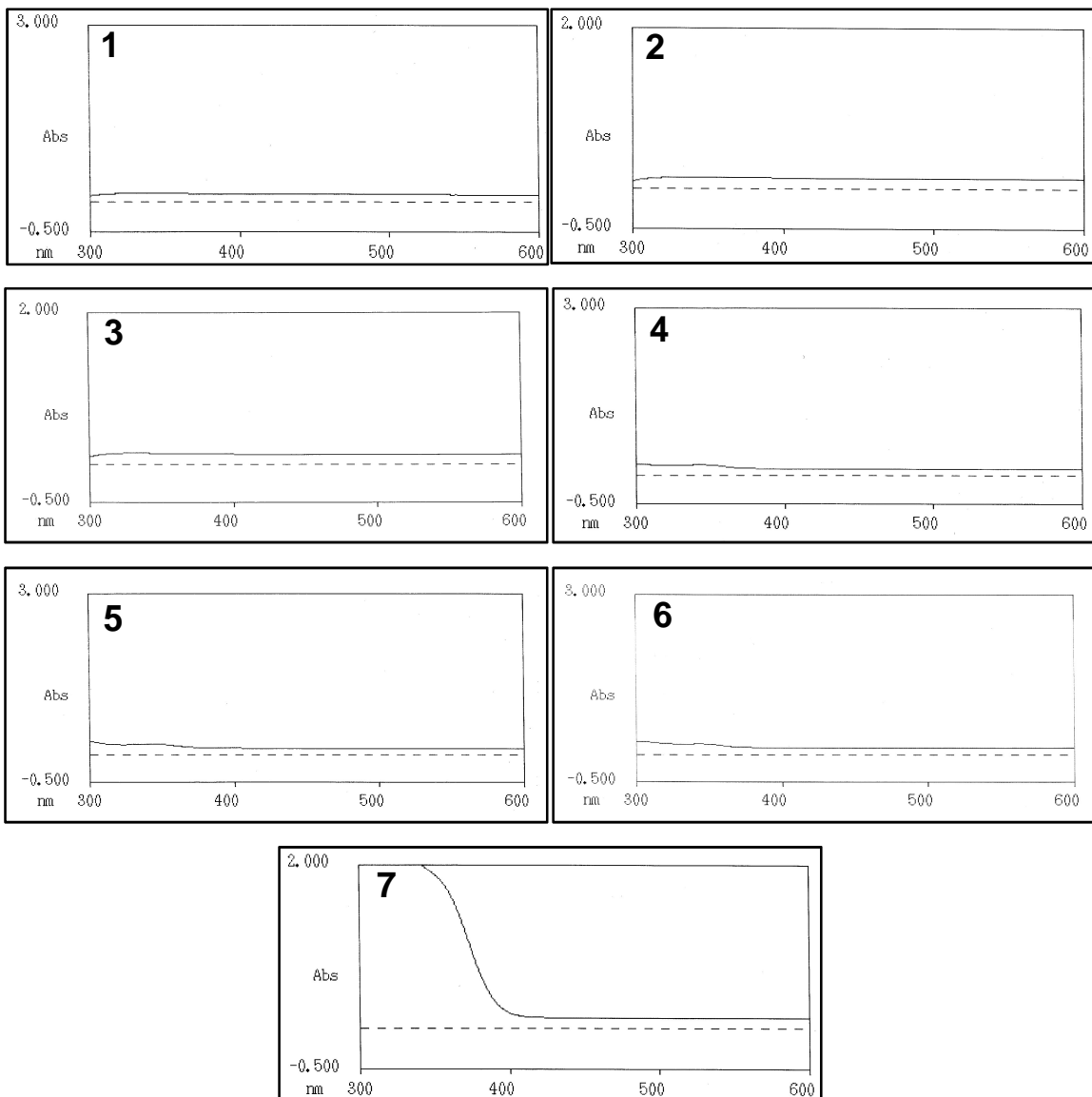
Struktur-Wirkungsanalysen der Naturstoffgruppe der pentazyklischen Triterpene ermöglichten den Nachweis der aktivitätsbestimmenden 11-Ketogruppe (ca. 70 % höhere Aktivität) innerhalb dieser Substanzklasse zur Inhibition der ZFTT-Reaktion. Zusätzlich wurde 11-Keto- β -boswelliasäure (β -KBA) als ZFTT-aktives (IC_{50} -Wert = 290 μM) und antimikrobiell wirksames ($\text{MHK}_{E. faecalis} = 34 \mu\text{M}$) Boswelliasäurederivat identifiziert. In weiteren Experimenten konnte das hohe Aktivitätspotential roher bakterieller Kulturüberstände unterschiedlicher *B. subtilis*-Stämme zur Inhibition der ZFTT-Reaktion gezeigt werden. Zusätzlich wurde die antimikrobielle Aktivität ausgewählter Kulturüberstände gegen resistente MRSA- und VRE-Stämme in Verdünnungen bis zu 1:32 nachgewiesen.

Zur Analyse der antimikrobiellen Wirkmechanismen der aktiven ZFTT-Inhibitoren „Substanz 31“ und des Tripeptids „G12“ wurden 2D-DIGE-Experimente durchgeführt, die als Ergebnis eine relative Quantifizierung differentiell regulierter Markerproteine des Testorganismus *B. subtilis* 168 unter dem Einfluß subletaler Substanzkonzentrationen liefern. Die massenspektrometrische Identifizierung der Markerproteine mittels MALDI-TOF-MS und MS/MS und dem nachfolgenden Abgleich mit bereits publizierten Markern antimikrobieller Substanzen erlaubte schließlich die Formulierung hypothetischer Wirkmechanismen beider Inhibitoren.

6. Anhang

6.1 Absorptionsspektren aktiver ZFTT-Inhibitoren

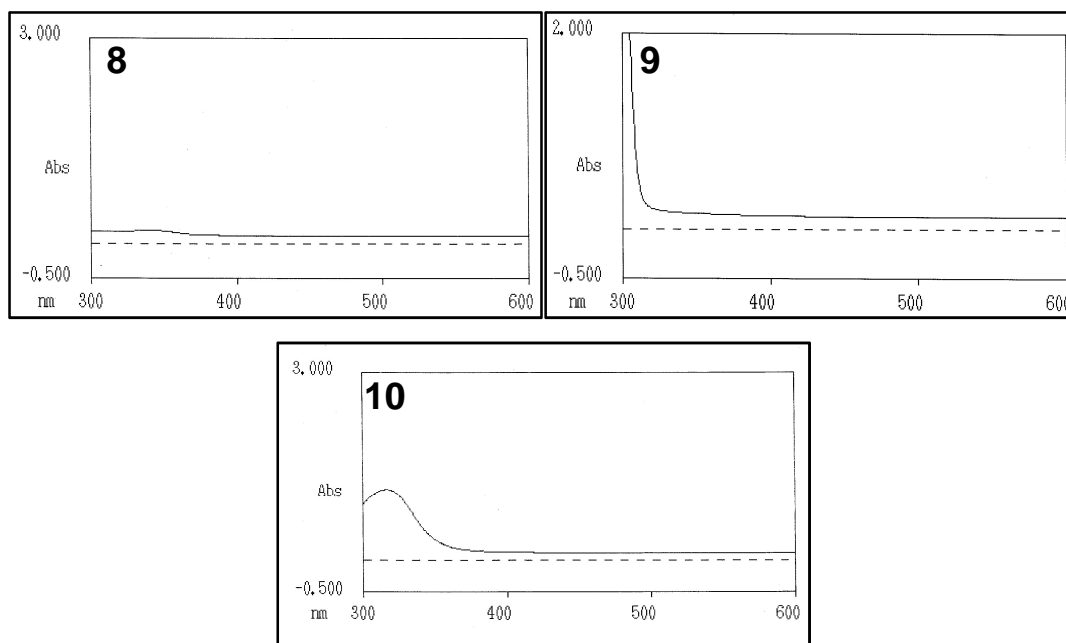
6.1.1 Absorptionsspektren ZFTT-aktiver Standardsubstanzen unter 3.2



Absorptionsspektrum #	Substanz	Substanzkonzentration	Lösungsmittel
1	Neomycintrisulfat	1 mM	Wasser
2	Paromomycinsulfat	1 mM	Wasser
3	Streptomycinsulfat	1 mM	Wasser
4	Erythromycin	1 mM	DMSO
5	Josamycin	1 mM	DMSO
6	Oleandomycintriacetat	1 mM	DMSO
7	Chloramphenicol	1 mM	DMSO

Abb. 6-1 und Tab. 6-1: Absorptionsspektren aktiver ZFTT-Inhibitoren unter 3.2.

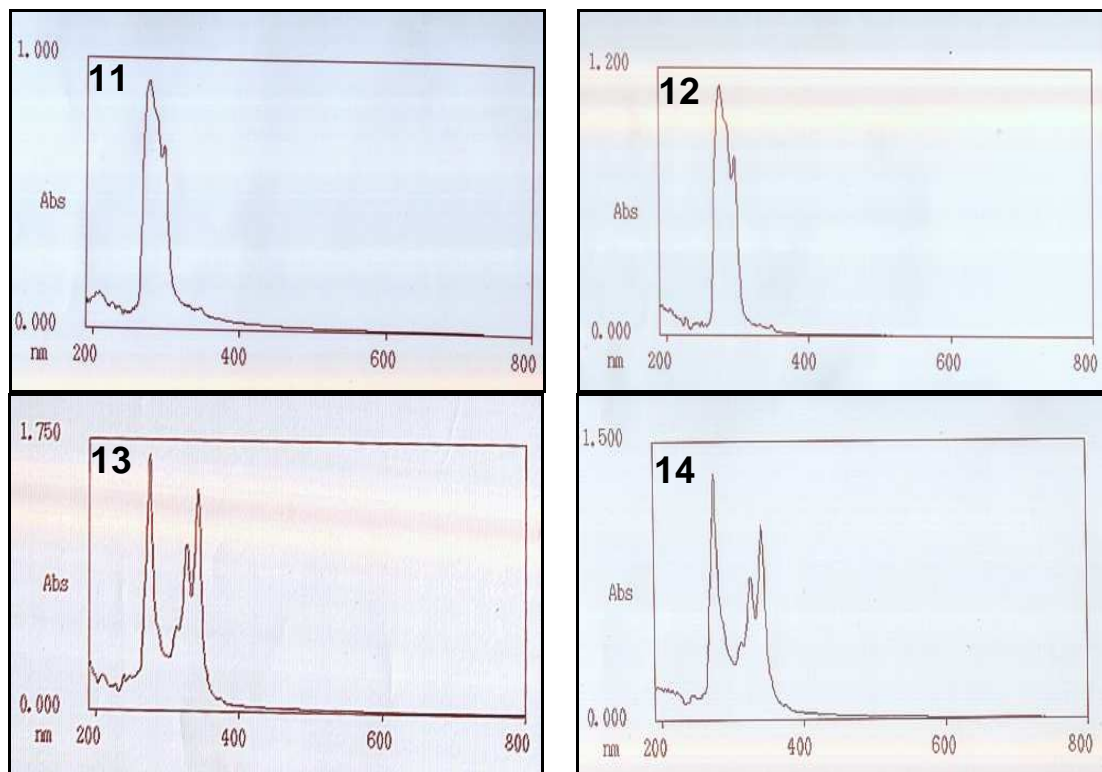
6.1.2 Absorptionsspektren ZFTT-aktiver kleiner Moleküle unter 3.3.2



Absorptionsspektrum #	Substanz	Substanzkonzentration	Lösungsmittel
8	1-(3-thienylmethyl)-3,5,7-triaza-1-azoniatricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]dekan; Substanz 18	0,5 mM	DMSO
9	1-[(5-fluoro-1-benzothien-3-yl)methyl]-3,5,7-triaza-1-azoniatricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dekan; Substanz 31	0,5 mM	DMSO
10	1-Prop-2-inyl-3,5,7-triaza-1-azoniaadamantanbromid; TAZA	0,5 mM	DMSO

Abb. 6-2 und Tab. 6-2: Absorptionsspektren aktiver ZFTT-Inhibitoren unter 3.3.2.

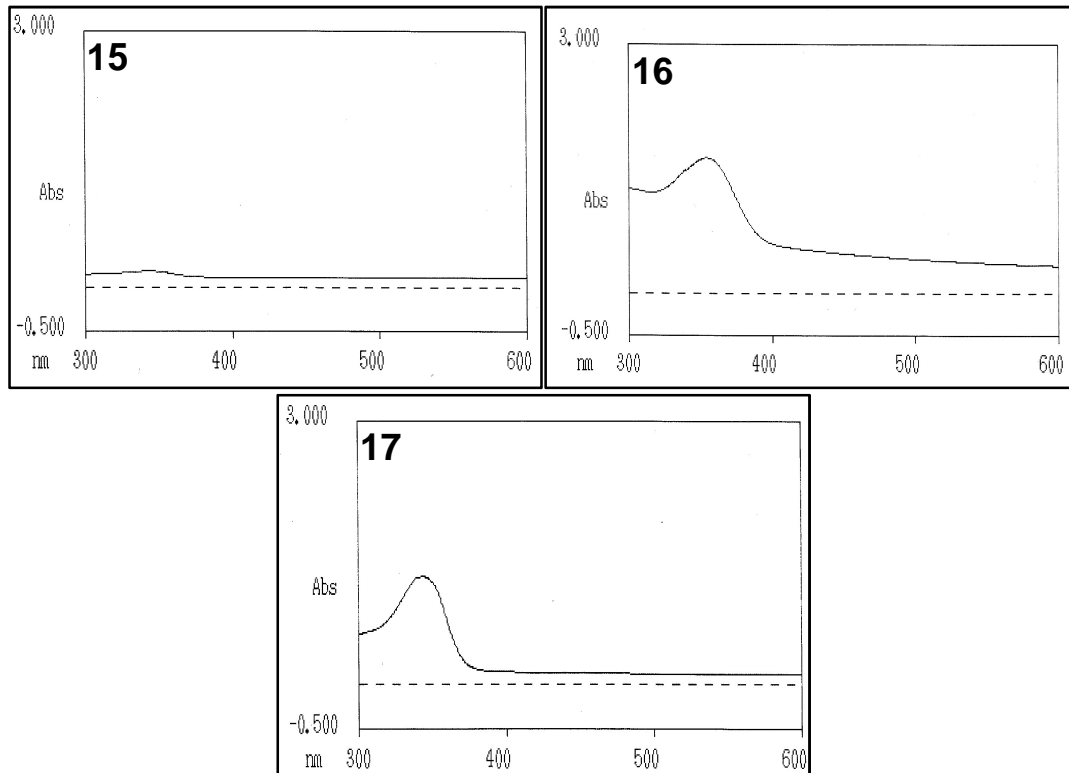
6.1.3 Absorptionsspektren ZFTT-aktiver Tripeptide unter 3.4.1



Absorptionsspektrum #	Substanz	Substanzkonzentration	Lösungsmittel
11	NH ₂ -(D)Arg-(L)Phen(C ₂)-(D)Arg-CONH ₂ ; Tripeptid G10	1 mM	Wasser
12	AcNH-(D)Arg-(L)Phen(C ₂)-(D)Arg-CONH ₂ ; Tripeptid G11	1 mM	Wasser
13	NH ₂ -(D)Arg-(L)Pyrenyl(C ₂)-(D)Arg-CONH ₂ ; Tripeptid G12	1 mM	Wasser
14	NH ₂ -(D)Arg-(L)Pyrenyl(C ₃)-(D)Arg-CONH ₂ ; Tripeptid G27	0,75 mM	Wasser

Abb. 6-3 und Tab. 6-3: Absorptionsspektren aktiver ZFTT-Inhibitoren unter 3.4.1.

6.1.4 Absorptionsspektren ZFTT-aktiver pentazyklischer Triterpene unter 3.5.1



Absorptionsspektrum #	Substanz	Substanzkonzentration	Lösungsmittel
15	11-Keto- β -boswelliasäure	0,5 mM	DMSO
16	Glycyrrhetinsäure	1 mM	DMSO
17	Ammoniumglycyrrhizinat	0,5 mM	DMSO

Abb. 6-4 und Tab. 6-4: Absorptionsspektren aktiver ZFTT-Inhibitoren unter 3.5.1.

6.2 Chemische Bezeichnung analysierter Substanzen

6.2.1 Specs-Substanzen zu 3.3.1

Potentielle A-Site Liganden - 3.3.1		
Substanzcode - Dissertation	Specs #	Substanzbezeichnung ¹
Y1	AN-465/42834458	2-chloro-N-methyl-N-phenyl-5-(4H-1,2,4-triazol-4-yl)benzamid
Y2	AG-690/15439072	N,N-diethyl-2-[3-methoxy(methylsulfonyl)anilino]acetamid
Y3	AF-399/42017730	4-(1-benzofuran-2-ylcarbonyl)-5-(4-tert-butylphenyl)-3-hydroxy-1-(2-phenylethyl)-1,5-dihydro-2H-pyrrrol-2-on
Y4	AG-690/34865037	4-benzyl-7,7-dimethyl-6,9-dihydro-7H-pyrano[4',3':4,5]thieno[3,2-e][1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrimidin-5(4H)-on
Y5	AG-690/08507016	2-[3-nitro-5-(3-pyridinyloxy)phenyl]-1H-isoindol-1,3(2H)-dion
Y6	AG-690/11451155	3-methyl-8-[(2-phenylethyl)sulfanyl]-7-(3-phenylpropyl)-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion
Y7	AM-807/37261003	3-benzoyl-17,19-dioxa-4-azapentacyclo[14.2.1.0 ^{2,14} .0 ^{4,13} .0 ^{7,12}]nonadeca-5,7,9,11-tetraen-15-on
Y8	AN-919/14384247	1-(4-ethoxyphenyl)-3-(4-thiomorpholinyl)-2,5-pyrrolidinedion
Y9	AN-919/15527194	1-(3,5-dimethoxyphenyl)-3-(4-thiomorpholinyl)-2,5-pyrrolidinedion
Y10	AN-023/14773005	3-cyclopentyl-5-(2,3-dimethoxybenzyliden)-2-(phenylimino)-1,3-thiazolidin-4-on
Y11	AQ-390/42698483	Dibenzo[b,d]furan-2-yl 2,5-dimethoxybenzensulfonat
Y12	AQ-390/42708525	N-(3-acetyl-2-methyl-1-benzofuran-5-yl)-4-fluoro-N-isonicotinoyl-2-methylbenzensulfonamid
Y13	AN-652/43024810	2-(methoxycarbonyl)phenyl 2,4,5-trimethoxybenzoat
Y14	AG-690/40696285	3-(1H-tetraazol-1-yl)phenyl 2-thiophenecarboxylat
Y15	AH-487/14755031	4-methyl-N-[2-(4-morpholinyl)-2-oxoethyl]-N-(2-phenylethyl)benzensulfonamid
Y16	AG-690/11451154	8-[(4-chlorobenzyl)sulfanyl]-3-methyl-7-(3-phenylpropyl)-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion
Y17	AG-401/42873878	5-(1-phenyl-1H-tetraazol-5-yl)-2-(4-pyridinyl)-4-(trifluoromethyl)pyrimidin
Y18	AJ-292/14559288	6-ethyl-3-(4-methoxyphenyl)-6-methyl-2-(methylsulfonyl)-3,5,6,8-tetrahydro-4H-pyrano[4',3':4,5]thieno[2,3-d]pyrimidin-4-on
Y19	AO-081/15245186	2-(3-methoxyphenyl)-9-(4-methoxyphenyl)tetrahydro-5H-pyrazolo[1,2-a]pyrrolo[3,4-c]pyrazol-1,3(2H,3aH)-dion
Y20	AO-081/15043081	5-(1,3-benzodioxol-5-ylmethyl)-3-cyclohexyl-2-[(4-methoxyphenyl)imino]-1,3-thiazolidin-4-on
Y21	AP-906/41639080	4-{acetyl[(2,4-dimethylphenyl)sulfonyl]amino}-1-naphthyl acetat

Tab. 6-5: Specs-Substanzcode und chemische Bezeichnung der Verbindungen.

6.2.1 Specs-Substanzen zu 3.3.2

Potentielle RNA-Liganden - 3.3.2		
Substanzcode - Dissertation	Specs #	Substanzbezeichnung ¹
1	AK-968/36914011	3-amino-4-(2-aminoanilino)-2H-chromen-2-on
2	AE-842/34025005	4-(2-aminoanilino)-2,6-dimethyl-3-pyridinylamin
3	AE-018/31856002	N,N-dimethyl-4-pyridinamin
4	AN-604/14719010	N-(2,4-dichlorobenzyl)-N-(1,3,5-triazatricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dec-7-yl)amin
5	AO-763/14814006	1,3-bis[2-hydroxy-2-(6-methoxy-2,2-dimethyltetrahydrofuro[2,3-d][1,3]dioxol-5-yl)ethyl]-5-methyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-on
6	AK-968/41924780	Ethyl 3-amino-2-[(2-phenylpropanethioly)amino]-2-butenolat
7	AK-249/12981051	6-amino-9-propyl-9H-carbazol-3-ylamin
8	AG-205/07944032	2-(hydroxymethyl)-6-(2-methyl-5-[[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl]amino]anilino)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol
9	AG-690/40140152	2,5-dimethoxybenzaldehyde [4,6-di(4-morpholinyl)-1,3,5-triazin-2-yl]hydrazon
10	AK-249/11477004	3-((2,4,5,7-tetrakisnitro-9H-fluoren-9-ylidene)methyl)-1H-indol
11	AG-205/32622033	2,4,5-trimethoxybenzaldehyd [4,6-di(4-morpholinyl)-1,3,5-triazin-2-yl]hydrazon
12	AO-476/40921651	6-amino-5-[(6-amino-4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinyl)(3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-4-yl)methyl]-2-thioxo-2,3-dihydro-4(1H)-pyrimidinon
13	AO-763/14815010	5-chloro-1,3-bis[(3,5,6-trihydroxy-4-methoxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl]-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one
14	AG-205/14141002	4,6-di(4-morpholinyl)-1,3,5-triazine-2-carbonitril
15	AG-205/33125038	5-(2-methylphenoxy)-1,3-benzenediamin
16	AK-777/37037060	2-[(4,6-diamino-2-pyrimidinyl)sulfanyl]-N,N-diethylacetamid
17	AN-604/14719007	N-(3,4-dimethoxybenzyl)-N-(1,3,5-triazatricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dec-7-yl)amin
18	AA-516/33241059	1-(3-thienylmethyl)-3,5,7-triaza-1-azoniatricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dekan
19	AN-604/14719009	N-[4-(diethylamino)benzyl]-N-(1,3,5-triazatricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dek-7-yl)amin
20	AE-848/33591030	3-[(2-hydroxyethyl)amino]carbonyl-1-[6-(3-[(2-hydroxyethyl)amino]carbonyl)-1-pyridiniumyl]hexyl]pyridinium
21	AH-034/32855031	5-[6-(4-thioxo-1,3,5-triazinan-1-yl)hexyl]-1,3,5-triazinan-2-thion
22	AM-814/41094635	2-(1-{2-[amino(imino)methyl]carbohydrazonoyl}-4-ethoxybutyliden)hydrazincarboximidamid
23	AG-205/32979032	(4,5,8-tris(hydroxymethyl)octahydropyrazino[2,3-b]pyrazin-1(2H)-yl)methanol
24	AG-664/32340028	N-[2-(7-hydroxy-9-methyl-3,9-diazabicyclo[3.3.1]non-3-yl)ethyl]guanidin
25	AG-690/15427921	4-[3-(9H-carbazol-9-yl)-2-hydroxypropyl]-4-methylmorpholin-4-ium
26	AG-205/33150021	3-((3-carboxy-2-nitro-6-methylphenyl)sulfanyl)-5-hydroxy-2,6-bisnitro-4-methylbenzoesäure
27	AE-411/41415604	1-tert-butyl-2-thioxo-1,2-dihydro-3-pyridinecarbaldehyd thiosemicarbazon
28	AG-205/07943064	2-(1,2-dihydroxyethyl)-5-(2-[[5-(1,2-dihydroxyethyl)-3,4-dihydroxytetrahydro-2-furanyl]amino]-4,5-dimethylanilino)tetrahydro-3,4-furandiol
29	AK-249/41069867	1-[3-(9H-carbazol-9-yl)-2-hydroxypropyl]-8-hydroxyquinolinium
30	AN-329/41189583	N-[4-[4-(acetylamino)-3-aminophenoxy]-2-aminophenyl]acetamid
31	AA-516/31407048	1-[(5-fluoro-1-benzothien-3-yl)methyl]-3,5,7-triaza-1-azoniatricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dekan
32	AG-690/13508188	5-(2,5-dimethyl-1H-pyrrol-1-yl)-2-(methoxy)anilin
33	AO-081/15569284	2,5-dimethyl-1-(6-quinolinyl)-1H-pyrrole-3-carbaldehydthiosemicarbazon
34	AG-205/33172033	Terephthalaldehyde bis[[4-(4-morpholinyl)-6-(1-pyrrolidinyl)-1,3,5-triazin-2-yl]hydrazon}
35	AC-907/34122064	3,5-bis(ethoxycarbonyl)-1-ethylpyridinium

Tab. 6-6: Specs-Substanzcode und chemische Bezeichnung der Verbindungen.

¹Quelle: Specs, Delft, Niederlande; www.specs.net

6.2.2 ASINEX-Substanzen zu 3.3.2.6

Potentielle RNA-Liganden - 3.3.2.4		
Substanzcode - Dissertation	ASNIEX #	Substanzbezeichnung ¹
AS1	ASN 02832805	N-(3-cyano-4,5-dimethylthiophen-2-yl)-2-(4,6-diaminopyrimidin-2-ylthio)acetamid
AS2	ASN 03019101	2-(4,6-diaminopyrimidin-2-ylthio)-N-(2,5-diethoxyphenyl)acetamid
AS3	ASN 03155390	2-(4,6-diaminopyrimidin-2-ylthio)-N-(3,5-dimethoxyphenyl)acetamid
AS4	ASN 03155391	N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-2-(4,6-diaminopyrimidin-2-ylthio)acetamid
AS5	ASN 03203608	ethyl 4-amino-2-(2-(3,5-dimethoxyphenylamino)-2-oxoethylthio)pyrimidin-5-carboxylat
AS6	ASN 03367087	1-((6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydrochinolin-3-yl)methyl)-3-(3-morpholinopropyl)-1-(pyridin-3-ylmethyl)thioharnstoff
AS7	ASN 03581037	ethyl 2-(2-(4-amino-3-carbamoyl-N-(2,4-dimethoxyphenyl)isothiazol-5-carboxamido)-2-(5-methylfuran-2-yl)acetamido)acetat
AS8	ASN 03775927	1-(3-hydroxypropyl)-1-((6-methoxy-2-oxo-1,2-dihydrochinolin-3-yl)methyl)-3-(3-morpholinopropyl)thioharnstoff
AS9	ASN 04365896	1,3-bis(3-(dimethylamino)propyl)-1-((7-methoxy-2-oxo-1,2-dihydroquinolin-3-yl)methyl)thioharnstoff
AS10	ASN 04370277	6-methoxy-3-(((1-(4-methoxybenzyl)-1H-tetrazol-5-yl)methyl)(3-morpholinopropyl)amino)methyl)chinolin-2(1H)-on
AS11	ASN 05303834	7-(((3-hydroxypropyl)((1-phenethyl-1H-tetrazol-5-yl)methyl)amino)methyl)-[1,3]dioxolo[4,5-g]chinolin-6(5H)-on
AS12	ASN 05700308	6-ethoxy-3-(((3-hydroxypropyl)((1-(2-methoxyethyl)-1H-tetrazol-5-yl)methyl)amino)methyl)chinolin-2(1H)-on
AS13	ASN 05700533	6-ethoxy-3-(((3-hydroxypropyl)((1-(3-morpholinopropyl)-1H-tetrazol-5-yl)methyl)amino)methyl)chinolin-2(1H)-on
AS14	ASN 06537061	1-(2-(3-cyano-6-methoxynaphthalen-2-ylamino)ethyl)-3-(3-(dimethylamino)propyl)thioharnstoff
AS15	BAS 00140972	N,N-bis-(N-carbamimidoylacetimidamido)-ethylendiamin
AS16	BAS 00175970	(E)-2-((2-(4,6-dimorpholino-1,3,5-triazin-2-yl)hydrazono)methyl)-4-methoxyphenol
AS17	BAS 00452693	2-(4,6-dimorpholino-1,3,5-triazin-2-ylamino)ethanol
AS18	BAS 00665568	1,1'-(2,2'-azanediy)bis(ethan-2,1-diyl)dipyridinium
AS19	BAS 00919007	2,2'-(piperazin-1,4-diyl)diethanamin
AS20	BAS 01367404	(E)-2-(2-(diethylamino)-5-nitrobenzyliden)hydrazincarboximidamid
AS21	BAS 02107985	N-[4-(dimethylamino)benzyl]-N-(1,3,5-triazatricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]dek-7-yl)amin
AS22	BAS 02973798	3-(2-(2-amino-2-oxoethyl)-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)propanamid
AS23	BAS 04952689	2-(4,6-diaminopyrimidin-2-ylthio)-N-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamid

Tab. 6-7: ASINEX-Substanzcode und chemische Bezeichnung der Verbindungen.

¹ Quelle: ASINEX, Moskau, Russland; www.asinex.com

6.3 Strukturformeln analysierter Substanzen

6.3.1 Specs-Substanzen zu 3.3.1

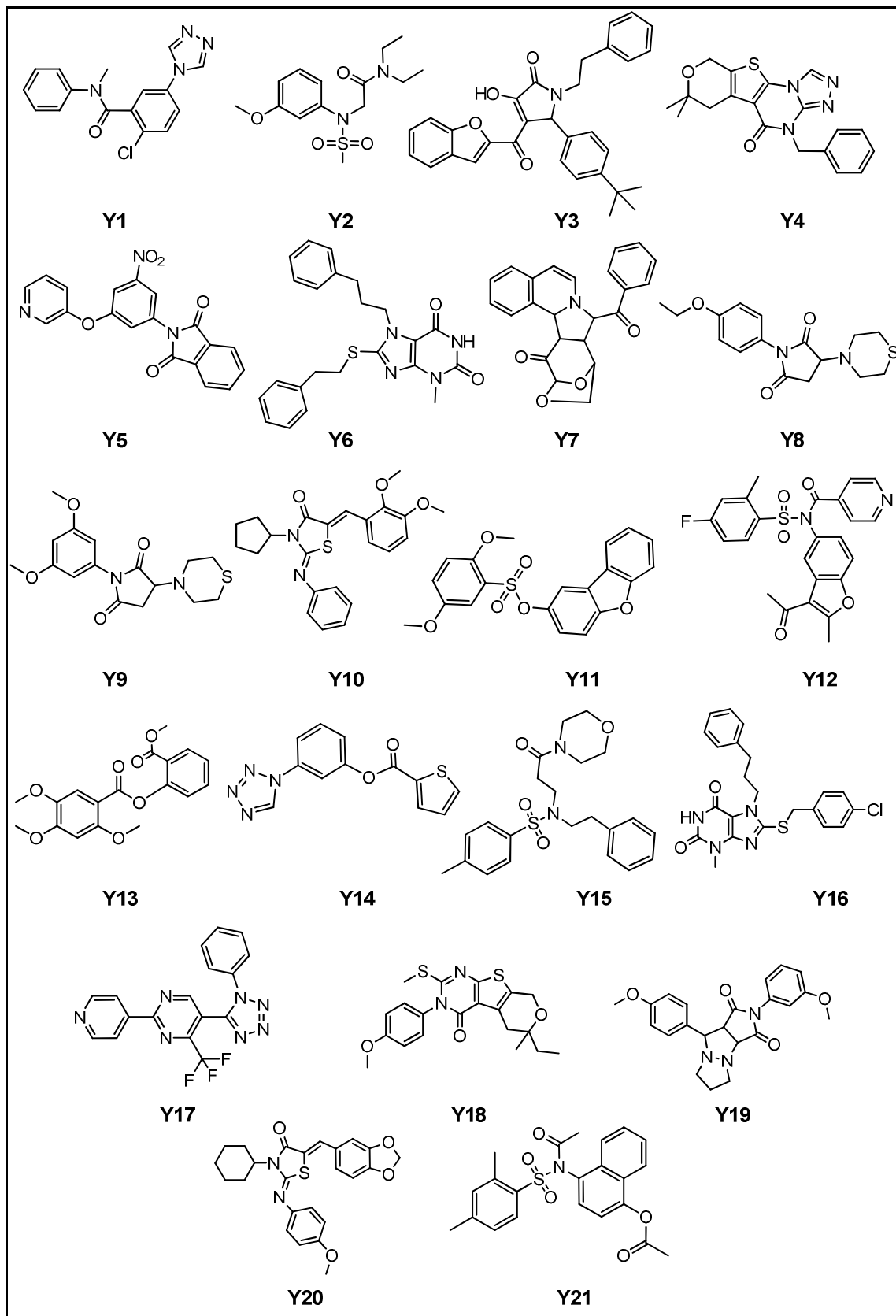
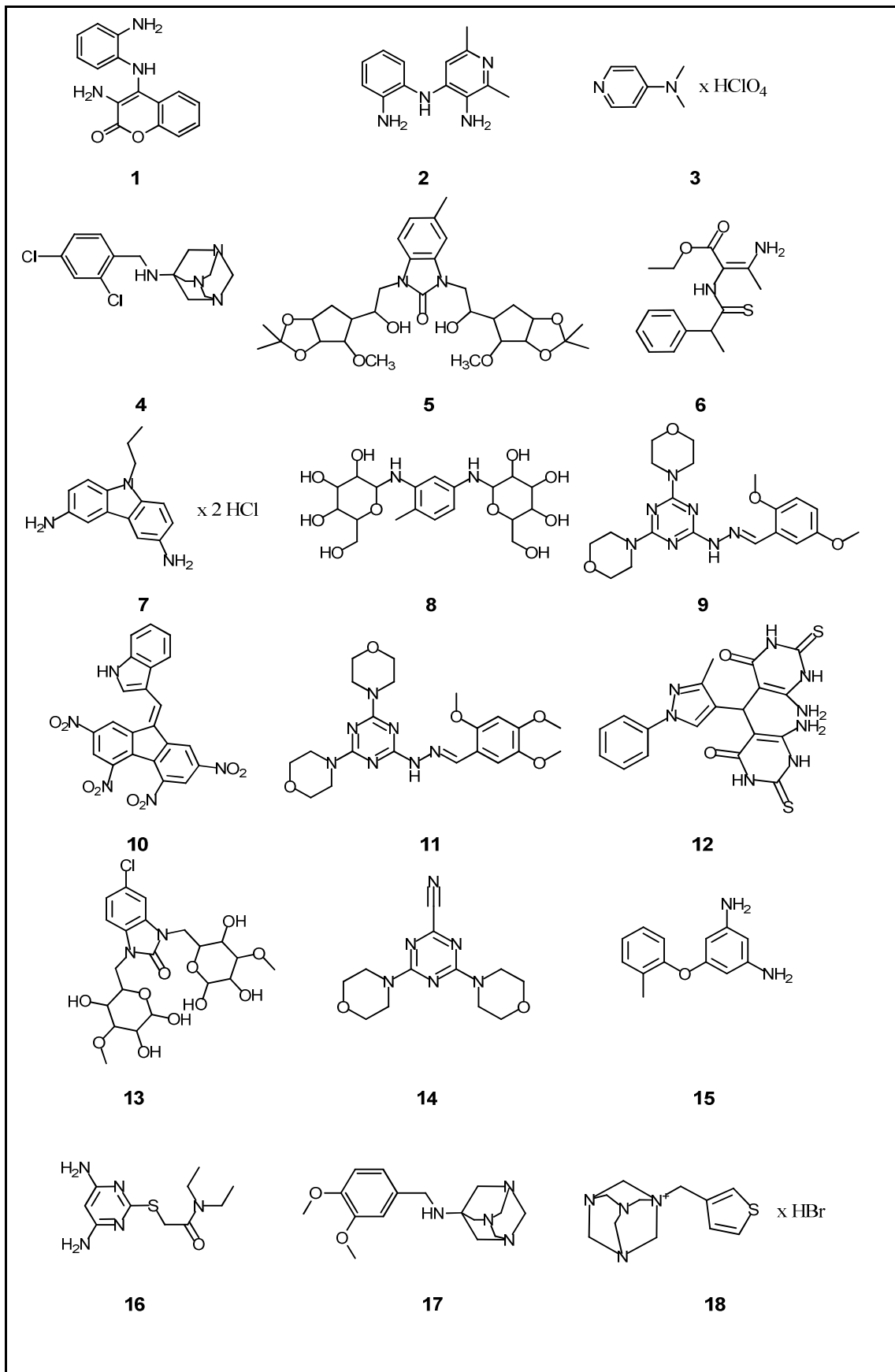


Abb. 6-5: Durch ligandenbasiertes virtuelles Screening generierte und zur experimentellen Charakterisierung im ZFTT-Assay ausgewählte potentielle A-Site Liganden.

6.3.2 Specs-Substanzen zu 3.3.2



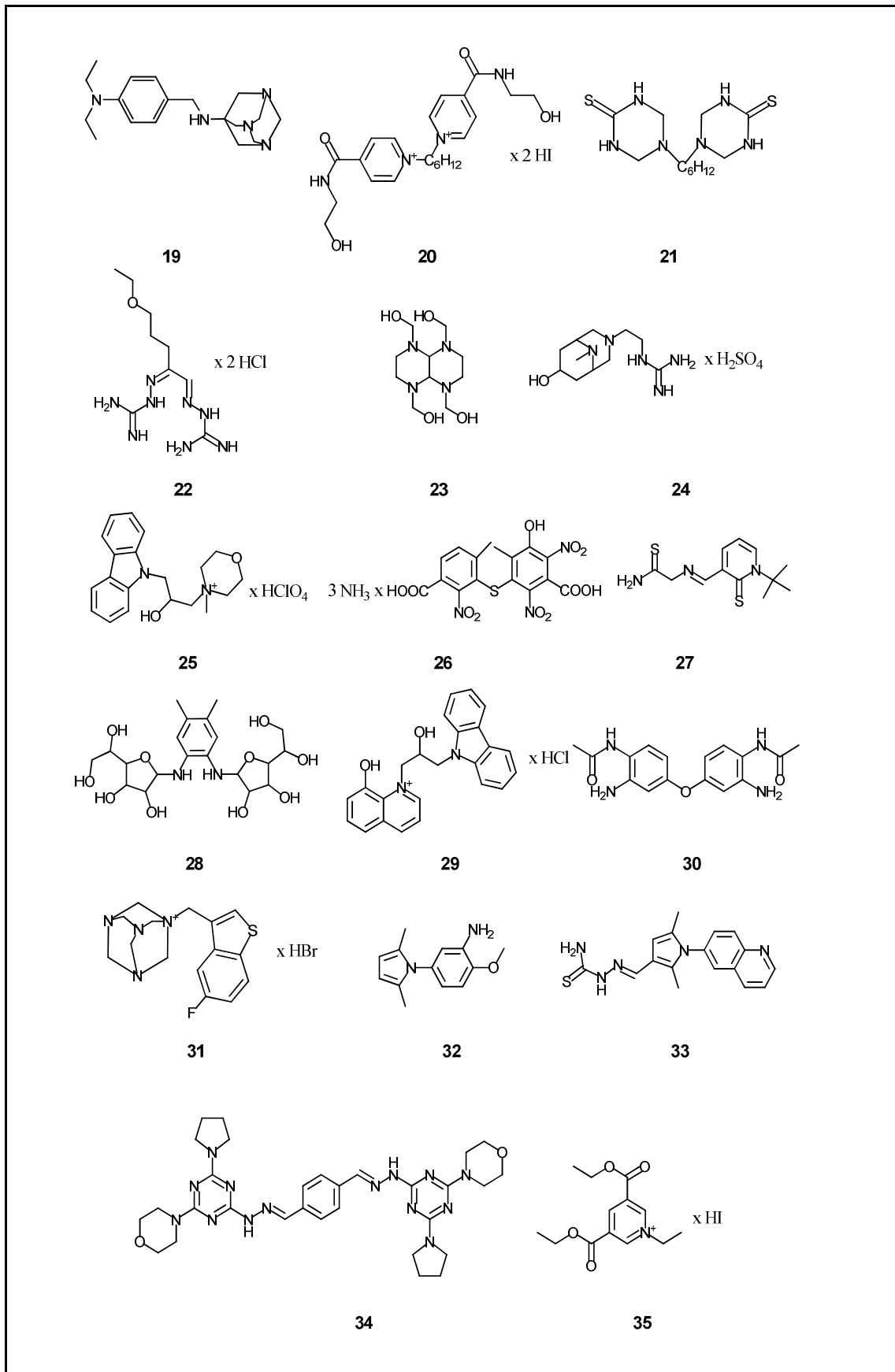


Abb. 6-6: Zur experimentellen Charakterisierung im ZFTT-Assay ausgewählte Specs-Substanzen.

6.3.3 ASINEX-Substanzen zu 3.3.2.6

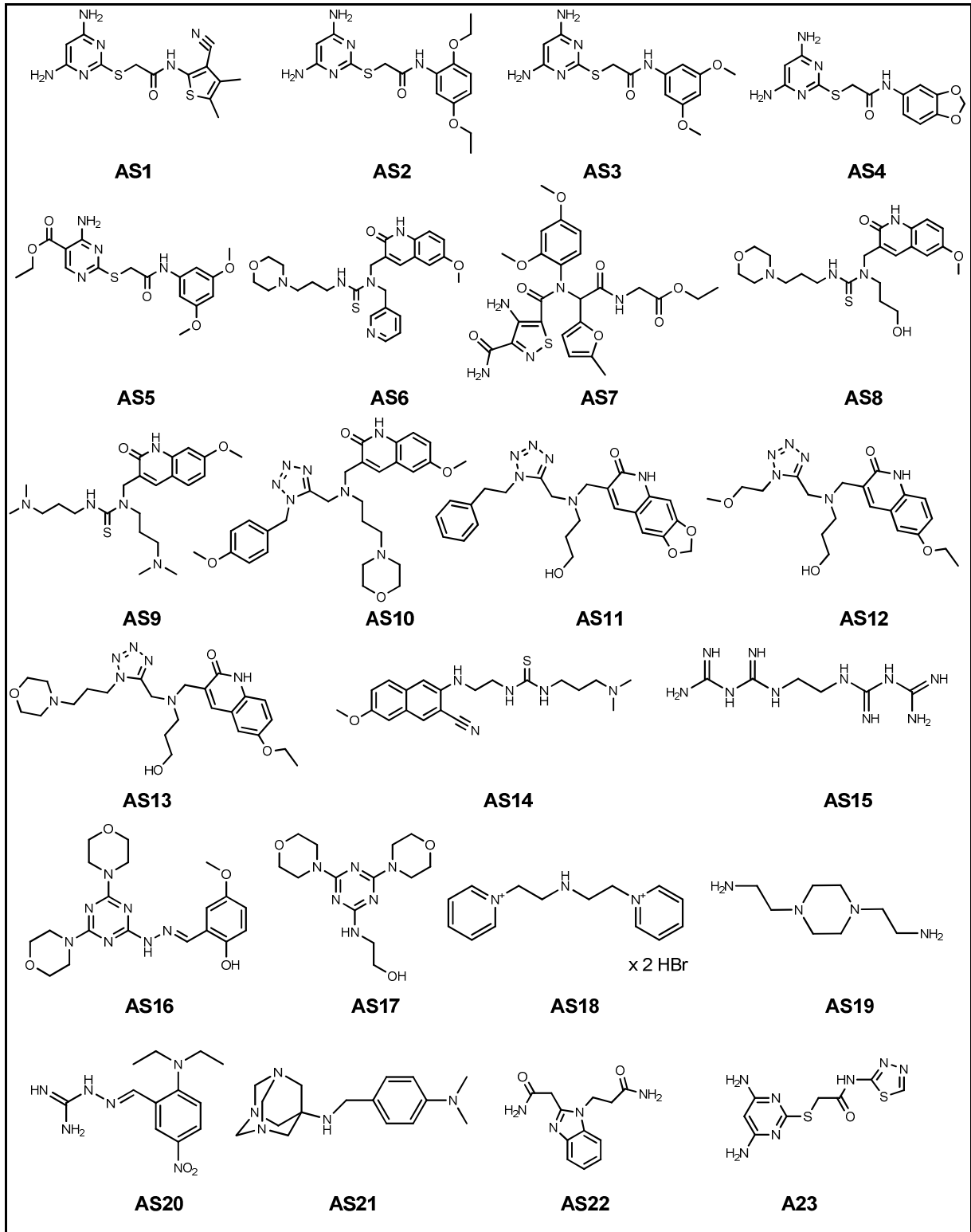
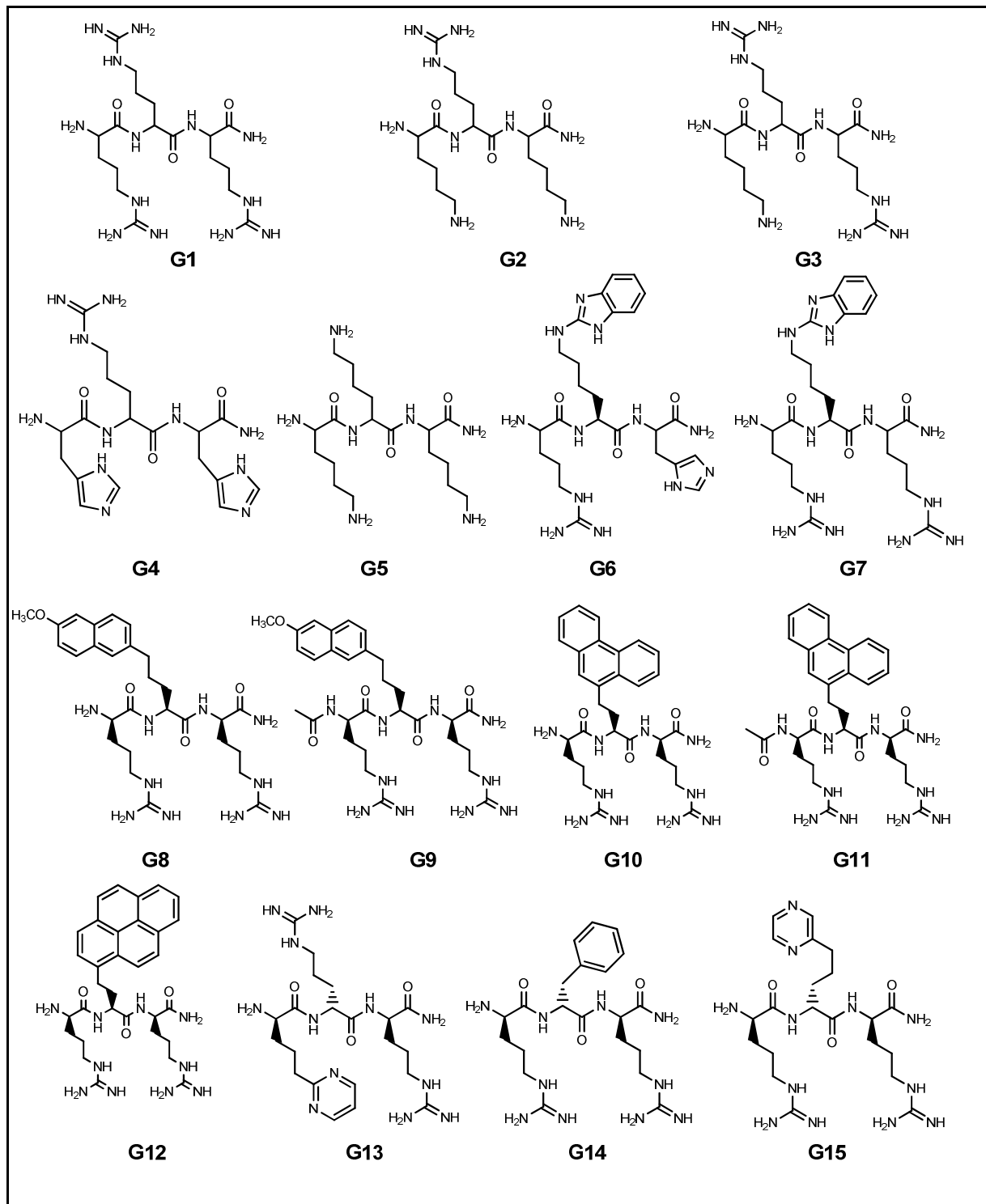


Abb. 6-7: Die zur experimentellen Charakterisierung nach ligandenbasierten virtuellen Screening unter Nutzung der ASINEX-Substanzdatenbank ausgewählten potentiellen RNA-Liganden.

6.3.4 Tripeptide zu 3.4



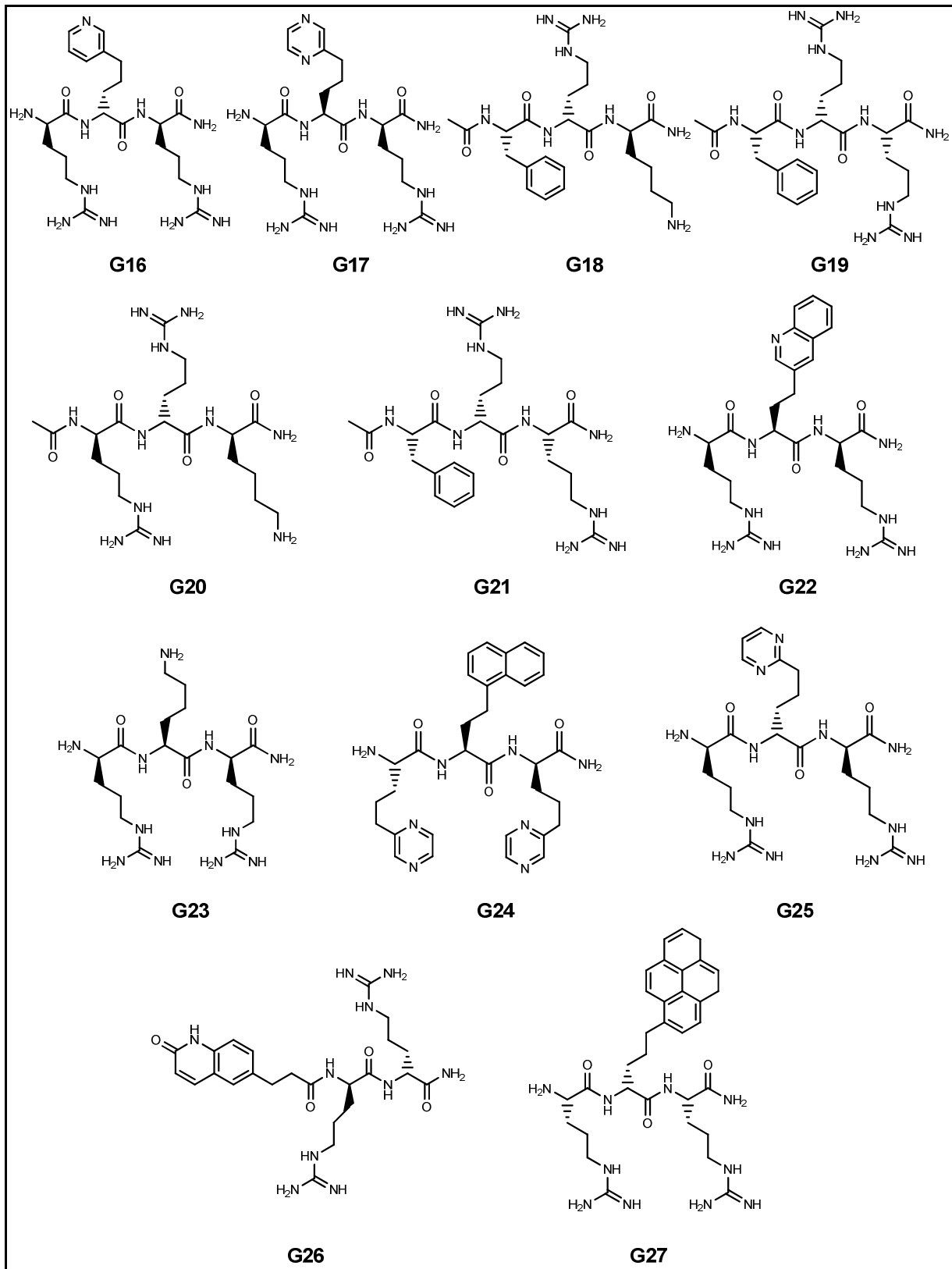
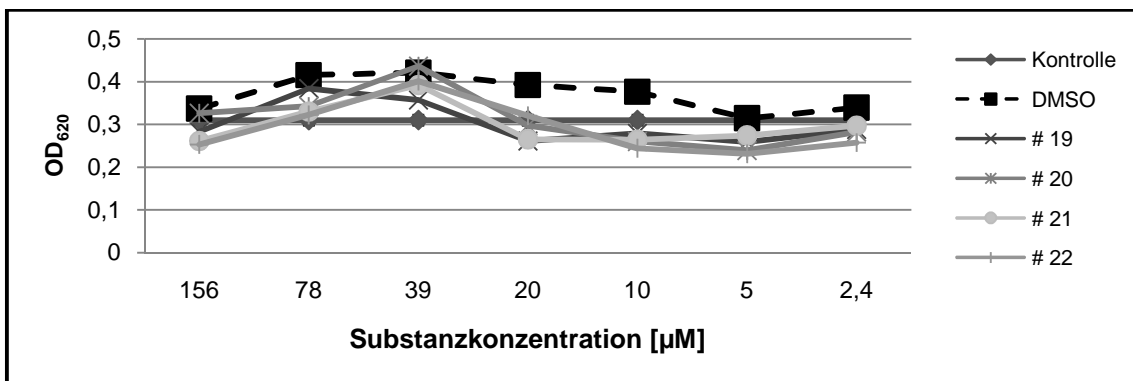
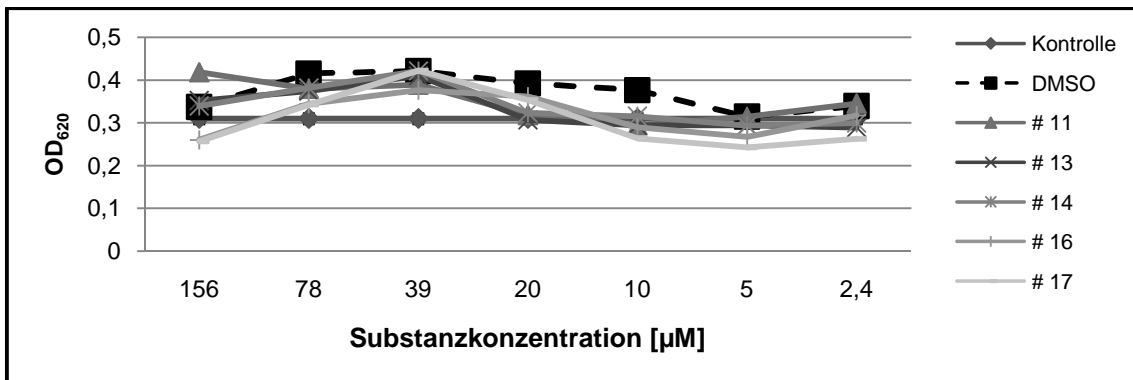
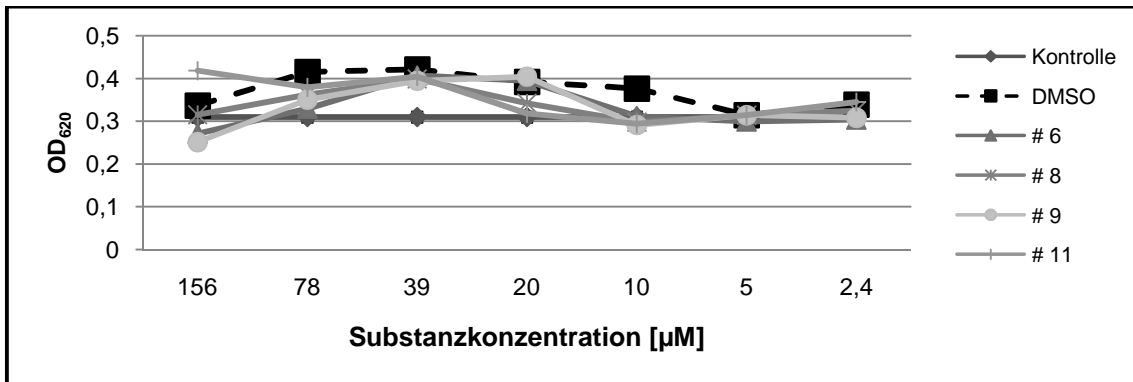
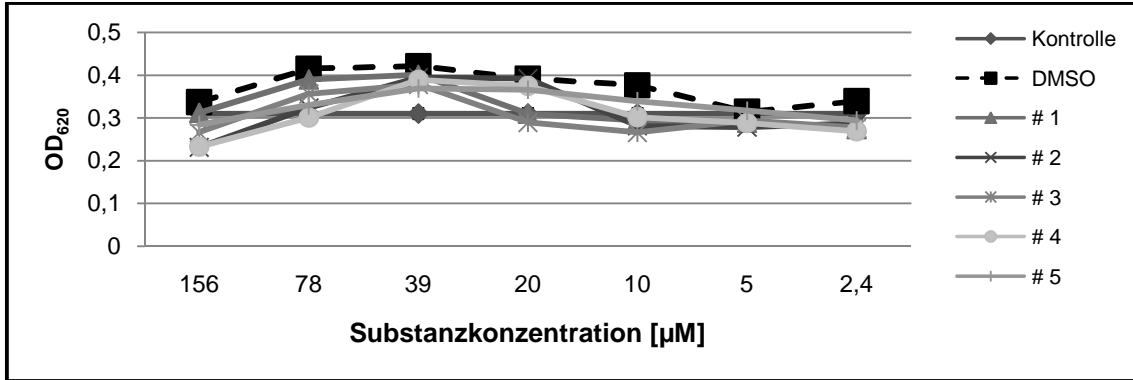


Abb. 6-8: Zur experimentellen Charakterisierung eingesetzte Tripeptide. Alle Tripeptide lagen als TFA-Salze vor.

6.4 Antimikrobielle Aktivität gegen *B. subtilis* 168

6.4.1 Antimikrobielle Aktivität der Specs-Substanzen (zu 3.3.2.4)



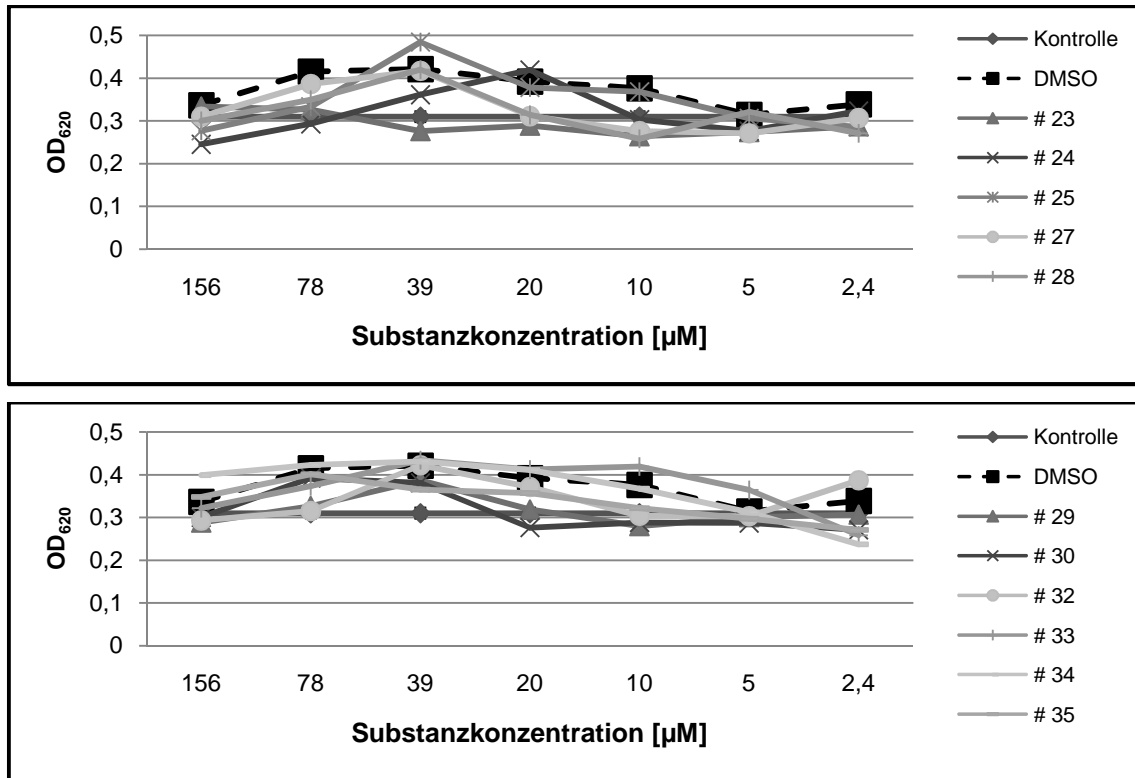
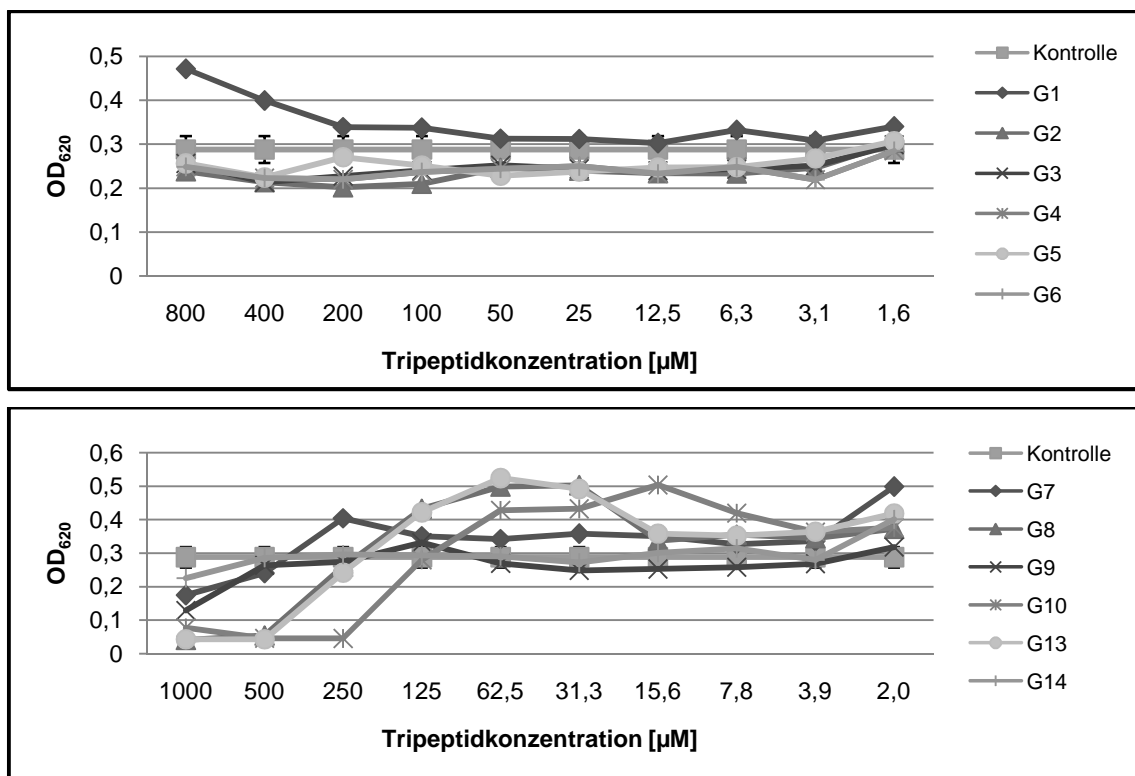


Abb. 6-9: Ergebnisse der Wachstumshemmungstests der Specs-Substanzen 1 - 35 gegen *B. subtilis* 168 ($n = 2$); (Substanzen 7, 15, 18 und 31: s. 3.3.2.4). Die dargestellte Kurve der Wachstumskontrolle entspricht dem arithmetischen Mittel der optischen Dichte (OD_{620}) aus 18 Kontrollkulturen und wurde jedem Messwert als Referenzpunkt zugeordnet. Specs-Substanz 10 konnte aufgrund der Bildung einer schwarzen Suspension im Well nicht vermessen werden. Substanz 26 stand zum Zeitpunkt der Messung nicht zur Verfügung. Die durchschnittliche relative Standardabweichung aller Messungen lag bei $\pm 15\%$.

6.4.2 Antimikrobielle Aktivität der Tripeptide (zu 3.4.3)



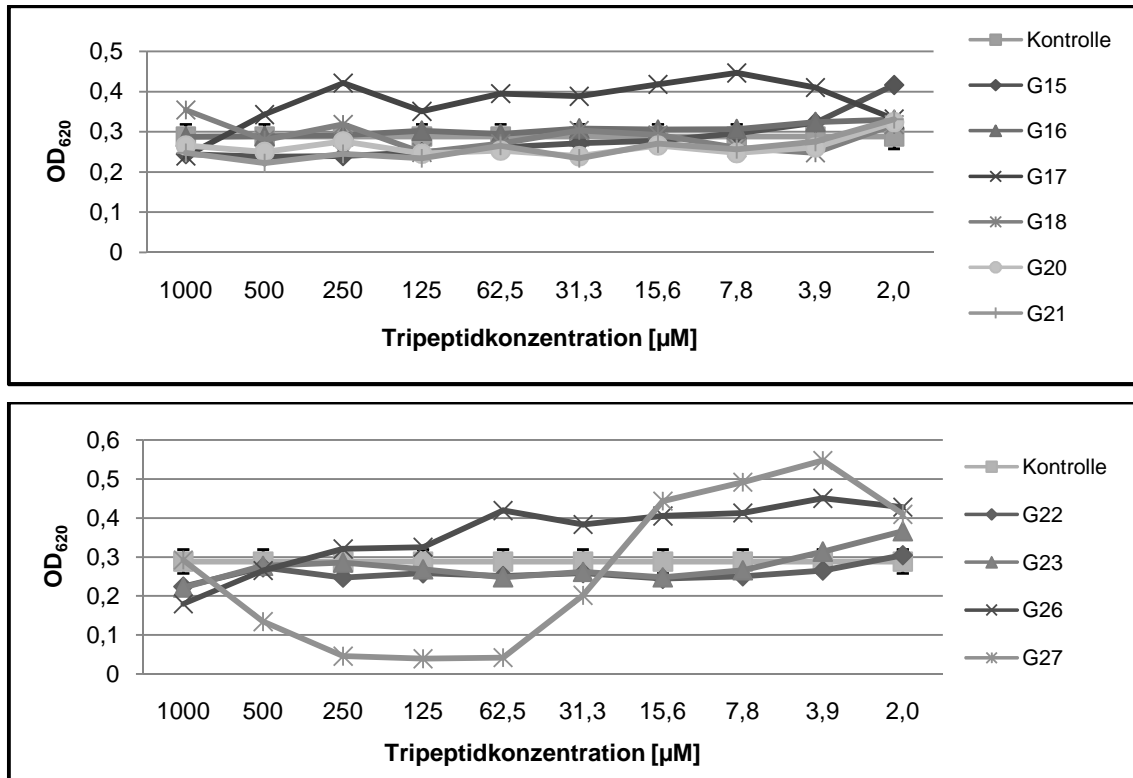
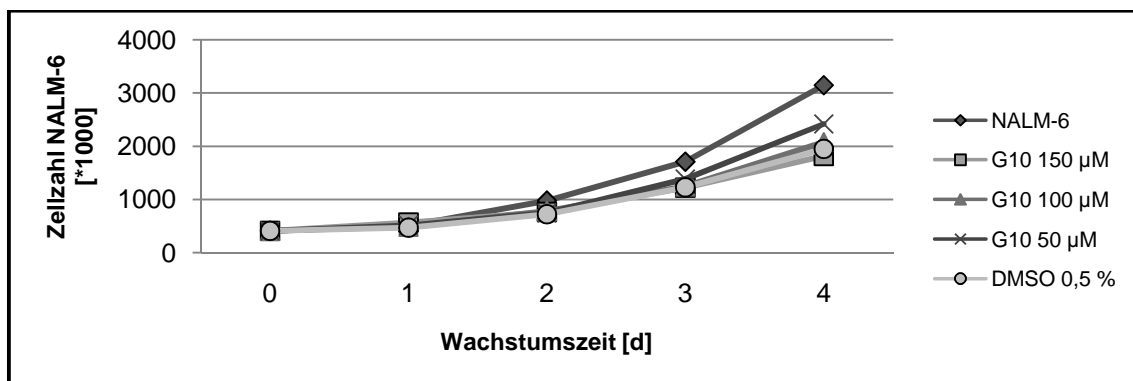


Abb. 6-10: Antibakterielle Aktivität der Substanzen G1 – G27 gegen *B. subtilis* 168 (n = 2). Angegeben ist neben den antimikrobiellen Profilen der jeweiligen Substanzen auch die Wachstumskontrolle ohne Inhibitor (Kontrolle). Die Wachstumskontrolle entspricht dem arithmetischen Mittel der optischen Dichte (OD₆₂₀) aus 20 Kontrollkulturen und wurde als Referenz jedem Konzentrationsmesspunkt zugeordnet. Das Tripeptid G24 stand zum Zeitpunkt des Experiments nicht zur Verfügung. Die maximale relative Standardabweichung der Messwerte lag bei ± 15 %.

6.5 Zytotoxizität antimikrobieller Tripeptide gegen eukaryotische NALM-6-Zellen (zu 3.4.6)

6.5.1 NALM-6-Wachstumskurven



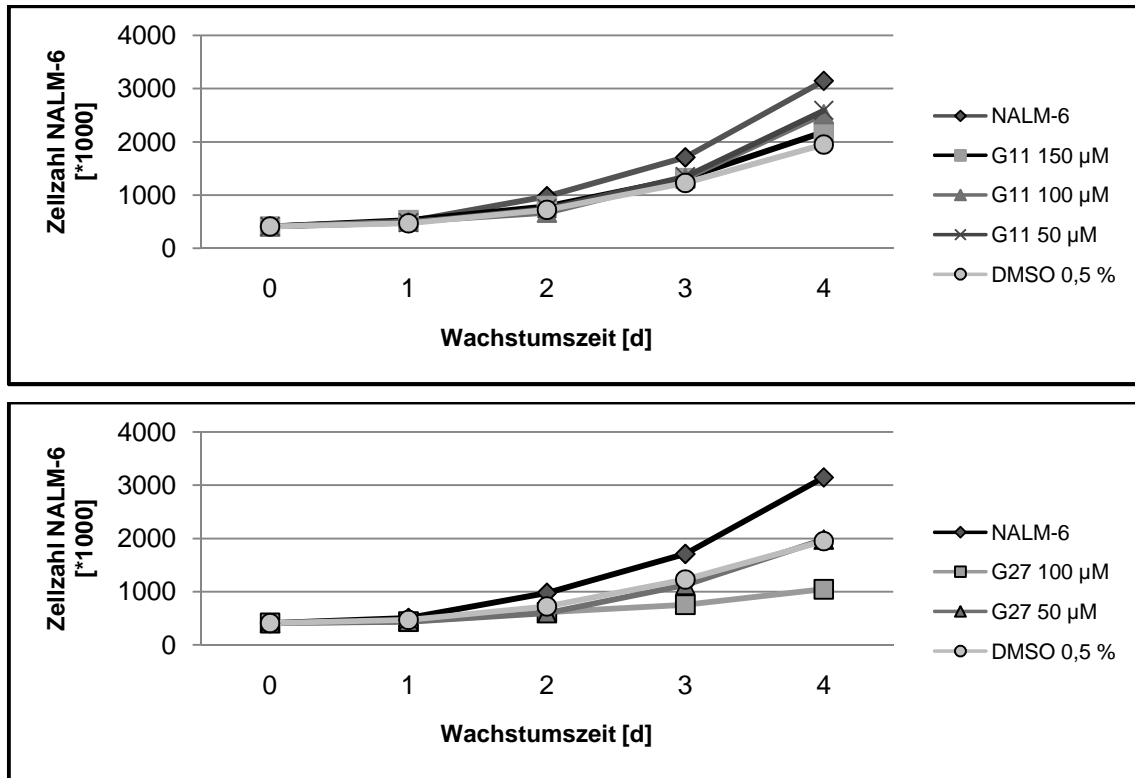


Abb. 6-11: NALM-6-Wachstumskurven unter dem Einfluß variabler Konzentrationen der Tripeptide G10, G11 und G27 (Wachstumskurve G12: s. 3.4.6). Als Wachstumskontrolle wurden NALM-6-Kulturen ohne Inhibitor mitgeführt (n = 2). Die maximale DMSO-Konzentration der Tripeptide betrug 0,4 % (v/v). Zur Beurteilung des Lösungsmiteleinfluß auf das Wachstum der NALM-6-Zellen ist die Zellzahl unter dem Einfluß von 0,5 % DMSO (v/v) dargestellt.

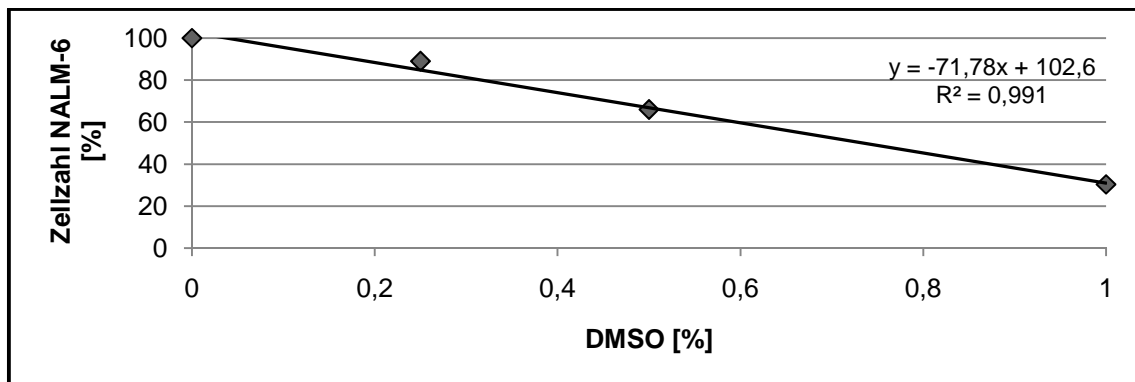


Abb. 6-12: DMSO-Einfluß auf das Zellwachstum inkubierter NALM-6-Zellen. Dargestellt ist die relative Zellzahl der Zellkulturen unter dem Einfluß variabler Konzentrationen von DMSO bezogen auf die entsprechende Zellzahl der NALM-6 Wachstumskontrollen.

6.5.2 Zellvitalität der NALM-6-Zellen

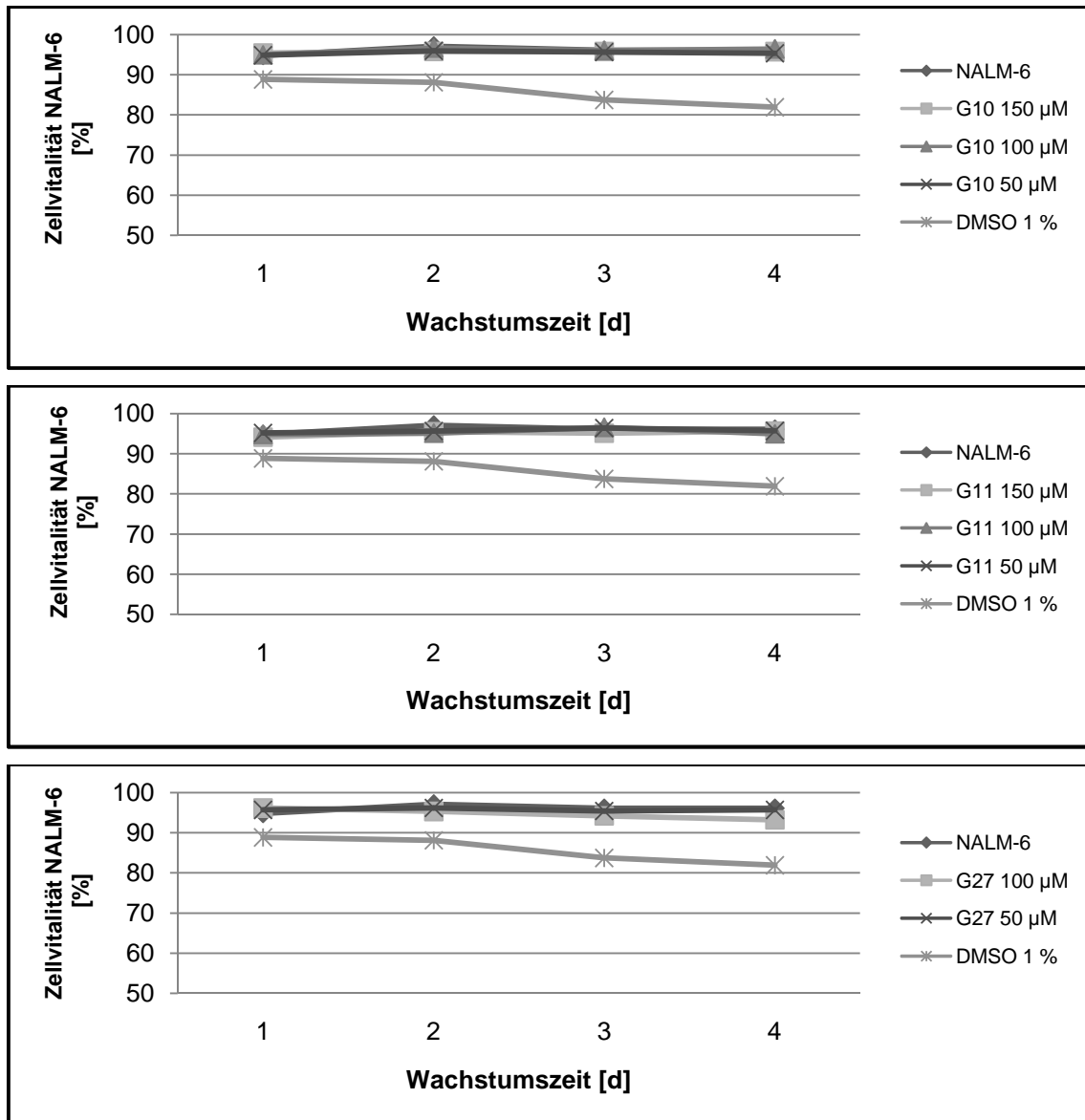


Abb. 6-13: Zellvitalität der NALM-6-Zellen unter dem Einfluß variabler Konzentrationen der Tripeptide G10, G11 und G27 (Zellvitalität G12: s. 3.4.6). Als Wachstumskontrolle wurden NALM-6-Kulturen ohne Inhibitor mitgeführt (n = 2). Der Einfluß des Lösungsmittels DMSO (1 %, (v/v)) auf die Zellvitalität ist zusätzlich dargestellt.

7. Abkürzungsverzeichnis

μA	Mikroampere
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
2-DE	Zweidimensionale Gelelektrophorese
2-DOS	2-Deoxystreptamin
aa-tRNA	Aminoacyl-tRNA
Abb.	Abbildung
AcK	Acetatkinase
ACN	Acetonitril
AcP	Acetylphosphat
AK	Arbeitskreis
APOD	Ammoniumperoxodisulfat
ARSase	Aminoacyl-tRNA Synthetase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Konzentration Crosslinker (% (w/v))
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
cDNA	complementary DNA
CDS	Communicative Diseases Surveillance
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylamino]-1-propansulfonat
CHCA	α -Cyano-4-hydroxymizimsäure
cm	Zentimeter
CMC	<i>critical micelle concentration</i> ; kritische Mizellbildungskonzentration
CrP	Kreatinphosphat
CTP	Cytidintriphosphat
CTR	Kontrolle
d	Tage
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIGE	<i>difference gel electrophoresis</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	<i>dots per inch</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Elongationsfaktor
ERY	Erythromycin
ESBL	extended spectrum beta-lactamase
ESI	<i>electrospray ionization</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FT-IR-Spektroskopie	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grünes Fluoreszierendes Protein
GSC	<i>Genetic Stock Center</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GZA	Ganzzellassay
h	Stunden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
i. Allg.	im Allgemeinen
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IF	Initiationsfaktor
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IVER	Ivermectin
KBE	Kolonie bildende Einheit
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
LB	Luria-Bertani
M	mol/l
mA	Milliampere
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
MHK	minimale Hemmkonzentration
MHz	Megahertz
min	Minuten
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie

mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde(n)
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAR	Paromomycin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphoenolpyruvat
pg	Pikogramm
pI	isoelektrischer Punkt
PK	Pyruvatkinase
PMF	<i>peptide mass fingerprint</i>
PMT	<i>photomultiplier tube</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PTC	Peptidyltransferasezentrum
RAI	relative Assayinhibition
RF	Releasefaktor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RuBPS	Ruthenium(II)-tris-bathophenanthrolindisulfonat
s	Sekunde(n)
s.	siehe
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
s. o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
STR	Streptomycin
Syn.	Synonym
<i>T</i>	Monomerkonzentration (% , (w/v))
Tab.	Tabelle
TAR	<i>trans</i> -activation response element
Tbl.	Tablette
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	1,2-Bis(dimethylamino)ethan
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>time-of-flight</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
TT	Transkription-/Translation
u. a.	unter anderem
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt

v. a.	vor allem
VRE	Vancomycin-resistenter <i>Enterococcus</i> -Stamm
z. B.	zum Beispiel
ZFTT	zellfreie Transkriptions-/Translationsreaktion

8. Literaturverzeichnis

Adelakun, E. A., E. A. Finbar, S. E. Agina and A. A. Makinde; Antimicrobial activity of *Boswellia dalzielii* stem bark. *Fitoterapia* **2001**, 72(7): 822-4.

Ahn, J. H., H. S. Chu, T. W. Kim, I. S. Oh, C. Y. Choi, G. H. Hahn, C. G. Park and D. M. Kim; Cell-free synthesis of recombinant proteins from PCR-amplified genes at a comparable productivity to that of plasmid-based reactions. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, 338(3): 1346-52.

Akerley, B. J., E. J. Rubin, V. L. Novick, K. Amaya, N. Judson and J. J. Mekalanos; A genome-scale analysis for identification of genes required for growth or survival of *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99(2): 966-71.

Ammon, H. P.; [Boswellic acids (components of frankincense) as the active principle in treatment of chronic inflammatory diseases]. *Wien Med Wochenschr* **2002**, 152(15-16): 373-8.

Amsterdam, D.; Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In *Antibiotics in Laboratory Medicine* ed. Loman, V. **1996**, pp. 52–111 Baltimore.

Anderson, A. C.; The process of structure-based drug design. *Chem Biol* **2003**, 10(9): 787-97.

Anderson, C. W., J. W. Straus and B. S. Dudock; Preparation of a cell-free protein-synthesizing system from wheat germ. *Methods Enzymol* **1983**, 101: 635-44.

Apfel, C. M., H. Locher, S. Evers, B. Takacs, C. Hubschwerlen, W. Pirson, M. G. Page and W. Keck; Peptide deformylase as an antibacterial drug target: target validation and resistance development. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**, 45(4): 1058-64.

Appelbaum, P. C. and P. A. Hunter; The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents* **2000**, 16(1): 5-15.

Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore and T. A. Steitz; The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **2000**, 289(5481): 905-20.

Bandow, J. E., H. Brötz, L. I. Leichert, H. Labischinski and M. Hecker; Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrob Agents Chemother* **2003a**, 47(3): 948-55.

Bandow, J. E., D. Becher, K. Buttner, F. Hochgrafe, C. Freiberg, H. Brötz and M. Hecker; The role of peptide deformylase in protein biosynthesis: a proteomic study. *Proteomics* **2003b**, 3(3): 299-306.

Barák, I., K. Muchova, A. J. Wilkinson, P. J. O'Toole, N. Pavlendová; Lipid spirals in *Bacillus subtilis* and their role in cell division. *Mol Microbiol* **2008**, 68(5): 1315-27.

Baranov, V. I., I. Morozov, S. A. Ortlepp and A. S. Spirin; Gene expression in a cell-free system on the preparative scale. *Gene* **1989**, 84(2): 463-6.

- Barber, M., R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick, A. N. Tyler and B. W. Bycroft; Fast atom bombardment mass spectrometry of bleomycin A2 and B2 and their metal complexes. *Biochem Biophys Res Commun* **1981**, 101(2): 632-8.
- Barker, J. J.; Antibacterial drug discovery and structure-based design. *Drug Discov Today* **2006**, 11(9-10): 391-404.
- Beavis, R. C. and Chait, B. T.; Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1989**, 3(12): 432-5.
- Beavis, R. C., Chaudhary, T., and Chait B. T.; α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for Matrix-assisted Laser Desorption mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, 27, 156-158.
- Bernhardt, J., K. Buttner, C. Scharf and M. Hecker; Dual channel imaging of two-dimensional electropherograms in *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* **1999**, 20(11): 2225-40.
- Berth M., F. M. Moser, M. Kolbe and J. Bernhardt; The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images. *Appl Microbiol Biotechnol* **2007**, 76(6): 1223-43.
- Binh, L. T. N., Fuchs, S., Engelmann, S., Hecker, M.; Physiological proteome analyses of *Staphylococcus aureus*, proteome signatures and antibiotic mode of action; *Posterpräsentation*.
- Birnboim, H. C. and J. Doly; A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **1979**, 7(6): 1513-23.
- Bjellqvist, B., K. Ek, P. G. Righetti, E. Gianazza, A. Gorg, R. Westermeier and W. Postel; Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* **1982**, 6(4): 317-39.
- Bjellqvist, B., J. C. Sanchez, C. Pasquali, F. Ravier, N. Paquet, S. Frutiger, G. J. Hughes and D. Hochstrasser; Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis* **1993**, 14(12): 1375-8.
- Böddeker, N., G. Bahador, C. Gibbs, E. Mabery, J. Wolf, L. Xu and J. Watson; Characterization of a novel antibacterial agent that inhibits bacterial translation. *RNA* **2002**, 8(9): 1120-8.
- Boman H. G., B. Agerberth and A. Boman; Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun* **1993**, 61(7): 2978-84.
- Bonnefoy, A., A. M. Girard, C. Agouridas and J. F. Chantot; Ketolides lack inducibility properties of MLS(B) resistance phenotype. *J Antimicrob Chemother* **1997**, 40(1): 85-90.
- Borsook, H.; Protein turnover and incorporation of labeled amino acids into tissue proteins in vivo and in vitro. *Physiol Rev* **1950**, 30(2): 206-19.
- Breithaupt, H.; The new antibiotics. *Nat Biotechnol* **1999**, 17(12): 1165-9.

- Breukink E., I. Wiedemann, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, H. Sahl and B. de Kruijff B.; Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* **1999**, 286 (5448): 2361-4.
- Breukink E. and B. de Kruijff B; Lipid II as a target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, 5(4): 321-32.
- Brodersen, D. E., W. M. Clemons, Jr., A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly and V. Ramakrishnan; The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **2000**, 103(7): 1143-54.
- Brötz H., G. Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds and H. G. Sahl; The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, 42(1): 154-60.
- Brötz-Oesterhelt, H., J. E. Bandow and H. Labischinski; Bacterial proteomics and its role in antibacterial drug discovery. *Mass Spectrom Rev* **2005**, 24(4): 549-65.
- Brown, R. S. and J. J. Lennon; Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer. *Anal Chem* **1995**, 67(13): 1998-2003.
- Brunner, E., C. H. Ahrens, S. Mohanty, H. Baetschmann, S. Loevenich, F. Potthast, E. W. Deutsch, C. Panse, U. de Lichtenberg, O. Rinner, H. Lee, P. G. Pedrioli, J. Malmstrom, K. Koehler, S. Schrimpf, J. Krijgsveld, F. Kregenow, A. J. Heck, E. Hafen, R. Schlapbach and R. Aebersold; A high-quality catalog of the *Drosophila melanogaster* proteome. *Nat Biotechnol* **2007**, 25(5): 576-83.
- Bugg T. D. and C. T. Walsh; Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance. *Nat Prod Rep* **1992**, 9(3): 199-215.
- Calnan B., B. Tidor, S. Biancalana, D. Hudson and A. Frankel; Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science* **1991**, 252(5009): 1167-1171.
- Cao T. W., R. Ye and J. D. Helmann; Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* σ^W and σ^M regulons. *Mol Microbiol* **2002**, 45(5): 1267-1276.
- Carrillo C., J. A. Teruel, F. J. Aranda and A. Ortiz; Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim Biophys Acta* **2003**, 1611(1-2): 91-7.
- Carter, A. P., W. M. Clemons, D. E. Brodersen, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly and V. Ramakrishnan; Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **2000**, 407(6802): 340-8.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher; Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **1994**, 263(5148): 802-5.

-
- Chan, P. F., R. Macarron, D. J. Payne, M. Zalacain and D. J. Holmes; Novel antibacterials: a genomics approach to drug discovery. *Curr Drug Targets Infect Disord* **2002**, 2(4): 291-308.
- Charles I. G., A. Chubb, R. Gill, J. Clare, P. N. Lowe, L. S. Holmes, M. Page, J. G. Keeling, S. Moncada and V. Riveros-Moreno; Cloning and expression of a rat neuronal nitric oxide synthase coding sequence in a baculovirus/insect cell system. *Biochem Biophys Res Comm* **1993**, 196(3): 1481 – 9.
- Chopra, I., P. M. Hawkey and M. Hinton; Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J Antimicrob Chemother* **1992**, 29(3): 245-77.
- Chopra, I. and M. Roberts; Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* **2001**, 65(2): 232-60 ; second page, table of contents.
- Chrnyk, B. A., J. Evans, J. Lillquist, P. Young and R. Wetzel; Inclusion body formation and protein stability in sequence variants of interleukin-1 beta. *J Biol Chem* **1993**, 268(24): 18053-61.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical and Laboratory Standards Institute; Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, **2006**; 7th ed., vol. 26, no. 2. Approved standard M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- Cohen, S. N., A. C. Chang and L. Hsu; Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1972**, 69(8): 2110-4.
- Craig, D., E. A. Arriaga, P. Banks, Y. Zhang, A. Renborg, M. M. Palcic and N. J. Dovichi; Fluorescence-based enzymatic assay by capillary electrophoresis laser-induced fluorescence detection for the determination of a few beta-galactosidase molecules. *Anal Biochem* **1995**, 226(1): 147-53.
- Cubitt, A. B., R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross and R. Y. Tsien; Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **1995**, 20(11): 448-55.
- Dandliker, P. J., S. D. Pratt, A. M. Nilius, C. Black-Schaefer, X. Ruan, D. L. Towne, R. F. Clark, E. E. Englund, R. Wagner, M. Weitzberg, L. E. Chovan, R. K. Hickman, M. M. Daly, S. Kakavas, P. Zhong, Z. Cao, C. A. David, X. Xuei, C. G. Lerner, N. B. Soni, M. Bui, L. L. Shen, Y. Cai, P. J. Merta, A. Y. Saiki and B. A. Beutel; Novel antibacterial class. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**, 47(12): 3831-9.
- Davis, B. J.; Disc Electrophoresis. Ii. Method and Application to Human Serum Proteins. *Ann N Y Acad Sci* **1964**, 121: 404-27.
- Domagk, G.J.P.; Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* **1935**, 61: 250-253
- Douthwaite, S. and W. S. Champney; Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. *J Antimicrob Chemother* **2001**, 48 Suppl

TI: 1-8.

Dreisewerd, K.; The desorption process in MALDI. *Chem Rev* **2003**, *103*(2): 395-426.

Ehrenstein G. and H. Lecar; Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys* **1977**, *10*(1):1-34.

Ehring, H., Karas, M., Hillenkamp, F.; Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27*, 472–480.

Evers, S., K. Di Padova, M. Meyer, H. Langen, M. Fountoulakis, W. Keck and C. P. Gray; Mechanism-related changes in the gene transcription and protein synthesis patterns of *Haemophilus influenzae* after treatment with transcriptional and translational inhibitors. *Proteomics* **2001**, *1*(4): 522-44.

Eymann, C., A. Dreisbach, D. Albrecht, J. Bernhardt, D. Becher, S. Gentner, T. Tam le, K. Buttner, G. Buurman, C. Scharf, S. Venz, U. Volker and M. Hecker; A comprehensive proteome map of growing *Bacillus subtilis* cells. *Proteomics* **2004**, *4*(10): 2849-76.

Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong and C. M. Whitehouse; Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* **1989**, *246*(4926): 64-71.

Fernandes, P.; Antibacterial discovery and development--the failure of success? *Nat Biotechnol* **2006**, *24*(12): 1497-503.

Fleming, A.; On the antibacterial action of cultures of a penicillium with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, *British Journal of Experimental Pathology* **1929**, *10*, 226- 236.

Freiberg, C. and H. Brötz-Oesterhelt; Functional genomics in antibacterial drug discovery. *Drug Discov Today* **2005**, *10*(13): 927–35.

Freiberg, C., N. Brunner, L. Macko, H. P. Fischer; Discovering antibiotic efficacy biomarkers: toward mechanism-specific high content compound screening. *Mol Cell Proteomics* **2006**, *5*(12): 2326-35.

Frimodt-Moller, N., A. M. Hammerum, L. Bagger-Skjot, J. H. Hessler, C. T. Brandt, R. L. Skov and D. L. Monnet; Global development of resistance--secondary publication. *Dan Med Bull* **2007**, *54*(2): 160-2.

Futaki S.,T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda, Y. Sugiura; Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* **2001**, *276*(8): 5836-40.

Gale, E. F. and J. P. Folkes; Effect of nucleic acids on protein synthesis and amino-acid incorporation in disrupted staphylococcal cells. *Nature* **1954**, *173*(4417): 1223-7.

Gallego, J. and G. Varani; Targeting RNA with small-molecule drugs: therapeutic promise and chemical challenges. *Acc Chem Res* **2001**, *34*(10): 836-43.

-
- Gao H., X. Jiang, K. Pogliano and A. I. Aronson; The E1beta and E2 subunits of the *Bacillus subtilis* pyruvate dehydrogenase complex are involved in regulation of sporulation. *J Bacteriol* **2002**, *184*(10): 2780-8.
- Gilbert P. and L. E. Moore LE; Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* **2005**, *99*(4): 703-15.
- Gmuender, H., K. Kuratli, K. Di Padova, C. P. Gray, W. Keck and S. Evers; Gene expression changes triggered by exposure of *Haemophilus influenzae* to novobiocin or ciprofloxacin: combined transcription and translation analysis. *Genome Res* **2001**, *11*(1): 28-42.
- Gold L.M. und Schweiger M.; Synthesis of bacteriophage-specific enzymes directed by DNA in vitro. *Methods Enzymol.* **1971**, *20*: 537-542.
- Goossens, H.; European status of resistance in nosocomial infections. *Chemotherapy* **2005**, *51*(4): 177-81.
- Görg, A., W. Postel and S. Gunther; The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **1988**, *9*(9): 531-46.
- Görg, A., W. Weiss and M. J. Dunn; Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* **2004**, *4*(12): 3665-85.
- Gorokhovatsky, A., L. A. Shaloiko, V. S. Bondar, E. S. Vysotski, E. E. Maximov, H. von Doehren and Y. B. Alakhov; Cell-free bioluminescent screening of translation inhibitors. *Biotechnol Appl Biochem* **1998**, *27* (Pt 3): 259-63.
- Green, R. and H. F. Noller; Ribosomes and translation. *Annu Rev Biochem* **1997**, *66*: 679-716.
- Gualerzi, C. O. and C. L. Pon; Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry* **1990**, *29*(25): 5881-9.
- Häbich, D.; von Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S.; Antibakterielle Naturstoffe in der medizinischen Chemie– Exodus oder Renaissance?. *Angew Chem* **2006**, *31*, 5194-5254,
- Hampel, M.; Proteomanalytische Untersuchung von MLL-Derivatzelllinien. *Dissertation* **2006**.
- Hancock, R. E. and A. Bell; Antibiotic uptake into gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1988**, *7*(6): 713-20.
- Hancock R. E. and D. S. Chapple; Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**, *43*(6): 1317-23.
- Hancock R. E. and H. G. Sahl.; Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* **2006**, *24*(12): 1551 – 7.
- Haney, S. A., L. E. Alksne, P. M. Dunman, E. Murphy and S. J. Projan; Genomics in anti-infective drug discovery--getting to endgame. *Curr Pharm Des* **2002**, *8*(13): 1099-118.

-
- Hansen, J. L., J. A. Ippolito, N. Ban, P. Nissen, P. B. Moore and T. A. Steitz; The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol Cell* **2002**, *10*(1): 117-28.
- Hansen, J. L., P. B. Moore and T. A. Steitz; Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol* **2003**, *330*(5): 1061-75.
- Harrison C.; GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK. *Cell Stress Chaperones* **2003**, *8*(3): 218-24.
- Heath R. J., N. Su, C. K. Murphy and C. O. Rock; The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductases FabI and FabL from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **2000**, *275*(51): 40128-33.
- Heim, R., D. C. Prasher and R. Y. Tsien; Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*(26): 12501-4.
- Henzel, W. J., J. T. Stults and C. Watanabe; *Proceedings of the Third Symposium of the Protein Society* Seattle, Washington **1989**.
- Henzel, W. J., T. M. Billeci, J. T. Stults, S. C. Wong, C. Grimley and C. Watanabe; Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*(11): 5011-5.
- Henzler Wildman K. A., D. K. Lee, A. Ramamoorthy; Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* **2003**, *42*(21): 6545-58.
- Hermann, T.; Chemical and functional diversity of small molecule ligands for RNA. *Biopolymers* **2003**, *70*(1): 4-18.
- Hiramatsu, K., H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri and F. C. Tenover; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* **1997**, *40*(1): 135-6.
- Hofemeister J., B. Conrad, B. Adler, B. Hofemeister, J. Feesche, N. Kucheryava, G. Steinborn, P. Franke, N. Grammel, A. Zwintscher, F. Leenders, G. Hitzeroth and J. Vater; Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Mol Genet Genomics* **2004**, *272*(4): 363-78.
- Horneffer, V., Reichelt, R., and Strupat, K.; Protein incorporation into MALDI-matrix crystals investigated by high resolution field emission scanning electron microscopy. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *226*, 117-131.
- Hurwitz, R., J. Hozier, T. LeBien, J. Minowada, K. Gajl-Peczalska, I. Kubonishi and J. Kersey; Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer* **1979**, *23*(2): 174-80.
- Hutter, B., C. Schaab, S. Albrecht, M. Borgmann, N. A. Brunner, C. Freiberg, K. Ziegelbauer, C. O. Rock, I. Ivanov and H. Loferer; Prediction of mechanisms of action of antibacterial compounds by gene expression profiling. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, *48*(8): 2838-44.

Hyde A. J., J. Parisot, A. McNichol and B. B. Bonev BB; Nisin-induced changes in *Bacillus* morphology suggest a paradigm of antibiotic action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*(52): 19896-901

Jain, C., A. Deana and J. G. Belasco; Consequences of RNase E scarcity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **2002**, *43*(4): 1053-64.

James, P., M. Quadroni, E. Carafoli and G. Gonnet; Protein identification by mass profile fingerprinting. *Biochem Biophys Res Commun* **1993**, *195*(1): 58-64.

Jaskolla T. W., W. D. Lehmann and M. Karas; 4-Chloro-alpha-cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*(34): 12200-5.

Jefferson, E. A., S. Arakawa, L. B. Blyn, A. Miyaji, S. A. Osgood, R. Ranken, L. M. Risen and E. E. Swayze; New inhibitors of bacterial protein synthesis from a combinatorial library of macrocycles. *J Med Chem* **2002**, *45*(16): 3430-9.

Ji, Y., B. Zhang, S. F. Van, Horn, P. Warren, G. Woodnutt, M. K. Burnham and M. Rosenberg; Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Science* **2001**, *293*(5538): 2266-9.

Jones, G., P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach and R. Taylor; Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* **1997**, *267*(3): 727-48.

Karas, M., Bachmann, D. and Hillenkamp, F.; Influence of the wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2935-2939.

Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., and Hillenkamp, F.; Matrix-assisted Ultraviolet Laser Desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1987**, *78*, 53-68

Karas, M. and F. Hillenkamp; Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* **1988**, *60*(20): 2299-301.

Karas, M., Bahr, U., and Hillenkamp, F.; UV Laser Matrix Desorption/Ionisation mass spectrometry of proteins in the 100000 Dalton range. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1989**, *92*, 231-242.

Karas, M., Bahr, U., Ingendoh, E., Nordhoff, E., Stahl, B., Strupat, K., and Hillenkamp, F.; Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *241*, 175-185

Karas, M., M. Glückmann and J. Schäfer; Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom* **2000**, *35*(1): 1-12.

Karas, M. and Krüger, R.; Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem Rev* **2003**, *103*(2): 427-40.

-
- Karimi, R., M. Y. Pavlov, R. H. Buckingham and M. Ehrenberg; Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol Cell* **1999**, 3(5): 601-9.
- Katzen, F., G. Chang and W. Kudlicki; The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol* **2005**, 23(3): 150-6.
- Kelleher, N. L.; Y. L. Hong; G. A. Valaskovic, D. J. Aaserud, E. K. Fridriksson and F. W. McLafferty; Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry. *J Am Chem Soc* **1999**;121: 806–812.
- Kigawa, T., T. Yabuki, Y. Yoshida, M. Tsutsui, Y. Ito, T. Shibata and S. Yokoyama; Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins. *FEBS Lett* **1999**, 442(1): 15-9.
- Kim, D. M. and C. Y. Choi; A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. *Biotechnol Prog* **1996**, 12(5): 645-9.
- Kim, D. M., T. Kigawa, C. Y. Choi and S. Yokoyama; A highly efficient cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **1996**, 239(3): 881-6.
- Kim, D. M. and J. R. Swartz; Prolonging cell-free protein synthesis with a novel ATP regeneration system. *Biotechnol Bioeng* **1999**, 66(3): 180-8.
- Kim, D. M. and J. R. Swartz; Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions. *Biotechnol Prog* **2000**, 16(3): 385-90.
- Kim H. J., S. I. Kim, M. Ratnayake-Lecamwasam, K. Tachikawa, A. L. Sonenshein and M. Strauch; Complex regulation of the *Bacillus subtilis* aconitase gene. *J Bacteriol* **2003**, 185(5): 1672-80.
- Kisselev, L., M. Ehrenberg and L. Frolova; Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J* **2003**, 22(2): 175-82.
- Klammt, C.; Etablierung eines zellfreien Systems zur präparativen Proteinsynthese. *Diplomarbeit* **2002**.
- Klammt, C., F. Lohr, B. Schafer, W. Haase, V. Dotsch, H. Ruterjans, C. Glaubitz and F. Bernhard; High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *Eur J Biochem* **2004**, 271(3): 568-80.
- Klammt, C., D. Schwarz, V. Dotsch and F. Bernhard; Cell-free production of integral membrane proteins on a preparative scale. *Methods Mol Biol* **2007**, 375: 57-78.
- Klevens, R. M., M. A. Morrison, J. Nadle, S. Petit, K. Gershman, S. Ray, L. H. Harrison, R. Lynfield, G. Dumyati, J. M. Townes, A. S. Craig, E. R. Zell, G. E. Fosheim, L. K. McDougal, R. B. Carey and S. K. Fridkin; Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA* **2007**, 298(15): 1763-71.
- Klose, J. and U. Kobalz; Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* **1995**, 16(6): 1034-

59.

Knochenmuss, R. and R. Zenobi; MALDI Ionization: The Role of In-Plume Processes. *Chem Rev* **2003**, *103*, 441-452.

Kourai H., T. Yabuhara, A. Shirai, T. Maeda and H. Nagamune; Syntheses and antimicrobial activities of a series of new bis-quaternary ammonium compounds. *Eur J Med Chem* **2006**, *41*(4): 437-44.

Krebs, A., V. Ludwig, J. Pfizer, G. Durner and M. W. Göbel; Enantioselective synthesis of non-natural aromatic alpha-amino acids. *Chemistry* **2004**, *10*(2): 544-53.

Krüger, R., Pfenninger, A., Fournier, I., Glückmann, M., and Karas, M.; Analyte Incorporation and Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Visualized by pH Indicator Molecular Probes. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5812-5821.

Laemmli, U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*(5259): 680-5.

Lamanda, A., A. Zahn, D. Roder and H. Langen; Improved Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) staining and destaining protocol for a better signal-to-background ratio and improved baseline resolution. *Proteomics* **2004**, *4*(3): 599-608.

Lee, M. S., B. A. Dougherty, A. C. Madeo and D. A. Morrison; Construction and analysis of a library for random insertional mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*: use for recovery of mutants defective in genetic transformation and for identification of essential genes. *Appl Environ Microbiol* **1999**, *65*(5): 1883-90.

Leichert L. I., C. Scharf and M. Hecker; Global characterization of disulfide stress in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **2003**, *185*(6): 1967-75.

Limburg, E., R. Gahlmann, H. P. Kroll and D. Beyer; Ribosomal alterations contribute to bacterial resistance against the dipeptide antibiotic TAN 1057. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, *48*(2): 619-22.

Lin, J. T., M. Bindel Connelly, C. Amolo, S. Otani and D. S. Yaver; Global Transcriptional Response of *Bacillus subtilis* to Treatment with Subinhibitory Concentrations of Antibiotics That Inhibit Protein Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother*, **2005**, *49*(5): 1915-1926.

Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp and A. Kenworthy; Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, *2*(6): 444-56.

Ludwig V., A. Krebs, M. Stoll, U. Dietrich, J. Ferner, H. Schwalbe, U. Scheffer, G. Dürner and M. W. Göbel; Tripeptides from synthetic amino acids block the Tat-TAR association and slow down HIV spread in cell cultures. *Chembiochem* **2007**, *8*(15): 1850-6.

Madsen, C. T., L. Jakobsen and S. Douthwaite; Mycobacterium smegmatis Erm(38) is a reluctant dimethyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, *49*(9): 3803-9.

Mamyurin, B.A., Karataev, V.I., Shmikk, D.V., Zagulin, V.A.; The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov. Phys. JETP* **1973**,

37, 45.

Mann, M., P. Hojrup and P. Roepstorff; Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass Spectrom* **1993**, 22(6): 338-45.

March, J. C., G. Rao and W. E. Bentley; Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Appl Microbiol Biotechnol* **2003**, 62(4): 303-15.

Marengo E., E. Robotti, F. Antonucci, D. Cecconi, N. Campostrini and P. G. Righetti; Numerical approaches for quantitative analysis of two-dimensional maps: a review of commercial software and home-made systems. *Proteomics* **2005**, 5(3): 654-66.

Martemyanov, K. A., A. S. Spirin and A. T. Gudkov; Direct expression of PCR products in a cell-free transcription/translation system: synthesis of antibacterial peptide cecropin. *FEBS Lett* **1997**, 414(2): 268-70.

Mascher, T., S. L. Zimmer, T. A. Smith and J. D. Helmann; Antibiotic-inducible promoter regulated by the cell envelope stress-sensing two-component system LiaRS of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2004**, 48(8): 2888-96.

Matsumoto C., K. Hamasaki, H. Mihara and A. Ueno; A high-throughput screening utilizing intramolecular fluorescence resonance energy transfer for the discovery of the molecules that bind HIV-1 TAR RNA specifically. *Bioorg Med Chem Lett* **2000**, 10(16): 1857-61.

Maurizi, M. R.; Degradation in vitro of bacteriophage lambda N protein by Lon protease from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **1987**, 262(6): 2696-703.

Mazzei, T., E. Mini, A. Novelli and P. Periti; Chemistry and mode of action of macrolides. *J Antimicrob Chemother* **1993**, 31 Suppl C: 1-9.

McLean J. E., N. Hamaguchi, P. Belenky, S. E. Mortimer, M. Stanton and L. Hedstrom; Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase binds nucleic acids in vitro and in vivo." *Biochem J* **2004**, 379(Pt 2): 243-51.

Mengin-Lecreulx, D. and J. van Heijenoort; Characterization of the essential gene glmM encoding phosphoglucosamine mutase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **1996**, 271(1): 32-9.

Menninger, J. R. and D. P. Otto; Erythromycin, carbomycin, and spiramycin inhibit protein synthesis by stimulating the dissociation of peptidyl-tRNA from ribosomes. *Antimicrob Agents Chemother* **1982**, 21(5): 811-8.

Michel-Reydellet, N., K. Woodrow and J. Swartz; Increasing PCR fragment stability and protein yields in a cell-free system with genetically modified *Escherichia coli* extracts. *J Mol Microbiol Biotechnol* **2005**, 9(1): 26-34.

Miesel, L., J. Greene and T. A. Black; Genetic strategies for antibacterial drug discovery. *Nat Rev Genet* **2003**, 4(6): 442-56.

Moazed, D. and H. F. Noller; Chloramphenicol, erythromycin, carbomycin and vernamycin B protect overlapping sites in the peptidyl transferase region of 23S ribosomal RNA. *Biochimie*

1987, 69(8): 879-84.

Mogk A., A. Völker, S. Engelmann, M. Hecker, W. Schumann and U. Völker; Nonnative proteins induce expression of the *Bacillus subtilis* CIRCE regulon. *J Bacteriol* **1998**, 180(11): 2895-900.

Moore, P. B. and T. A. Steitz; After the ribosome structures: how does peptidyl transferase work? *RNA* **2003**, 9(2): 155-9.

Mothana, R. A. and U. Lindequist; Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *J Ethnopharmacol* **2005**, 96(1-2): 177-81.

Nesterenko, M. V., M. Tilley and S. J. Upton; A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* **1994**, 28(3): 239-42.

Neuhaus, F. C. and J. Baddiley; A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **2003**, 67(4): 686-723.

Neuhoff, V., N. Arold, D. Taube and W. Ehrhardt; Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **1988**, 9(6): 255-62.

Nietert, M.; Virtuelles Screening nach RNA-Liganden: Zum Umgang mit einer flexiblen Zielstruktur. *Dissertation* **2008**.

Nikaido, H.; Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **2003**, 67(4): 593-656.

Nirenberg, M. W. and J. H. Matthaei; The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1961**, 47: 1588-602.

Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore and T. A. Steitz; The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **2000**, 289(5481): 920-30.

Ogle, J. M., D. E. Brodersen, W. M. Clemons, Jr., M. J. Tarry, A. P. Carter and V. Ramakrishnan; Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **2001**, 292(5518): 897-902.

Ogle, J. M. and V. Ramakrishnan; Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem* **2005**, 74: 129-77.

Ohuchi, S., H. Nakano and T. Yamane; In vitro method for the generation of protein libraries using PCR amplification of a single DNA molecule and coupled transcription/translation. *Nucleic Acids Res* **1998**, 26(19): 4339-46.

Olsen, J. V., S. E. Ong and M. Mann; Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* **2004**, 3(6): 608-14.

-
- Ornstein, L.; Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* **1964**, *121*: 321-49.
- Pankuch, G. A., D. B. Hoellman, G. Lin, S. Bajaksouzian, M. R. Jacobs and P. C. Appelbaum; Activity of HMR 3647 compared to those of five agents against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* by MIC determination and time-kill assay. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**, *42*(11): 3032-4.
- Paoletti L., Y. J. Lu, G. E. Schujman, D. de Mendoza and C. O. Rock; Coupling of fatty acid and phospholipid synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **2007**, *189*(16): 5816-24.
- Pape, T., W. Wintermeyer and M. V. Rodnina; Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nat Struct Biol* **2000**, *7*(2): 104-7.
- Pappin, D. J., P. Hojrup and A. J. Bleasby; Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* **1993**, *3*(6): 327-32.
- Patnaik, R. and J. R. Swartz; *E. coli*-based in vitro transcription/translation: in vivo-specific synthesis rates and high yields in a batch system. *Biotechniques* **1998**, *24*(5): 862-8.
- Park, C. B., H. S. Kim and S. C. Kim; Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, *244*(1): 253-7.
- Patel P. S., S. Huang, S. Fisher, D. Pirnik, C. Aklonis, L. Dean, E. Meyers, P. Fernandes and F. Mayerl; Bacillaene, a novel inhibitor of prokaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* **1995**, *48*(9): 997-1003.
- Patnaik, R. and J. R. Swartz *E. coli*-based in vitro transcription/translation: in vivo-specific synthesis rates and high yields in a batch system. *Biotechniques* **1998**, *24*(5): 862-8.
- Payne D. J., M. N. Gwynn, D. J. Holmes and D. L. Pompliano; Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, *6*(1): 29-40.
- Pelham, H. R. and R. J. Jackson; An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* **1976**, *67*(1): 247-56.
- Pieles, U., W. Zurcher, M. Schar and H. E. Moser; Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **1993**, *21*(14): 3191-6.
- Pietiäinen, M., M. Gardemeister, M. Mecklin, S. Leskelä, M. Sarvas and V. P. Kontinen; Cationic antimicrobial peptides elicit a complex stress response in *Bacillus subtilis* that involves ECF-type sigma factors and two-component signal transduction systems. *Microbiol* **2005**, *151*, 1577-1592.
- Piscitelli, S. C., L. H. Danziger and K. A. Rodvold; Clarithromycin and azithromycin: new macrolide antibiotics. *Clin Pharm* **1992**, *11*(2): 137-52.

-
- Poehlsgaard, J. and S. Douthwaite; The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat Rev Microbiol* **2005**, 3(11): 870-81.
- Pouny, Y., D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas and Y. Shai; Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* **1992**, 31(49): 12416-23.
- Powers, J. P. and R. E. Hancock; The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **2003**, 24(11): 1681-91.
- Pratt, S. D., C. A. David, C. Black-Schaefer, P. J. Dandliker, X. Xuei, U. Warrior, D. J. Burns, P. Zhong, Z. Cao, A. Y. Saiki, C. G. Lerner, L. E. Chovan, N. B. Soni, A. M. Nilius, F. L. Wagenaar, P. J. Merta, L. M. Traphagen and B. A. Beutel; A strategy for discovery of novel broad-spectrum antibacterials using a high-throughput *Streptococcus pneumoniae* transcription/translation screen. *J Biomol Screen* **2004**, 9(1): 3-11.
- Puglisi J. D., L. Chen, A. D. Frankel and J. R. Williamson; Role of RNA structure in arginine recognition of TAR RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90(8): 3680-4.
- Raleigh, E. A., R. Trimarchi and H. Revel; Genetic and physical mapping of the mcrA (rgIA) and mcrB (rgIB) loci of *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **1989**, 122(2): 279-96.
- Ramakrishnan, V.; Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **2002**, 108(4): 557-72.
- Righetti, P. G., A. Castagna, F. Antonucci, C. Piubelli, D. Cecconi, N. Campostrini, P. Antonioli, H. Astner and M. Hamdan; Critical survey of quantitative proteomics in two-dimensional electrophoretic approaches. *J Chromatogr A* **2004**, 1051(1-2): 3-17.
- Roberts, B. E. and B. M. Paterson; Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1973**, 70(8): 2330-4.
- Rodnina, M. V., M. Beringer and W. Wintermeyer; How ribosomes make peptide bonds. *Trends Biochem Sci* **2007**, 32(1): 20-6.
- Rodriguez-Villalobos, H., M. Aoun, C. Heymans, B. J. De, V. Duchateau, J. M. Verdebout and F. Crokaert; Cross reaction between a pan-Candida genus probe and *Fusarium* spp. in a fatal case of *Fusarium oxysporum* pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2002**, 21(2): 149-52.
- Safayhi, H., T. Mack, J. Sabieraj, M. I. Anazodo, L. R. Subramanian and H. P. Ammon; Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J Pharmacol Exp Ther* **1992**, 261(3): 1143-6.
- Safayhi, H., B. Rall, E. R. Sailer and H. P. Ammon; Inhibition by boswellic acids of human leukocyte elastase. *J Pharmacol Exp Ther* **1997**, 281(1): 460-3.
- Sawasaki, T., Y. Hasegawa, M. Tsuchimochi, N. Kamura, T. Ogasawara, T. Kuroita and Y. Endo; A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene

products. *FEBS Lett* **2002**, 514(1): 102-5.

Schlunzen, F., R. Zarivach, J. Harms, A. Bashan, A. Tocilj, R. Albrecht, A. Yonath and F. Franceschi; Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **2001**, 413(6858): 814-21.

Schmidt, F., S. Donahoe, K. Hagens, J. Mattow, U. E. Schaible, S. H. Kaufmann, R. Aebersold and P. R. Jungblut; Complementary analysis of the Mycobacterium tuberculosis proteome by two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tag technology. *Mol Cell Proteomics* **2004**, 3(1): 24-42.

Schumann, W. The Bacillus subtilis heat shock stimulon. *Cell Stress Chaperones* **2003**, 8(3): 207-17.

Schwarz, S. and C. Kehrenberg; Old dogs that learn new tricks: modified antimicrobial agents that escape pre-existing resistance mechanisms. *Int J Med Microbiol* **2006**, 296 Suppl 41: 45-9.

Schweiger, M. and L. M. Gold; Bacteriophage T4 DNA-dependent in vitro synthesis of lysozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1969**, 63(4): 1351-8.

Serio, A. W., K. B. Pechter and A. L. Sonnenshein; Bacillus subtilis aconitase is required for efficient late-sporulation gene expression. *J Bacteriol* **2006**, 188(17): 6396-405.

Seshachalam, D., D. H. Frahm and F. M. Ferraro; Cation reversal of inhibition of growth by valinomycin in Streptococcus pyogenes and Clostridium sporogenes. *Antimicrob Agents Chemother* **1973**, 3(1): 63-7.

Shapiro, A. L., E. Vinuela and J. V. Maizel, Jr.; Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* **1967**, 28(5): 815-20.

Shaw J., R. Rowlinson, J. Nickson, T. Stone, A. Sweet, K. Williams and R. Tonge; Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics* **2003**, 3(7): 1181-95.

Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm and M. Mann; Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **1996**, 68(5): 850-8.

Shimomura, O., F. H. Johnson and Y. Saiga; Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol* **1962**, 59: 223-39.

Shirokov, V. A., Simonenko, P. N., Biryukov, S. V., Spirin, A. S.; Continuous-flow and continuous-exchange translation systems and bioreactors. Editor Spirin, A. S., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg **2002**, pp. 91 – 107.

Siekevitz, P. und Zamecnik, P. C.; In vitro incorporation of l-C¹⁴-DL-alanine into proteins of rat liver granular fractions. *Fed. Proc.* **1951**, 10, 246.

Silverman, L., R. Campbell and J. R. Broach; New assay technologies for high-throughput

screening. *Curr Opin Chem Biol* **1998**, 2(3): 397-403.

Spirin, A. S.; The ribosome as an RNA-based molecular machine. *RNA Biol* **2004**, 1(1): 3-9.

Spirin, A. S., V. I. Baranov, L. A. Ryabova, S. Y. Ovodov and Y. B. Alakhov; A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* **1988**, 242(4882): 1162-4.

Steen, H. and M. Mann; The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, 5(9): 699-711.

Stein, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* **2005**, 56(4): 845-57.

Stiege, W. and V. A. Erdmann; The potentials of the in vitro protein biosynthesis system. *J Biotechnol* **1995**, 41(2-3): 81-90.

Strupat, K., Karas, M., and Hillenkamp, F.; 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* **1991**, 111, 89-102.

Stulke, J., R. Hanschke and M. Hecker; Temporal activation of beta-glucanase synthesis in *Bacillus subtilis* is mediated by the GTP pool. *J Gen Microbiol* **1993**, 139(9): 2041-5.

Suhartono, M., Weidlich, M., Stein, T., Karas, M., Dürner, G., Göbel, M. W.; Synthesis of Non-Natural Aromatic α -Amino Acids by a Heck Reaction (p NA). *Eur J Org Chem* **2008**, 9, 1608 – 1614.

Suhartono, M.; Chiral-Pool-Synthesen von nicht-natürlichen Aminosäuren: Neue Bausteine für RNA-Liganden. *Dissertation* **2008**.

Suhartono, M., M. Weidlich, T. Stein, M. Karas, G. Dürner and M. Göbel; Synthesis of Non-Natural Aromatic α -Amino Acids by a Heck Reaction. *Eur J Org Chem* **2008**, 9, 1608-1614.

Svensson, H., Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH-gradients. I. The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases. *Acta Chem Scand* **1961**, 15, 325-341.

Syrovets, T., B. Buchele, E. Gedig, J. R. Slupsky and T. Simmet; Acetyl-boswellic acids are novel catalytic inhibitors of human topoisomerases I and II α . *Mol Pharmacol* **2000**, 58(1): 71-81.

Syrovets, T., B. Buchele, C. Krauss, Y. Laumonier and T. Simmet; Acetyl-boswellic acids inhibit lipopolysaccharide-mediated TNF- α induction in monocytes by direct interaction with I κ B kinases. *J Immunol* **2005**, 174(1): 498-506.

Szeto T. H., S. L. Rowland, L. I. Rothfield and G. F. King; Membrane localization of MinD is mediated by a C-terminal motif that is conserved across eubacteria, archaea, and chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**, 99(24): 15693-8.

Taber, H. W., J. P. Mueller, P. F. Miller and A. S. Arrow; Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev* **1987**, 51(4): 439-57.

- Takanishi, C. L., E. A. Bykova, W. Cheng and J. Zheng; GFP-based FRET analysis in live cells. *Brain Res* **2006**, 1091(1): 132-9.
- Talbot G. H., J. Bradley, Jr., J. E. Edwards, D. Gilbert, M. Scheld, J. G. Bartlett and the *Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America*; Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **2006**, 42(5): 657-68.
- Tam le T., H. Antelmann, C. Eymann, D. Albrecht, J. Bernhardt and M. Hecker; Proteome signatures for stress and starvation in *Bacillus subtilis* as revealed by a 2-D gel image color coding approach. *Proteomics* **2006**, 6(16): 4565-85.
- Tanrikulu, Y., M. Nietert, U. Scheffer, E. Proschak, K. Grabowski, P. Schneider, M. Weidlich, M. Karas, M. Gobel and G. Schneider; Scaffold Hopping by "Fuzzy" Pharmacophores and its Application to RNA Targets. *Chembiochem* **2007**, 8(16): 1932-1936.
- Taranenko, N. I., K. Tang, S. L. Allman, L. Y. Ch'ang and C. H. Chen; 3-Aminopicolinic acid as a matrix for laser desorption mass spectrometry of biopolymers. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1994**, 8(12): 1001-6.
- Tenson, T. and A. Mankin; Antibiotics and the ribosome. *Mol Microbiol* **2006**, 59(6): 1664-77.
- Thiede, B., W. Hohenwarter, A. Krah, J. Mattow, M. Schmid, F. Schmidt and P. R. Jungblut; Peptide mass fingerprinting. *Methods* **2005**, 35(3): 237-47.
- Thomas LV *et al.*, *Natural Food Antimicrobial Systems*, ed Naidu AS (CRC, NY), **2000**, 463-524.
- Tjornelund, J. and S. H. Hansen; Use of metal complexation in non-aqueous capillary electrophoresis systems for the separation and improved detection of tetracyclines. *J Chromatogr A* **1997**, 779(1-2): 235-43.
- Tonge R., J. Shaw, B. Middleton, R. Rowlinson, S. Rayner, J. Young, F. Pognan, E. Hawkins, I. Currie and M. Davison; Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* **2001**, 1(3): 377-96.
- Tor, Y., T. Hermann and E. Westhof; Deciphering RNA recognition: aminoglycoside binding to the hammerhead ribozyme. *Chem Biol* **1998**, 5(11): R277-83.
- Tsalkova, T., G. Zardeneta, W. Kudlicki, G. Kramer, P. M. Horowitz and B. Hardesty; GroEL and GroES increase the specific enzymatic activity of newly-synthesized rhodanese if present during in vitro transcription/translation. *Biochemistry* **1993**, 32(13): 3377-80.
- Tsien, R. Y.; The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **1998**, 67: 509-44.
- Tsiodras, S., H. S. Gold, G. Sakoulas, G. M. Eliopoulos, C. Wennersten, L. Venkataraman, R. C. Moellering and M. J. Ferraro; Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **2001**, 358(9277): 207-8.

- Tyers, M. and M. Mann; From genomics to proteomics. *Nature* **2003**, 422(6928): 193-7.
- Ünlü, M., M. E. Morgan and J. S. Minden; Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **1997**, 18(11): 2071-7.
- VanBogelen, R. A. and F. C. Neidhardt; Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, 87(15): 5589-93.
- VanBogelen, R. A., E. E. Schiller, J. D. Thomas and F. C. Neidhardt; Diagnosis of cellular states of microbial organisms using proteomics. *Electrophoresis* **1999**, 20(11): 2149-59.
- Vassilatis, D. K., J. P. Arena, R. H. Plasterk, H. A. Wilkinson, J. M. Schaeffer, D. F. Cully and L. H. Van der Ploeg; Genetic and biochemical evidence for a novel avermectin-sensitive chloride channel in *Caenorhabditis elegans*. Isolation and characterization. *J Biol Chem* **1997**, 272(52): 33167-74.
- Vesterberg, O.; Synthesis and isoelectric fractionation of carrier ampholytes. *Acta Chem Scand* **1969**, 23, 2653.
- Walsh, C. and G. Wright; Introduction: antibiotic resistance. *Chem Rev* **2005**, 105(2): 391-4.
- Ward, W. W. and M. J. Cormier; An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the Renilla green-fluorescent protein. *J Biol Chem* **1979**, 254(3): 781-8.
- Ward, W. W. and S. H. Bokman; Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry* **1982**, 21(19): 4535-40.
- Wasinger, V. C., S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J. X. Yan, A. A. Gooley, M. R. Wilkins, M. W. Duncan, R. Harris, K. L. Williams and I. Humphery-Smith; Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **1995**, 16(7): 1090-4.
- Weber, C. C., K. Reising, W. E. Muller, M. Schubert-Zsilavec and M. Abdel-Tawab; Modulation of Pgp Function by Boswellic Acids. *Planta Med* **2006**.
- Weidlich, M., C. Klammt, F. Bernhard, M. Karas and T. Stein; Differential activity profiles of translation inhibitors in whole-cell and cell-free approaches. *Lett Appl Microbiol* **2007**.
- Werner, G., C. Cuny, F. J. Schmitz and W. Witte; Methicillin-resistant, quinupristin-dalfopristin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced sensitivity to glycopeptides. *J Clin Microbiol* **2001**, 39(10): 3586-90.
- Westermeier, R.; Electrophoresis in Practice. Third edition. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim **2001**
- White, J. P. and C. R. Cantor; Role of magnesium in the binding of tetracycline to *Escherichia coli* ribosomes. *J Mol Biol* **1971**, 58(1): 397-400.
- Wiley, W.C. und MacLaren, I.H.; Time-of-Flight Spectrometer with Improved Resolution. *Rev. Sci. Instr.* **1955**, 26, 1150-1157.

- Wilkins, M. R., C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J. C. Sanchez, J. X. Yan, A. A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith, K. L. Williams and D. F. Hochstrasser; From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* **1996**, *14*(1): 61-5.
- Williams, J. D.; Spectrum of activity of azithromycin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1991**, *10*(10): 813-20.
- Wilson, K. E., J. E. Flor, R. E. Schwartz, H. Joshua, J. L. Smith, B. A. Pelak, J. M. Liesch and O. D. Hensens; Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. II. Isolation and physico-chemical characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **1987**, *40*(12): 1682-91.
- Wolff, S., A. Otto, D. Albrecht, J. S. Zeng, K. Buttner, M. Gluckmann, M. Hecker and D. Becher; Gel-free and gel-based proteomics in *Bacillus subtilis*: a comparative study. *Mol Cell Proteomics* **2006**, *5*(7): 1183-92.
- Woodward, W. R., J. L. Ivey and E. Herbert; Protein synthesis with rabbit reticulocyte preparations. *Methods Enzymol* **1974**, *30*(0): 724-31.
- Wright, A. J.; The penicillins. *Mayo Clin Proc* **1999**, *74*(3): 290-307.
- Yang, F., L. G. Moss and G. N. Phillips, Jr.; The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **1996**, *14*(10): 1246-51.
- Yates, J. R., 3rd, S. Speicher, P. R. Griffin and T. Hunkapiller; Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal Biochem* **1993**, *214*(2): 397-408.
- Zavialov, A. V., R. H. Buckingham and M. Ehrenberg; A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3. *Cell* **2001**, *107*(1): 115-24.
- Zhang, J. H., T. D. Chung and K. R. Oldenburg; A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **1999**, *4*(2): 67-73.
- Zimmer, M.; Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev* **2002**, *102*(3): 759-81.
- Zimmerman S. B., C. D. Schwartz, R. L. Monaghan, B. A. Pelak, B. Weissberger, E. C. Gilfillan, S. Mochales, S. Hernandez, S. A. Currie, E. Tejera *et al.*; Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I. Production, taxonomy and antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)* **1987**, *40*(12): 1677-81.
- Zubay, G.; In vitro synthesis of protein in microbial systems. *Annu Rev Genet* **1973**, *7*: 267-87.
- Zweerink, M. M. and A. Edison "Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. III. Mode of action of difficidin. *J Antibiot (Tokyo)* **1987**, *40*(12): 1692-7.

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name: Markus Weidlich
Adresse: Heidelberger Strasse 56A
64625 Bensheim
Geburtsdatum: 08.06.1976
Geburtsort: Mannheim
Familienstand: ledig



Schulbildung

1983 – 1987 Carl-Zuckmayer Grundschule Nackenheim
1987 – 1996 Gutenberg-Gymnasium Mainz;
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1996 – 1997 Orthopädische Klinik Wiesbaden gGmbH

Hochschulausbildung

1997 – 2003 Johannes Gutenberg-Universität Mainz;
Studium der Pharmazie
12/2003 Erteilung der Approbation als Apotheker

Praktische Ausbildung

11/2002 – 04/2003 Trajan-Apotheke Mainz
05/2003 – 10/2003 Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt/Main,
Abt.: DI&A Pharmaceutical Sciences

Wissenschaftliche Ausbildung

01/2004 – 10/2008 Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Goethe-Universität, Frankfurt am Main unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Karas;
Thema der Dissertation: Identifizierung und Charakterisierung neuer antimikrobieller Inhibitoren der zellfreien prokaryotischen Transkriptions-/Translationsreaktion

Wissenschaftliche Publikationen

Tanrikulu, Y.; Nietert, M., Scheffer, U.; Proschak, E.; Grabowski, K.; Schneider, P.; Weidlich, M.; Karas, M.; Göbel, M.; Schneider, G.;

Scaffold hopping by "fuzzy" pharmacophores and its application to RNA targets.

Chembiochem 2007, 8, 1932 – 1936.

Weidlich, M.; Nietert, M., Suhartono, M., Göbel, M., Schneider, G., Stein, T., Karas, M.;

Rational approaches to discover novel antimicrobial RNA ligands. *Farm. Vestn.* 2007, 58, 46.

Weidlich, M.; Klammt, C.; Bernhard, F.; Karas, M.; Stein, T.;

Differential activity profiles of translation inhibitors in whole-cell and cell-free approaches.

Letters in Applied Microbiology 2008, 46, 155 – 159.

Suhartono, M.; Weidlich, M.; Stein, T.; Karas, M.; Dürner, G.; Göbel M.;

Synthesis of Non-Natural Aromatic α -Amino Acids by a Heck Reaction.

European Journal of Organic Chemistry 2008, 9, 1608 – 1614

Posterpräsentationen

Weidlich, M.; Klammt, C.; Bernhard, F.; Stein, T.; Karas, M.;

Translation inhibitor action of standard antibiotics *in-vivo* versus *in-vitro*.

Frontiers in Medicinal Chemistry, Medicinal Chemistry divisions of GDCh and DPhG,
Frankfurt am Main; 12. – 15. März 2006

Weidlich, M.; Klammt, C.; Bernhard, F.; Stein, T.; Karas, M.;

Role of the Gram-negative cell envelope for the uptake of antibiotics: Whole cell versus cell-free.

Joint Meeting of the Czech Pharmaceutical Society, the German Pharmaceutical Society and the Hungarian Society for Pharmaceutical Sciences, Marburg; 04. – 07. Okt. 2006

Niertert, M., Tanrikulu, Y., Grabowski, K., Scheffer, U., Göbel, M., Weidlich M., Karas, M., Kestner E., Gohlke, H., Schneider, G.;

Virtual Screening for RNA.

2nd German Conference on Cheminformatics, Goslar; 12. – 14. Nov. 2006

Weidlich, M.; Nietert, M.; Beckhaus, T.; Schneider, G.; Stein, T.; Karas, M.;

Proteomic characterization of a novel antibacterial translation inhibitor by 2D-DIGE analysis.

41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Giessen; 02.

– 05. März 2008

Wissenschaftliche Vorträge

On the hunt for new transcription/translation inhibiting molecules;

Doktorandenseminar des Institutes für Pharmazeutische Chemie und Pharmazeutische

Biologie, Frankfurt am Main, 13. Feb. 2007

Rational approaches to discover novel antimicrobial RNA-ligands;

5th Austrian-German-Hungarian-Italian-Polish-Slovenian Joint Meeting on Medicinal

Chemistry, Portorož / Slowenien; 19. Juni 2007

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazeutische Chemie der Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Karas in der Zeit vom Januar 2004 bis Oktober 2008 angefertigt.

Die Realisierung dieser Arbeit war nur durch die Unterstützung zahlreicher Kollegen und Freunde möglich. Dafür möchte ich Euch danken!

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Karas für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis als Doktorand bedanken, die mir die Möglichkeit gab auf dem hochinteressanten Gebiet der antimikrobiellen Wirkstoffforschung zu arbeiten. Herr Prof. Dr. Karas lies mir alle Freiheiten und unterstützte mich jederzeit bei der experimentellen Gestaltung dieser Arbeit. Besonders die kritischen und konstruktiven Gespräche motivierten mich immer wieder als „Einzelkämpfer“ weitere Experimente in Angriff zu nehmen. Auch für die Unterstützung im Rahmen der Besuche nationaler und internationaler wissenschaftlicher Konferenzen bin ich Herrn Prof. Dr. Karas sehr dankbar.

Bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Karas, namentlich Dr. Marianne André, Tabiwang Arrey, Dominic Bäumlisberger, Dr. Ute Bahr, Sabrina Baltruschat, Tobias Beckhaus, Sandra Bornemann, Dr. Carsten Corvey, Frank Dannenberg, Walter Eckhard, Dr. Martin Hampel, Daniel Hierl, Tri Hoang, Dr. Corina Hunger, Thorsten Jaskolla, Dr. Jan-Henning Keller, Stavroula Markoutsas, Dr. Björn Meyer, Andreas Münch, Dimitrios Papatirou, Markus Persike, Dr. Isam Rais, Benjamin Rietschel, Dr. Thomas Russ, Malte Schürken, Dr. Eric Schulz, Dr. Sieglinde Überall, Dorothea Urbanek möchte ich mich für eine tolle Arbeitsatmosphäre bedanken. Es war eine schöne Zeit!!

Herrn Prof. Dr. Torsten Stein danke ich für die vielseitige Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit. Vor allem die Möglichkeit am Institut für Molekulare Biowissenschaften der Goethe-Universität Frankfurt am Main mikrobiologisch zu arbeiten, ergab sich nur durch die Kooperation mit Prof. Dr. Stein. Besonders unsere wissenschaftlichen Diskussionen zur Eliminierung bössartiger Krankheitserreger waren sehr erfrischend. Auch für die

Unterstützung beim „Design“ unserer gemeinsamen wissenschaftlichen Publikationen möchte ich mich bedanken.

Dr. Frank Bernhard und Dr. Christian Klammt danke ich für den *knowledge transfer* zum Aufbau des zellfreien Assaysystems und für die Bereitstellung des S30-Extraktes.

Herrn Prof. Dr. Gisbert Schneider, Dr. Manuel Nietert und Yusuf Tanrikulu danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Rahmen unserer gemeinsamen Forschungsk Kooperationen und für die Möglichkeit der Nutzung der im AK Prof. Dr. Schneider generierten Substanzbibliotheken.

Prof. Dr. Michael Göbel und Dr. Marcel Suhartono möchte ich für die produktive und erfolgreiche Zusammenarbeit an unserem Forschungsprojekt und für die Überlassung der im AK Prof. Dr. Göbel synthetisierten Tripeptide danken.

Herrn Dr. Thomas Wichelhaus danke ich vielmals für die sofortige Bereitschaft unser Projekt durch Bereitstellung seiner wissenschaftlichen Ressourcen zu unterstützen.

Prof. Dr. Rolf Marschalek und Jenny Merkens danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung des NALM-6-Zellassays.

Dr. Philipp Krüger danke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen des Boswellia-Projektes.

Explizit möchte ich Tobias Beckhaus für seine Hilfe bei allen proteomanalytischen Fragestellungen von der Gelpräparation („*Rotiphorese mit oder ohne ?*“) über den automatischen Proteinverdau bis zur Massenspektrometrie herzlich danken. Du warst eine große Hilfe !

Allen Kolleginnen und Kollegen der pharmazeutischen Institute der Goethe-Universität Frankfurt am Main, insbesondere meinen Mitstreitern im Praktikum „Pharmazeutische Chemie I“ namentlich Prof. Dr. Holger Stark, Prof. Dr. Manfred Schubert-Zsilavec, Dr. Holger Kubas, Dr. Oliver Saur, Dr. Laura Popescu, Dr. Beate Firla, Dr. Perry Griffin, Dr. Yvonne Klein (geb. Syha), Tim Kottke, Heiko Zettl, Dr. Aleksandra Zivkovic, Thorsten

Jaskolla, Moritz Schübler und Michael Amon danke ich herzlich für die kollegiale und fröhliche Arbeitsatmosphäre.

Dr. Michael Burkard und Dr. Markus Helfrich danke ich für eine tolle Arbeitsatmosphäre im AK Stein. Ihr hattet für einen Apotheker immer ein offenes Ohr bei dummen Fragen zur Mikrobiologie.

Besonderer Dank geht natürlich an das Office #1...„ihr wißt schon was ich meine“ (aus: Meyer B., 2008, Dissertation – Danksagung).

Lieber Walter, lieber Bernd auch Euch beiden herzlichen Dank für Eure Unterstützung bei der Überwindung aller bürokratischen Hürden. Ihr wisst ja, das ein Meenzer im Ausland oft nicht verstanden wird.

Zur kritischen Durchsicht meiner Arbeit danke ich Dr. Björn Meyer und Tobias Beckhaus.

Großer Dank gilt auch meiner Familie, die mich auf meinem Lebensweg immer unterstützt hat. Besonders möchte ich meinen Großeltern danken, die v. a. in schwereren Zeiten für mich da waren.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über die „Identifizierung und Charakterisierung neuer antimikrobieller Inhibitoren der zellfreien prokaryotischen Transkriptions-/Translationsreaktion“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den

.....
Markus Weidlich