

Entwicklung und Anwendungen eines
SPR-Biosensor-Assays
für Moenomycine und andere
Glykosyltransferase-Inhibitoren

Dem Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften der
Bergischen Universität Wuppertal
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegte Dissertation

von

Daniel Bury

aus Essen

2015

Die Dissertation kann wie folgt zitiert werden:

urn:nbn:de:hbz:468-20151207-141307-4

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn%3Anbn%3Ade%3A468-20151207-141307-4>]

Abstract

Moenomycins are a family of highly active (mainly against gram-positive bacteria) glycopeptide antibiotics inhibiting the penultimate step in bacterial cell wall synthesis (i.e. transglycosylation). They are the only known natural substances inhibiting transglycosylation by binding directly to the peptidoglycan glycosyltransferase (GT). Because of poor pharmacokinetic properties, they are of limited clinical use. A mixture of moenomycins is, however, used as growth promoter in livestock breeding under the name flavophospholipol (Flavomycin[®], Gainpro[®], Pharmastim[®], Jivet[®]). Use of antibiotics as growth promoters adds to the generation and selection of antibiotic resistant pathogen strains. Thus, utilization of growth promoters was banned in the European Union in 2006.

The threat of emerging antimicrobial resistance caused by the widespread use of antibiotics in human therapy and animal husbandry leads to a constant need of new antibiotics. GTs are essential for bacteria, which makes them an attractive target.

This work describes the development of a competitive SPR (surface plasmon resonance) biosensor assay and its application for analysis in feedstuffs as well as qualitative structure-activity relationship studies on GT inhibition. The assay is based on the interaction between a moenomycin A derivative tethered to the sensor chip surface and monofunctional glycosyltransferase MtgA from *Staphylococcus aureus*. It is capable of detecting 1 µg/mL flavophospholipol and 0.5 µM moenomycin A, respectively.

Moenomycin A needed for synthesis of the immobilized derivative was isolated from flavophospholipol (Flavomycin[®]) in high yields (>70%) and purity (>99%) by a procedure first described in this work. It comprises reversed phase semi-preparative HPLC under acidic conditions followed by desalting via solid phase extraction (SPE). The practicality of the assay for screening for flavophospholipol in feedstuffs was tested. Three feed samples were each analyzed unspiked and spiked at the lowest and highest reasonable flavophospholipol concentrations (between 1 and 20 mg/kg), respectively. Ground feedstuffs were extracted with methanol under elevated pressure and temperature by accelerated solvent extraction. Further cleanup was performed via solid phase extraction. The assay was capable of distinguishing clearly between positive and negative samples in two feedstuffs. In the third feedstuff, matrix interference lead to high SPR responses resulting in a false positive blank sample. However, false negative results were not observed.

Furthermore, the assay was used to investigate the mechanism of action of GT inhibitors mimicking the peptidoglycan monomer lipid II or the lipid II precursor lipid I. All inhibitors resulted in decreased MtgA binding to the sensor chip surface indicating inhibition via the donor site of the enzyme. At low concentrations, however, some lipid II analogous inhibitors caused increased MtgA binding. These findings suggest that these lipid II analogs bind to the acceptor site as well, inducing a heteroallosteric activation of the donor site for moenomycin A. However, at high inhibitor concentrations, competition via the donor site outweighs the enhancement.

Assuming that this hypothesis of cooperativity is true, differential effects of the analyzed inhibitors on enhancement of MtgA binding point towards the significance of different structure elements for binding to the acceptor site: The disaccharide in lipid II analogs is essential. Phosphoglycerate instead of phosphate as linker between disaccharide and lipid moiety increases affinity. A peptide side chain however reduces affinity.

The assay described in this work is a sensitive tool for the detection of moenomycins and the identification of GT inhibitors. The results presented constitute the first indication of a positive cooperativity between donor and acceptor sites of GTs. The findings regarding the examined inhibitors contribute to the understanding of GT inhibition and might add to the development of new pharmaceutical leads for GT inhibitors.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael Petz danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, dieses weitgehend frei zu bearbeiten. Auch für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit und die zahlreichen Diskussionen möchte ich ihm danken.

Herrn Prof. Dr. Heiko Hayen danke ich für die Diskussionen zur Isolierung des Moenomycin A.

Herrn Prof. Dr. Walter Reineke und Herrn Priv.-Doz. Dr. Eberhard Schmidt danke ich für die Möglichkeit, die mikrobiologischen Arbeiten in ihren Laboren durchzuführen. Insbesondere möchte ich ihrem Mitarbeiter Herrn Dr. Christian Mandt für die Beratung und die Hilfestellung bei diesen Arbeiten danken.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Scherkenbeck danke ich für das ausführliche Gespräch über die Synthesen der Moenomycin-Derivate.

Herrn Prof. Dr. Manfred Schneider danke ich für das ausführliche Gespräch über die Möglichkeiten zur enzymatischen Spaltung von Moenomycin A.

Herrn Prof. Dr. Fabian Mohr danke ich für die Beratung zur Auswahl eines geeigneten Palladium-Katalysators zur Spaltung von Moenomycin A. Seinem Mitarbeiter Herrn Bernd Mell möchte ich für die Bereitstellung des von ihm synthetisierten Bis(benzonitril)palladium(II)-chlorids danken.

Herrn Prof. Dr. Hans-Josef Altenbach und Herrn Prof. Dr. Stefan Kirsch danke ich für die Möglichkeit, die Lyophilisation des isolierten Moenomycin A in ihren Laboren durchzuführen. Herrn Ümit Gün danke ich für die praktische Unterstützung.

Herrn Dr. Mohammed Terrak und seinen Mitarbeitern an der Universität Liège danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit und im Zuge dessen für die Bereitstellung der verwendeten Peptidoglykan-Glykosyltransferasen (PGT), sowie die zahlreichen Diskussionen zu den SPR-Experimenten im Rahmen der Kooperation. Im Speziellen danke ich seiner Mitarbeiterin Frau Ismahene Dahmane für die Herstellung und Charakterisierung der untersuchten PGT-Mutanten im Rahmen ihrer Doktorarbeit. Im Rahmen dieser Kooperation wurde von Herrn Dr. Eefjan Breukink von der Universität Utrecht Lipid II zur Verfügung gestellt. Außerdem wurden von Herrn Dr. Shrinivas Dumbre im Labor von Herrn Prof. Dr. Piet Herdewijn an der Universität Leuven Lipid I- und Lipid II-analoge PGT-Inhibitoren synthetisiert und bereitgestellt. Dafür möchte ich mich bedanken.

Frau Dr. Erika Müller-Seitz danke ich für die zahlreichen Diskussionen und ihr Interesse am Fortgang der Arbeit.

Frau Annabel Sand danke ich für die Entwicklung der analytischen HPLC-Methode zur Trennung der Moenomycine im Basischen, der Synthese der Derivatisierungsreagenzien für das Amin- und Biotinderivat von Moenomycin A und ihre Versuche zur chemischen und enzymatischen Spaltung der Moenomycine im Rahmen ihrer durch den Autor dieser Arbeit betreuten Examensarbeit.

Frau Dr. Regina Conrads und Herrn Marcus Breuer-Grau vom Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Ruhr-Wupper (CVUA-RRW) in Krefeld danke ich für die Bereitstellung der LC-MS/MS-Methode für den Nachweis von Flavophospholipol in Futtermitteln und die Möglichkeit, Futtermittel mit Accelerated Solvent Extraction (ASE) zu extrahieren, sowie eine Vergleichsanalytik mittels LC-HRMS durchzuführen. Herrn Breuer-Grau danke ich für die praktische Unterstützung bei der Messung der LC-MS-Proben.

Frau Helma Geltenpoth vom Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften – ISAS – e.V. Dortmund und Herrn Prof. Dr. Heiko Hayen danke ich für die LC-MS-Messungen zur Reaktionskontrolle bei der Hydrierung von Moenomycin A.

Der Deutschen Tiernahrung Cremer GmbH & Co. KG in Düsseldorf danke ich für die kostenlose Bereitstellung von Flavophospholipol-freien Futtermitteln für die Herstellung des dotierten Probenmaterials.

Dem gesamten Arbeitskreis der Lebensmittelchemie an der Bergischen Universität Wuppertal möchte ich für die kollegiale und angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium der Lebensmittelchemie ermöglichten und mich in meiner Entscheidung, diesen Weg einzuschlagen, bestärkten.

Mein besonderer Dank gilt Sarah Hohagen für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Unterstützung während der Zeit, in der diese Arbeit entstand.

Teile dieser Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Bury D, Dahmane I, Derouaux A, Dumbre S, Herdewijn P, Matagne A, Breukink E, Mueller-Seitz E, Petz M, Terrak M (2015) *Positive cooperativity between acceptor and donor sites of the peptidoglycan glycosyltransferase*. *Biochem Pharmacol* 93(2):141-150.

Teile dieser Arbeit wurden als Konferenzbeiträge vorgestellt:

Bury D, Mueller-Seitz E, Hayen H, Petz M (2012) *Isolierung von Moenomycin A aus dem Mastförderer Flavomycin® zur Synthese von Derivaten für einen SPR-Assay*. Posterbeitrag zum 41. Deutschen Lebensmittelchemikertag, 10.-12. September 2012 in Münster.

Bury D, Mueller-Seitz E, Terrak M, Petz M (2013) *Flavomycin: Strategy for an SPR biosensor assay*. Posterbeitrag zur Regionalverbandstagung NRW der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (LChG), 6. März 2013 in Münster.

Bury D, Mueller-Seitz E, Terrak M, Petz M (2013) *SPR biosensor assay for the growth promoter Flavomycin®*. Posterbeitrag zum 42. Deutschen Lebensmittelchemikertag, 16.-18. September 2013 in Braunschweig.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Moenomycine	3
2.1	Moenomycine und Flavophospholipol.....	4
2.1.1	Antibiotika der Moenomycin-Gruppe.....	4
2.1.2	Flavophospholipol.....	7
2.2	Physikalische und chemische Eigenschaften	9
2.3	Biosynthese.....	10
2.4	Wirkung.....	16
2.4.1	Peptidoglykansynthese.....	16
2.4.2	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	23
2.4.3	Wirkungsspektrum.....	30
2.5	Moenomycine als Mastförderer	32
2.5.1	Verwendung von Flavophospholipol in der Tiermast.....	32
2.5.2	Resistenzproblematik und EU-weites Verbot von Mastförderern	34
2.6	Entwicklung neuer GT-Inhibitoren	35
3	Nachweisverfahren für Moenomycine	37
3.1	Mikrobiologische Hemmstofftests	37
3.2	Elektrophoretische Nachweisverfahren	39
3.3	Chromatographische Methoden zum Nachweis von Flavophospholipol	40
3.4	Chromatographische Methoden zur Trennung der Moenomycine	41
4	SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine	43
4.1	Aufbau und Prinzip von SPR-Biosensoren	43
4.1.1	Messprinzip	44
4.1.2	Der verwendete SPR-Biosensor	51
4.1.3	Das Sensorgramm.....	53
4.1.4	Assayformate	60
4.1.5	Sensorchipoberflächen.....	64
4.1.6	Regeneration der Chipoberfläche	70
4.1.7	Bulk-Effekt.....	71
4.2	Anwendungsgebiete von SPR-Biosensoren	74
4.3	SPR-Biosensoren und Assays für PGT-Inhibitoren.....	75
5	Zielsetzung	79
6	Aufbau der möglichen Assayformate.....	81

6.1	Direkter Assay für die Futtermittelanalytik	81
6.2	Kompetitive Assayformate	81
6.2.1	Derivate für die Immobilisierung	81
6.2.2	Biomolekulare Erkennungspartner	89
6.3	Direkter Assay für Peptidoglykan-GTs	94
7	Ergebnisse und Diskussion	95
7.1	Direkter Flavophospholipol-Assay	95
7.2	Isolierung von Moenomycin A	101
7.2.1	Methode	101
7.2.2	Strategie.....	104
7.2.3	Trennung der Moenomycine im Basischen.....	107
7.2.4	Trennung der Moenomycine im Säuren.....	111
7.2.5	Weitere verfolgte Ansätze für die chromatographische Trennung .	117
7.2.6	Entsalzung der Fraktionen der semi-präparativen HPLC.....	119
7.2.7	Charakterisierung des isolierten Moenomycin A.....	123
7.3	Synthese von Moenomycin A-Derivaten.....	127
7.3.1	Synthese von 5-Amino- <i>N</i> -(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid	127
7.3.2	Synthese des Aminderivats von Moenomycin A.....	128
7.3.3	Synthese des Biotinylierungsreagenzes	129
7.3.4	Synthese von Decahydromoenomycin	130
7.3.5	Abspaltung des Moenocinolrests.....	131
7.4	Kompetitiver SPR-Assay.....	135
7.4.1	Chipoberfläche.....	136
7.4.2	Sensorgramme.....	138
7.4.3	Empfindlichkeit.....	139
7.4.4	Einfluss der verwendeten GT und des Tensids	140
7.4.5	Assaystabilität	144
7.4.6	Einfluss der Proteincharge	149
7.5	Analyse von Futtermitteln.....	151
7.5.1	Herstellung des Probenmaterials	151
7.5.2	Extraktion der Futtermittel und Matrixanreicherung	153
7.5.3	Richtigkeit	160
7.6	Charakterisierung von PGT-Mutanten.....	165
7.6.1	Eignung des SPR-Assays	166
7.6.2	Komplexität der Sensorgramme	167
7.6.3	MtgA-Mutante mit modifizierter hydrophober Region.....	169

7.6.4	Zusammenfassung der Daten.....	172
7.7	Charakterisierung von Glykosyltransferase-Inhibitoren.....	173
7.7.1	Einfluss von DMSO auf die Assayempfindlichkeit.....	174
7.7.2	Positive Kooperativität der Donor- und Akzeptorbindungsstelle.....	175
7.7.3	Einfluss der Substituenten substratanaloger Inhibitoren.....	184
8	Zusammenfassung und Ausblick.....	187
9	Material und Methoden.....	193
9.1	Verwendete Geräte, Chemikalien und Materialien.....	193
9.2	Direkter Flavophospholipol-Assay.....	198
9.3	Analytische HPLC-Trennung der Moenomycin-Kongenere.....	198
9.4	Akkurate Massen der tentativen Moenomycin-Kongenere.....	200
9.5	Semi-präparative HPLC-Trennung der Moenomycin-Kongenere.....	200
9.6	Entsalzung der Eluate der semi-präparativen HPLC per SPE.....	201
9.7	¹ H NMR des isolierten Moenomycin A.....	202
9.8	5-Amino- <i>N</i> -(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid.....	203
9.9	Moenomycin A-Aminderivat.....	204
9.10	Biotinylierungsreagenz.....	206
9.11	Decahydromoenomycin.....	207
9.12	Abspaltung des Moenocinolrests.....	208
9.13	Herstellung der Moenomycin A-Chipoberfläche.....	209
9.14	Kompetitiver Flavophospholipol-Assay.....	209
9.15	Kompetitiver Assay mit <i>E. coli</i> PBP1b.....	210
9.16	Homogenisierung und Dotierung der Futtermittelproben.....	211
9.17	Aufarbeitung der Futtermittelproben.....	213
9.18	Analyse der Futtermittlextrakte per LC-HRMS.....	215
9.19	Direkter SPR-Assay für PGT-Mutanten.....	216
9.20	Kompetitiver SPR-Assay auf PGT-Inhibitoren.....	217
10	Abkürzungsverzeichnis.....	219
11	Literatur.....	223
12	Anhang.....	247
12.1	Verwendete Futtermittel.....	247
12.1.1	Ferkelaufzuchtfutter:.....	247
12.1.2	Alleinfuttermittel für Legehennen:.....	248
12.1.3	Rindermastfutter:.....	248
12.2	Flavophospholipol-Premix.....	249

1 Einleitung

Moenomycine sind eine Gruppe von Antibiotika mit sehr hoher Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien [1]. Sie sind die bislang einzigen bekannten Naturstoffe, die das bakterielle Wachstum dadurch hemmen, dass sie die Transglykosylierung, den vorletzten Schritt der bakteriellen Zellwandsynthese, durch Bindung an das Enzym Peptidoglykan-Glykosyltransferase (PGT) hemmen. Moenomycine werden nach oraler Verabreichung nicht resorbiert, was den Nutzen für die Humantherapie einschränkt. Sie werden aber unter der Bezeichnung Flavophospholipol zur Leistungssteigerung in der Tiermast eingesetzt [2].

Der Einsatz von Antibiotika in der Humantherapie, sowie in der Nutztierhaltung hat zu einer weltweit verstärkten Ausbreitung antibiotikaresistenter humanpathogener Bakterien geführt [3]. Als Reaktion auf diese Entwicklung ist seit 2006 der Gebrauch von Mastförderern in der EU verboten. Moenomycine bilden keine Rückstände in tierischen Geweben [4-8], der Nachweis einer rechtswidrigen Anwendung ist daher nur im Futtermittel möglich. Zu diesem Zweck werden neben analytischen Methoden zur exakten Quantifizierung schnelle Screening-Verfahren benötigt.

Aufgrund ihres einzigartigen Wirkmechanismus sind Moenomycine und ihre Wechselwirkung mit der PGT von großem Interesse für die Entwicklung neuer Antibiotika. Neben der Entwicklung Substrat-analoger Inhibitoren ist daher die Synthese Moenomycin-analoger Inhibitoren einer der Ansätze zur Identifizierung neuer Leitstrukturen [9]. Für beide Ansätze sind detaillierte Kenntnisse der Interaktion zwischen Enzym und Moenomycinen oder Substraten erforderlich.

2 Moenomycine

Moenomycine (syn.: Bambermycine) sind Phosphoglykolipide mit antimikrobieller Aktivität, die von verschiedenen Streptomyceten produziert werden (*Streptomyces ghanaensis*, *S. bambergiensis*, *S. ederensis*, *S. geysiriensis*) [2, 10, 11]. Das von diesen Bakterien gebildete Gemisch verschiedener Moenomycin-Kongenere wird unter der Bezeichnung Flavophospholipol, sowie unter verschiedenen Markennamen (Flavomycin[®], Gainpro[®], Pharmastim[®], Jivet[®]) als Mastförderer in der kommerziellen Tierhaltung eingesetzt.

Die Herstellung und Gewinnung der Moenomycine wurde 1960 durch die Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft zum Patent angemeldet [12]. In der Literatur wurden Moenomycine erstmals 1965 durch Wallhäusser et al. [13] und Huber et al. [14] beschrieben. Die Rechte am Namen Flavomycin[®] hielt die Farbwerke Hoechst AG bereits seit 1952 ([15]; Registernummer 629601). Derzeit besitzt die Firma Huvepharma die Markenrechte und vertreibt Flavomycin[®] über ihre Tochtergesellschaft Biovet¹ ([15]; internationale Marken 295197 u. 376794).

¹ 1999 fusionierten Hoechst und Rhône-Poulenc unter Abspaltung ihrer Chemiesparten zu Aventis [16]; im selben Jahr wurde das Tiergesundheitssegment Hoechst Roussel Vet an Intervet verkauft [17]. 2005 übernahm Biovet das Geschäftsfeld Futtermittelzusatzstoffe von Intervet [18].

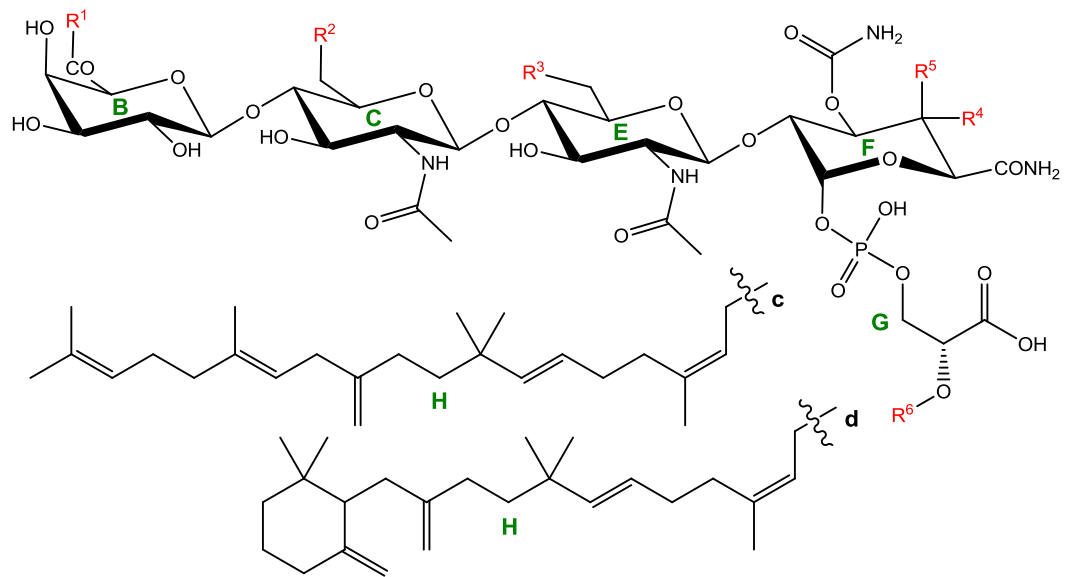
Moenomycine

2.1 Moenomycine und Flavophospholipol

2.1.1 Antibiotika der Moenomycin-Gruppe

Eine Reihe von Phosphoglykolipiden ähnlicher Struktur, von denen ein Teil in Flavophospholipol nachgewiesen wurde (s.u.), wird zur Moenomycin-Gruppe zusammengefasst. Alle bislang exakt charakterisierten Antibiotika dieser Gruppe (s. Abbildung 1) verfügen über eine Oligosaccharidkette aus vier Zuckerresten (B-C-E-F in Abbildung 1), die über eine Phosphoglycerat-Gruppe (G) mit einem langkettigen Alkohol (H) verbunden ist [1, 10, 19]. Alle Zuckerreste (auch Ring D) liegen in der 4C_1 -Konformation vor [20, 21]. Bei dem Alkohol handelt es sich in der Regel um Moenocinol. Lediglich bei den Diumycinen (Macarbomycinen) ist stattdessen Diumycinol mit dem Phosphoglycerat verethert. Die C-Kongeneren unterscheiden sich von den anderen Moenomycinen durch das Fehlen von Ring D (β -D-Glucopyranosyl-Rest). Die A- und C-Kongeneren des Moenomycins sind durch das Vorhandensein der häufig als Chromophor bezeichneten 2-Amino-cyclopentan-1,3-dion-Gruppe (Ring A; in Abbildung 1 in der Enolform 2-Amino-3-hydroxycyclopent-2-enon abgebildet) charakterisiert. Die Nosokomycine verfügen über eine freie Carbonsäurefunktion oder ein Carbonsäureamid an Ring B (β -D-Galacturonsäure bzw. -amid). Weitere Modifikationen der Carbonsäurefunktion von Ring B finden sich bei den Moenomycinen G, I, J, K und L. Bei Ring C und E kann es sich um *N*-Acetylglucosamin oder den entsprechenden Desoxyaminosucker *N*-Acetylchinovosamin handeln. Ring F ist bei den meisten Kongeneren in Position 4 methyliert. In Abhängigkeit davon liegt die 4-OH-Gruppe in äquatorialer (methyliert) oder axialer (nicht methyliert) Stellung vor.

Moenomycine



Kongener:	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
Moenomycin A	a	H	b	OH	CH ₃	c
Moenomycin A ₁₂	a	H	b	H	OH	c
Moenomycin C ₁	a	H	H	H	OH	c
Moenomycin C ₃	a	H	H	OH	CH ₃	c
Moenomycin C ₄	a	H	OH	OH	CH ₃	c
Moenomycin A ₇	a	OH	b	OH	CH ₃	c
6E-OH-Moenomycin C ₁ *	a	H	OH	H	OH	c
Nosokomycin A	OH	H	b	OH	CH ₃	c
Nosokomycin A ₂	OH	OH	b	OH	CH ₃	c
Nosokomycin B	NH ₂	H	b	OH	CH ₃	c
Nosokomycin B ₂	NH ₂	OH	b	OH	CH ₃	c
Nosokomycin C	OH	H	OH	OH	CH ₃	c
Nosokomycin D	NH ₂	H	OH	OH	CH ₃	c
Pholipomycin	a	OH	OH	OH	CH ₃	c
Moenomycin G	e	H	b	OH	CH ₃	c
Moenomycin G ₂	e	OH	b	OH	CH ₃	c
Moenomycin I	f	H	b	OH	CH ₃	c
Moenomycin I ₂	f	OH	b	OH	CH ₃	c
Moenomycin K	g	H	b	OH	CH ₃	c
Moenomycin K ₂	g	OH	b	OH	CH ₃	c
Moenomycin L	h	H	b	OH	CH ₃	c
Moenomycin L ₂	h	OH	b	OH	CH ₃	c
Moenomycin J**	i	H	b	OH	CH ₃	c
Diumycin AC326-α	a	OH	b	OH	CH ₃	d

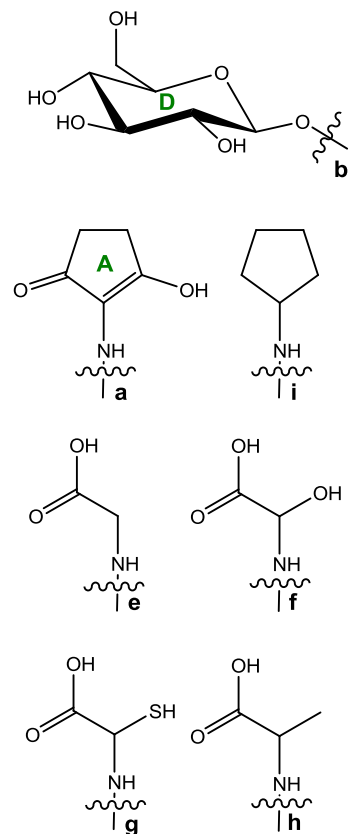


Abbildung 1: Phosphoglykolipid-Antibiotika der Moenomycin-Gruppe (in Anlehnung an Abb. 2 in [1] und Abb. 1 in [19]). *: Struktur wurde nur mittels MS/MS aufgeklärt, weshalb die Konfiguration an C4 von Ring F nicht bestimmt werden konnte (s. Fußnote 2 auf Seite 6); **: Moenomycin J wurde nur *in vitro* synthetisiert.

Moenomycine

Die Aufklärung der Struktur der Moenomycine war das Resultat zahlreicher spektroskopischer und massenspektrometrischer Untersuchungen an diesen Substanzen und ihren chemischen Abbauprodukten. Lange Zeit waren nur die Strukturen der fünf Moenomycin-Kongenerere A, A₁₂ (gelegentlich auch als Moenomycin A_{1/2} bezeichnet), C₁, C₃ und C₄ [13, 14, 20, 22-37], sowie des von *Streptomyces lividoclavatus* produzierten Pholipomycins bekannt [1, 35, 38, 39]. Die Totalsynthese von Moenomycin A gelang erst 2006 [40]. Im selben Jahr entdeckten Zehl et al. [41] in Flavomycin® 6C-Hydroxy-Moenomycin A (Moenomycin A₇ [19]) und 6E-Hydroxy-Moenomycin C₁.² Zehl et al. fanden außerdem zwei weitere, bereits aus Abbauprodukten bekannte Kongenerere, die nicht über Ring A verfügen. Diese wurden von Uchida et al. [42, 43] als Nosokomycin A und B benannt und zusammen mit den bis dahin unbekanntenen Nosokomycinen C und D in Kulturmedien von *Streptomyces* sp. K04-0144 nachgewiesen. Bereits in den späten 1960er Jahren war die Existenz von Moenomycinen mit Glycin als Modifikation an Ring B postuliert worden [7]. Erst 2013 gelang der Nachweis eines solchen Moenomycins (Moenomycin G) als Sekundärmetabolit von *S. ghanaensis* ATCC 14672 [19]. Ostash et al. [19] mutmaßen, dass dieses Kongener aufgrund der Produktionsbedingungen im kommerziellen Produkt nicht enthalten sein könnte und daher unentdeckt blieb. Durch heterologe Expression wurden Moenomycin G₂, sowie Nosokomycin A₂ und B₂ gewonnen [19, 44, 45]. Durch Überexpression des Enzyms MoeH5 (s. Abschnitt 2.3) und Supplementierung mit den entsprechenden Aminosäuren (gleichgültig ob L- oder D-Konfiguration) gelang außerdem die *in vivo*-Synthese der I-, K- und L-Kongenerere des Moenomycins (Derivate anderer proteinogener Aminosäuren wurden nicht synthetisiert) [19]. *In vitro* konnte zudem nach Zusatz von Cyclopentylamin Moenomycin J gebildet werden [19].

² Zehl et al. identifizierten das 6E-Hydroxy-Moenomycin C₁ als 4F-Demethyl-6E-O-de-β-D-glucopyranosyl-moenomycin A. Da sie die Struktur der beiden Moenomycine lediglich aus MS/MS-Experimenten schlossen, hatten Zehl et al. keine Informationen über die Konfiguration der 4-Hydroxy-Gruppe an Ring F des zweiten Kongeners. Ring F wird bei der Biosynthese ausgehend von Galacturonsäure aufgebaut und die Methylgruppe nachträglich unter Inversion an C4 eingeführt (s.u.). Daher ist bei allen bekannten Vertretern der Moenomycin-Gruppe in Position 4 dieses Rings entweder die Hydroxygruppe in axialer und Wasserstoff in äquatorialer Position oder eine Methylgruppe in axialer und die Hydroxygruppe in äquatorialer Position. Somit wird es sich eher um 6E-Hydroxy-Moenomycin C₁ handeln, wie es auch bei Ostash et al. abgebildet ist (Abb. 2 in [1]).

Zur Gruppe der Moenomycin-Antibiotika zählen auch die Diumycine, dessen einziger Vertreter bekannter Struktur das aus *Actinomyces sp.* AC326 isolierte AC326- α ist [46]. Einige weitere Phosphoglykolipidantibiotika, deren Strukturen nicht vollständig aufgeklärt sind, werden ebenfalls zu dieser Gruppe gerechnet [1, 7, 10]. Hierzu zählen z.B. die von *S. prasinsus* produzierten Prasinomycine, Prenomycin und Ensanchomycin (für weitere Details s. [7] und Quellen in [1]). In älteren Literaturstellen werden zum Teil auch weitere Moenomycin-Fractionen erwähnt (bezeichnet als Moenomycin B₁ und B₂), deren chromatographische Trennung die Moenomycine D bis H liefert (nicht zu verwechseln mit den von Ostash et al. [19] benannten Moenomycinen!) [7, 14, 47-49]. Die Strukturen dieser Substanzen wurden nicht aufgeklärt und sie sind in kommerziellem Flavomycin[®] nicht nachgewiesen worden [35]. Als Ursache hierfür wird bei Scherkenbeck et al. [35] auf Unterschiede in den Produktspektren der ursprünglich untersuchten und der industriell genutzten Stämme verwiesen.

2.1.2 Flavophospholipol

Für die Herstellung von Flavophospholipol werden die Streptomyceten (*Streptomyces bambergiensis nov. spec.* 3263 (ATCC 13879), *S. ghanaensis nov. spec.* 4092 (ATCC 14672), *S. geysiriensis nov. spec.* 3888 (ATCC 15303) oder *S. ederensis nov. spec.* 2861 (ATCC 15304)) in einem Komplexmedium unter aeroben Bedingungen angezüchtet [11-13, 50, 51]. Die Ausbeute wird durch Verwendung von pflanzlichen oder tierischen Fetten als Kohlenstoffquelle [52], sowie durch Zusatz bestimmter nichtionischer Tenside (Fettalkoholethoxylate) erhöht [50, 51]. Das Mycel wird durch Filtration oder Zentrifugation isoliert und mit Methanol (oder anderen geeigneten Lösungsmitteln) extrahiert [12, 13]. Alternativ kann auch das homogenisierte Kulturmedium extrahiert werden [50, 51].

Eine erste Anreicherung erfolgt durch Abdestillieren des Methanols und Isolierung der Moenomycine aus der verbliebenen wässrigen Phase durch Säurefällung (Salzsäure, pH 2 bis 2,5) oder Extraktion mit 1-Butanol (bei pH 3) und anschließende Fällung (Diethylether, Ethylacetat) oder Ausfrieren [11-13]. Alternativ kann der methanolische Extrakt zur Trockne eingedampft werden, der Rückstand mit Methanol unter

Moenomycine

Rückfluss extrahiert werden und die Moenomycine hieraus mit Diethylether gefällt werden.

Zur weiteren Aufreinigung können die Moenomycine an Kieselgur oder Bleicherde adsorbiert und nach der Elution durch Zusatz von Diethylether gefällt werden [12]. Alternativ zur Aufreinigung an Kieselgur oder Bleicherde kann das Rohprodukt gegen Wasser dialysiert werden. Die in der nicht dialysierbaren Fraktion enthaltenen Moenomycine werden mit 1-Butanol extrahiert (bei pH 3) und ausgefroren oder gefällt (Diethylether oder Ethylacetat). Weitere Aufreinigung mittels Chromatographie an Magnesiumsilikat (Florisol®), gefolgt von Gelfiltration und Anionenaustauschchromatographie liefert farbloses Flavophospholipol hoher Reinheit [11, 13].

Im Labormaßstab lässt sich das Kongenerengemisch aus dem Kulturmedium gewinnen, indem die Zellen abzentrifugiert und der Überstand nach Abdampfen zur Trockne in Methanol/Wasser 80:20 (v/v) aufgenommen und filtriert wird. Die Zellen werden in Methanol aufgenommen, mittels Ultraschall lysiert und filtriert. Der Abdampfrückstand der vereinigten Filtrate wird in Wasser aufgenommen und mit Butanol extrahiert. Die wässrige Phase wird mittels Ultrafiltration aufgereinigt. Die im Überstand befindlichen Moenomycine werden per MPLC (medium pressure liquid chromatography) an einer C18-Phase mit einem Gemisch aus Phosphatpuffer pH 8 mit Natriumheptansulfonat und Acetonitril als Eluent isoliert. Anschließend wird durch Ultrafiltration entsalzt [53].

Für einen der zur Flavomycin®-Produktion eingesetzten Streptomyceten (*S. ghanaensis* ATCC 14672) wurde gezeigt, dass bei geeigneten Wachstumsbedingungen ausschließlich die Kongenere Moenomycin A und A₁₂ gebildet werden [53]. Im Allgemeinen bilden die verwendeten Streptomyceten allerdings die fünf Moenomycin-Kongenere A, A₁₂, C₁, C₃ und C₄ [54, 55], die demzufolge im kommerziell erhältlichen Produkt nachweisbar sind (Flavomycin®, Gainpro®) [56, 57]. Gallo et al. [57] schätzten die Zusammensetzung der in Flavomycin® enthaltenen Moenomycine ab (Fullscan-ESI-MS) und berichten 78,7% Moenomycin A, 2,6% Moenomycin C₁, 12,6% Moenomycin C₃, sowie 6,1% Moenomycin C₄. Donnerstag et al. [37] geben einen Anteil von ca. 5% Moenomycin A₁₂ in Flavomycin® an. Im Rahmen der Zulassung von

Flavophospholipol als Mastförderer in der EU waren die Mengenverhältnisse der einzelnen Kongenere reguliert (Moenomycin A: 40-80%; Moenomycin A₁₂: 0-20%; Moenomycin C₁: 0-20%; Moenomycin C₃: 5-25%; Moenomycin C₄: 0-15%) [58].

Die im vorangegangenen Absatz genannten Publikationen berücksichtigen nicht die von Zehl et al. [41] in Flavomycin® gefundenen Kongenere Moenomycin A₇, 6E-Hydroxy-Moenomycin C₁, sowie Nosokomycin A und B.

2.2 Physikalische und chemische Eigenschaften

Moenomycine sind farblose, amorphe Feststoffe, die sich ab 200 °C zersetzen [59]. Für die Mischung der A- bzw. C-Kongenere sind definierte Schmelzpunkte publiziert (184-185 °C (A); 178-179 °C (C)) [47, 60]. Moenomycine sind leicht löslich in Wasser, Tetrahydrofuran und einigen polaren Lösungsmitteln (Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid, Methanol), hingegen mäßig löslich in Ethanol und Propanol [59, 61]. Sie sind schlecht löslich in Methylethylketon, Ethylacetat und Ether und praktisch unlöslich in Acetonitril und stark unpolaren Lösungsmitteln (Dichlormethan, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Toluol, Benzol, Petrolether, Isooctan).

Moenomycine bilden schwache Komplexe mit Zink, Eisen und Kupfer, nicht hingegen mit Alkali- und Erdalkalimetallen [14]. Auch mit einigen Chelatbildnern (z.B. EDTA) bilden Moenomycine Komplexe [13]. Die Alkali- und Erdalkalisalze sind leicht löslich, Salze mit vielen anderen Metallen (Zink, Aluminium, Eisen und einige andere Schwermetalle) hingegen sind unlöslich [14].

Die A- und C-Kongenere der Moenomycine weisen aufgrund der 2-Aminocyclopentan-1,3-dion-Gruppe (Ring A) UV-Absorption auf. Das Absorptionsmaximum liegt bei den pH-Werten 7,0 (Phosphatpuffer) und 12 bei 258 nm und im Sauren (0,1 M Salzsäure) bei 245-247 nm [14, 47].

Die meisten Moenomycine verfügen über drei Säurefunktionen: eine β -Diketogruppe (Ring A), sowie einen Phosphodiester und eine Carbonsäure (beide in Gruppe G). Lantzsch et al. [62] bestimmten die pK_S-Werte von Moenomycin A über die pH-Abhängigkeit der Infrarotspektren. Es gelang ihnen, die pK_S-Werte für die Enolgruppe (Ring A) und die Carboxylgruppe zu bestimmen bzw. (im Falle der Carbonsäure)

Moenomycine

abzuschätzen. Diese betragen 3,8 (Ring A) und ca. 5,3 (Carbonsäure). Im gesamten untersuchten pH-Bereich (2,6 bis 9,6) lag der Phosphodiester deprotoniert vor.

Moenomycine weisen eine Tensid-artige Struktur mit einer sehr großen polaren Kopfgruppe (Gruppen A-G) und einem unpolaren Lipidrest auf. Aufgrund dieser Struktur neigen sie zur Einlagerung in Phospholipidmembranen und Mizellen, ebenso wie zur Mizellbildung [62-64]. Die Größe der sphärischen Moenomycin-Mizellen nimmt mit sinkendem pH zu. Auch die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC: critical micelle concentration) wird durch die Ladung der Moleküle und deren Abschirmung beeinflusst (Werte zwischen 0,03 und 0,7 mM). Mit sinkendem pH und steigender Ionenstärke nimmt die CMC ab [62].

Als Feststoff (Natriumsalz) und in wässriger Lösung sind Moenomycine sehr beständig (kein Aktivitätsverlust bei Erhitzen einer wässrigen Lösung auf 120 °C für 45 min). Lösungen weisen bei pH-Werten zwischen 7 und 9 die höchste Stabilität auf (jeweils 100% Aktivität nach 12 Monaten Lagerung bei 4 °C). Im Säuren oder stark Basischen kommt es zur Zersetzung [13]. Im Säuren wird zuerst der Moenocinolrest abgespalten [48]. Dies geschieht bereits im schwach Säuren, was darauf zurückzuführen ist, dass der Allylether des Moenocinolrests zu einem labilen Enolether isomerisiert und dieser anschließend hydrolysiert wird (s. Abschnitt 6.2.2) [31, 65, 66].

Einen Überblick über einige selektive Reaktionen von Moenomycinen bieten Welzel [67] und Vogel et al. [66].

2.3 Biosynthese

Nach bisherigem Kenntnisstand erfolgt die Synthese von Moenomycin A wie in Abbildung 2, Abbildung 3 und Abbildung 4 dargestellt [1, 19, 68]. Die beteiligten Enzyme sind in zwei Genclustern codiert (*moe* Cluster 1 und Cluster 2), wobei *moe* Cluster 2 die für die Synthese von Ring A benötigten Enzyme codiert und Cluster 1 alle übrigen.

Moenomycine

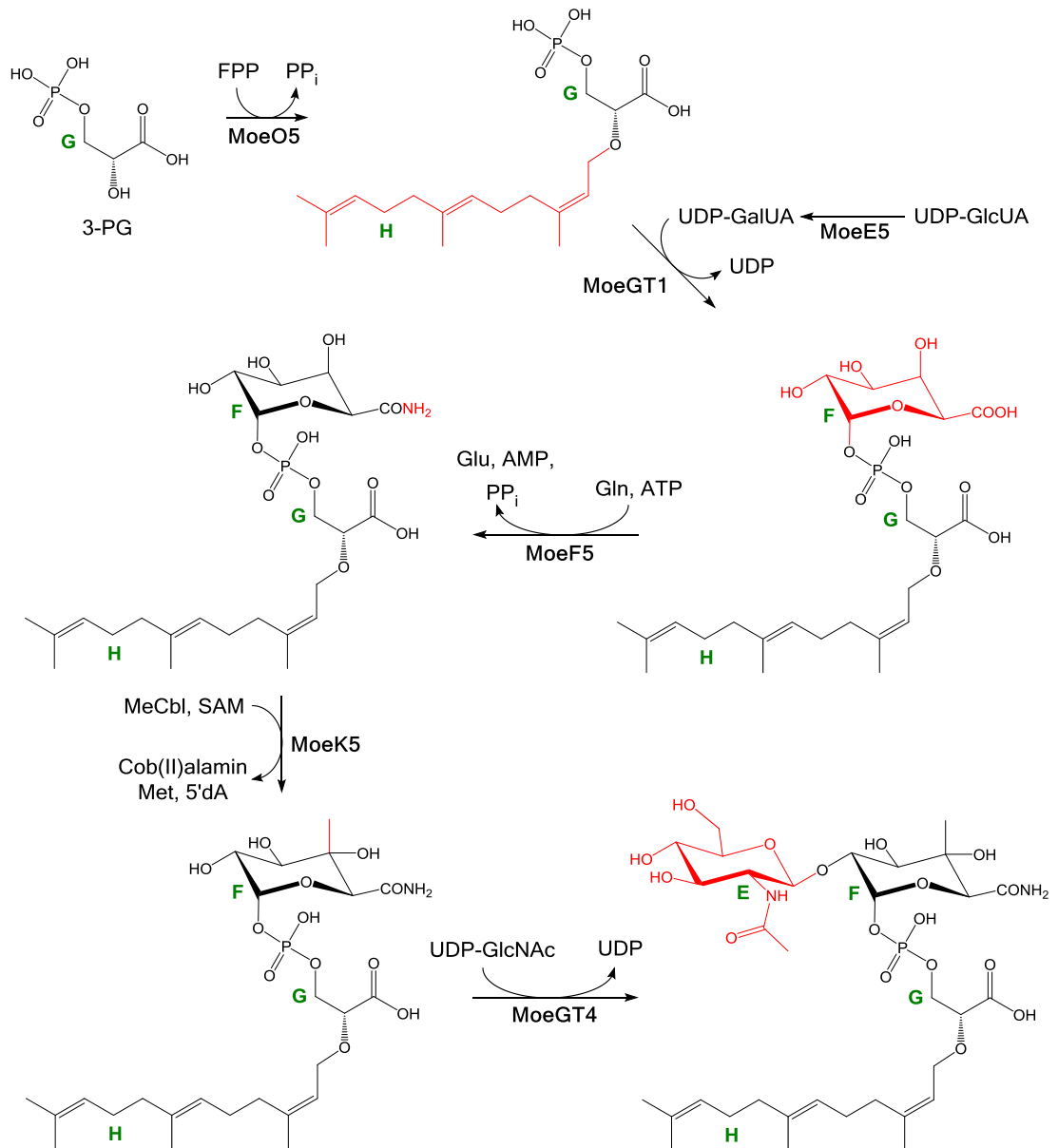


Abbildung 2: Erste Schritte der Biosynthese von Moenomycin A (in Anlehnung an Abb. 4 in [68]). Beteiligte Enzyme sind jeweils unter oder neben dem Reaktionspfeil genannt. PP_i: Pyrophosphat; UDP: Uridindiphosphat; Gln: Glutamin; Glu: Glutaminsäure; ATP: Adenosintriphosphat; AMP: Adenosinmonophosphat; SAM: S-Adenosylmethionin; Cob(II)alamin: Cobalamin (Cobalt in Oxidationsstufe +II); Met: Methionin; 5'dA: 5'-Desoxyadenosin (weitere Abkürzungen im Text erläutert).

Moenomycine

Der erste Syntheseschritt ist die Reaktion von 3-Phosphoglycerat (3-PG) mit (2*E*,6*E*)-Farnesylpyrophosphat (FPP) unter Isomerisierung zu (2*Z*,6*E*)-Farnesyl-3-phosphoglycerat (Farnesyl-3-PG) [69]. UDP-Galacturonsäure (UDP-GalUA), durch Epimerisierung gebildet aus UDP-Glucuronsäure (UDP-GlcUA), wird α -glykosidisch mit der Phosphatgruppe von Farnesyl-3-PG verestert. Anschließend wird die Carbonsäurefunktion amidiert. Methylierung in Position 4 des Galacturonamid-Rests erfolgt durch das Enzym MoeK5, bei dem es sich wahrscheinlich um eine Radikal-SAM-Methyltransferase handelt, die Methylcobalamin (MeCbl) als Methyl donor nutzt. Die Methylierung geht mit Inversion an C4 einher. Dieses Monosaccharidderivat wird durch Anknüpfung eines *N*-Acetylglucosamin-Rests (GlcNAc) in ein Disaccharidderivat überführt. Ausgehend von letzterem spaltet sich die Biosynthese in zwei mögliche Pfade auf (s. Abbildung 3).

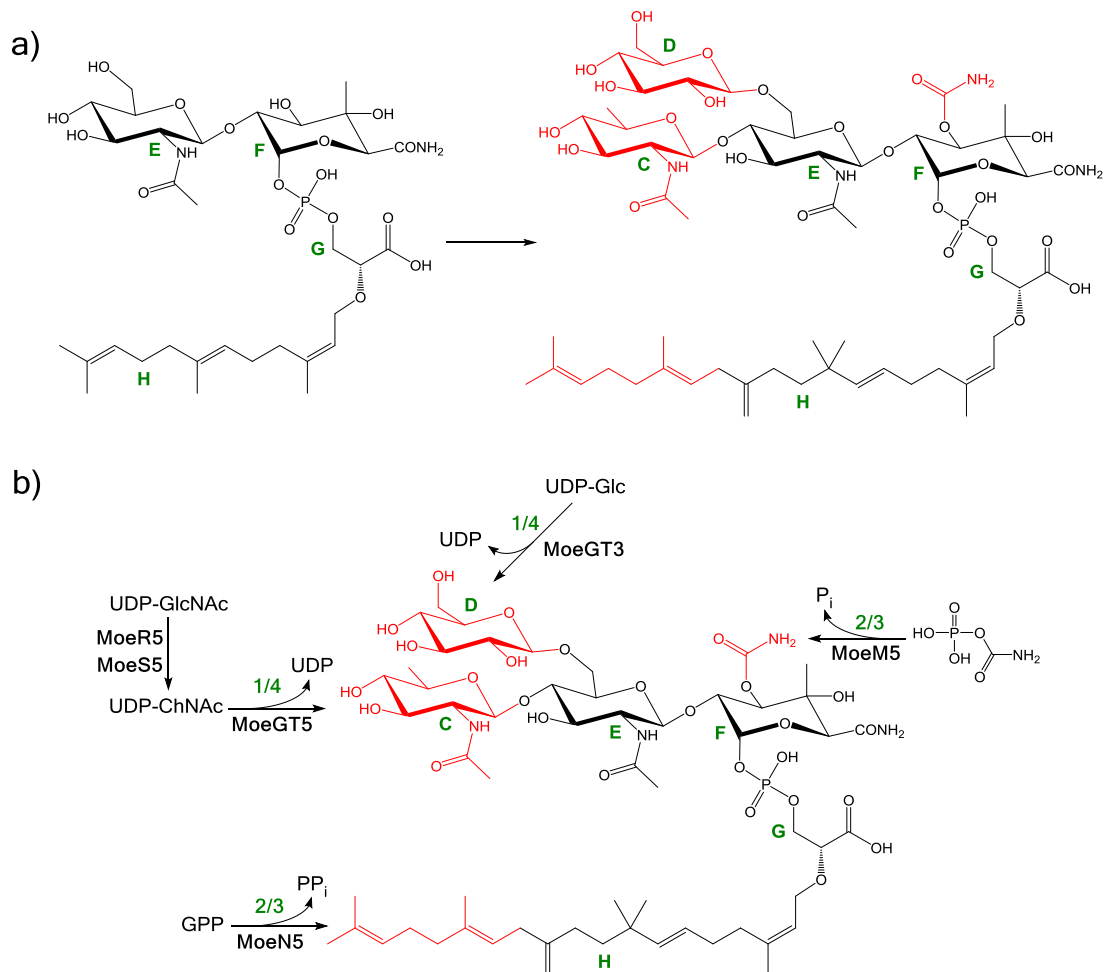


Abbildung 3 - Biosynthese von Moenomycin A (fortgesetzt): a) Bruttoreaktion der in b) dargestellten Teilschritte. Beteiligte Enzyme sind jeweils unter oder neben dem Reaktionspfeil genannt. Die grünen Ziffern auf den Reaktionspfeilen geben an, in welcher Reihenfolge die Reaktionen stattfinden können. P_i: Phosphat; ChNAc: *N*-Acetylchinovosamin (weitere Abkürzungen im Text erläutert).

In einem der Pfade wird zunächst Ring C, im zweiten Pfad Ring D angehängt. Anschließend wird die Lipidkette durch Reaktion mit Geranylpyrophosphat (GPP) verlängert und die 3-Hydroxyfunktion in Ring F carbamoyliert. Beide Reaktionen können unabhängig voneinander erfolgen und sind nicht erforderlich für die nachfolgende Anknüpfung weiterer Zuckerreste [68]. Danach erfolgt jeweils die Anknüpfung von Ring C bzw. D, womit die beiden Pfade wieder zusammentreffen. MoeGT2 überträgt einen Galacturonsäurerest (Ring B) auf das resultierende substituierte Tetrasaccharid (s. Abbildung 4).

Moenomycine

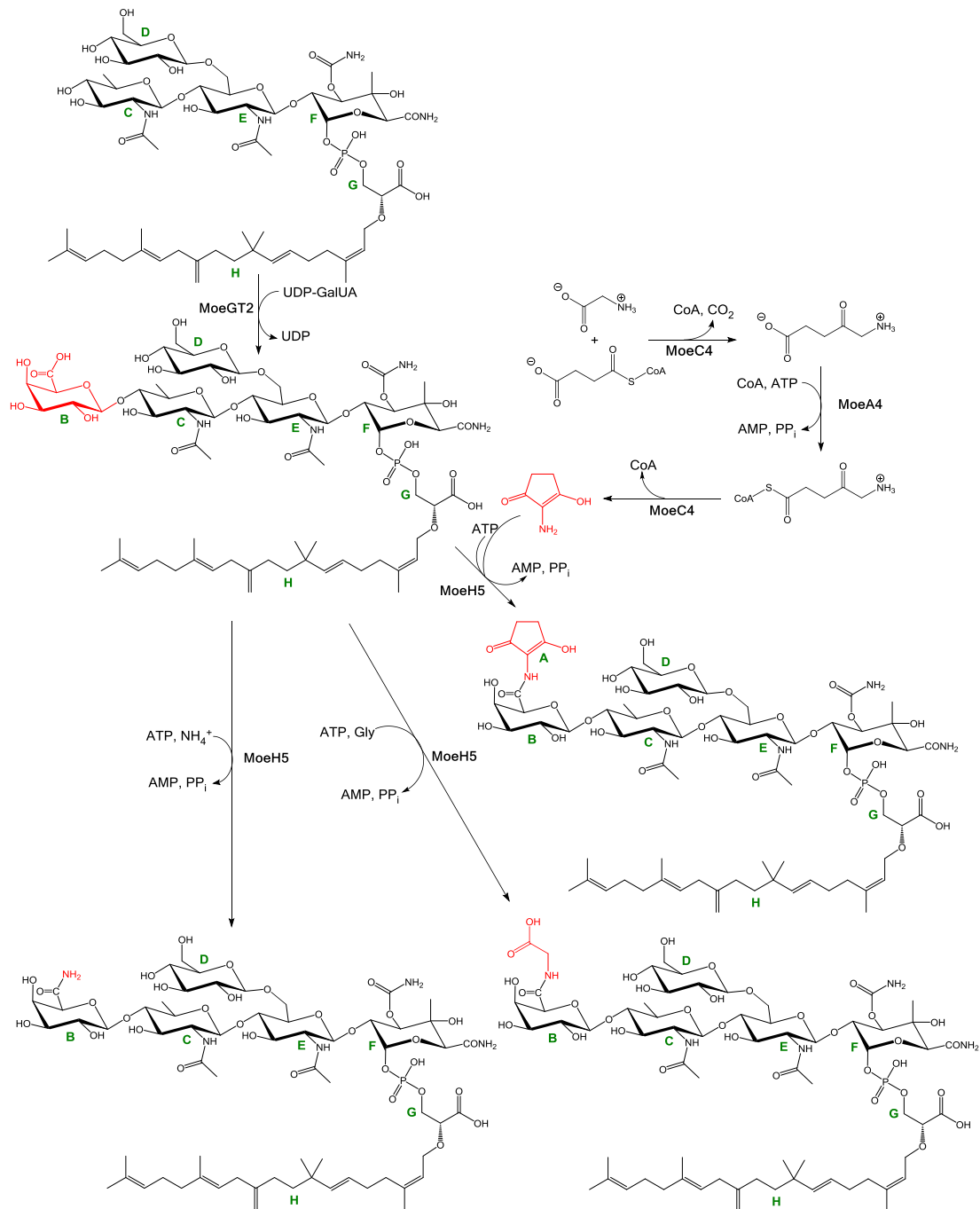


Abbildung 4: Biosynthese von Moenomycin A (fortgesetzt – in Anlehnung an Abb. 8 in [1] und Abb. 7 in [19]). Beteiligte Enzyme sind jeweils unter oder neben dem Reaktionspfeil genannt. Abkürzungen im Text erläutert).

Die Synthese von Ring A verläuft in Analogie zu einigen anderen Naturstoffen ausgehend von 5-Aminolävulinyl-CoA (CoA: Coenzym A) [70]. Die hieran beteiligten Enzyme MoeA4 und MoeC4 sind in *moe* Cluster 2 codiert [19, 71]. Die bifunktionelle 5-Aminolävulinat-Synthase/-Cyclase MoeC4 und die Acyl-CoA-Ligase MoeA4 katalysieren die Synthese des 5-Aminolävulinats und dessen Zyklisierung zu 2-Amino-3-hydroxycyclopent-2-enon. Letzteres wird anschließend durch MoeH5 auf den Galacturonsäurerest übertragen, wobei auch weitere, bislang nicht identifizierte Enzyme beteiligt sein könnten [19]. Nosokomycin B und Moenomycin G sind alternative Nebenprodukte, die durch Umsetzung der Säurefunktion mit Ammonium oder Glycin entstehen.

Die Vielfalt der gefundenen Moenomycine lässt sich zumindest zum Teil durch die Substratpromiskuität der beteiligten Enzyme erklären [19, 68]: Die Methylierung von Ring F durch MoeK5 ist für die weiteren Syntheseschritte nicht erforderlich, was das Auftreten der Kongenere mit D-Galacto-Konfiguration dieses Rings erklärt (Moenomycine A₁₂, C₁ und 6C-Hydroxy-Moenomycin C₁). Außerdem können MoeGT4 und MoeGT5 sowohl UDP-GlcNAc, als auch UDP-N-Acetylchinosamin (UDP-ChNAc) als Substrat verwenden, was die Variabilität der Reste R² und R³ in Abbildung 1 erklärt. Die Nosokomycine stellen wiederum die späten Zwischenprodukte der Moenomycin-Synthese dar, wobei die Substratpromiskuität von MoeH5 das Auftreten von Nosokomycinen mit Ring B-Carbonsäureamid neben A-, C- und G-Kongeneren des Moenomycins erklärt.

Der Efflux der produzierten Moenomycine aus der Zelle ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurden beteiligte ATP-abhängige Transporter im *moe*-Gencluster identifiziert, Gen-Knockout-Experimente geben aber Grund zur Annahme, dass weitere Transportmechanismen eine Rolle spielen [72].

Moenomycine

2.4 Wirkung

2.4.1 Peptidoglykansynthese

Die bakterielle Zellwand verhindert, dass die Zellen aufgrund des osmotischen Drucks (Turgor) platzen und ist daher für das Überleben der Bakterien essentiell. Bei den meisten Bakterien wird diese Funktion durch eine 80 nm (Grampositive) bis <10 nm (Gramnegative) dicke Schicht aus vernetzten Peptidoglykan-Ketten (Mureinschicht) erfüllt [73]. Daher ist die Synthese dieses Polymers ein geeigneter Angriffsort für Antibiotika [74].

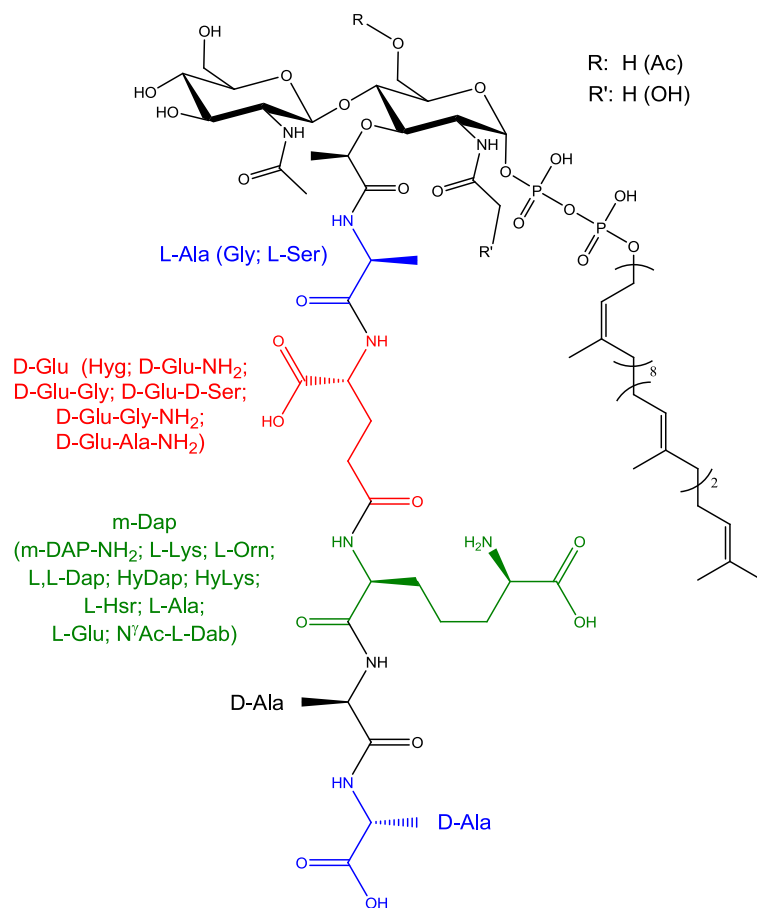


Abbildung 5: Struktur des Peptidoglykan-Bausteins Lipid II. Dargestellt ist das häufigste Substitutionsmuster, mögliche Abweichungen sind in Klammern angegeben. Ala: Alanin; Gly: Glycin; Ser: Serin; Glu: Glutaminsäure; Hyg: *threo*-3-Hydroxyglutaminsäure; D-Glu-NH₂: Amid von D-Glutaminsäure (weitere Amide analog); D-Glu-Gly: Dipeptid aus D-Glu und Glycin (weitere Dipeptide analog); m-Dap: *meso*-2,6-Diaminopimelinsäure; Orn: Ornithin; L,L-Dap: L,L-2,6-Diaminopimelinsäure; HyDap: *meso*-2,6-Diamino-3-hydroxypimelinsäure; HyLys: 5-Hydroxylysin; Hsr: Homoserin; N^γAc-L-Dab: γ -N-acetylierte L-Diaminobuttersäure.

Abbildung 5 zeigt die Struktur von Lipid II, dem Monomer des Peptidoglykans. Die Zusammensetzung des Pentapeptids variiert je nach Bakterium [73-77]. Dargestellt sind die am häufigsten vorkommenden Aminosäurereste. Die Struktur des Disaccharids ist im Vergleich dazu hoch konserviert [73, 74, 78]. Mögliche Abweichungen sind jeweils in Klammern angegeben.

Die Synthese von Lipid II ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt [73, 79].³

³ Beteiligte Enzyme (Benennung aus [80]): GlnS: Glutamin-Fruktose-6-phosphat-Transaminase; GlnM: Phosphoglucosamin-Mutase; GlnU: Glucosamin-1-phosphat-*N*-Acetyl-Transferase; MurA: UDP-*N*-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferase; MurB: UDP-*N*-Acetylmuramat-Dehydrogenase; MurC: UDP-*N*-Acetylmuramat-L-Alanin-Ligase; MurD: UDP-*N*-Acetylmuramoyl-L-Alanin-D-Glutamat-Ligase; MurE: UDP-*N*-Acetylmuramoyl-L-Alanyl-D-Glutamat-2,6-Diaminopimelat-Ligase; MurF: UDP-*N*-Acetylmuramoyltripeptid-D-Alanyl-D-Alanin-Ligase; MurY: Phospho-*N*-Acetylmuramoylpentapeptid-Transferase; MurG: Undecaprenyldiphosphomuramoylpentapeptid β -*N*-Acetylglucosaminyl-Transferase)

Moenomycine

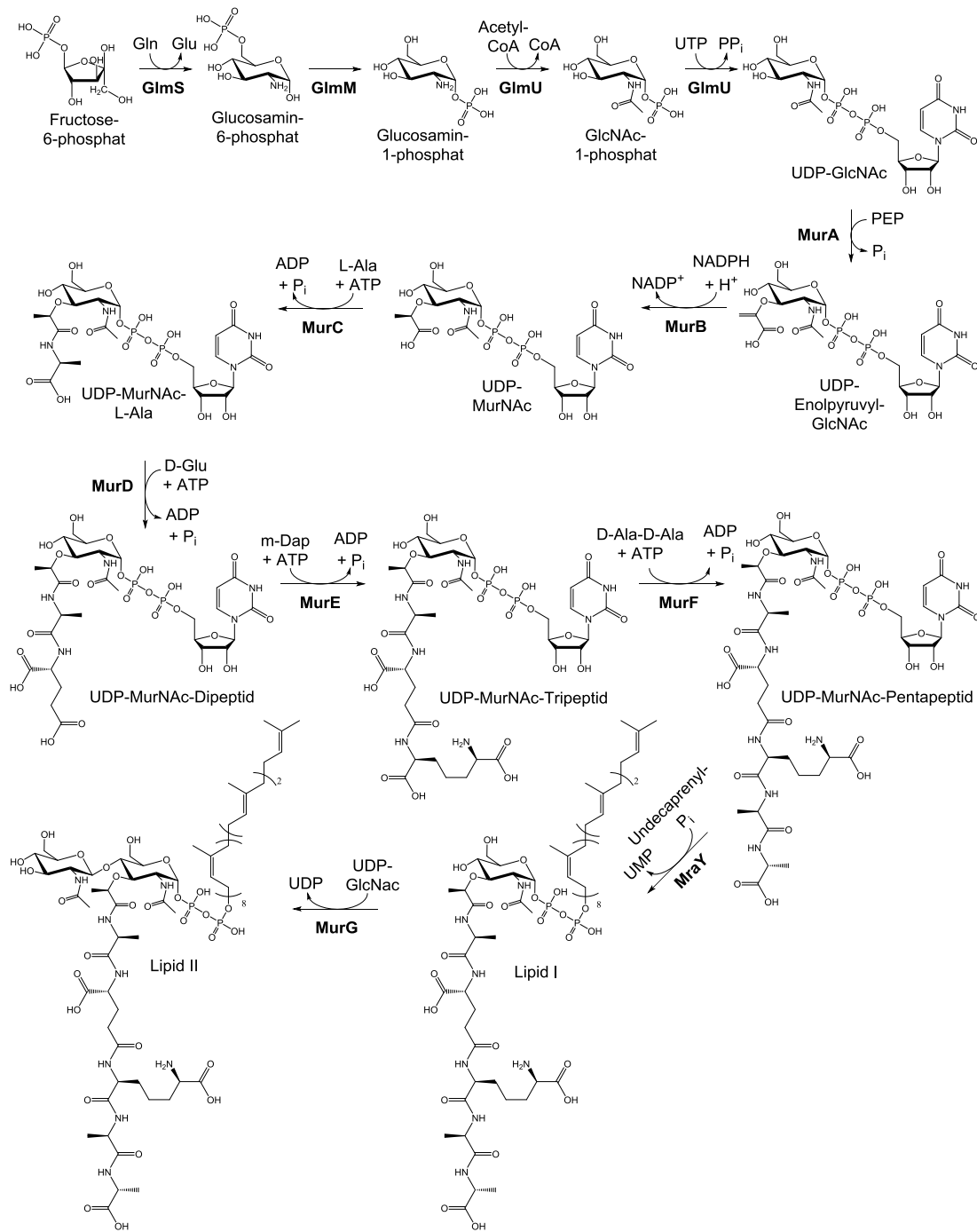


Abbildung 6: Biosynthese von Lipid II (in Anlehnung an Abb. 1 in [79] und Abb. 3 in [73]). Beteiligte Enzyme in fetter Schrift; ADP: Adenosindiphosphat; ATP: Adenosintriophosphat; CoA: Coenzym A; Gln: Glutamin; UDP: Uridindiphosphat; UMP: Uridinmonophosphat; UTP: Uridintriophosphat; PEP: Phosphoenolpyruvat; Pi: Phosphat; PPi: Pyrophosphat; weitere Abkürzungen im Text erklärt.

Ausgehend von Fructose-6-phosphat wird zunächst Uridindiphosphat-*N*-Acetylmuraminsäure (UDP-MurNAc) synthetisiert und diese schrittweise zum Pentapeptid umgesetzt. Durch Verknüpfung mit dem in der Zellmembran eingebetteten Undecaprenyl-Rest wird das erste membrangebundene Lipid-Intermediat, das Monosaccharidderivat Lipid I, gebildet. Durch Reaktion mit UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) entsteht Lipid II. Dieses wird durch die Flippase MurJ auf die extracytosolische Seite der Zellmembran transportiert (s. Abbildung 7) [81].

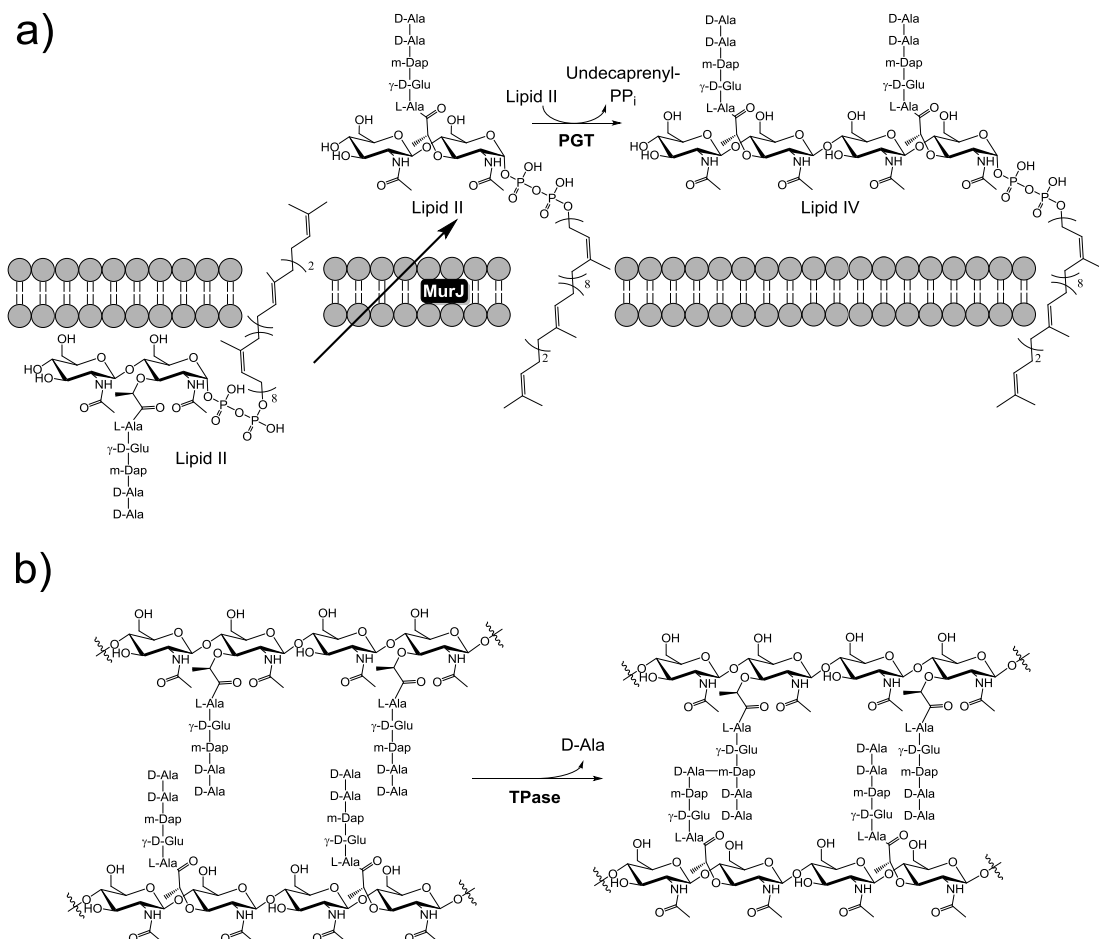


Abbildung 7 - Peptidoglykansynthese: a) Transport von Lipid II auf die extracytosolische Seite der Zellmembran und Transglykosylierungsreaktion (PGT: Peptidoglykan-Glykosyltransferase); b) Transpeptidierungsreaktion (TPase: Transpeptidase). In Anlehnung an Abb. 6 aus [73].

Moenomycine

Dort wird Lipid II durch Peptidoglykan-Glykosyltransferasen (PGT oder GT51: Glykosyltransferasen der Familie 51) zu einer Polysaccharidkette polymerisiert (in Abbildung 7 a ist nur das erste Polymerisationsprodukt Lipid IV dargestellt, an das sukzessive weitere Monomere angeknüpft werden). Aus dem abgespaltenen Undecaprenylpyrophosphat wird durch Einwirkung des Enzyms Undecaprenyldiphosphat-Phosphatase (UppP) das für die Lipid I-Synthese benötigte Undecaprenylphosphat regeneriert [82].

Die PGT lassen sich in zwei Gruppen unterteilen [73]. Zum einen gibt es bifunktionelle Penicillin-Bindeproteine (PBP), die sowohl über eine Glykosyltransferase-Domäne, als auch über eine Transpeptidase-Domäne verfügen und zum anderen monofunktionelle Glykosyltransferasen (MGT), die nicht über die Transpeptidase-Domäne verfügen. Lediglich die sogenannte Klasse A-PBP verfügen über eine aktive Glykosyltransferase-Domäne, bei Klasse B-PBP ist diese verkümmert und inaktiv.

Die Verknüpfung der Peptidseitenketten der wachsenden Peptidoglykanpolymere (Transpeptidierung; Abbildung 7 b) wird durch die Transpeptidase-Domäne der PBP katalysiert. In der Regel wird zwischen dem D-Ala in Position 4 der ersten Peptidseitenkette und der freien Aminofunktion der Aminosäure in Position 3 der zweiten Peptidseitenkette eine Amidbindung geknüpft. Dabei wird das terminale D-Ala der ersten Peptidkette abgespalten. Bei grampositiven Bakterien erfolgt die Verknüpfung oft nicht direkt, sondern über eine Oligopeptidkette [75]. So verbindet beispielsweise bei *Staphylococcus aureus* eine bereits im Cytosol an das Lipid II angehängte Pentaglycinkette das D-Ala in Position 4 mit dem Lysin in Position 3 der zweiten Kette [83]. Weitere Variationen sind bei Schleifer und Kandler [75] beschrieben. Das Ausmaß der Vernetzung wird durch kontrollierte Abspaltung des terminalen D-Ala-Rests von Pentapeptidseitenketten durch D,D-Carboxypeptidasen reguliert [84]. Auch liegt ein Teil der Pentapeptidketten im Murein unverändert vor [75].

Der Ablauf der Transglykosylierung ist in Abbildung 8 dargestellt. Ein Molekül Lipid II wird in der Akzeptorbindungsstelle der Glykosyltransferase gebunden und reagiert mit dem membrangebundenen Ende der wachsenden Peptidoglykankette in der Donorbindungsstelle [86]. Die 4-Hydroxyfunktion der GlcNAc-Gruppe von Lipid II greift nukleophil am anomeren Kohlenstoff der wachsenden Peptidoglykankette an, während ein Glutamatrest im aktiven Zentrum die Deprotonierung der OH-Gruppe erleichtert [85, 87-89]. Die Abspaltung der Abgangsgruppe (Undecaprenylpyrophosphat) soll durch Wechselwirkungen mit einem Lysin- und einem Argininrest begünstigt werden [85]. Es wird angenommen, dass anstelle der Dissoziation des Komplexes aus wachsender Peptidoglykankette und PGT das neue membrangebundene Ende der verlängerten Peptidoglykankette in die Donorbindungsstelle verschoben wird [88].

Peptidoglykan-GT unterscheiden sich hinsichtlich benötigter Cofaktoren und unterschiedlicher optimaler Reaktionsbedingungen, so ist ein Teil der PGT nur in Gegenwart zweiwertiger Metallkationen enzymatisch aktiv [87, 90, 91].

Während der Zellteilung und des Wachstums der Zelle wird der koordinierte Umbau des Peptidoglykans durch ein komplexes Zusammenspiel der Peptidoglykan-Glykosyltransferasen und -Transpeptidasen mit Muraminidasen (Murein-abbauende Peptidasen und Glykosidasen) ermöglicht [73, 92, 93].

Das klassische planare Modell der dreidimensionalen Struktur des Peptidoglykans geht von parallel zur Zellmembran angeordneten Peptidoglykanschichten aus, während das jüngere Gerüstmodell von vernetzten Peptidoglykanhelices ausgeht. Beide Modelle konnten bislang weder allgemein bestätigt, noch widerlegt werden. Allerdings ist mittlerweile bekannt, dass zwischen den verschiedenen Bakterienspezies sowie auch zwischen verschiedenen Bereichen der Zellwand Unterschiede in der Architektur des Peptidoglykans bestehen. Einen Überblick über die aktuellen Erkenntnisse zur dreidimensionalen Struktur des Peptidoglykans bieten Turner et al. [74]. Einen Überblick über weitere Bestandteile der bakteriellen Zellwand bieten Ginsberg et al. [73].

Moenomycine

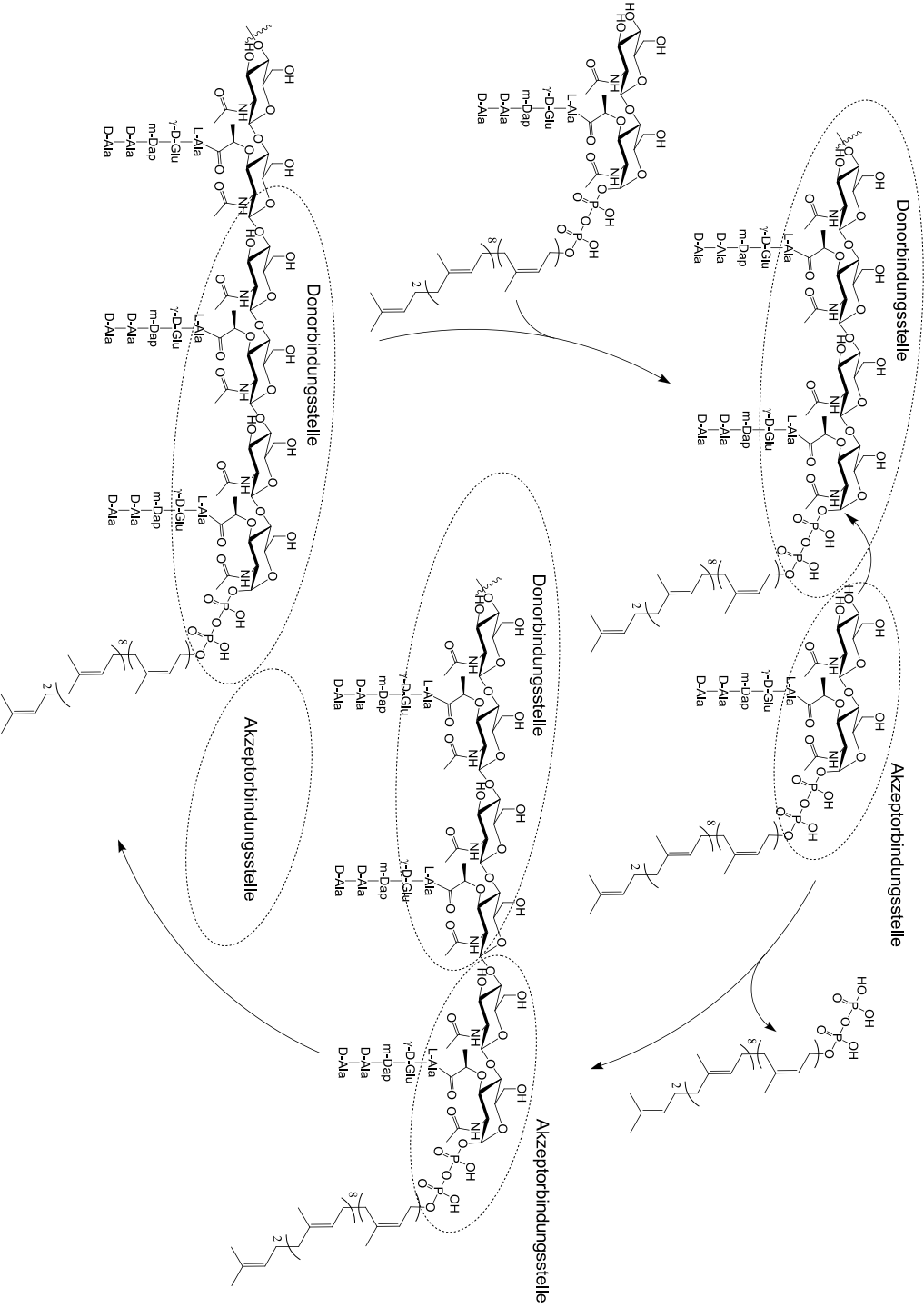


Abbildung 8: Mechanismus der Transglykosylierung (in Anlehnung an Abb. 4 aus [85])

2.4.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Die Peptidoglykansynthese wird durch eine Reihe von Antibiotika gehemmt⁴. Viele dieser Antibiotika sind Substrat-Binder. Bacitracin hemmt indirekt die Peptidoglykansynthese, indem es an Undecaprenylpyrophosphat auf der Außenseite der Zellmembran bindet und so die Regeneration des Undecaprenylphosphats verhindert [73]. Die Glykopeptide Vancomycin und Teicoplanin binden an den terminalen D-Ala-D-Ala-Rest der Peptidseitenkette von Peptidoglykanvorläufern, und hemmen dadurch die Transglykosylierung und die Transpeptidierung [10, 73]. Die Lantibiotika Nisin und Mersacidin binden an die Diphosphozucker-Gruppierung von Lipid II und hemmen so die Transglykosylierung [94]. Zusätzlich bildet Nisin im Komplex mit Lipid II Poren in der Zellmembran der Bakterien. Auch Mannopectimycine und die Lipoglykodepsipeptide Ramoplanin und Enduracidin binden an Lipid II [73, 95, 96]. Die β -Lactamantibiotika hingegen hemmen die Transpeptidierung, indem sie kovalent an das aktive Zentrum der Transpeptidasedomäne der PBP binden [73]. Die Antibiotika der Moenomycinfamilie sind die einzigen bekannten Naturstoffe, die die Transglykosylierung durch Bindung an die Peptidoglykan-Glykosyltransferase (PGT) hemmen [1, 91]. Bemerkenswerterweise scheinen allerdings auch einige synthetische Vancomycin-Derivate direkte Inhibitoren der PGT zu sein [97, 98].

Studien zur Wirksamkeit (PGT-Hemmung bzw. antibakterielle Wirkung) von Moenomycin-Derivaten und -Abbauprodukten führten zur Identifizierung des minimalen Pharmakophors von Moenomycin A [31, 34-36, 65, 99-117]. Durch spätere röntgenkristallographische Untersuchungen wurde dieses Modell erweitert [118]. Das substituierte Disaccharid E-F-G-H (s. Abbildung 1) ist die minimale Einheit von Moenomycin A, die die Transglykosylierung *in vitro* hemmt [112]. Als wirksam *in vivo* und *in vitro* erwiesen sich die substituierten Trisaccharide C-E-F-G-H und D-E-F-G-H [67, 68, 118]. Bei den Kristallstrukturen von PGT-Moenomycin A-Komplexen ragt Ring D in die Lösung [88], was erklärt, weshalb dieser Ring einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Wirksamkeit hat und C-E-F-G-H als minimales

⁴ Auf die Hemmung der intrazellulären Syntheseschritte wird an dieser Stelle nicht eingegangen. Hierzu wird auf Ginsberg et al. [73] verwiesen.

Moenomycine

Pharmakophor identifiziert wurde. Bei dem ebenfalls aktiven Trisaccharidderivat D-E-F-G-H könnte der D-Ring durch Einnahme einer geeigneten Konformation den C-Ring ersetzen [1]. Anwesenheit der Methylgruppe an C4 von Ring F und die Konfiguration an diesem Kohlenstoff, ebenso wie Vorhandensein oder Fehlen der 6-Hydroxyfunktion an Ring C und Ring E sind für die Hemmung der PGT von geringer Bedeutung [67, 112, 119].

Bereits 1997 wurde die Annahme formuliert, dass Moenomycine die PGT hemmen, indem sie anstelle der wachsenden Peptidoglykankette an das aktive Zentrum binden [111]. Bestätigung fand diese Hypothese durch den Beleg, dass Moenomycin A und Lipid IV um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren [120]. Erkenntnisse aus Röntgenstrukturuntersuchungen von PGT (in der Apoform und im Komplex mit Moenomycin A) trugen zum Verständnis bei, wie Moenomycin A die wachsende Peptidoglykankette imitiert [85, 88, 121-125].

PBP und MGT enthalten eine Glykosyltransferase (GT)-Domäne und sind über eine Transmembranhelix mit daran angrenzendem N-terminalem cytoplasmatischem Schwanz in der Zellmembran verankert. PBP verfügen zusätzlich über eine C-terminale Transpeptidase-Domäne. Die GT-Domäne besteht aus einer starren globulären „Kopfreion“ („head region“), die Ähnlichkeiten mit Lysozym aufweist, und einer kleineren, flexibleren, drei Helices umfassenden „Kieferregion“ („Jaw region“) (Abbildung 9) [88].

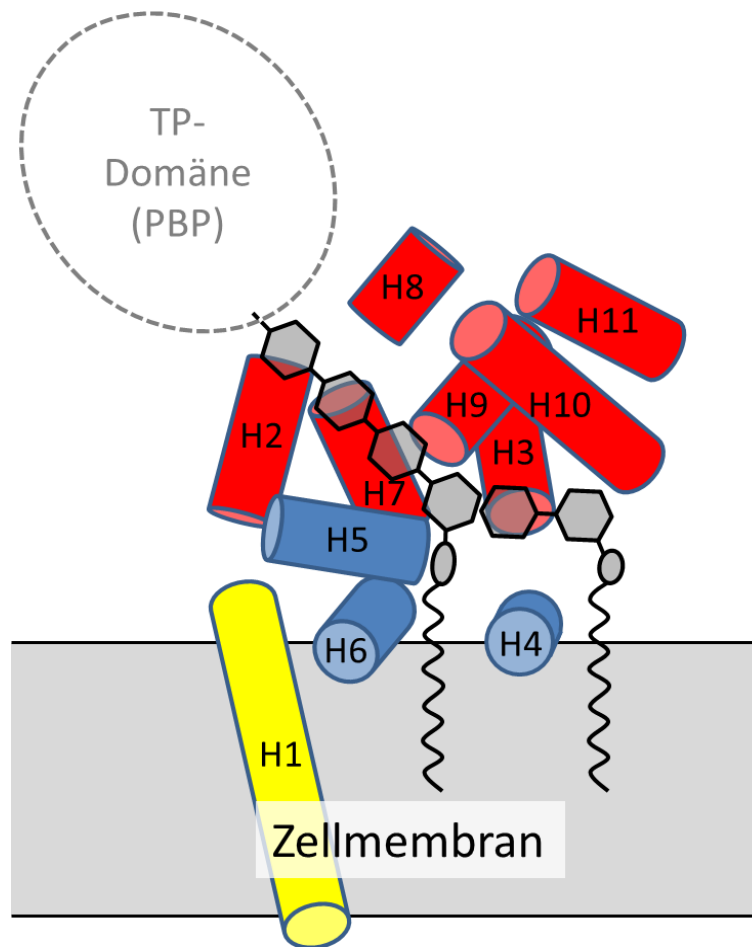


Abbildung 9: Schematische Darstellung der PGT mit Lipid II in der Akzeptorbindungsstelle (rechts) und der wachsenden Peptidoglykankette in der Donorbindungsstelle (links) (in Anlehnung an Abb. 1, 4, S6 und S8 in [85], Abb. 7 in [124], Abb. 3 in [91], Abb. 1 in [126], Abb. 1 und 6 in [122]). Die Zylinder repräsentieren Helices. Die Kopfregion der GT-Domäne ist rot dargestellt und die Kieferregion blau. Letztere besteht aus äußerer Helix (H4), innerer Helix (H6) und Spalt-Helix („cleft helix“) (H5). Gelb dargestellt ist die Transmembranhelix (H1). Im Fall der PBP grenzt an die GT-Domäne die TP-Domäne an.

Das aktive Zentrum befindet sich in einem Spalt zwischen Kopf- und Kieferregion. Die Kieferregion enthält eine besonders flexible Region („mobile region“ oder „flexible region“), bestehend aus der sogenannten äußeren Helix und einer β -Haarnadelschleife an deren C-Terminus [1, 85, 122, 126]. Die äußere Helix trennt die Donor- und die Akzeptorbindungsstelle [88, 122]. Es wird angenommen, dass die Flexibilität dieser Region die Translokation der wachsenden Peptidoglykankette in die Donorbindungsstelle ermöglicht (s. Abbildung 8) [88, 122]. Ein Teil der Oberfläche der

Moenomycine

Kieferregion ist hydrophob und sehr wahrscheinlich der bakteriellen Zellmembran zugewandt (s. Abbildung 10) [88, 124].

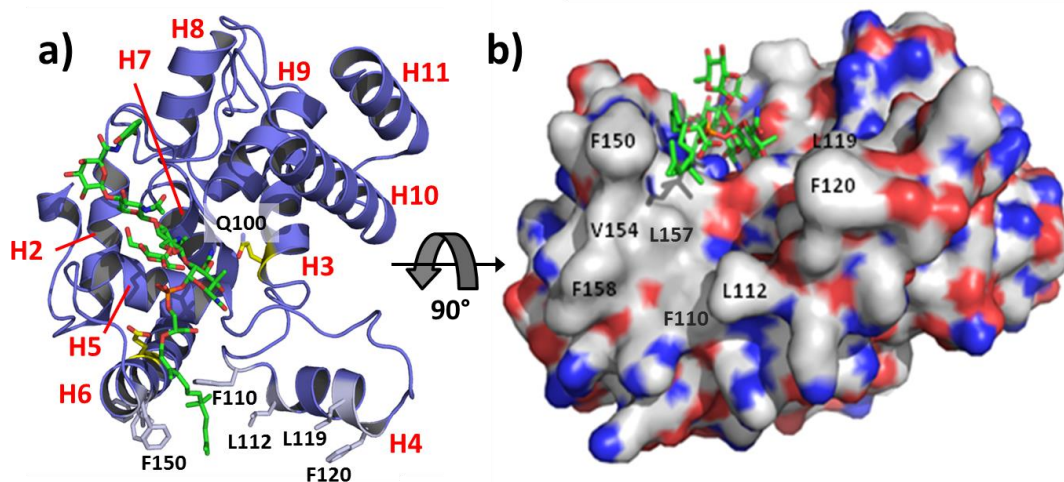


Abbildung 10: *S. aureus* MtgA Mutante E100Q mit Moenomycin A gebunden in der Donorbindungsstelle (PDB 3HZS; publiziert in [124]): a) Bändermodell; Perspektive wie in Abbildung 9; b) Elektrostatische Oberfläche; Perspektive im Vergleich zu Teilabb. a um 90° um die horizontale Achse der Papierebene gedreht; die markierten Reste bilden die hydrophobe Oberfläche.⁵

Kristallstrukturen von PGT mit Substrat in der Donorbindungsstelle sind zwar bislang nicht beschrieben, es war aber möglich, PGT mit Moenomycin A zu kokristallisieren (s. exemplarisch Abbildung 10 a). Basierend auf solchen Röntgenstrukturen stellten Lovering et al. [88, 122] ein Modell zur Anordnung der Substrate in den Bindungsstellen auf. Gemäß diesem Modell nimmt in der Donorbindungsstelle der PGT ein GlcNAc-Rest der wachsenden Peptidoglykankette die Position von Ring E des Moenomycins und ein MurNAc-Rest die von Ring F ein. Aufgrund der unterschiedlichen Konnektivität der Zuckerreste (β 1-4 im Falle des Peptidoglykans und β 1-2 bei Moenomycin) kommt C1 von Ring F mit C3 von MurNAc zur Deckung.

⁵ entnommen (geringfügig abgeändert) aus: Bury D, Dahmane I, Derouaux A, Dumbre S, Herdewijn P, Matagne A, Breukink E, Mueller-Seitz E, Petz M, Terrak M (2015) *Positive cooperativity between acceptor and donor sites of the peptidoglycan glycosyltransferase*. *Biochem Pharmacol* 93(2):141-150, Copyright (2014), abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Für vier verschiedene PGT wurden Kontakte zwischen den polaren Gruppen von Moenomycin A in der Donorbindungsstelle bzw. Lipid II in der Akzeptorbindungsstelle und dem Peptidrückgrat oder den Aminosäureseitenketten der PGT identifiziert (s. Abbildung 11) [85, 88, 118, 122-124].

Das Sequenzalignment der beteiligten Aminosäuren in *Aquifex aeolicus* PGT mit über 200 anderen Peptidoglykan-Glykosyltransferasen zeigte sechs hoch konservierte Reste in der Donorbindungsstelle auf, die an der Bindung des Strukturelements F-G von Moenomycin A beteiligt sind [118] (in Abbildung 11 unterstrichen): E83, Q121 und K137 sind invariant, R132 ist hoch konserviert, S116 kann nur durch Threonin und K124 durch Arginin ersetzt werden.

Für die drei Proteine *S. aureus* MtgA, *E. coli* PBP1b und *A. aeolicus* PGT wurde mittels Punktmutationen unter anderem die Bedeutung einiger dieser konservierten Reste untersucht [85, 87, 89, 118, 123, 127]. Zwei der drei invarianten Aminosäurereste waren essentiell für die enzymatische Aktivität (MtgA: E100; PBP1b: E233, Q271; PGT: E83, Q121). Bei einem dieser Reste handelt es sich um den Glutamatrest, von dem angenommen wird, dass er die Deprotonierung der 4-Hydroxyfunktion der GlcNAc-Gruppe von Lipid II begünstigt (MtgA: E100; PBP1b: E233; PGT: E83). Zwei weitere der sechs konservierten Reste (MtgA: S132, K140; PBP1b: S266, K274; PGT: S116, K124) hatten bei allen drei Enzymen einen Einfluss auf die Enzymaktivität (die Mutanten waren inaktiv oder deutlich in ihrer Aktivität gemindert). Die genannten Wechselwirkungen des Strukturelements F-G von Moenomycin A mit einigen für die katalytische Aktivität wichtigen Aminosäuren stützen das katalytische Modell von Lovering et al. [88, 122].

Moenomycine

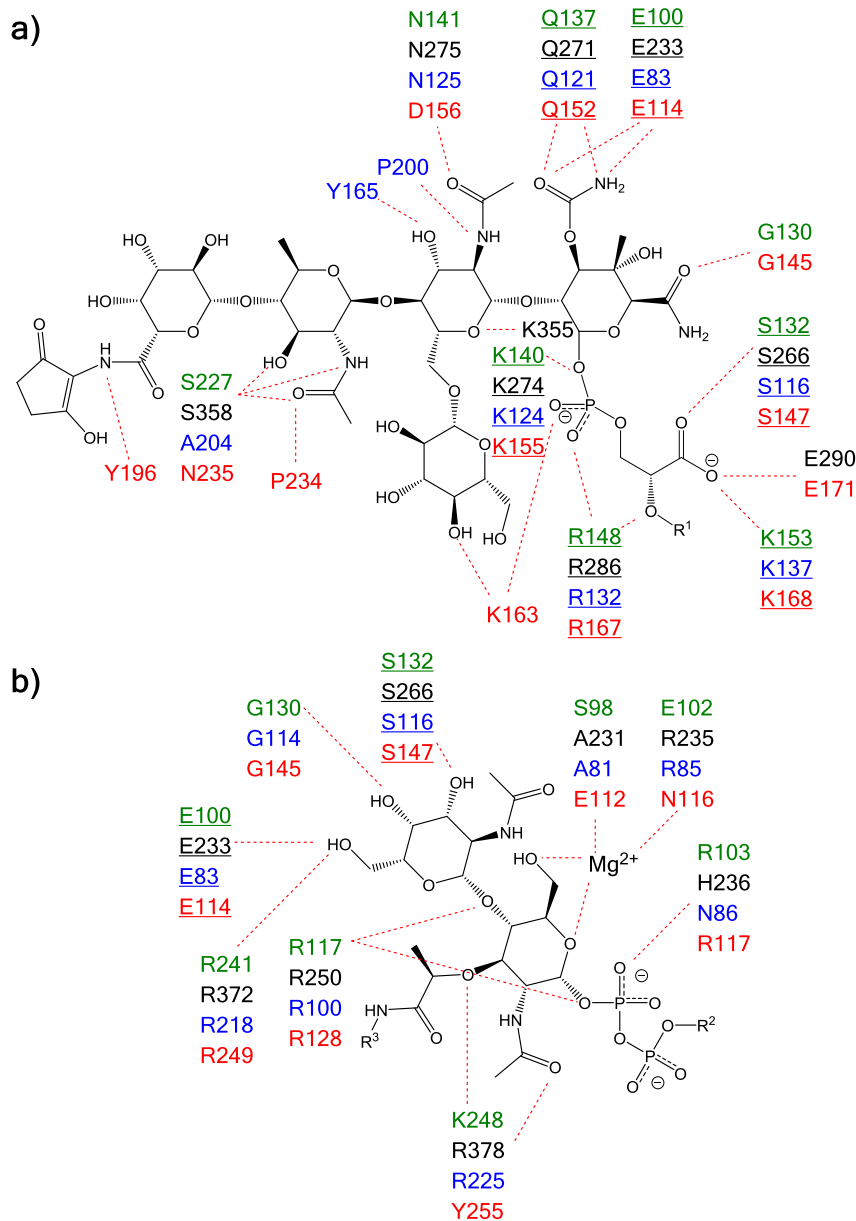


Abbildung 11: Kontaktstellen der PGT zu a) Moenomycin A (R¹: Moenocinolrest) in der Donorbindungsstelle und b) dem Lipid II-Analogen Substanz 3 in [85] (R²: Undecaprenylrest; R³: L-Ala-Spacer-Biotin) in der Akzeptorbindungsstelle. Rote gestrichelte Linien stellen die Wechselwirkungen zwischen Strukturelementen der gebundenen Moleküle und den Aminosäureresten oder dem Peptidrückgrat der PGT dar (teils unter Beteiligung von Wasser). Dargestellt sind die wechselwirkenden Aminosäuren für *Staphylococcus aureus* MtgA, *Escherichia coli* PBP1b, *Aquifex aeolicus* PGT und *Staphylococcus aureus* PBP2 (jeweils farblich markiert). Für in a) genannte Reste wurde die Interaktion über Kristallstrukturen belegt. Für die in b) dargestellten Interaktionen mit dem Lipid II-Analogen lagen nur Daten für *S. aureus* MtgA vor, die entsprechenden Aminosäuren der anderen PGT wurden über Sequenz- oder Strukturalignment identifiziert. Konservierte Reste sind unterstrichen. In Anlehnung an Abb. 2 u. S12 aus [85], Abb. 11c aus [1], Abb. 4b aus [118] und Abb. 2A aus [123]; ergänzt gemäß [91] i.V.m. Abb. 3 aus [85].

Es wird angenommen, dass die Pyrophosphatgruppe der Substrate mit positiv geladenen Oberflächen in der Donor- und auch der Akzeptorbindungsstelle der PGT wechselwirkt [85, 88, 89, 128]. Die Phosphoglycerat-Gruppe der Moenomycine imitiert die Pyrophosphat-Gruppe der wachsenden Peptidoglykan-Kette. Hierbei ist die Ladung der Carbonsäuregruppe für die Wechselwirkung mit dem Enzym bedeutsam und nicht ihre räumliche Struktur [125].

Der Moenocinolrest imitiert den Undecaprenylrest des Donorsubstrats, der für die Substraterkennung von Lipid II und der wachsenden Peptidoglykankette bedeutsam ist [129]. Unterhalb und zwischen äußerer und innerer Helix der Kieferregion verfügt die Donorbindungsstelle der PGT über eine hydrophobe Region, die einer Alkylkettenlänge von ca. 30 Kohlenstoffen entspricht [122]. Die Transmembranhelix könnte zusätzlich an der Erkennung des Undecaprenyl- bzw. Moenocinolrests beteiligt sein, denn ihr Fehlen führt *in vitro* zu verringerter Enzymaktivität und geringerer Affinität zu Moenomycinen [85, 130, 131].

Der Moenocinolrest der Moenomycine bindet in dem hydrophoben Bereich zwischen innerer und äußerer Helix [124], wodurch er in Richtung der Zellmembran ausgerichtet wird (s. Abbildung 10) [88]. Moenomycin-Derivate ohne Moenocinolrest sind praktisch unwirksam [65, 97]. Derivate mit kürzerer Lipidkette zeigen ab einer Kettenlänge von 10 Kohlenstoffen (Neryl) deutliche Hemmung der PGT *in vitro* [118, 132], ausgeprägte antibakterielle Aktivität ist ab einer Alkylkettenlänge von 15 Kohlenstoffen (Farnesyl) zu beobachten [68]. Hydrierung des Moenocinolrests führt zu keinem nennenswerten Aktivitätsverlust [101]. Lipidketten mit polarer Modifikation (sekundäre Aminofunktionen oder Hydroxylierung nahe der Phosphoglyceratgruppe oder Hydroxylierung in ω -2- oder ω -3-Position) hingegen zeigen keine antibakterielle Wirksamkeit, hemmen aber zum Teil die PGT-Aktivität *in vitro* [108, 108, 115, 115, 116, 133]. Die unterschiedlichen Ansprüche an die Lipidkettenlänge und -substitution *in vivo* und *in vitro* könnten darauf zurückzuführen sein, dass die Moenomycine in die Zellmembran eingelagert und korrekt ausgerichtet werden müssen, um *in vivo* an die PGT binden und mit dem Substrat um die Bindungsstelle konkurrieren zu können [115, 132].

Moenomycine

Die Peptidseitenkette von Lipid II scheint für die Substraterkennung von geringer Bedeutung zu sein. Untersuchungen an Lipid II-Derivaten mit modifizierter Peptidseitenkette zeigten zunächst, dass der D-Lac-L-Ala-Rest für die Bindung an die GT und die Eignung als Substrat wichtig sei, wohingegen Lipid II-Derivate mit Methylether, anstelle des D-Lac-L-Ala-Rests nicht als Substrat akzeptiert wurden [134]. Dumbre et al. [135] konnten anhand von Lipid I- und Lipid II-analogen Inhibitoren zeigen, dass das Vorhandensein des Lactylethers für die Substraterkennung ausreichend ist. Die Derivate waren sogar zum Teil wirksamere Inhibitoren, wenn die Peptidseitenkette fehlte.

2.4.3 Wirkungsspektrum

Die Antibiotika der Moenomycin-Gruppe gehören zu den stärksten bekannten Wirkstoffen gegen grampositive Bakterien [1, 67]. Die minimalen Hemmkonzentrationen (MIC: minimal inhibitory concentration) von Moenomycin A für verschiedene grampositive Spezies liegen typischerweise im Bereich von 1 ng/mL bis einige 100 ng/mL [7, 36, 37, 65], womit es 10 bis 1000 mal wirksamer ist (auf molarer Basis), als das als Reserveantibiotikum in der Humanmedizin eingesetzte Vancomycin [1]. Es gibt allerdings auch weniger empfindliche (z.B. einige *Enterococcus*-Spezies) und intrinsisch Moenomycin-resistente Stämme [1, 2, 112, 136, 137]. Die verschiedenen Kongenere (inkl. Nosokomycine) unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit zum Teil um mehrere Größenordnungen voneinander [19, 36, 37]. Trotz der essentiellen Bedeutung der PGT für das Überleben von Bakterien ist die Wirkung der Moenomycin-Antibiotika gegen gramnegative Bakterien und einige *Corynebacterineae* (z.B. Mycobakterien) um mehrere Größenordnungen geringer (MIC von Moenomycin A teils >100 µg/mL) [1, 7, 65, 138]. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die durch die äußere Lipidmembran der gramnegativen Bakterien bzw. die mit einer Lipiddoppelschicht besetzte Zellwand der *Corynebacterineae* erschwerte Diffusion der Moenomycine zum Wirkungsort [1, 73, 112, 139, 140]. Dies findet auch darin Bestätigung, dass die Moenomycine *in vitro* die PGT gramnegativer Bakterien hemmen [112, 118, 127]. Einige Stämme

bestimmter gramnegativer Gattungen (z.B. von *Helicobacter* und *Pseudomonas*) weisen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Moenomycinen auf [1, 138, 141].

Die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Bakterienstämme gegenüber Moenomycinen könnte zum Teil die Folge der unterschiedlichen Affinität der verschiedenen PGT gegenüber den Inhibitoren und der individuellen Ausstattung der Stämme mit diesen Enzymen sein. So werden einige PGT sogar überhaupt nicht durch Moenomycine inhibiert [142, 143]. Aufgrund unterschiedlicher physiologischer Funktionen der verschiedenen PGT (Beteiligung an Zellwachstum oder Zellteilung; Lokalisation der Enzyme) und des Zusammenwirkens der PGT mit anderen Enzymen im Divisom (an der Zellteilung beteiligter Multienzymkomplex) kann dennoch bereits die Hemmung eines Teils der PGT eine bakterio-statische oder bakterizide Wirkung haben [1, 73, 126, 144-147].

Die Eigenresistenz der Moenomycin-Bildner ist bislang nicht aufgeklärt. Die Gencluster für die Moenomycin-Produktion beinhalten keine Resistenzgene, es scheint sich vielmehr um einen den *Actinobacteria* eigenen Resistenzmechanismus zu handeln [1]. Ein Bakterium (*Bacillus* DSM 4675), das aus einem Flavomycin®-Fermentationsansatz isoliert wurde, ist imstande, Moenomycine durch das Zellwand-assoziierte Enzym Moenomycinase zu spalten [103]. Andere spezifische Resistenzmechanismen gegen Moenomycine sind jedoch nicht bekannt [148]. Plasmid-vermittelte Resistenzen sind ebenfalls nicht bekannt [1, 140]. Durch Anzucht auf GT-Inhibitoren (Moenomycin A oder Vancomycin-Derivate) enthaltenden Medien gelang die Selektion Moenomycin-resistenter Keime [149, 150]. Ursache für die Resistenzbildung sind Veränderungen in der Permeabilität der äußeren Membran [150]. Auch Mutanten von *Staphylococcus aureus* mit verringertem Lysylphosphatidylglycerin-Gehalt der Zellmembran und damit verbundener negativerer Nettoladung sind weniger anfällig gegen Moenomycine und Vancomycin [151].

Moenomycine

2.5 Moenomycine als Mastförderer

2.5.1 Verwendung von Flavophospholipol in der Tiermast

Die Verfütterung von Moenomycin-haltigen Futtermitteln führt bei Geflügel, Schweinen und Rindern bereits in geringen Dosen zu verstärkter Gewichtszunahme und zu einer gesteigerten Legeleistung von Legehennen [4, 13, 152]. Der Einsatz als Mastförderer in der Aquakultur ist ebenfalls beschrieben [153]. Flavophospholipol kann in Abhängigkeit der sonstigen Haltungsbedingungen die Wolleproduktion von Schafen steigern [154]. Es hat jedoch keinen Einfluss auf die Milchleistung von Kühen oder die Nährstoffzusammensetzung der Milch [155].

Die Ursachen für die wachstumsfördernde Wirkung sind bislang nicht im Detail geklärt [2]. Es wird angenommen, dass die Wirkung von Flavophospholipol zum Teil darauf zurückzuführen ist, dass die Zahl grampositiver opportunistischer Erreger verringert wird. Außerdem wird die Zahl der sogenannten HAP-Bakterien (HAP: high-activity ammonia-producing) verringert und so die Menge an verfügbaren Aminosäuren erhöht und Ammoniak-bedingte toxische Effekte verringert [1, 156]. Eine aktuell diskutierte Hypothese für einen allgemeinen Wirkmechanismus wachstumsfördernder Antibiotika ist, dass diese die Produktion der Gallensalzhydrolase durch Bakterien im Verdauungstrakt hemmen [157].

Moenomycine sind besonders wirksam gegen einige Resistenzplasmid-tragende Enterokokken und *Escherichia coli* und verringern so den Transfer von Resistenzgenen durch Konjugation [1, 140, 158]. Als Ursache hierfür wird angenommen, dass durch Veränderungen der Bakterienzelle im Zuge der Konjugation (z.B. Ausbildung von Sexpili) die Diffusion der Moenomycine an ihren Wirkungsort erleichtert wird [1, 140]. Vereinzelt wurde allerdings beobachtet, dass die Konjugation zwar *in vitro* unterdrückt wurde, im Tierversuch jedoch auftrat [159].

Moenomycine weisen im Tierversuch eine geringe orale und intravenöse Toxizität auf [4, 7, 160]. Basierend auf der NOEC (no observed effect concentration) bezüglich der menschlichen Darmmikroflora wurde ein ADI (acceptable daily intake) von 1 µg/(kg*d) für Flavomycin® abgeleitet [161]. Moenomycine werden nach oraler Gabe praktisch nicht resorbiert [4, 7, 140, 158]. Nach parenteraler Gabe binden sie an

Plasmaproteine und Zellmembranen, was geringe Konzentrationen an freiem Wirkstoff zur Folge hat [140]. In Einklang damit wurde beobachtet, dass die MIC von Moenomycinen in Blut-enthaltenden Medien um mehrere Größenordnungen erhöht ist [162]. Die renale Ausscheidung der unveränderten Moenomycine erfolgt nur langsam [7, 140, 158].

Aufgrund ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften sind Moenomycine von geringem Nutzen für die Humantherapie. Lediglich die Anwendung zur Therapie von Infektionen mit multiresistenten *Helicobacter pylori* ist erprobt [141]. Im Tierversuch mit Mäusen zeigten Moenomycine nach subkutaner oder intravenöser Injektion protektive und kurative Effekte bezüglich Streptokokken-Infektionen, nach oraler Gabe hingegen war die Wirksamkeit erwartungsgemäß deutlich niedriger [1, 7, 13].

Flavophospholipol wird als Mastförderer vorrangig für Geflügel und Schweine eingesetzt [2]. Weltweit wird es unter anderem in den USA, Kanada, Russland, China und Australien verwendet [153, 163-166]. Schätzungen zufolge werden in den USA allein in der Schweinemast jährlich 543 kg Flavophospholipol verbraucht, wobei es mit einem Dosis-Median von 4 g/t der ergiebigste Mastförderer ist [164]. Somit werden jährlich schätzungsweise 136.000 t Flavophospholipol-haltiges Schweinefutter in den USA verfüttert. Chlortetracyclin und Bacitracin, die mit einem geschätzten jährlichen Verbrauch als Mastförderer in der Schweinemast (Mastphase) in den USA von 68.387 kg bzw. 72.760 kg zu den mengenmäßig bedeutsamsten Mastförderern gehören, ergeben im Vergleich bei einem Dosis-Median von 100 g/t bzw. 30 g/t geschätzte 684.000 t bzw. 2.425.000 t Schweinefutter [164].

Bis Ende 2005 (s.u.) war Flavophospholipol auch als Mastförderer innerhalb der EU zugelassen. Die Zulassung war durch die Richtlinie 70/524/EWG geregelt [167], die durch die Futtermittelverordnung in nationales Recht umgesetzt wurde [168].

Zur Orientierung bezüglich praxisrelevanter Flavophospholipol-Gehalte in Futtermitteln sind in Tabelle 1 die Gehalte angegeben, die im Rahmen der Ende 2005 aufgehobenen Zulassung als Mastförderer innerhalb der EU vorgeschrieben waren [58, 167-170].

Moenomycine

Tabelle 1: Praxisrelevante Gehalte an Flavophospholipol in Tierfutter

Tierart	Maximalalter	Flavophospholipol [mg/kg]	Einschränkungen
Kälber	6 Monate	6-16	-
	6 Monate	8-16	nur für Milchaustauschfuttermittel
Mastrinder	-	2-10*	-
Schweine	6 Monate	1-20	-
	3 Monate	10-25	nur für Milchaustauschfuttermittel
Jung- und Legehennen	-	2-5	-
Truthühner	26 Wochen	1-20	-
anderes Geflügel (außer Gänsen, Enten und Tauben)	-	-	-
	16 Wochen	1-20	-
Kaninchen	-	2-4	-
Pelztiere	-	2-4	-

*: Ergänzungsfuttermittel - Gehalt bezogen auf die Gesamttagesration

2.5.2 Resistenzproblematik und EU-weites Verbot von Mastförderern

Durch den weit verbreiteten Einsatz von Antibiotika (in der Humanmedizin, wie in der Tiermast) kommt es zur vermehrten Entstehung resistenter Bakterienstämme [3, 9]. Ursache hierfür ist neben der Selektion resistenter Keime der Transfer der Resistenzgene intrinsisch resistenter Keime auf nicht resistente Bakterien [9]. Problematisch ist dies insbesondere hinsichtlich des Auftretens von nosokomialen Infektionen mit Antibiotika-resistenten Keimen. Klinisch relevant ist vor allem eine Gruppe grampositiver und gramnegativer Erreger, die als ESKAPE-Pathogene bezeichnet werden (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter*

Spezies), zu denen auch die Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) und Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) zählen [3, 171]. Um diesem Prozess entgegenzuwirken, wurde mit Wirkung zum 1. Januar 2006 EU-weit die Zulassung von Antibiotika als Mastförderer zurückgezogen (Art. 11 Abs. 2 der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 [172]).

Aufgrund von Artikel 41 bis 43 der Verordnung (EG) Nr. 882/2004 [173] sind die Mitgliedsstaaten der Europäischen Union zwecks Sicherstellung der Einhaltung lebensmittel- und futtermittelrechtlicher Bestimmungen zur Erstellung und Durchführung eines mehrjährigen nationalen Kontrollplans (MNKP) verpflichtet. In Deutschland ist die Kontrolle der Einhaltung des Futtermittelrechts als Teil des MNKP (Integrierter mehrjähriger Kontrollplan der Bundesrepublik Deutschland [174]) im Kontrollprogramm Futtermittel geregelt [175]. Dieses sieht eine Analyse von Futtermitteln auf „nicht mehr als Zusatzstoff zugelassene Stoffe“ (inkl. Flavophospholipol) vor [176]. Im Jahr 2013 wurden beispielsweise 408 Futtermittel (Einzel- und Mischfuttermittel), Futtermittelzusatzstoffe und -vormischungen auf das Vorhandensein von Moenomycinen (Flavophospholipol) untersucht. Eine Analyse tierischer Erzeugnisse (Fleisch, Innereien, Milch, Eier) auf Flavophospholipol ist nicht vorgesehen, da aufgrund der Pharmakokinetik der Moenomycine bei Verfütterung praxisrelevanter Dosen keine Rückstände auftreten [4-8].

2.6 Entwicklung neuer GT-Inhibitoren

Die anwendungsbedingte Entstehung von Antibiotikaresistenzen macht eine kontinuierliche Entwicklung geeigneter neuer Wirkstoffe erforderlich [9]. Aufgrund der essentiellen Bedeutung der Peptidoglykansynthese sind PGT ein geeigneter Angriffsort für Antibiotika [74]. Dabei ist die Hemmung der Transpeptidase ein üblicher Wirkmechanismus, während kein in der Anwendung befindliches Antibiotikum die GT-Domäne direkt inhibiert.

Mit Ausnahme der Bildung von Moenomycinase durch *Bacillus* DSM 4675 sind keine spezifischen Resistenzmechanismen gegen Moenomycine bekannt [148]. Auch liegen trotz jahrzehntelanger Anwendung von Flavophospholipol als Mastförderer

Moenomycine

keine eindeutigen Belege für neuerworbene Resistenzen gegen Moenomycine vor [1, 2, 19, 140, 158, 159]. Moenomycine wechselwirken mit einigen für die Enzymaktivität essentiellen Aminosäureresten im aktiven Zentrum der PGT (s. Abschnitt 2.4.2). Daher ist die Möglichkeit der Resistenzbildung über Mutation der PGT auf wenige Aminosäuren beschränkt und aufgrund der Bildung verkürzter PG-Ketten mit Störungen bei der Zellteilung in Gegenwart des Inhibitors verbunden [1, 148]. Aufgrund der Lokalisierung der Transglykosylierungsreaktion auf der Außenseite der bakteriellen Zellmembran sind einige Resistenzmechanismen (z.B. Ausschleusung des Inhibitors) prinzipiell ausgeschlossen und die Inhibitoren müssen nicht imstande sein, die Zellmembran zu durchdringen. Darüber hinaus gibt es keine den PGT homologen Proteine beim Menschen, was die Wahrscheinlichkeit toxischer Nebenwirkungen von PGT-Inhibitoren verringert [73]. Moenomycine und ihre Konkurrenz mit dem natürlichen Substrat um die PGT sind somit ein wertvoller Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Antibiotika [9, 71, 91].

Zur Identifizierung von Leitstrukturen für neue Antibiotika, die die Peptidoglykan-Glykosyltransferasen hemmen, werden verschiedene Strategien verfolgt. Die beiden gängigsten Ansätze sind die Synthese von Moenomycin- und Substrat-Analoga [134, 135, 177-180], sowie das Hochdurchsatz-Screening (HTS: high throughput screening) von Substanzbibliotheken [130, 181-183] (auf die angewendeten Screening-Verfahren wird in Abschnitt 4.3 eingegangen). Daneben wurden auch andere Verfahren, wie *in silico*-Screening und Computer-gestütztes Wirkstoffdesign angewendet [184-186].

Die gezielte Synthese von Moenomycin- oder Substrat-Analoga setzt detaillierte Kenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Bindungspartnern, sowie über den Mechanismus der Katalyse voraus. Zwar wurden auf diesem Gebiet in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte gemacht (s. Abschnitt 2.4.2), dennoch besteht hier weiterhin Forschungsbedarf.

3 Nachweisverfahren für Moenomycine

Für den Nachweis von Moenomycinen sind verschiedene mikrobiologische, elektrophoretische und chromatographische Verfahren, sowie Kombinationen daraus beschrieben. Moenomycine werden nicht in nennenswertem Maße resorbiert, weshalb es nicht zu Rückständen in tierischen Geweben kommt (Abschnitt 2.5.2). Der Nachweis einer rechtswidrigen Anwendung kann demnach nur durch Analyse des verabreichten Futters oder der tierischen Ausscheidungen erfolgen. Da zunächst nicht bekannt war, ob es zu Moenomycin-Rückständen in tierischen Produkten (Fleisch, Milch, Eier) kommen würde, wurden einige der hier genannten Verfahren für die Anwendung in diesen Matrices entwickelt. Darüber hinaus wurden viele, vor allem chromatographische, Verfahren im Zuge der Identifizierung der verschiedenen Moenomycin-Kongenere entwickelt. Eine getrennte Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Kongenere ist zwar für den Nachweis einer rechtswidrigen Anwendung von Flavophospholipol nicht erforderlich, allerdings sind die chromatographischen Verfahren insbesondere vor dem Hintergrund von Interesse, dass im Zuge dieser Arbeit eine Isolierung des Hauptkongeners Moenomycin A erfolgen musste (Abschnitt 7.2).

3.1 Mikrobiologische Hemmstofftests

Mikrobiologische Hemmstofftests sind in der Tierarzneimittelrückstandsanalytik als Screening-Verfahren für Antibiotikarückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft sehr gebräuchlich. Sie erlauben einen kostengünstigen Nachweis von Substanzen, die das bakterielle Wachstum hemmen. Häufig sind diese Verfahren nicht selektiv und liefern in der Regel nur qualitative oder semi-quantitative Aussagen, weswegen im Anschluss zur Bestätigung und exakten Quantifizierung ein selektives physikalisch-chemisches Verfahren angewendet wird [187]. Auch für den Nachweis von Flavophospholipol in verschiedenen Matrices können Hemmstofftests zum Einsatz kommen.

Nachweisverfahren für Moenomycine

Bis zum Anwendungsverbot ab dem Jahr 2006 durch die Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 [172], war Flavophospholipol als Mastförderer auch innerhalb der EU zugelassen. Zur Kontrolle der Einhaltung der vorgeschriebenen Mindest- und Höchstgehalte in Futtermitteln war die Anwendung des Agar-Diffusions-Hemmstofftests nach Richtlinie 78/633/EWG [188], (umgesetzt in Bundesrecht in der Futtermittel-Probenahme- und Analyseverordnung [189]) vorgeschrieben. Aufgehoben wurde diese Richtlinie erst mit Wirkung zum 26. August 2009 durch die Verordnung (EG) Nr. 152/2009 [190]. Der Hemmstofftest sieht zunächst eine Extraktion des Futtermittels mit 50% Methanol unter Rückfluss und (außer bei Vormischungen, Konzentraten und Mineralfuttermitteln) eine darauf folgende Aufreinigung über zunächst Kationen-, dann Anionenaustauscher vor. Anschließend werden vier Verdünnungsstufen des Extrakts und vier Verdünnungsstufen eines Flavophospholipol-Standards hergestellt. In eine Agarplatte, die mit dem Testkeim *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P beimpft wurde, sind acht Löcher gestanzt, in die jeweils eine der acht Lösungen pipettiert wird. Nach Inkubieren sind kreisförmige Zonen um die Löcher herum zu erkennen, in denen es nicht zum Bakterienwachstum gekommen ist. Der Radius dieser sogenannten Hemmhöfe ist konzentrationsabhängig. Er wird gemessen und daraus der Gehalt an Flavophospholipol im Futtermittel berechnet. Die Bestimmungsgrenze des Verfahrens wird mit 1 mg/kg Futtermittel angegeben. Wallhäusser et al. [13] beschreiben ebenfalls die Anwendung eines Hemmstofftests zur Quantifizierung von Moenomycinen mit *Bacillus cereus* als Testkeim.

Auch qualitative Agar-Diffusions-Hemmstofftests zum Nachweis von Flavophospholipol und eventuellen Rückständen sind beschrieben [6, 8]. Die Hemmstofftests verwenden verschiedene Testorganismen (*Bacillus cereus* Kiel, *Bacillus subtilis* 165, *Bacillus subtilis* BGA und *Micrococcus luteus* ATCC 9341 [6] und *Bacillus cereus* [8]) und werden auf verschiedene Matrices angewendet (Alleinfutter für Hühner, Muskulatur, Nieren und Leber, sowie Kot von Masthähnchen [6]; Milch [8]).

Präve [191] beschreibt einen mikrobiologischen Hemmstofftest, um in Fermentationsansätzen von *Streptomyces ghanaensis* 4092 (ATCC 14672), die der Gewinnung von Moenomycinen dienen sollen, die Produktmenge zu bestimmen. Der

Nachweisverfahren für Moenomycine

Nachweis beruht auf der Hemmung des Wachstums von *Micrococcus pyogenes* var. aureus 209P (ATCC 6538 P) und dadurch verringerter Trübheit des Testansatzes, welche mittels Turbidimetrie bei 578 nm quantifiziert werden kann. Ein qualitativer turbidimetrischer Assay mit *Staphylococcus aureus* 209P als Testkeim wurde zuvor bereits von Wallhäusser et al. [13] beschrieben.

Daneben wurden auch weitere unspezifische Hemmstofftests wie der zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch gebräuchliche Brillantschwarz-Reduktionstest [192, 193] und der Joghurt-Test nach Frank [194] angewendet, um Milch auf Flavophospholipol-Rückstände zu untersuchen [8].

3.2 Elektrophoretische Nachweisverfahren

Es sind verschiedene elektrophoretische Verfahren mit anschließender bioautographischer Detektion zur Trennung von Flavophospholipol und anderen Antibiotika publiziert [195-198]. Während sowohl Grynne [195], als auch Langner et al. [196] nur Experimente mit Standardlösungen der verschiedenen Antibiotika durchführten und Ionova und Petkov [198] Fleisch und Eier analysierten, wendeten Salvatore und Katz ihr Nachweisverfahren auf Futtermittel an [197]. Daher wird auf dieses Verfahren im Folgenden exemplarisch eingegangen. Das Verfahren dient dem Nachweis von Flavophospholipol und 16 weiteren Antibiotika. Die elektrophoretische Trennung erfolgt auf zwei verschiedenen Agarose-Gelen bei pH 6,0 bzw. pH 8,0. Danach werden die Trennschichten mit angeimpftem Medium überschichtet und inkubiert, wobei bei Anwesenheit von Antibiotika Hemmzonen entstehen. Aufgrund der Position dieser Hemmzonen bei beiden pH-Werten kann eine weitgehende Unterscheidung der Antibiotika erfolgen. Eine Quantifizierung erfolgt anhand des Durchmessers der Hemmzonen. Für die Analyse in Futtermitteln wird eine Standardprozedur vorgeschlagen. Zunächst wird das Futtermittel in einem Ansatz mit Isooctan und in einem zweiten Ansatz mit DMF extrahiert. Dies dient zum einen dazu, störende Matrixbestandteile, die unspezifisch das Bakterienwachstum hemmen könnten, zu entfernen. Zum anderen sollen aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeiten der Antibiotika mit jedem der beiden Lösungsmittel bestimmte Gruppen

Nachweisverfahren für Moenomycine

von Antibiotika abgetrennt werden. Somit soll eine weitere Eingrenzung der Identität der vorhandenen Antibiotika aufgrund des Auftretens oder Fehlens der Hemmzonen nach Waschen mit Isooctan oder DMF möglich sein. Nach dem Waschschrift erfolgt die Extraktion mit einem Methanol-Tris-Puffer-Gemisch. Das Analysenverfahren wurde von Salvatore und Katz beispielhaft lediglich auf reale Futtermittel angewendet, die Oxytetracyclin und Neomycin, Tylosin, Bacitracin oder Chlortetracyclin und Penicillin G enthielten. Mit Flavophospholipol-Standards wurde mit *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 12980) als Testkeim eine Nachweisgrenze von 0,5 µg/mL erreicht, was bei Anwendung der beschriebenen Aufarbeitung und einer 100%igen Wiederfindung 1 mg/kg Flavophospholipol in Futtermitteln entspräche.

3.3 Chromatographische Methoden zum Nachweis von Flavophospholipol

Für den Nachweis von Flavophospholipol wurden dünnschichtchromatographische Verfahren mit bioautographischer Detektion entwickelt [196, 199, 200]. Die Trennung erfolgt auf Cellulose mit einem Butanol/Methanol/Essigsäure/Wasser-Gemisch als Fließmittel [196], oder an Kieselgel mit Chloroform/Ethanol/Wasser [199, 200]. Eine Anwendung für Futtermittel ist nicht beschrieben, stattdessen wurden Standardlösungen verschiedener Antibiotika ([196]) bzw. Flavophospholipol in zuvor dotierten Eiern oder Fleisch analysiert ([199, 200]).

Pérez et al. [201] und Gallo et al. [57] beschreiben LC-MS-Methoden zum Nachweis von Flavophospholipol über das Hauptkongener Moenomycin A. Bei Gallo et al. erfolgt die Analyse in verschiedenen Futtermitteln, die zuvor mit einem Flavophospholipol-Standard versetzt wurden. Die im Mixer zerkleinerten Futtermittel werden mit einem Ammoniak-Methanol-Gemisch extrahiert und per SPE an einer *N*-Vinylpyrrolidon/Divinylbenzol-Copolymer-Phase aufgereinigt. Die Extrakte werden per LC-ESI-MS/MS im Negativ-Ionenmodus analysiert. Die Trennung erfolgt an einer C12-Phase mit einem 10 mM Ammoniumacetat-Puffer/Acetonitril-Gradienten. Pérez et al. beschreiben ein Verfahren für die Bestimmung von Moenomycin A in Hühnermist. Auch hier erfolgt nach Extraktion (Accelerated Solvent Extraction mit Methanol) eine Aufreinigung des Extrakts per SPE, wobei eine C4-Phase zum Einsatz

Nachweisverfahren für Moenomycine

kommt. Die aufgereinigten Extrakte werden per LC-ESI-MS im Negativ-Ionenmodus analysiert, wobei die chromatographische Trennung an einer C18-Phase mit wässriger Ameisensäure und Acetonitril als Eluenten per Gradientenelution erfolgt.

3.4 Chromatographische Methoden zur Trennung der Moenomycine

Eine grobe Trennung der Moenomycine nach A- und C-Kongeneren ist per Dünnschichtchromatographie oder Säulenchromatographie an Kieselgel möglich [14, 31, 35, 37, 47, 49]. Hierbei werden auch die nicht exakt charakterisierten B-Kongenere (s. Abschnitt 2.1.1) abgetrennt [14, 47, 49]. Als Eluenten kommen Gemische von wässriger Ammoniaklösung mit 1- oder 2-Propanol zum Einsatz. Für die DC sind als Eluenten außerdem Gemische von 2-Propanol mit Boratpuffer pH 9,0 und von Ethanol mit Wasser beschrieben [47]. Die Detektion bei der DC kann im Falle der A- und C-Kongenere, die über die chromophore 2-Amino-Cyclopentan-1,3-dion-Gruppe verfügen, per Fluoreszenzlöschung erfolgen. Alternativ ist die Detektion mit Chlorsulfonsäure/Eisessig 2:1 (v/v) als Sprüh- oder Tauchreagenz beschrieben [14, 49].

Eine zumindest partielle Trennung der Moenomycin A- und C-Kongenere kann mittels HPLC erfolgen [37, 41, 53, 54, 56]. Zur Detektion der Moenomycine werden UV-Detektion oder ESI-MS bzw. ESI-MS/MS angewendet.

Donnerstag et al. [37] beschreiben die Basislinientrennung der Moenomycin-Kongenere A, A₁₂, C₁, C₃ und C₄ per HPLC an einer C18-Phase. Als Eluent werden 3 g/L Natriumheptansulfonat in schwach alkalischem 0,1 M Phosphatpuffer (15,5 g/L K₂HPO₄; 1,0 g/L KH₂PO₄) im Verhältnis 80:20 (v/v) gemischt mit Acetonitril verwendet. Endler et al. [53] wenden ein ähnliches Eluentengemisch mit höherem Acetonitril-Anteil (37%) an. Subramaniam-Niehaus et al. [54] wenden ein Gemisch aus Methanol, Acetonitril und 0,07 mM Phosphatpuffer pH 7,8 im Verhältnis 35:25:40 (v/v/v) als Eluent an einer C18-Phase mit Endcapping an. Hierbei kommt es zur Coelution von Moenomycin A und C₃. Außerdem wird die LC-MS-Trennung an einer C18-Phase mit Trifluoressigsäure und Acetonitril als Eluenten beschrieben, wobei es nur zur Antrennung zwischen A- und C-Kongeneren kommt [54]. Auch eine von

Nachweisverfahren für Moenomycine

Eichhorn und Aga [56] beschriebene LC-MS-Trennung an einer C18-Phase mit 0,3% Ameisensäure und Acetonitril als Eluenten ergab nur eine Antrennung der fünf A- und C-Kongenere. Zehl et al. [41] zeigen ebenfalls lediglich eine Antrennung der Moenomycin-Kongenere bei Trennung an einer C18-Phase mit Ammoniumacetat in Wasser und in Methanol als Eluenten.

4 SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

Im diesem Abschnitt wird auf molekularbiologische oder biochemische Assays und im Detail auf SPR-Biosensoren für Moenomycine eingegangen.

Biosensoren sind im IUPAC Compendium of Chemical Terminology definiert als „A device that uses specific biochemical reactions mediated by isolated enzymes, immunosystems, tissues, organelles or whole cells to detect chemical compounds usually by electrical, thermal or optical signals.“ [202]

Mit Biosensoren kann eine Wechselwirkung zwischen einer Substanz und einem biologischen System oder Biomolekül (über die vorab genannte Definition hinaus z.B. auch Antikörper, Nukleinsäuren inklusive Aptamere, Rezeptorproteine, Ionenkanäle [203, 204]) in ein elektrisches Signal umgewandelt und somit nachgewiesen und quantitativ beschrieben werden. Im weiteren Sinne werden auch solche Systeme, bei denen die Erkennung der Analyten durch ihre Affinität zu MIPs (molecular imprinting polymers) erfolgt, vereinzelt zu den Biosensoren gezählt [204]. Die Umwandlung des biologischen Signals in ein elektrisches Signal erfolgt mittels eines physikochemischen (z.B. amperometrischen, potentiometrischen oder konduktometrischen), piezoelektrischen, calorimetrischen oder optischen Transducers [203, 204]. Bei SPR-Biosensoren (SPR: surface plasmon resonance; Oberflächenplasmonresonanz) ist der Transducer ein Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskop und die zu messende Wechselwirkung ist eine spezifische Bindung der Substanz an das Biomolekül.

4.1 Aufbau und Prinzip von SPR-Biosensoren

Im folgenden Abschnitt wird zunächst schematisch die Funktionsweise von SPR-Biosensoren beschrieben und im Anschluss das Detektionsprinzip, sowie der Aufbau des verwendeten SPR-Biosensors eingehender erläutert. Danach wird auf die zeitaufgelöste Darstellung der Messdaten (Sensorgramm), die für diese Arbeit relevanten SPR-Biosensor-Assayformate, die Herstellung von Sensorchipoberflächen, sowie auf die Auswertung der Messdaten eingegangen.

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

4.1.1 Messprinzip

Da es sich bei dem verwendeten SPR-Biosensor um einen Resonanzwinkel-SPR-Biosensor mit Prismenkopplung nach Kretschmann und Raether handelt [205], wird nur auf diese, am weitesten verbreitete Bauart von Resonanzwinkel-SPR-Biosensoren eingegangen [206]. Für weitere Bauarten und Funktionsweisen (z.B. Resonanzwinkel-SPR mit Prismenkopplung nach Otto, spektrale SPR, localized SPR (LSPR)) sei auf weiterführende Literatur (z.B. [206-212]) verwiesen.

Vereinfacht betrachtet besteht ein SPR-Biosensor in Kretschmann-Raether-Konfiguration aus einem halbzyklindrischen Glasprisma, dessen plane Fläche mit einer dünnen Goldschicht (40-50 nm [206]) bedampft ist und eine der Wände einer Flusszelle bildet (s. Abbildung 12).

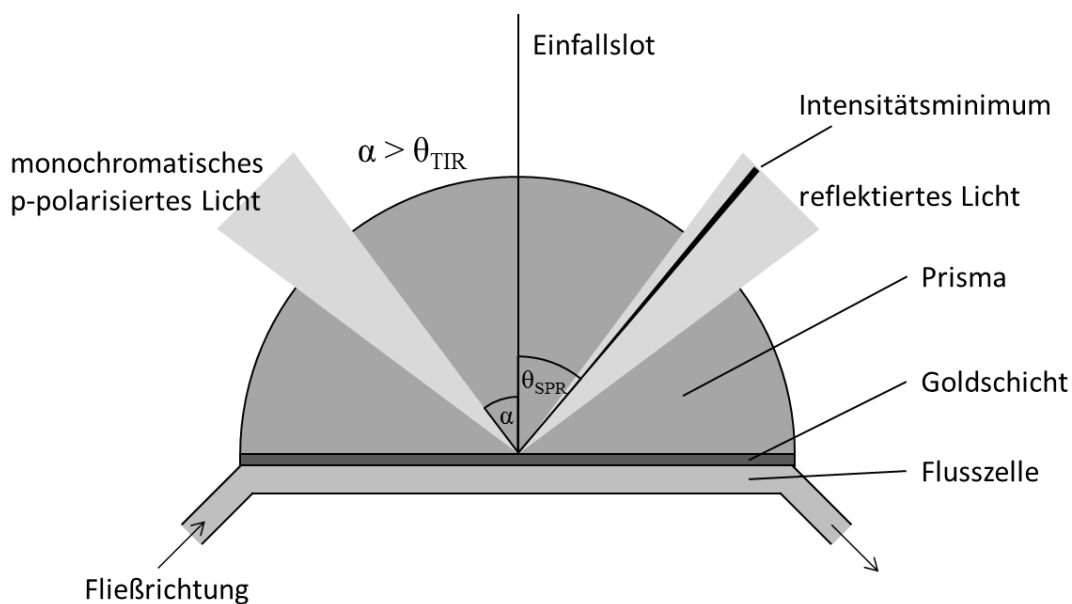


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines SPR-Biosensors (Erläuterungen s. Text)

Auf der Goldoberfläche ist einer der Interaktionspartner (z.B. im Falle einer Antigen-Antikörper-Wechselwirkung das Antigen oder der Antikörper), in diesem Kontext als Ligand bezeichnet, immobilisiert und steht in Kontakt mit der vorbeiströmenden Flüssigkeit in der Flusszelle. Durch das Glasprisma wird keilförmig p-polarisiertes, monochromatisches Licht (oder NIR-Strahlung - der Einfachheit halber wird im

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

Folgendes (nur noch von Licht gesprochen) auf die Grenzfläche Glas/Gold gestrahlt. Da die Einfallswinkel größer dem Grenzwinkel der Totalreflexion (θ_{TIR}) sind, wird das Licht vollständig an der Grenzfläche reflektiert. Die Intensität des reflektierten Lichts ist im Bereich eines bestimmten Ausfallswinkels verringert (abgeschwächte Totalreflexion (ATR)). Dies ist darauf zurückzuführen, dass im dementsprechenden Einfallswinkelbereich Oberflächenplasmonresonanz auftritt, also Photonen in Oberflächenplasmonen umgewandelt werden (hierauf wird später eingegangen). Der Winkel, bei dem das Maximum der Oberflächenplasmonresonanz und somit die maximale Intensitätsminderung des reflektierten Lichts auftritt (SPR-Winkel, θ_{SPR}), wird durch die dielektrischen Eigenschaften des Mediums nahe der Goldfläche beeinflusst. Durchströmt eine Lösung des zweiten Interaktionspartners, in diesem Kontext als Analyt bezeichnet, die Flusszelle, kann dieser an den Liganden binden und sich so an der Goldoberfläche anreichern, wodurch sich der Brechungsindex des angrenzenden Mediums ändert. Infolge dessen ändern sich die Resonanzbedingungen und somit auch der Winkel, bei dem das Intensitätsminimum der reflektierten Strahlung auftritt (s. Abbildung 13). Der Transducer eines SPR-Biosensors wandelt demnach das biologische Signal der Bindung des Analyten an den Liganden in ein optisches Signal (Änderung des SPR-Winkels) um.

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

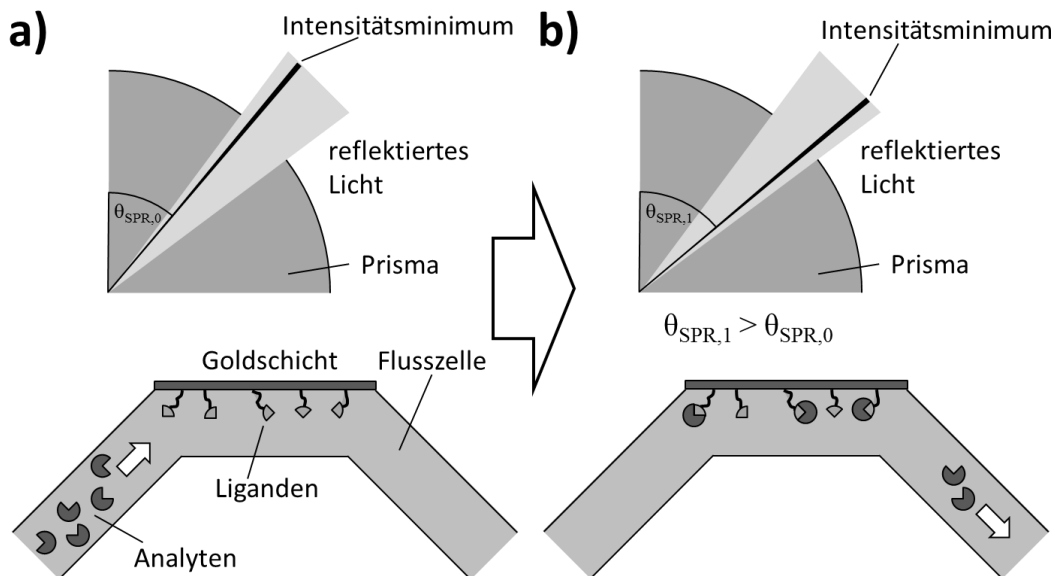


Abbildung 13: Vor Injektion einer Lösung des Analyten befinden sich auf der Goldoberfläche nur die immobilisierten Liganden; b) nach erfolgter Injektion der Analytlösung hat ein Teil der Analyten an die Liganden gebunden, wodurch der SPR-Winkel zugenommen hat.

Bei der Oberflächenplasmonresonanz werden an der Grenzfläche zwischen einem Metall und einem Dielektrikum (z.B. Luft oder Wasser) Photonen in Oberflächenplasmonen umgewandelt [213]. Es wird eine Elektronendichtewelle im Metall entlang seiner Oberfläche erzeugt. Der Begriff „Oberflächenplasmon“ beschreibt dabei, analog zu „Photon“ im Falle von Licht, den Teilchencharakter dieser Ladungsdichtewelle [214]. Eine Umwandlung der Photonen in Oberflächenplasmonen ist möglich, obwohl der Lichtstrahl an der Grenzfläche zwischen Glas und Gold reflektiert wird, also scheinbar nicht ins Gold eindringt. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich das Licht als inhomogene elektromagnetische Welle, die senkrecht zur Grenzfläche exponentiell abklingt (evaneszente Welle), im Gold ausbreitet [212]. Voraussetzung für die Umwandlung von Photonen in Oberflächenplasmonen ist, dass die Energie (Frequenz) und der Impuls in Ausbreitungsrichtung der Plasmonen (und somit die Vektorkomponente des Wellenvektors parallel zur Goldschicht; \vec{k}_x) von Plasmon und Photon identisch sind. Diese Voraussetzung ist am Schnittpunkt der Dispersionskurven für Licht und Oberflächenplasmonen erfüllt (s. Abbildung 14).

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

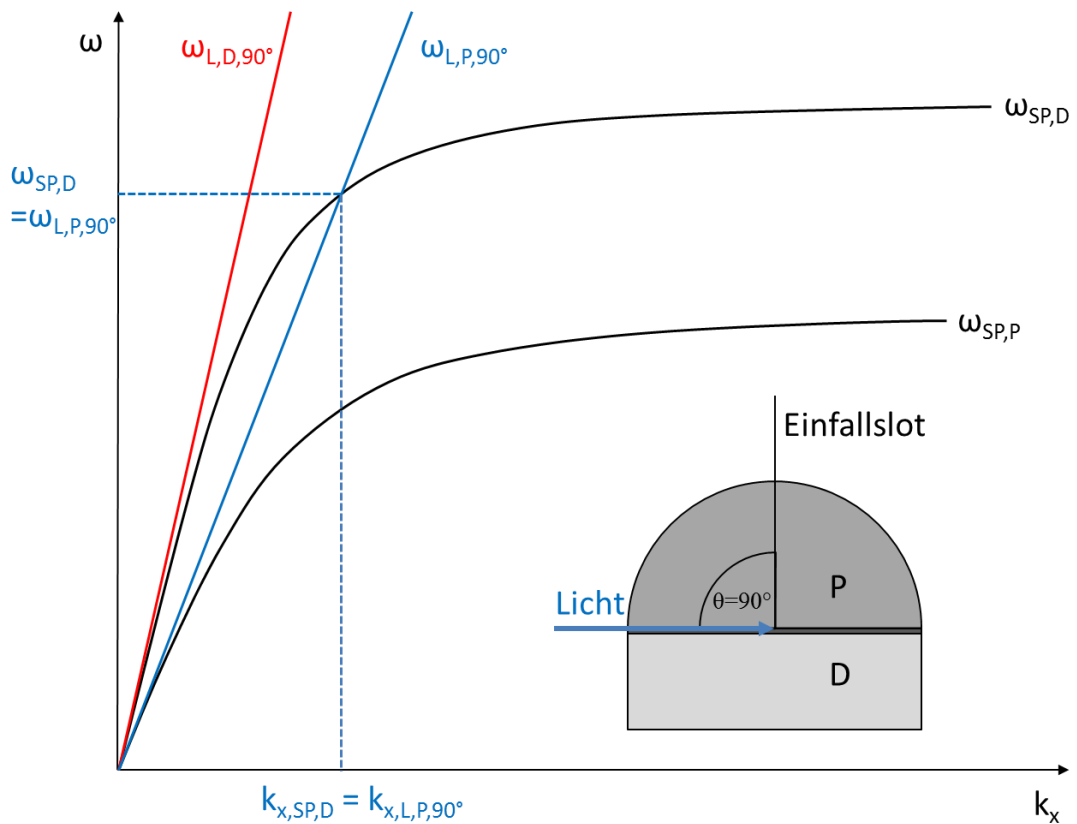


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Dispersionsrelation für Licht bei Ausbreitung im Glasprisma P ($\omega_{L,P,90^\circ}$) und im Dielektrikum D mit $n(D) < n(P)$ ($\omega_{L,D,90^\circ}$) und für Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche Gold/P ($\omega_{SP,P}$) oder Gold/D ($\omega_{SP,D}$). Der Einfallswinkel des Lichts beträgt 90° , somit ist $k_x = k$. In Anlehnung an Abb. 2.2 in [206] und Abb. 3 in [215].

Da sich die Dispersionskurven von Licht bei Ausbreitung im Dielektrikum D und von Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche Gold/D nicht schneiden, können Oberflächenplasmonen nicht durch direkte Einstrahlung von Licht auf die Goldoberfläche erzeugt werden [206]. Bei gleicher Frequenz ω von Licht und Oberflächenplasmonen ist k_x für das Photon stets kleiner, als für das Oberflächenplasmon (in Abbildung 14 ist die Lichtgerade für den Einfallswinkel $\theta = 90^\circ$ dargestellt, weshalb $k_x = k$ gilt. Für kleinere Winkel ergeben sich kleinere Werte für k_x , weshalb sich auch hier kein Schnittpunkt mit $\omega_{SP,D}$ ergibt). Eine Kopplung von Photonen mit Oberflächenplasmonen ist hingegen möglich, indem das Licht durch ein Prisma eingestrahlt wird [205, 215]. Der Betrag des Wellenvektors (Kreiswellenzahl) k steht mit der Ausbreitungsgeschwindigkeit c des Lichts im

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

Medium und seiner Kreisfrequenz ω in der Beziehung $k = \omega/c$ mit $c = c_0/n$ (c_0 : Vakuumlichtgeschwindigkeit; n : Brechungsindex). Somit lässt sich die Dispersionsrelation als $\omega = k * c_0/n$ (bzw. gleichbedeutend als $\omega = k * c_0/\epsilon^{1/2}$ mit ϵ der Dielektrizitätskonstante des Mediums [216]) formulieren, wobei die Steigung der Lichtgeraden c_0/n beträgt. Durch den größeren Brechungsindex des Prismenmaterials im Vergleich zum Dielektrikum D wird die Steigung der Lichtgeraden verringert ($\omega_{L,P,90^\circ}$ in Abbildung 14), wodurch ein Schnittpunkt mit der Dispersionskurve $\omega_{SP,D}$ entsteht und somit Oberflächenplasmonresonanz möglich ist. Auch die Steigung der Dispersionskurve von Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche Gold/Prisma ($\omega_{SP,P}$) ist gegenüber $\omega_{SP,D}$ verringert, wodurch sich kein Schnittpunkt zwischen $\omega_{L,P,90^\circ}$ und $\omega_{SP,P}$ ergibt. Deshalb können die Photonen des im Prisma total reflektierten Lichts nur mit Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche Gold/Dielektrikum D koppeln und nicht mit Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche Gold/Prisma. Daher ist es erforderlich, dass die Goldschicht dünner ist, als die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes des total reflektierten Lichts, welche in der Größenordnung von $\lambda/2$ liegt (bei SPR-Biosensoren des marktführenden Herstellers Biacore® (jetzt Teil von GE Healthcare) [206], wie auch beim in dieser Arbeit verwendeten Biacore Q®, dient eine NIR-LED als Strahlungsquelle, die Strahlung der Wellenlänge 760 nm emittiert [206, 212, 213, 217]) [206]. Aufgrund der exponentiellen Abnahme der Feldstärke mit wachsender Distanz zur Grenzfläche Prisma/Gold sind bei Verwendung von sichtbarem Licht oder IR-Strahlung Dicken der Metallschicht von mehr als 100 nm nicht mehr praktikabel [212].

Da das ins Prisma eingestrahlte Licht monochromatisch ist, ist die Kreisfrequenz ω konstant ($\omega_{L,P,\lambda}$ in Abbildung 15). In Abbildung 15 liegt der Schnittpunkt der Lichtgeraden $\omega_{L,P,90^\circ}$ (Einfall parallel zur Goldschicht) mit der Dispersionskurve der Oberflächenplasmonen ($\omega_{SP,D}$) nicht bei der Frequenz $\omega_{L,P,\lambda}$. Parallel einfallendes Licht der Wellenlänge λ erfüllt somit nicht die Resonanzbedingungen und es kommt nicht zur Oberflächenplasmonresonanz. Der Betrag k_x ist vom Einfallswinkel θ des Lichts abhängig. Der Wellenvektor \vec{k}_x ist die Vektorkomponente von \vec{k} parallel zur Goldschicht und somit ergibt sich $k_x = k * \sin(\theta)$. Daher nimmt die Steigung der Lichtgeraden hin zu kleineren Einfallswinkeln zu. Nur für einen bestimmten Einfallswinkel ($\theta = \alpha$ in Abbildung 15) sind die Resonanzbedingungen $\omega_{L,P} = \omega_{SP,D}$ und

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

$k_{x,SP,D} = k_{x,L,P}$ erfüllt und es kommt zur Oberflächenplasmonresonanz. Dieser Winkel entspricht dem SPR-Winkel ($\alpha = \theta_{SPR}$).

Bei SPR-Biosensoren wird p-polarisiertes Licht eingekoppelt. Grund hierfür ist, dass nur Licht mit einer elektrischen Feldkomponente senkrecht zur Oberfläche des Goldes Schwingungen in dessen Oberflächenladungsdichte anregen kann und p-polarisiertes Licht diese Bedingung erfüllt [206].

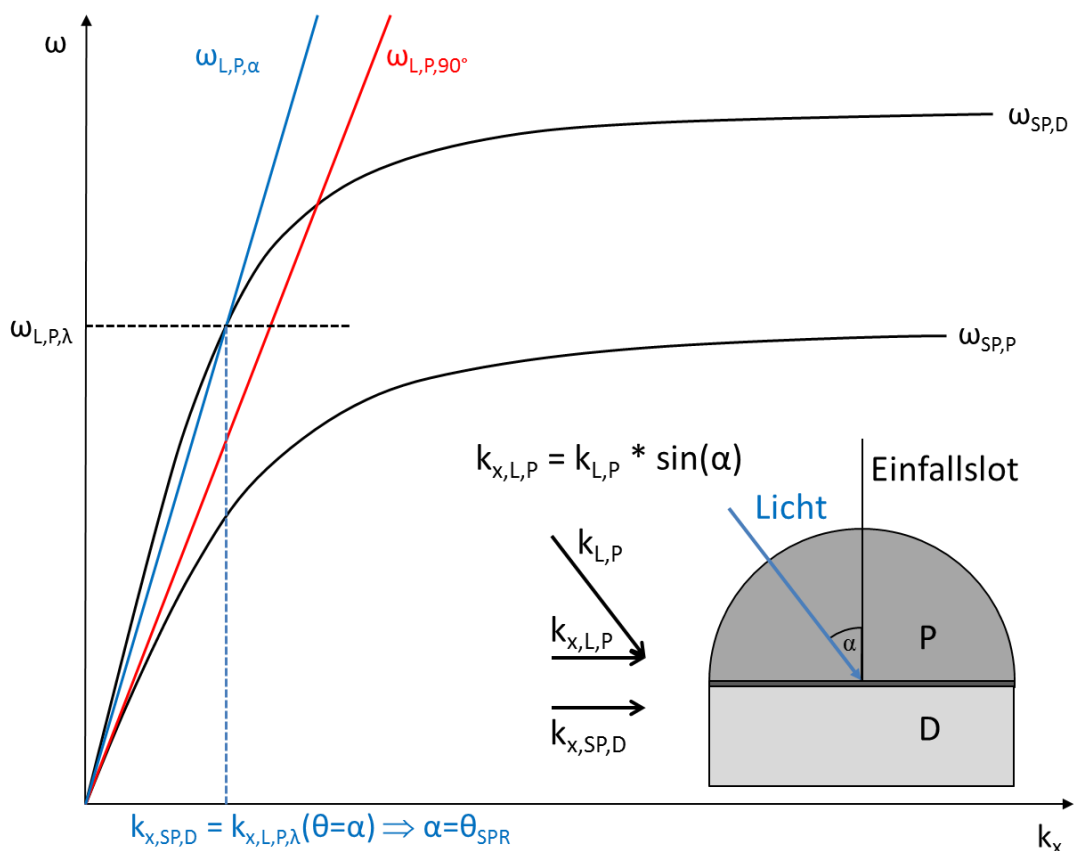


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Winkelabhängigkeit der SP-Resonanzbedingungen. Dispersionskurven $\omega_{SP,D}$, $\omega_{SP,P}$ und $\omega_{L,P,90^\circ}$ wie in Abbildung 14. $\omega_{L,P,\alpha}$ ist die Lichtgerade für Ausbreitung im Glasprisma bei einem Einfallswinkel $\theta = \alpha$. Bei monochromatischem Licht ($\omega = \omega_{L,P,\lambda}$) stimmen Frequenz und Impuls in Ausbreitungsrichtung x für Photon und Plasmon nur bei diesem Winkel überein. In Anlehnung an Abb. 2.2 in [206], Abb. 3 in [215] und Abb. 1 in [205].

Die Elektronendichtewelle an der Grenzfläche Gold/Dielektrikum erzeugt ein evaneszentes elektrisches Feld, das sich in beiden Richtungen ausbreitet. Die dielektrischen Eigenschaften des Mediums innerhalb dieses Feldes beeinflussen die

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

Ausbreitungsgeschwindigkeit der Elektronendichtewelle. Somit ist der Impuls der Oberflächenplasmonen abhängig von der Dielektrizitätskonstante bzw. dem Brechungsindex des an die Goldschicht angrenzenden Dielektrikums. Änderungen in der Zusammensetzung des Dielektrikums führen daher zu geänderten Resonanzbedingungen [218, 219]. Die Stärke des evaneszenten Feldes nimmt exponentiell mit dem Abstand zur Grenzfläche ab. Die Eindringtiefe des Feldes (also die Distanz, nach der sich die Amplitude der Welle auf den 1/e-ten Teil verringert hat [220]) hängt dabei von der Wellenlänge des eingekoppelten Lichts ab (in Tabelle 2 sind Eindringtiefen für das evaneszente Feld von Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche Gold/Wasser angegeben).

Tabelle 2: Eindringtiefen des evaneszenten Feldes von Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche Gold/Wasser in Abhängigkeit der Wellenlänge der eingekoppelten Photonen

Wellenlänge	630 nm*	648 nm**	700 nm***	850 nm*
Eindringtiefe in Gold [nm]	29	27	26	25
Eindringtiefe in Wasser [nm]	162	191	238	400

*: Daten aus [221]; **: Daten aus [220]; ***: Daten aus [206]

Es ist ersichtlich, dass die SP-Resonanzbedingungen vorrangig durch Veränderungen der Zusammensetzung des Dielektrikums nahe der Goldoberfläche beeinflusst werden (z.B. durch Bindung von Analyten an den immobilisierten Bindungspartner). Als Faustregel gilt, dass SPR-Biosensoren für die Detektion molekularer Prozesse innerhalb eines Abstands zur Metalloberfläche von maximal der halben Wellenlänge des eingekoppelten Lichts ausreichend empfindlich sind [206].

Bei den bisherigen Ausführungen wurde meist Bezug auf Metallschichten aus Gold genommen. Prinzipiell können durch Einkopplung von Licht durch ein Prisma auch an der Grenzfläche zwischen einem Dielektrikum und anderen Metallen (z.B. Platin, Silber, Kupfer, Aluminium [206, 212, 213, 216, 220, 222]) Oberflächenplasmonen

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

erzeugt werden. Für den Einsatz in SPR-Biosensoren sind allerdings nur Silber und Gold üblich. Silber bietet zwar einige günstigere Eigenschaften als Gold, wie z.B. eine größere Eindringtiefe des evaneszenten Feldes und einen schärfer abgegrenzten SPR-Winkel, Gold ist allerdings aufgrund seiner chemischen Inertheit häufig vorteilhafter [206, 220].

4.1.2 Der verwendete SPR-Biosensor

In Abbildung 16 ist der Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten SPR-Biosensors Biacore Q[®] (Biacore AB, Uppsala, Schweden) schematisch dargestellt.

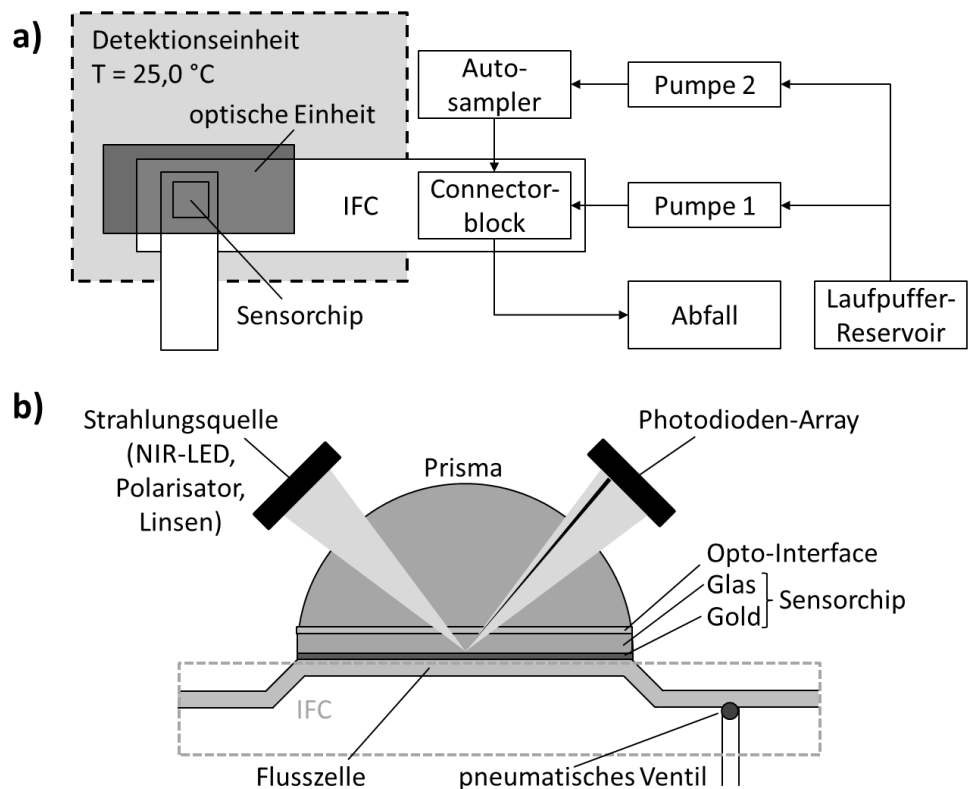


Abbildung 16: a) Schematische Darstellung des SPR-Biosensors Biacore Q[®]; b) Detailliertere Darstellung der Detektionseinheit aus Teilabbildung a); in Anlehnung an Abb. 1 in [223] und Abb. B-1 in [217]

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

Der Transducer besteht, in Abweichung zur schematisierten Abbildung 12, nicht aus einem Prisma, auf das eine Goldschicht direkt aufgebracht ist, sondern die Goldschicht befindet sich auf einem auswechselbaren Glaschip ("Sensorchip"). Der Sensorchip ist in einen Kunststoffrahmen eingebaut, der zum Schutz vor Schäden und Verunreinigung in eine Kassette eingeschoben ist. Die Kassette wird in eine Führungsschiene in einer thermisch isolierten Schleuse gelegt und durch einen Führungsstift der Kunststoffrahmen aus der Kassette geschoben, wodurch der Sensorchip innerhalb der Detektionseinheit zwischen Optointerface und IFC (s.u.) genau in Position gebracht wird. Die Zufuhr von Lösungen zum Sensorchip erfolgt mittels eines als „Integrated μ -Fluidic Cartridge“ (IFC) bezeichneten mikrofluiden Systems. Die IFC besteht aus einem harten Kunststoffgehäuse, in dem sich ein Bauteil aus Silikonkautschuk befindet. Im Kunststoffgehäuse ist eine Erhebung mit Aussparungen vorhanden, die bei Kontakt mit der goldbeschichteten Seite des Sensorchips vier parallele Flusszellen (Länge * Breite * Höhe: 2,4 mm * 0,5 mm * 0,05 mm; Volumen: 60 nL [217]) bildet, die jeweils auf einer Seite durch den Sensorchip begrenzt sind (s. Abbildung 17). Jede dieser vier Flusszellen kann einzeln angesteuert werden (eine gleichzeitige Ansteuerung mehrerer Flusszellen ist bei der Biacore Q[®] jedoch nicht möglich). Die Ansteuerung der vier Flusszellen erfolgt durch ein System von feinen Kanälen und pneumatischen Ventilen im Silikonkautschuk.

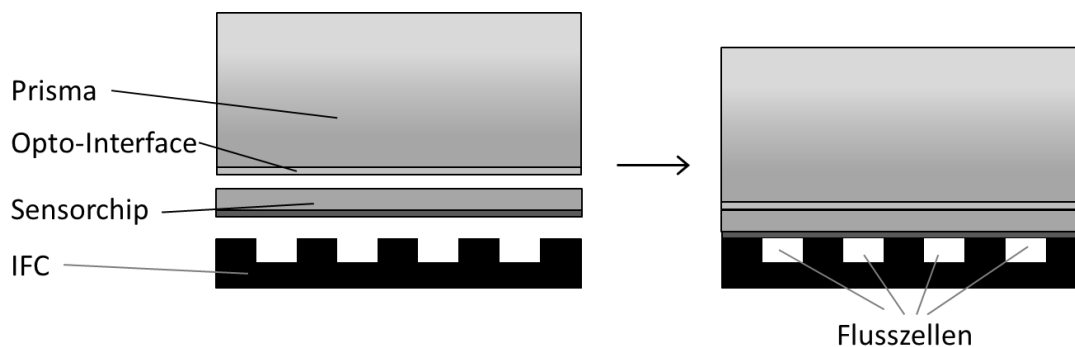


Abbildung 17: Durch Absenken der optischen Einheit wird das Prisma mit dem Opto-Interface gegen die Rückseite des Sensorchips und die Vorderseite des Sensorchips gegen die IFC gepresst, wodurch 4 Flusszellen entstehen. Perspektive im Vergleich zu Abbildung 16 b um 90° gedreht; in Anlehnung an Abb. 3.9 in [206]

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

Der Sensorchip wird über ein als "Opto-Interface" bezeichnetes Bauteil mit dem Prisma verbunden. Das Opto-Interface ist eine Glasplatte, die lückenlos auf dem Prisma aufliegt und auf die eine dünne Schicht eines Silikonpolymers aufgebracht ist, dessen Brechungsindex dem des Glases entspricht [219]. Nach Einsetzen des Sensorchips in den Einbauschacht wird die optische Einheit auf den Chip abgesenkt und so die Silikonschicht auf die Rückseite (Glasseite) und die IFC gegen die Vorderseite (Goldseite) des Sensorchips gepresst, wodurch zwischen dem Prisma und dem Glaschip ein exakter optischer Kontakt gewährleistet wird und das fluide System abgedichtet wird.

Die IFC wird von zwei pulsationsfreien Spritzenpumpen mit Lösungen versorgt. Die erste Pumpe ist direkt über den „Connectorblock“ (Aufsatz auf der IFC mit Schraubanschlüssen für Kapillaren und einem Injektionsport) mit der IFC verbunden und dient der Zufuhr von Laufpuffer. Eine zweite Spritzenpumpe ist Teil eines Autosamplers und ermöglicht die Injektion von Lösungen aus Vials oder Mikrotiterplatten in den Injektionsport, sowie das Mischen von Reagenzien vor der Injektion.

Als Strahlungsquelle dient eine NIR-LED, die Strahlung der Wellenlänge 760 nm emittiert [217]. Die Strahlung wird durch Polarisationsfilter p-polarisiert und durch ein Linsensystem keilförmig in das halbzyklindrische Prisma eingestrahlt [206]. Die reflektierte Strahlung wird durch ein Photodioden-Array orts aufgelöst detektiert [206, 213, 219]. Die optische Auflösung des Photodioden-Arrays entspricht einer Winkeländerung von $0,1^\circ$, durch Interpolation wird die Genauigkeit der Bestimmung von θ_{SPR} auf $0,0001^\circ$ verbessert [219].

Die gesamte Detektionseinheit ist thermisch isoliert und wird auf konstant $25,0^\circ\text{C}$ (Genauigkeit besser $\pm 0,1^\circ\text{C}$) thermostatisiert [217].

4.1.3 Das Sensorgramm

Die zeitlich aufgelöste Auftragung der Messdaten von SPR-Biosensoren wird als Sensorgramm bezeichnet. Bei Resonanzwinkel-SPR-Biosensoren wird entweder die Änderung der Reflektivität bei konstantem Ausfallswinkel oder die SPR-Winkeländerung gegen die Zeit aufgetragen, wobei Letztgenanntes aufgrund des

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

praktisch linearen Zusammenhang zwischen gebundener Analytmenge und Signaländerung am häufigsten Anwendung findet (so auch bei dem verwendeten SPR-Biosensor) [206]. Abbildung 18 c zeigt ein Sensorgramm für eine Injektion eines Analyten für 250 s ($t = 0$ bis 250 s). Zur Veranschaulichung des Zustandekommens des Sensorgramms ist der Zustand der Sensorchipoberfläche zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (Abbildung 18 a) und die daraus resultierende Verschiebung des Reflektivitätsminimums (Abbildung 18 b) dargestellt.

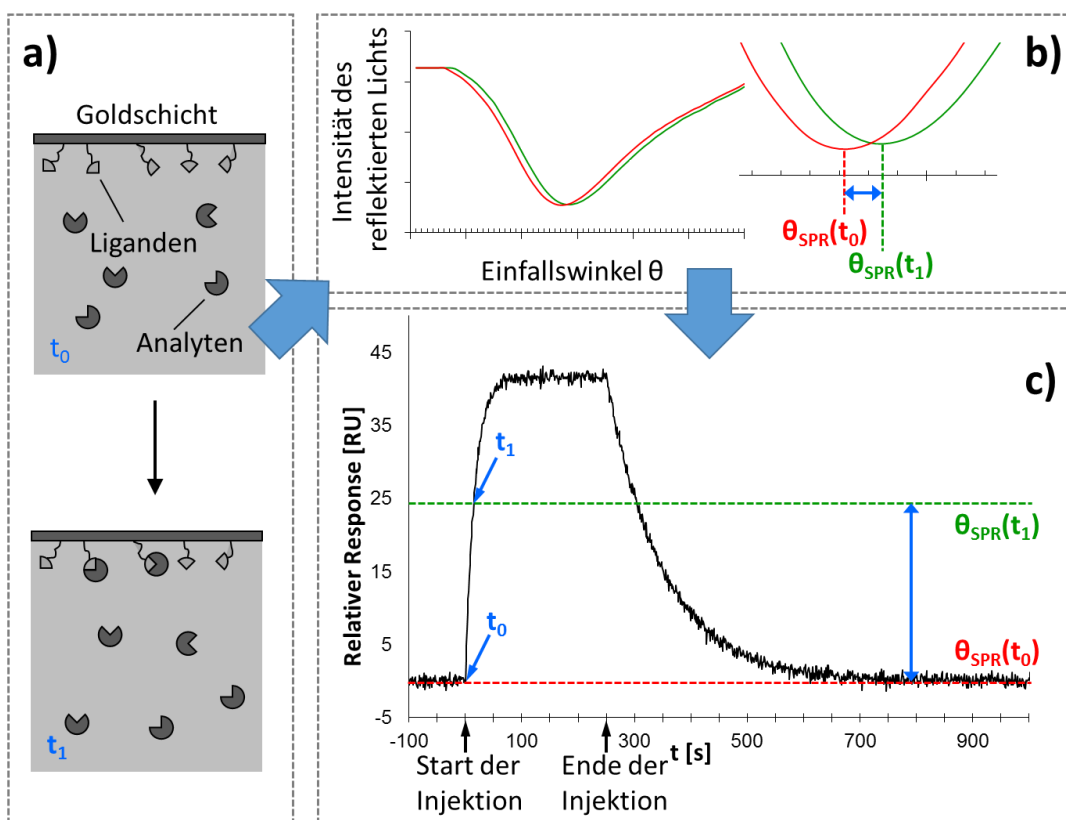


Abbildung 18 - Visualisierung der Messdaten: a) Sensorchipoberfläche unmittelbar nach Beginn der Injektion einer Analyt-Lösung (t_0 – bislang hat kein Analyt gebunden) und einige Sekunden später (t_1); b) dargestellt ist die Intensität des reflektierten Lichts in Abhängigkeit des Ausfallswinkels (rot: zum Zeitpunkt t_0 , grün: t_1 ; rechts vergrößerter Ausschnitt); c) Eine Auftragung des SPR-Winkels (\triangleq Reflektivitätsminimum in Teilabbildung b)) in der Einheit Resonance Units gegen die Zeit wird als Sensorgramm bezeichnet (Im abgebildeten Sensorgramm ist nicht der absolute, sondern der relative Response angegeben – s. hierzu Erläuterungen im Text).

Zum Zeitpunkt t_0 unmittelbar nach Beginn der Injektion ist noch kein Analyt an die Liganden auf der Chipoberfläche gebunden. Im Laufe der Injektion nimmt die Menge

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

an gebundenen Analytmolekülen zu (exemplarisch Zeitpunkt t_1), wodurch das Reflektivitätsminimum hin zu größeren Ausfallswinkeln verschoben wird. Eine Auftragung des SPR-Winkels in der Einheit „Resonance Units“ (RU; $1 \text{ RU} \triangleq 0,0001^\circ$ [219]) gegen die Zeit ergibt das Sensorgramm (Abbildung 18 c). Der Messwert von SPR-Biosensoren wird allgemein als „Response“ bezeichnet, wobei bei dem dargestellten Sensorgramm nicht der absolute, sondern der relative Response aufgetragen wurde. Das heißt, für sämtliche Messpunkte wurde der Response zu einem definierten Zeitpunkt subtrahiert. Der absolute Response von SPR-Biosensoren liegt in der Größenordnung mehrerer 10.000 RU, wobei die Änderungen des Response im Lauf der Analyse in der Regel weniger als 1000 RU beträgt. Der relative Response ist somit ein anschaulicheres Maß, als der absolute Response. In diesem Fall wurde der Zeitpunkt unmittelbar vor Beginn der Injektion als Bezugspunkt gewählt, sodass ein relativer Response von 0 dem Fall entspricht, dass kein Analyt gebunden ist.

Bei SPR-Biosensoranalysen erfolgt die Injektion des Analyten über einen definierten Zeitraum, wobei in dieser Zeit anstelle des Laufpuffers die Analytlösung über die Chipoberfläche strömt (im Gegensatz zu z.B. chromatographischen Verfahren, bei denen der Analyt schnellstmöglich in den Strom der mobilen Phase injiziert wird). Während der als Assoziationsphase bezeichneten ersten Phase der Analytinjektion steigt die Konzentration der Ligand-Analyt-Komplexe und somit auch der Response kontinuierlich an ($t = 0$ bis ca. $t = 100$ s in Abbildung 18 c). Nach einiger Zeit erreicht der Response einen konstanten Wert – es hat sich ein Fließgleichgewicht („Steady State“) eingestellt (ab ca. $t = 100$ s in Abbildung 18 c). Nach Beendigung der Injektion (ab $t = 250$ s in Abbildung 18 c) dissoziieren die gebildeten Komplexe und die Analyten werden mit dem Laufpuffer von der Chipoberfläche gespült, wodurch der Response exponentiell abfällt (Dissoziationsphase).

Die sich für jede zu analysierende Lösung wiederholende Abfolge von Injektionen (Analytlösung, Regenerationslösung (s.u.) und ggf. weitere erforderliche Lösungen) wird als Zyklus bezeichnet.

Die Form des Sensorgramms lässt sich mit Hilfe der zugrundeliegenden Bindungskinetik beschreiben [224, 225]: Für eine Ligand-Analyt-Interaktion, die einer einfachen 1:1-Stöchiometrie folgt, lässt sich die Änderung der Konzentration des

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

gebildeten Komplexes [LA] mit der Zeit als eine Funktion der Analytkonzentration [A] in der injizierten Lösung, der Konzentration an verbleibendem, unbesetztem Liganden [L] auf der Chipoberfläche und der Geschwindigkeitskonstanten k_a und k_d ausdrücken, wobei folgende Differentialgleichung erhalten wird:

$$\frac{d[LA]}{dt} = k_a * [L] * [A] - k_d * [LA] \quad (4.1)$$

Da die injizierte Analytlösung kontinuierlich ersetzt wird, kann die Konzentration des Analyten während der gesamten Injektion als konstant angesehen werden und der Ausdruck $k_a * [A]$ durch die resultierende scheinbare Assoziationsratenkonstante k_a' ersetzt werden:

$$\frac{d[LA]}{dt} = k_a' * [L] - k_d * [LA] \quad (4.2)$$

Im Laufe der Injektion verringert sich [L], während sich [LA] erhöht, was in einer Abnahme der Bildungsrate von [LA] resultiert, bis [LA] schließlich eine Fließgleichgewichtskonzentration erreicht (ab ca. $t = 100$ s in Abbildung 18 c):

$$k_a' * [L] = k_d * [LA] \quad (4.3)$$

$$\Rightarrow \frac{d[LA]}{dt} = 0 \quad (4.4)$$

Mit $[L] = [L]_0 - [LA]$ ($[L]_0$: Gesamtkonzentration des Liganden) kann Gleichung 4.2 wie folgt umgeformt werden:

$$\begin{aligned} \frac{d[LA]}{dt} &= k_a' * [L]_0 - k_a' * [LA] - k_d * [LA] \\ &= k_a' * [L]_0 - (k_a' + k_d) * [LA] \end{aligned} \quad (4.5)$$

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

Unter Berücksichtigung des Massenwirkungsgesetzes für das Bindungsereignis ($K_D' = k_d/k_a' = [L]_{eq}/[LA]_{eq}$) und des Zusammenhangs $[L]_{eq} = [L]_0 - [LA]_{eq}$ kann der Ausdruck $[L]_0$ durch den Ausdruck $[LA]_{eq} * (1 + k_d/k_a')$ ersetzt werden ($[L]_{eq}$ und $[LA]_{eq}$ sind die jeweiligen Gleichgewichtskonzentration):

$$\begin{aligned}
 \frac{d[LA]}{dt} &= k_a' * [LA]_{eq} * \left(1 + \frac{k_d}{k_a'}\right) - (k_a' + k_d) * [LA] \\
 &= (k_a' + k_d) * [LA]_{eq} - (k_a' + k_d) * [LA] \\
 &= (k_a' + k_d) * ([LA]_{eq} - [LA]) \tag{4.6}
 \end{aligned}$$

Variablentrennung und unbestimmte Integration ergibt:

$$-\ln([LA]_{eq} - [LA]) = (k_a' + k_d) * t + C \tag{4.7}$$

Die Integrationskonstante C kann durch Einsetzen der Zahlenwerte für den Beginn der Injektion ($t = 0$; $[LA] = 0$) erhalten werden. Einsetzen in Gleichung 4.7 ergibt:

$$\begin{aligned}
 -\ln([LA]_{eq} - [LA]) &= (k_a' + k_d) * t - \ln([LA]_{eq}) \\
 \Leftrightarrow \ln([LA]_{eq}) - \ln([LA]_{eq} - [LA]) &= (k_a' + k_d) * t \tag{4.8}
 \end{aligned}$$

$$\Rightarrow \frac{[LA]_{eq}}{[LA]_{eq} - [LA]} = e^{[(k_a' + k_d) * t]} \tag{4.9}$$

Durch Umformung von Gleichung 4.9 wird die folgende integrierte Geschwindigkeitsgleichung erhalten:

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

$$\frac{[LA]_{eq}}{[LA]_{eq} - [LA]} = e^{[(k'_a + k_d) * t]}$$

$$\Leftrightarrow [LA] * e^{[(k'_a + k_d) * t]} = [LA]_{eq} * e^{[(k'_a + k_d) * t]} - [LA]_{eq}$$

$$\Leftrightarrow [LA] = [LA]_{eq} - [LA]_{eq} * e^{-[(k'_a + k_d) * t]}$$

$$\Leftrightarrow [LA] = [LA]_{eq} * \left(1 - e^{-[(k'_a + k_d) * t]}\right)$$

$$= [LA]_{eq} * \left(1 - e^{-[(k'_a * [A] + k_d) * t]}\right) \quad (4.10)$$

Während der Injektion (Assoziationsphase und Fließgleichgewicht) lässt sich demnach das Sensorgramm durch die Exponentialfunktion 4.10 beschreiben (der Response und [LA] sind linear korreliert). Nach Beendigung der Injektion ($t = 250$ s in Abbildung 18 c) wird die Analytlösung schlagartig durch Laufpuffer ersetzt, wodurch die Analytkonzentration auf 0 sinkt und sich Gleichung 4.1 zu dem folgenden Ausdruck vereinfacht:

$$\frac{d[LA]}{dt} = -k_d * [LA] \quad (4.11)$$

Variablentrennung und unbestimmte Integration von Gleichung 4.11 ergibt

$$\ln[LA] = -k_d * t + C \quad (4.12)$$

Dieser Ausdruck lässt sich, analog zu Gleichung 4.10, in die integrierte Geschwindigkeitsgleichung überführen (die Integrationskonstante C wird wiederum durch Einsetzen der Zahlenwerte für das Ende der Injektion ($t = t_0$; $[LA] = [LA]_0$) erhalten):

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

$$\begin{aligned}\ln[LA] &= -k_d * t + \ln[LA]_0 + k_d * t_0 \\ &= \ln[LA]_0 - k_d * (t - t_0)\end{aligned}\quad (4.13)$$

$$\Rightarrow [LA] = [LA]_0 * e^{-k_d * (t - t_0)} \quad (4.14)$$

Somit ist, unabhängig von der Konzentration der zuvor injizierten Analytlösung, die Dissoziationsrate der Ligand-Analyt-Komplexe eine Funktion der Dissoziationsratenkonstante k_d und der Konzentration des Komplexes $[LA]$, weshalb die Sensorgramme für verschiedene Konzentrationen desselben Analyten in der Dissoziationsphase dieselbe Form aufweisen.

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

4.1.4 Assayformate

Für die Konzentrationsanalyse mit SPR-Biosensoren sind verschiedene Assayformate gebräuchlich [206, 209, 226]. Das einfachste Assayformat ist der direkte Assay, bei dem der biomolekulare Erkennungspartner als Ligand auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert ist und eine Lösung des Analyten injiziert wird (s. Abbildung 19).

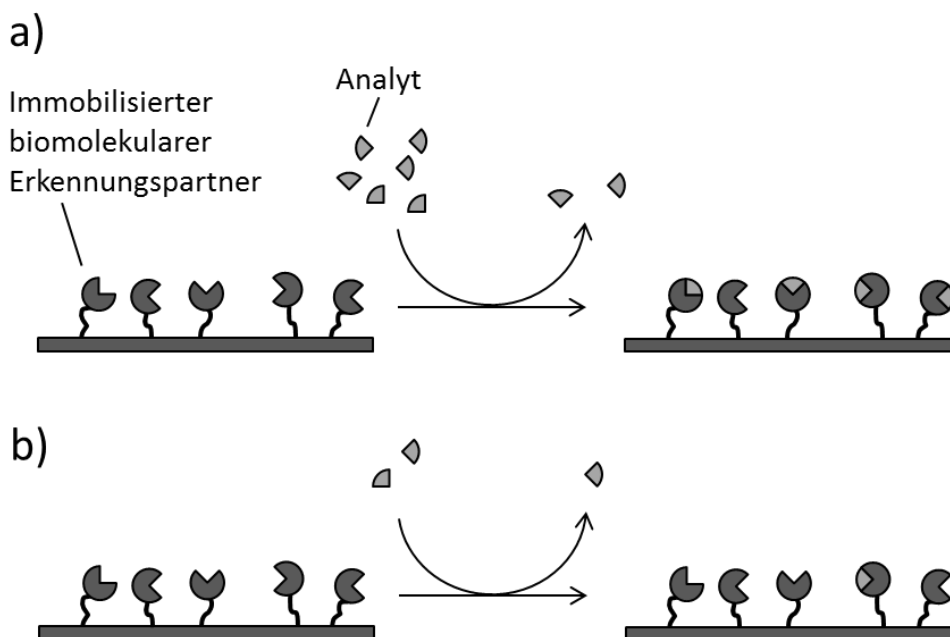


Abbildung 19 - Direkter Assay: Analyt aus der Probe bindet direkt an den immobilisierten biomolekularen Erkennungspartner. Proben mit hoher Analytkonzentration (a) ergeben höhere Bindungslevel, als Proben mit niedriger Analytkonzentration (b).

Die Analyten binden an die immobilisierten biomolekularen Erkennungspartner, wobei die Konzentration der gebundenen Analyten (bzw. der gebildeten Analyt-Ligand-Komplexe) zu jedem beliebigen Zeitpunkt von der Konzentration des Analyten in der injizierten Lösung abhängt (s. Gleichung 4.10). Für die quantitative Auswertung wird der Response zu einem definierten Zeitpunkt gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen; der Response zu diesem gegebenen Zeitpunkt wird als Bindungslevel bezeichnet. Zwar ist es nicht erforderlich, dass der Bindungslevel im Fließgleichgewichtszustand gemessen wird, im Sinne der Robustheit des Assays

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

sollte aber für alle relevanten Konzentrationen die späte Assoziationsphase mit geringer Steigung erreicht sein [226]. Da sich der Bindungslevel direkt proportional zur Konzentration des Analyten verhält, wird dieser Assay als direkter Assay bezeichnet. Eine Abwandlung des direkten Assays stellt der Sandwich-Assay (direkter Assay mit Verstärkung) dar, bei dem nach (vorzugsweise hochaffiner) Bindung des Analyten ein zweiter biomolekularer Erkennungspartner an den Analyten bindet, was zu einer Verstärkung des Bindungssignals führt. Die Anwendbarkeit dieses Assays für kleinere Analyten ist allerdings stark eingeschränkt, da der Analyt über zwei voneinander unabhängige Bindungsstellen verfügen muss, die ausreichend weit voneinander entfernt sind, um sterische Hinderung der Bindung des zweiten Erkennungspartners zu vermeiden [226].

Neben den direkten Assayformaten gibt es auch zwei indirekte Assayformate. Man unterscheidet zwischen dem Inhibitions-Assay (oder Lösungskompetitions-Assay) und dem Oberflächenkompetitions-Assay. Beim Inhibitions-Assay wird der zu quantifizierende Analyt oder ein geeignetes Derivat auf der Chipoberfläche immobilisiert (Ligand). Eine zu untersuchende Lösung des Analyten wird mit dem biomolekularen Erkennungspartner⁶ gemischt. Entsprechend der Bindungsaffinität stellt sich ein Gleichgewicht zwischen freiem Erkennungspartner und dem Komplex aus Analyt und Erkennungspartner ein. Anschließend wird die Lösung injiziert und fließt über die Chipoberfläche, wobei freie Erkennungspartner an den immobilisierten Analyten auf der Chipoberfläche binden können (s. Abbildung 20).

⁶ Der frei in Lösung vorliegende Bindungspartner, also in diesem Fall der biomolekulare Erkennungspartner des Analyten, wird zwar im Kontext mit SPR-Biosensoren auch als „Analyt“ bezeichnet. Um Verwechslungen zu vermeiden, wird dieser Begriff aber im Folgenden nur für die zu quantifizierende Substanz verwendet.

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

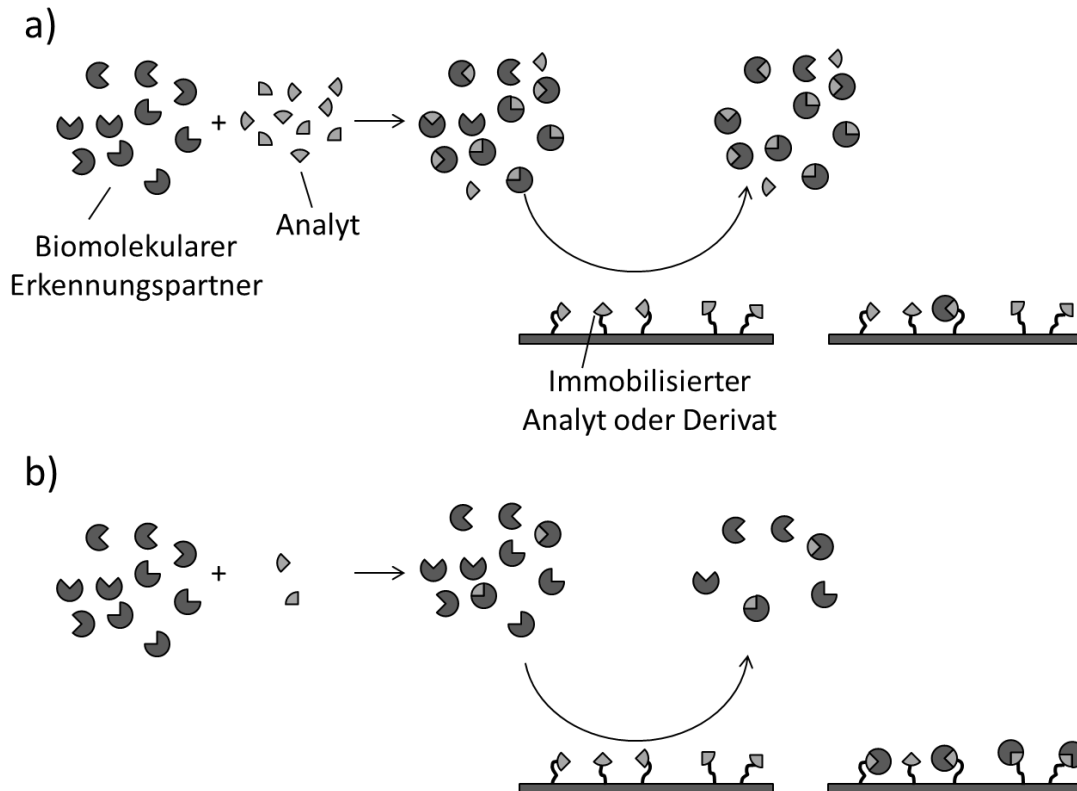


Abbildung 20 - Inhibitions-Assay: Analyt aus der Probe konkurriert mit immobilisiertem Analyten um die biomolekularen Erkennungspartner. Dargestellt sind die Verhältnisse für eine hohe (a) und eine niedrige (b) Analytkonzentration in der Probe.

Im Falle einer hohen Analytkonzentration in der Probe (Abbildung 20 a) ist der Anteil an freiem Erkennungspartner in der injizierten Lösung gering, sodass nur eine geringe Menge an Erkennungspartner an den Analyten auf der Chipoberfläche binden kann. Im Falle einer niedrigeren Analytkonzentration in der Probe hingegen (Abbildung 20 b) liegt im Gleichgewicht eine größere Konzentration an freiem Erkennungspartner in der injizierten Lösung vor. Daher binden mehr Erkennungspartner an den immobilisierten Analyten, was in einem höheren Bindungslevel resultiert. Das SPR-Signal beim Inhibitions-Assay ist folglich reziprok proportional zur Konzentration des Analyten. Der Inhibitions-Assay wird auch als kompetitiver Assay bezeichnet, da der Analyt aus der Probe mit immobilisiertem Analyten um die biomolekularen Erkennungspartner konkurriert.

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

Beim Oberflächenkompetitions-Assay ist der biomolekulare Erkennungspartner der Ligand. Analyt aus der Probe konkurriert mit einem zugesetzten, hochmolekularen Konjugat des Analyten um die Bindungsstellen des Liganden. Beide kompetitiven Assays haben gemeinsam, dass anstelle der Bindung des Analyten aus der Probe die Bindung eines hochmolekularen Interaktionspartners detektiert wird. Da der SPR-Response massenabhängig ist (für Proteine z.B. führt eine Änderung der Oberflächenkonzentration um 1 ng/mm^2 zu einer Signaländerung von ca. 1000 RU [219]), sind kompetitive Assays somit für den Nachweis niedermolekularer Substanzen empfindlicher, als direkte Assays, welche in der Regel nur für Analyten mit einem Molekulargewicht $>5000 \text{ Da}$ angewendet werden [218, 226].

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

4.1.5 Sensorchipoberflächen

Für einen SPR-Biosensor-Assay muss einer der Interaktionspartner als Ligand auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert werden. Zwar ist es möglich, Proteine an einer Goldoberfläche direkt zu adsorbieren, einige Proteine denaturieren aber auf der Goldoberfläche oder bilden keine homogenen Schichten. Außerdem ist die Menge an immobilisiertem Liganden sehr gering, niedermolekulare Liganden werden meist nicht adsorbiert und die Bindung ist reversibel. Darüber hinaus werden an der Goldoberfläche auch andere Substanzen adsorbiert, wie zum Beispiel Matrixbestandteile oder sogar der frei in Lösung vorliegende Interaktionspartner. Daher ist es unüblich, die Liganden direkt an der Goldschicht zu adsorbieren [227]. Stattdessen werden chemisch modifizierte Goldoberflächen verwendet.

Die gebräuchlichste Sensorchipmodifikation ist Carboxymethyldextran (CMD) [206, 228]. CMD bietet die Vorteile, dass durch seine dreidimensionale Struktur und durch pH-abhängige Vorkonzentrierung des Liganden (s.u.) mit geringem Materialverbrauch hohe Oberflächenkonzentrationen des Liganden erzielt werden können und dass es bei hoher Ionenstärke im Laufpuffer (wie bei SPR-Analysen üblich) eine geringe unspezifische Bindung von Matrixbestandteilen aufweist sowie gegenüber Säuren und Laugen stabil ist (relevant für die Regeneration der Oberfläche - s. Abschnitt 4.1.6) [227]. Außerdem ist das CMD weder verzweigt, noch quervernetzt, wodurch es ein niedrigviskoses Hydrogel bildet, in dem sich der Ligand wie in Lösung verhält, was den direkten Vergleich mit Verfahren erlaubt, die die Interaktion beider Bindungspartner in Lösung untersuchen (wie z.B. isotherme Titrationskalorimetrie) [227, 229-231]. Im Folgenden wird die Herstellung einer CMD-Chipoberfläche beschrieben [227] (s. Abbildung 21):

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

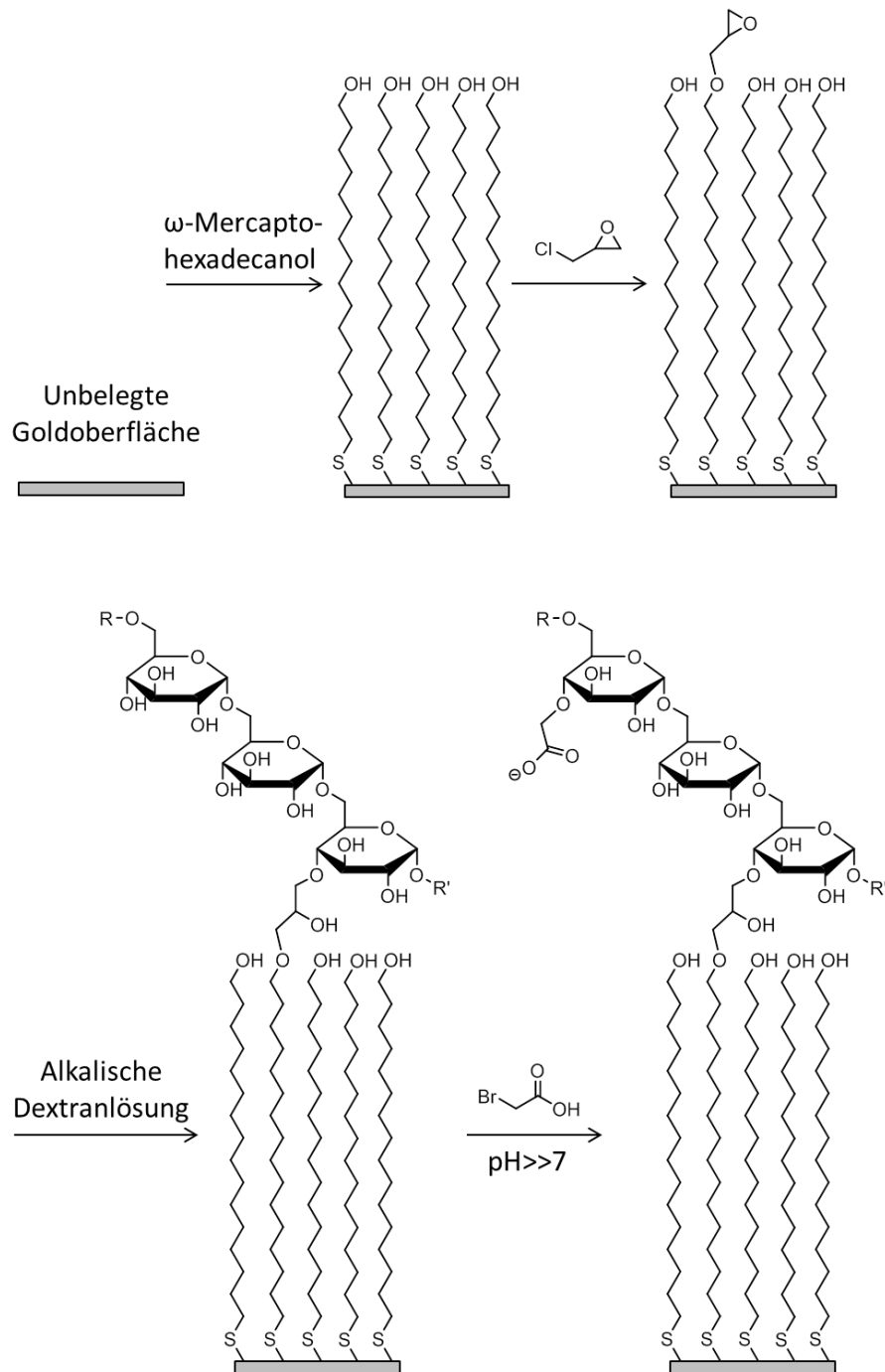


Abbildung 21: Schema der Reaktionsfolge zur Herstellung eines CMD-Chips, wie in [227] beschrieben (R; R': Reste des Dextranpolymers)

Zunächst wird die saubere goldbeschichtete Oberfläche (z.B. mit Peroxoschwefelsäure gereinigt [232, 233]) des Sensorchips mit einer Lösung von

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

ω -Mercaptohexadecanol in Ethanol/Wasser 80:20 (v/v) behandelt. Das ω -Mercaptohexadecanol bindet nach Abspaltung von atomarem Wasserstoff als Thiolat an die Goldoberfläche [234] und bildet eine selbstorganisierende Monoschicht (SAM: self-assembled monolayer) aus. Durch Umsetzung mit Epichlorhydrin im Alkalischen wird ein Teil der Alkoholfunktionen der SAM mit reaktiven Epoxidgruppen funktionalisiert. An diese Epoxidgruppen bindet Dextran, das in alkalischer Lösung auf den Chip gebracht wird. Durch Behandlung mit Bromessigsäure wird ein Teil der Alkoholfunktionen des Dextrans in Carboxymethylether überführt. So wird eine CMD-Sensorchipoberfläche erhalten, die im gequollenen Zustand mit einem ca. 100 nm dicken (variiert je nach pH und Ionenstärke) Hydrogel bedeckt ist. Über die Carbonsäurefunktionen des CMD können Liganden kovalent immobilisiert werden, die über eine Amino-, Thiol- oder Aldehydfunktion verfügen (s.u.).

Neben CMD eignen sich auch weitere Polysaccharide (z.B. Carboxymethylcellulose, Pektin, Heparin oder Hyaluronsäure) oder andere Polymere, wie zum Beispiel Polyethylenglykol, Polyacrylsäure, Polyvinylalkohol oder Poly-L-Lysin als bio-inerte Hydrogele. Die Dicken der verwendeten Hydrogele betragen üblicherweise 20 nm bis 200 nm [206]. Auch die bereits im Zusammenhang mit der Herstellung von CMD-Chips erwähnten SAMs werden als Chipoberflächen genutzt, wobei z.B. durch Mischung des ω -Mercaptoalkanols mit entsprechend ω -funktionalisierten Alkanthiolen (z.B. mit Amino- oder Carbonsäurefunktion) homogene Oberflächen erhalten werden, die für verschiedene kovalente Immobilisierungstechniken zugänglich sind [232, 233]. Darüber hinaus sind Chipoberflächen verfügbar, die die Einbettung von Liganden in Lipidschichten oder -membranen erlauben [206, 212, 231]. Als Biosensorchip-Oberflächen im weiteren Sinne sind auch MIPs gebräuchlich [235-237].

Da die Aminkopplung die gebräuchlichste kovalente Immobilisierungstechnik ist [206, 238, 239] und in dieser Arbeit angewendet wurde, wird hierauf näher eingegangen (für Thiol- und Aldehydkopplung sei auf weiterführende Literatur verwiesen, z.B. [206, 231, 240]). Die Carbonsäurefunktionen der Sensorchipoberfläche werden in aktive Ester überführt, die dann mit primären

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

Aminofunktionen des Liganden reagieren. In Abbildung 22 ist die Reaktionsfolge bei der Aminkopplung dargestellt [206, 212, 231, 241].

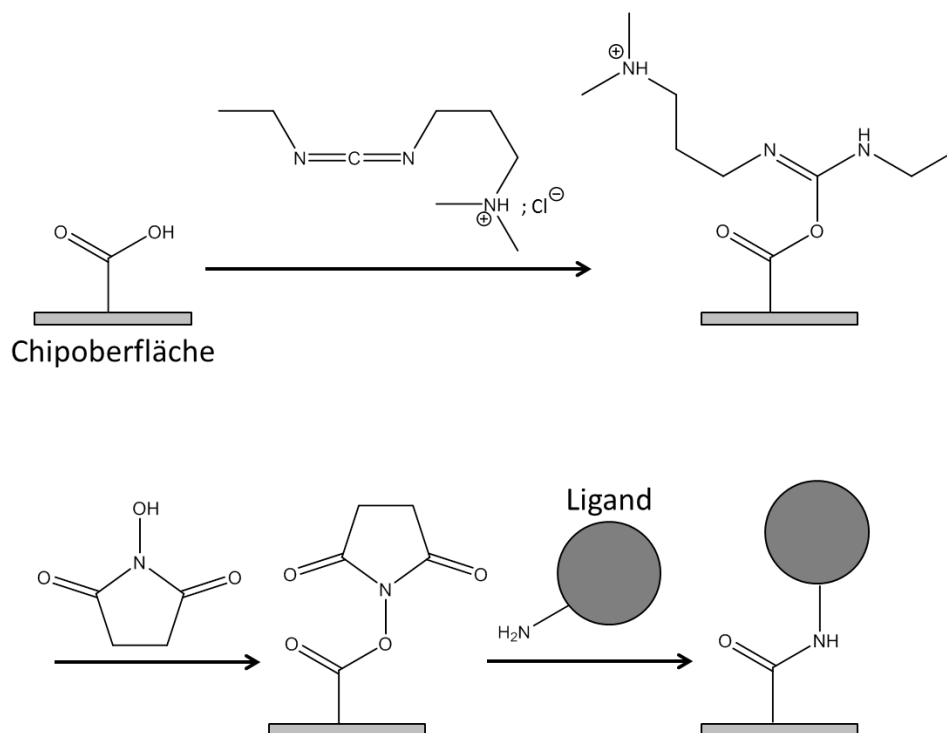


Abbildung 22 - Aminkopplung: In den ersten beiden Schritten erfolgt die Aktivierung der Carboxylgruppen auf der Chipoberfläche als NHS-Ester mittels EDC-Hydrochlorid und NHS. Im zweiten Schritt reagiert der Ligand über eine primäre Aminofunktion mit dem aktiven Ester.

Zunächst werden die Carbonsäurefunktionen der Chipoberfläche durch Injektion einer Mischung von *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid (EDC) und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) in NHS-Ester überführt (Aktivierung). Hierbei wird zunächst ein *O*-Acylisoharnstoff gebildet, der schnell mit NHS zum NHS-Ester weiter reagiert. Im Falle von CMD-Oberflächen und Aktivierung mit 0,2 M EDC und 0,05 M NHS für 7 min werden 30-40% der Carbonsäurefunktionen umgesetzt [241]. Bei nachfolgender Injektion des Liganden reagiert dieser über primäre Aminofunktionen (z.B. terminale Aminofunktionen von Peptiden und Proteinen oder ϵ -Aminofunktion von Lysinresten) mit dem aktiven Ester. Als Nebenreaktionen bei Proteinen und Peptiden können auch Cysteinseitenketten zum Thioester reagieren und Histidinseitenketten am Imidazolstickstoff acyliert werden, wobei letzteres

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

Nebenprodukt rasch hydrolysiert wird [242]. Die Menge an immobilisiertem Liganden (Immobilisierungslevel) kann über Wahl eines geeigneten pH-Werts und einer niedrigen Ionenstärke der Liganden-Lösung maximiert werden. Bei pH-Werten oberhalb von 3,5 (entspricht dem pK_s der Carboxylgruppen des CMD [231]) verfügt das CMD über eine negative Nettoladung. Ist der pH-Wert der Liganden-Lösung zudem niedriger als der isoelektrische Punkt des Liganden, liegt dieser positiv geladen vor. Bei ausreichend niedrigen Ionenstärken (üblicherweise 10 bis 20 mM monovalente Kationen im Immobilisierungspuffer [206, 231]) kommt es so zur Anreicherung des Liganden über elektrostatische Wechselwirkungen mit den Carboxylaten im CMD. Dieser als Vorkonzentrierung bezeichnete Effekt ist aufgrund der kooperativen Wirkung mehrerer Ladungen im Liganden bei großen Liganden stärker ausgeprägt und bei kleinen Liganden häufig nicht zu beobachten. Nach der Injektion des Liganden wird zwecks Entfernung nicht kovalent gebundener Liganden und Desaktivierung nicht umgesetzter NHS-Ester eine 1 M Ethanolamin-Lösung pH 8,5 injiziert.

Zusätzlich zu den bereits genannten kovalenten Immobilisierungstechniken werden auch verschiedene nichtkovalente, als Einfang-Verfahren bezeichnete Techniken angewendet. Diese beruhen auf der Affinität eines am Liganden vorhandenen Tags zu einem entsprechenden Bindungspartner. Gegenüber der Aminkopplung, bei der in der Regel mehrere Nukleophile auf der Oberfläche des Liganden mit den aktiven Estern reagieren können, bieten Einfangverfahren den Vorteil, dass das Tag häufig an definierter Position vorliegt. So kommt es seltener zu einer Quervernetzung des Liganden oder zur sterischen Hinderung der Interaktion mit dem freien Bindungspartner. Außerdem sind die Immobilisierungsbedingungen im Allgemeinen milder, sodass insgesamt die Wahrscheinlichkeit geringer ist, dass die Aktivität des Liganden durch die Immobilisierung beeinflusst wird [212, 231]. Am weitesten ist der Einfang mittels Streptavidin (oder Avidin) verbreitet [206, 228, 243, 244]. Streptavidin weist eine hohe Affinität zu Biotin auf ($K_D = 10^{-15}$ mol/L) [245]. Daher werden biotinylierte Liganden (z.B. 5'-biotinylierte Oligonukleotide) praktisch irreversibel gebunden. Streptavidin verfügt über vier Biotin-Bindestellen, weshalb Streptavidin-Chips entweder durch Einfang auf einer biotinylierten SAM-Chipoberfläche [243],

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

oder per Aminkopplung auf z.B. einer CMD-Chipoberfläche hergestellt werden können [244].

Ein weiteres Verfahren ist der Einfang von Liganden mit His₆- oder His₁₀-Tag (rekombinante Proteine) an einem mit Nickel beladenen Metallchelator (z.B. NTA: Nitrilotriessigsäure) (s. Abbildung 23) [246-248].

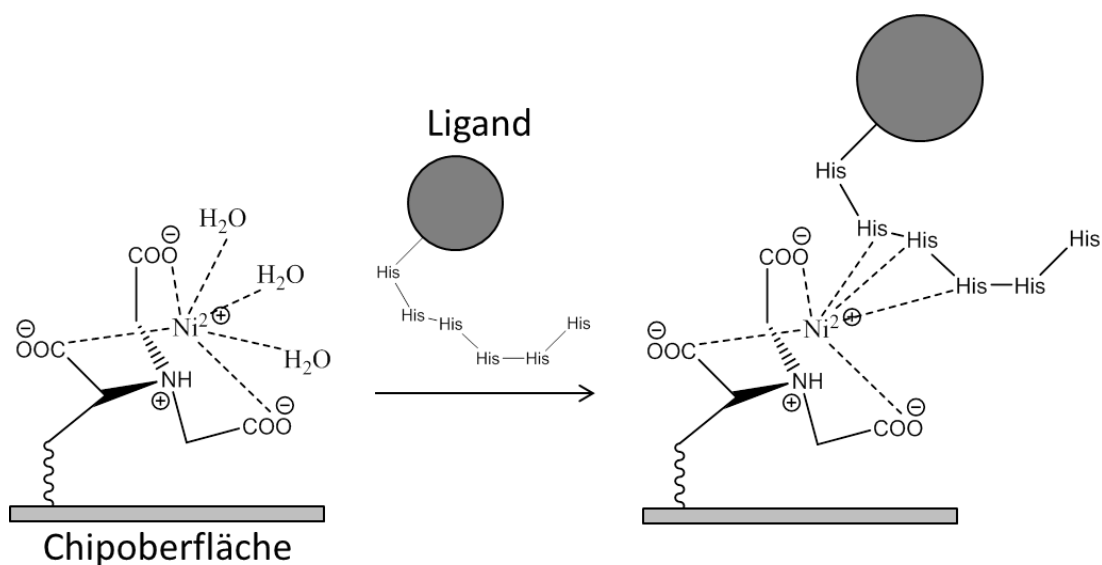


Abbildung 23: His-Tag-Einfang: Die Nitrilotriessigsäuregruppen in der Ni^{2+} -Form binden Liganden mit His-Tag.

Die Stabilität der Bindung ist in manchen Fällen so gering, dass es zu einer raschen Dissoziation der Liganden kommt. In diesem Fall können alternativ Anti-His₆-Antikörper verwendet werden [228]. Über Aminkopplung [246] oder Streptavidin-Biotin-Einfang [247] geeigneter NTA-Derivate können NTA-Chips aus z.B. CMD-Chips oder SAM-Chips hergestellt werden [206, 212].

Zusätzlich zu den bereits genannten Anti-His₆-Antikörpern, werden auch weitere mit Antikörpern belegte Chipoberflächen zum Einfang von Liganden mit z.B. Glutathion-S-Transferase-Tag oder FLAGTM-Tag (Octapeptid mit der Sequenz: AspTyrLysAspAspAspLys [249]) verwendet [206, 228].

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

4.1.6 Regeneration der Chipoberfläche

Wie anhand von Gleichung 4.14 zu erkennen ist, handelt es sich bei der Dissoziation der Komplexe aus Ligand und freiem Bindungspartner um einen exponentiellen Zerfall. Die Halbwertszeit $t_{1/2}$ des Komplexes kann durch Einsetzen von $[LA] = 1/2 * [LA]_0$ und $t = t_{1/2}$, sowie $t_0 = 0$ s (ab Beginn der Dissoziation) und Umformung berechnet werden:

$$\begin{aligned} \frac{[LA]_0}{2} &= [LA]_0 * e^{-k_d * t_{1/2}} \\ \Rightarrow \ln[LA]_0 - \ln 2 &= \ln[LA]_0 - k_d * t_{1/2} \\ \Leftrightarrow t_{1/2} &= \frac{\ln 2}{k_d} \end{aligned} \quad (4.15)$$

Somit ergibt sich beispielsweise für eine Dissoziationsrate k_d von 10^{-3} s^{-1} eine Halbwertszeit von ca. 11,5 min. Für eine schnelle Analyse ist es daher in den meisten Fällen nicht praktikabel, die vollständige Dissoziation der Komplexe abzuwarten. Stattdessen wird die Chipoberfläche durch Injektion eines Agens regeneriert, das in der Regel zur vollständigen Dissoziation der Komplexe führt. Je nach Art der Bindungspartner sind verschiedene Reagenzien geeignet. Der Einsatz von Detergenzien (weit verbreitet ist die Anwendung von SDS), chaotropen Substanzen (z.B. Harnstoff), organischen Lösungsmitteln (z.B. DMSO oder Acetonitril), Chelatbildnern (z.B. EDTA), oder die Variation von pH oder Ionenstärke sind übliche Maßnahmen [206, 212, 226, 231, 250, 251]. Ein systematischer Ansatz zur Entwicklung geeigneter Regenerationsbedingungen wurde von Andersson et al. [250, 251] beschrieben. In einigen Fällen wird durch die Regeneration nicht der Komplex aus Ligand und freiem Bindungspartner dissoziiert, sondern der Ligand wird vollständig von der Chipoberfläche entfernt und durch neuen Liganden ersetzt. Dieses Verfahren ist z.B. beim His-Einfang üblich. Hier wird durch Injektion von EDTA das Nickel mitsamt Liganden (freie und im Komplex vorliegende)

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

von der Chipoberfläche entfernt. Anschließend werden die NTA-Gruppen wieder in die Nickelform gebracht und frischer Ligand injiziert [206, 246, 248].

4.1.7 Bulk-Effekt

Wie in Abschnitt 4.1.1 ausgeführt, sind die Resonanzbedingungen bei der SPR von den dielektrischen Eigenschaften des an die Goldoberfläche grenzenden Mediums abhängig. Das hat zur Folge, dass bei Injektion einer Lösung, deren Zusammensetzung von der des Laufpuffers abweicht (z.B. durch Matrixbestandteile der Probe, aber auch bereits lediglich durch darin gelösten freien Interaktionspartner), eine Änderung des SPR-Response auftritt. Dieser Effekt wird als Bulk-Effekt bezeichnet (aus Gründen der Anschaulichkeit wurde der Bulk-Effekt im Sensorgramm in Abbildung 18 c nicht dargestellt. Die Abbildung entspricht doppelt referenzierten Daten (s.u.)). Um den Bulk-Effekt von der Änderung des Messsignals infolge der biomolekularen Interaktion zwischen Ligand und freiem Bindungspartner zu unterscheiden, sind zwei Verfahren üblich. Das erste, am weitesten verbreitete Verfahren wird als doppelte Referenzierung (Double Referencing) bezeichnet [252]. Voraussetzung für dessen Anwendbarkeit ist die Messung der zu analysierenden Lösung auf einer Flusszelle, die mit dem aktiven Liganden belegt ist (Reaktionszelle) und zusätzlich auf einer Flusszelle, die entweder mit einem inaktiven Analogon des Liganden belegt ist, oder z.B. nur mit EDC/NHS aktiviert und danach mit Ethanolamin desaktiviert wurde (Referenzzelle). Üblicherweise werden hierzu SPR-Spektroskope verwendet, die eine gleichzeitige Injektion und Messung auf mindestens zwei Flusszellen ermöglichen.

Bei Beginn der Injektion der Lösung des freien Interaktionspartners kommt es zu einem sprunghaften Anstieg des SPR-Response infolge der plötzlichen Änderung des Brechungsindex der mit der Chipoberfläche in Kontakt stehenden Lösung (s. Abbildung 24 a).

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

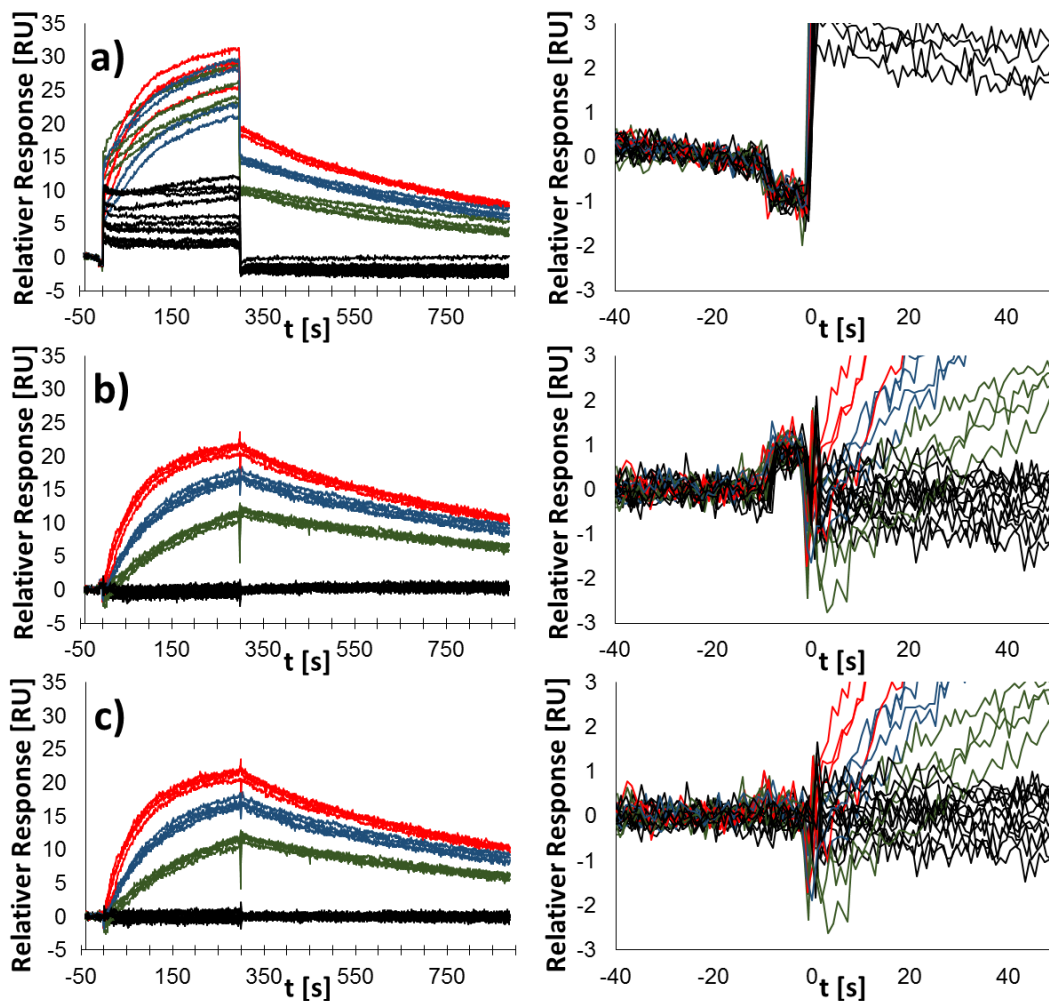


Abbildung 24 - Double Referencing: Injektion eines Analyten von $t = 0$ -300 s. Gezeigt sind 3 Konzentrationen c_1 (grün), $c_2 = 2 * c_1$ (blau), $c_3 = 4 * c_1$ (rot) des Analyten ($n = 4$) und 12 Pufferinjektionen (Leerwerte, schwarz). a) unbehandelte Daten; b) Sensorgramme nach Subtraktion der Referenzzellen-Daten; c) Sensorgramme nach Subtraktion der gemittelten Leerwert-Sensorgramme; Daten aus einer Laborvergleichsuntersuchung für eine BIA zweier unbekannter Bindungspartner.

Nach Beendigung der Injektion fällt das Signal schlagartig wieder ab (s. Abbildung 24 a). Bemerkenswert ist, dass selbst geringfügige Unterschiede zwischen den Zusammensetzungen von Laufpuffer und injizierter Lösung einen Bulkeffekt verursachen. So ist ein Bulkeffekt meist bereits bei Injektion von Laufpuffer zu beobachten (in Abbildung 24 a schwarze Spuren) [252], obwohl dieser sich nur geringfügig (z.B. durch Verdampfung geringer Wassermengen) in seiner

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

Zusammensetzung vom zuvor mit dem Chip in Kontakt stehenden Laufpuffer unterscheidet. Das Signal auf der Referenzzelle (nicht abgebildet) ist idealerweise identisch mit dem auf der Reaktionszelle, mit Ausnahme, dass es nicht zu einem Signalanstieg durch Bindung von freien Interaktionspartnern kommt. Subtraktion des Referenzzellen-Signals für jeden Zyklus eliminiert folglich den Bulk-Effekt (s. Abbildung 24 b). Die ggf. verbleibenden Signalspitzen (Spikes) zu Beginn und/oder Ende der Injektion ergeben sich durch geringfügigen zeitlichen Versatz der Daten beider Zellen. Zusätzlich zur Subtraktion der Referenzzellen-Daten wird das gemittelte Sensorgramm der Laufpufferinjektionen subtrahiert. Hierdurch werden Artefakte, die sich z.B. durch Ventilschaltungen ergeben und für jede einzelne Flusszelle reproduzierbar in jedem Zyklus auftreten, kompensiert (s. z.B. vergrößerten Ausschnitt in Abbildung 24 b u. c: um $t = -10$ bis 0 s kommt es in Teilabbildung b zu einem sprunghaften Signalanstieg und -abfall, der in Teilabbildung c nicht mehr vorhanden ist). Darüber hinaus wird eine eventuell vorhandene Drift der Basislinie kompensiert.

Die doppelte Referenzierung ist vor allem für die Untersuchung der Bindungskinetik einer Interaktion bedeutsam, wobei durch Anpassen des entsprechenden Modells der Interaktion an die Sensorgramme die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten ermittelt werden [252]. Für die Konzentrationsanalyse ist ein anderes Verfahren gebräuchlich, das keine Messung auf einer Referenzzelle erfordert [217, 226, 253]. Für die Konzentrationsbestimmung wird lediglich Auskunft über die Menge an Komplexen aus Ligand und freiem Interaktionspartner zu einem definierten Zeitpunkt benötigt. Daher wird der Response zu einem definierten, als Report Point bezeichneten Zeitpunkt kurz nach (5-30 s) Beendigung der Injektion der zu analysierenden Lösung über ein definiertes Zeitfenster (im Falle des verwendeten Biosensors 5 s) gemittelt. Der Response enthält keinen Beitrag vom Bulk-Effekt der zu analysierenden Lösung, da bereits wieder Laufpuffer über die Sensorchipoberfläche strömt. Zusätzlich wird an einem zweiten Report Point kurz vor Beginn der Injektion der zu analysierenden Lösung der Response gemittelt und dieser absolute Response vom absoluten Response des Report Points nach Ende der Injektion subtrahiert. Der so erhaltene relative Response ist um den Basislinienlevel reduziert. Dies dient dazu, Drift oder Verschiebungen der Basislinie zwischen den

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

Analysenzyklen zu kompensieren. Dieser relative Response (Bindungslevel) ist im Idealfall (keine unspezifische Bindung von Matrixkomponenten) ausschließlich auf gebildete Komplexe aus Ligand und dessen Bindungspartner zurückzuführen und ist je nach Assayformat (s. Abschnitt 4.1.4) direkt oder reziprok proportional zur Konzentration des Analyten.

Da das verwendete SPR-Spektroskop keine gleichzeitige Messung auf mehreren Flusszellen ermöglicht, war die doppelte Referenzierung der Messdaten im Vergleich zur Verwendung von Report Points mit erhöhtem Materialaufwand und erhöhter Messzeit verbunden. Daher wurde nur in Ausnahmefällen doppelte Referenzierung angewendet.

4.2 Anwendungsgebiete von SPR-Biosensoren

Die biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA; auch „biospezifische Interaktionsanalyse“) mit SPR-Biosensoren wird vorrangig für die Bestimmung von Gleichgewichtsdissoziationskonstanten und Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten von biomolekularen Interaktionen verwendet [238, 239, 254, 255]. SPR ist außerdem die am häufigsten angewendete Methode für die fragmentbasierte Wirkstoffentwicklung (Fragment-based lead discovery bzw. fragment-based drug discovery) [256]. Darüber hinaus wird BIA für die Bestimmung der Konzentration an aktivem Analyten in aufgereinigten Produkten oder zur Konzentrationsbestimmung in komplexen Probenmatrices verwendet. Auch für qualitative Studien wird SPR eingesetzt, wie z.B. für die Epitopkartierung, die Identifizierung und den Vergleich von Bindungspartnern oder die Untersuchung der Effekte von Mutationen auf die Bindungsfähigkeit [238, 239, 254, 255].

Die Konzentrationsbestimmung mittels SPR-Biosensoren ist in Lebensmitteln als Matrix gut etabliert. Gründe hierfür sind unter anderem, dass SPR-Biosensoren im Gegensatz zu anderen gebräuchlichen Screeningverfahren wie ELISA, FIA oder RIA eine Messung in Echtzeit ermöglichen und keine markierten Moleküle benötigt werden [208, 228]. Screening-Verfahren zum Nachweis von Rückständen und Kontaminanten umfassen pathogene Mikroorganismen, biogene Toxine

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

(Bakterientoxine, Mykotoxine, marine Toxine), Pestizidrückstände, Tierarzneimittelrückstände und anthropogene Kontaminanten wie PCB und Nonylphenol [253, 257, 258]. Als Beispiel für Verfälschungen in Lebensmitteln sei der Nachweis von Melamin genannt [259]. Der Nachweis gentechnisch veränderter Organismen ist ebenfalls mittels SPR möglich [260]. Auch Multianalytmethoden z.B. für den simultanen Nachweis von Deoxynivalenol und Zearalenon [261] sind beschrieben.

Im Bereich der Tierarzneimittelrückstandsanalytik werden SPR-Biosensoren schwerpunktmäßig für den Nachweis von Antibiotika genutzt, daneben sind auch Nachweisverfahren für Anthelminthika (z.B. Levamisol), Kokzidiostatika (z.B. Nicarbazin) und Betaagonisten (z.B. Ractopamin) beschrieben [258]. Für Antibiotika der Substanzklassen der Aminoglykoside, Chinolone, β -Lactame, Makrolide, Tetracycline, Sulfonamide, Nitroimidazole und Fenicole, die, teils legal, teils missbräuchlich, in der Nutztierhaltung eingesetzt werden, existieren SPR-Screening-Verfahren [258, 262]. So gibt es z.B. Screeningverfahren für den Nachweis von β -Lactamen in Milch [263], Tylosin in Honig und Eiern [264, 265], Streptomycin und Dihydrostreptomycin in Milch, Honig und Fleisch [266], Sulfonamiden in Hühnerserum [267] sowie Tetracyclinen in Milch, Honig und Schlachttiernieren [268-271].

Nach Kenntnis des Autors sind SPR-Biosensorverfahren zur Analyse von Futtermitteln für die Nutztierhaltung nicht publiziert. Da Getreide wichtiger Bestandteil der Nutztierernährung und häufig Hauptbestandteil von Alleinfuttermitteln für Nutztier sind [272], kommen Getreideerzeugnisse als vergleichbare Lebensmittelmatrix dem am nächsten. In Getreide und Getreideerzeugnissen sind SPR-Biosensorverfahren zum Nachweis von Ochratoxin A und Fusarientoxinen (Nivalenol, Deoxynivalenol, Zearalenon, T-2 und HT-2) publiziert [273-277].

4.3 SPR-Biosensoren und Assays für PGT-Inhibitoren

Moenomycine sind die bislang einzigen bekannten Naturstoffe, die die Mureinsynthese durch Bindung an das aktive Zentrum der Peptidoglykan-Glykosyltransferase (PGT) hemmen [1, 91]. Daher ist für die Entwicklung neuer

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

Antibiotika mit diesem Wirkmechanismus ein tiefergehendes Verständnis der Wechselwirkung zwischen Moenomycinen und ihrem Zielmolekül wichtig.

Für die Analyse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen und zum Screening potentieller Inhibitoren wurde eine Reihe von SPR-Biosensor-Assays und molekularbiologischen oder biochemischen Assays entwickelt. Diese erlauben eine Beurteilung der Wirksamkeit von potentiellen Inhibitoren *in vitro*.

Stembera et al. [133, 278] entwickelten einen kompetitiven SPR-Biosensor-Assay für die Identifizierung von PGT-Inhibitoren und testeten dessen Eignung anhand einiger Moenomycin-Analoga. Der Assay basiert auf der Bindung von Moenomycin A und dessen Analoga an die Donor-Bindungsstelle von *E. coli* PBP1b. Ein mittels Aminkopplung auf einer CMD-Chipoberfläche immobilisiertes Aminderivat von Moenomycin A konkurriert mit den Inhibitoren um die Donor-Bindungsstellen des injizierten PBP1b. Die Inhibitoren wurden entweder vor Injektion mit dem Enzym (PGT) gemischt oder im Anschluss an die Injektion des PBP1b injiziert. Als Laufpuffer wurde 10 mM Tris-Maleat-Puffer pH 6,6 mit 150 mM NaCl und 1% Triton-X 100 verwendet. Die Regeneration erfolgte durch Injektion von Moenomycin A oder alternativ 1% SDS in Laufpuffer. Auch die Bindung von Anti-Moenomycin A-Antikörpern [279], ebenso wie die konzentrationsabhängige Bindung einer isoliert exprimierten Glykosyltransferase-Domäne (von *Streptococcus pneumoniae* PBP1b) [280] an diesen Biosensorchip wurde demonstriert.

Rühl et al. [281] beschreiben die Herstellung einer Moenomycin-Chipoberfläche durch Streptavidin-Biotin-Einfang eines Biotin-Derivats von Moenomycin A und demonstrieren die Bindung von *E. coli* PBP1b an diese Chipoberfläche, sowie die Hemmung durch Moenomycin A. Als Laufpuffer verwenden sie 10 mM Tris-Maleat-Puffer pH 6,8 mit 150 mM NaCl, 0,1 mM MgCl₂ und 1% Triton-X 100.

SPR-Biosensor-Assays mit kovalent immobilisierter (Aminkopplung) PGT wurden zur Analyse der Interaktion mit Moenomycin A oder Lipid II-Analoga verwendet [130, 134].

Neben den bereits genannten SPR-Biosensor-Assays sollen an dieser Stelle auch andere molekularbiologische und biochemische Assays erwähnt werden, die

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

ebenfalls dazu geeignet sind Peptidoglykan-Glykosyltransferase-Hemmer zu identifizieren.

Einige dieser Assays basieren direkt auf der Peptidoglykan-Biosynthese.

Das Maß der Hemmung der Peptidoglykansynthese kann bestimmt werden, indem nicht umgesetztes Lipid II mit Fluorescamin derivatisiert und per HPIC an einer Anionenaustauschersäule mit Fluoreszenzdetektion quantifiziert wird [282]. Mit Dansyl-Lipid II anstelle des unmarkierten Substrats ist keine Vorsäulenderivatisierung erforderlich [90]. Bei Verwendung von ^{14}C -markierten Substraten kann gebildetes Peptidoglykan mittels Gelelektrophorese, Papier- oder Dünnschichtchromatographie von den Edukten getrennt und beides per Szintillationsmessung oder Computerradiographie detektiert werden [97, 135, 283, 284].

Bei einem kontinuierlichen Assay wird in Tensid-Mizellen eingelagertes Dansyl-Lipid II durch PBP1b polymerisiert und das gebildete Peptidoglykan *in situ* durch *N*-Acetylmuramidase gespalten [90, 185, 285]. Die Quantenausbeute des in die Tensid-Mizellen eingelagerten Dansyl-Lipid II ist größer als die des hydrolysierten Monomers, daher kann über die Abnahme der Fluoreszenz die Transglykosylierungsreaktion verfolgt werden.

Ein auf Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) basierender Assay nutzt ein doppelt markiertes Lipid II-Analogon, das am Lipidrest Dansyl-markiert und an der Oligopeptidseitenkette mit 4-Methylumbelliferon markiert ist. Durch FRET zwischen den beiden Resten wird die Fluoreszenz des 4-Methylumbelliferons gelöscht. PBP aus *Clostridium difficile* nutzt das markierte Lipid II-Analogon als Substrat und durch Abspaltung des dansylierten Lipidrests erhöht sich die Fluoreszenzintensität.

Bei einem von Chandrakala et al. [286] entwickelten Scintillation Proximity Assay (SPA) werden Membranfragmente von *E. coli* mit UDP-MurNAc-Pentapeptid und UDP- ^3H GlcNAc in Gegenwart der Inhibitoren inkubiert. Je nach Assay-Bedingungen binden die gebildeten radioaktiv markierten Biosyntheseprodukte (Lipid II, nicht vernetztes und vernetztes Peptidoglykan) an SPA-Beads und erzeugen so durch Szintillation eine Lichtemission. Die Ursachen für das unterschiedliche Verhalten der Syntheseprodukte sind nicht bekannt, aber es ermöglicht eine Unterscheidung

SPR-Biosensoren und Assays für Moenomycine

zwischen Inhibitoren der Transglykosylierung, der Transpeptidierung und früherer membrangebundener Biosyntheseschritte.

Weitere Assays nutzen die Konkurrenz zwischen PGT-Inhibitoren und Moenomycin A.

Vollmer und Höltje [287] beschreiben einen kompetitiven Radio-Rezeptor-Assay mit [³H]Benzylpenicillin-markiertem *E. coli* PBP1a oder PBP1b und Moenomycin A-modifizierten Agarose-Beads. Durch Inhibitoren blockierte PBP binden nicht an die Beads und werden durch Membranfiltration entfernt. Im Anschluss wird per Szintillationsmessung die Konzentration des verbliebenen Tritium-markierten PBPs bestimmt.

Ein auf Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie basierender kompetitiver Assay zeigt die Zunahme der Diffusionsgeschwindigkeit von Tetramethylrhodamin-markiertem Moenomycin infolge der Verdrängung aus der Donorbindungsstelle von *E. coli* PBP1b durch PGT-Inhibitoren an [117].

Zwei auf dem Prinzip der Fluoreszenz-Anisotropie basierende Assays zeigen die erhöhte Rotationsgeschwindigkeit und daraus resultierende Abnahme der Fluoreszenzpolarisation von Fluorescein-markierten Moenomycin-Derivaten infolge der Freisetzung aus dem Komplex mit PGT durch PGT-Inhibitoren an [130, 182, 288].

5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Assays auf dem Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie für Moenomycine und andere Inhibitoren der Peptidoglykan-Glykosyltransferasen (PGT). Der Assay sollte ausreichend empfindlich sein, um den Wachstumsförderer Flavophospholipol, der als Wirkstoffe Moenomycine enthält, in Futtermitteln in praxisrelevanten Gehalten nachweisen zu können. Außerdem sollte der Assay auf verschiedene Fragestellungen aus dem Gebiet der Entwicklung neuer PGT-Inhibitoren (s.u.) angewendet werden können.

Dafür war es essentiell, zunächst geeignete biomolekulare Erkennungspartner, sowie für die Entwicklung eines Inhibitions-Assays geeignete Derivate von Moenomycinen für eine Immobilisierung auf SPR-Sensorchipoberflächen zu finden. Um eine verringerte Robustheit des Assays infolge unterschiedlicher Reinheit und Kongenerenverhältnisse des für die Synthesen verwendeten Moenomycins zu vermeiden (s. hierzu Erläuterungen in Abschnitt 7.2), sollte zudem ein Verfahren für die Isolierung eines definierten Moenomycin-Kongeners gefunden werden. Mit diesem Verfahren sollten ausreichende Mengen des entsprechenden Kongeners für die Synthese des Derivats isoliert werden.

Der Assay sollte auf seine Eignung als Screeningverfahren zum Nachweis einer rechtswidrigen Anwendung von Flavophospholipol als Mastförderer geprüft werden. Da aufgrund der Pharmakokinetik von Moenomycinen keine Rückstände in tierischen Geweben auftreten, sollte ein Nachweis im Futtermittel erfolgen. Dafür war es notwendig, eine geeignete Aufarbeitung zur Matrixabreicherung zu entwickeln, um einen robusten Nachweis von Flavophospholipol zu erlauben. Bestandteile der Probenmatrix wie Lipide und Proteine können bei SPR-Biosensor-Assays zu Matrixeffekten wie unspezifischer Bindung an die Sensorchipoberfläche, Maskierung des Analyten oder einer Störung der zugrundeliegenden biomolekularen Interaktion führen [226, 253]. Zur Extraktion verwendete organische Lösemittel können ebenfalls die Interaktion stören (z.B. durch Denaturierung des biomolekularen Interaktionspartners) oder Kunststoffteile des SPR-Biosensors beschädigen, weshalb Extrakte mit hohem Wasseranteil zu bevorzugen sind. Auch darf die injizierte Lösung

Zielsetzung

keine Partikel enthalten, die das mikrofluide System des SPR-Biosensors blockieren könnten.

Aufgrund der üblichen Einsatzmengen von Flavophospholipol in der Tiermast musste die Nachweisgrenze des Assays niedrig genug sein, um einen Nachweis von 1 mg/kg Flavophospholipol im Futtermittel zu gewährleisten. Anhand von drei verschiedenartigen Futtermitteln sollte die Tauglichkeit des entwickelten Assays überprüft werden. Hierzu sollte auch eine Vergleichsanalytik per LC-MS durchgeführt werden.

Aufgrund der vermehrten Entstehung antibiotikaresistenter Bakterienstämme durch den Einsatz von Antibiotika in der Tiermast besteht eine Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Reserveantibiotika für den Einsatz in der Humanmedizin [9]. Moenomycine sind bislang die einzigen auf dem Markt befindlichen Antibiotika, die über direkte Hemmung der PGT wirken [1, 91]. Für die Entwicklung neuer Antibiotika sind daher PGT ein attraktives Ziel, wobei ein besseres Verständnis ihrer Wirkungsweise und ihrer Hemmung hilfreich sein sollte. Aufgrund der zu erwartenden pharmakokinetischen Eigenschaften ist die gezielte Entwicklung von Inhibitoren der Akzeptorbindungsstelle mit kurzem Lipidrest ein sinnvoller Ansatz zur Identifizierung von Leitstrukturen für neue Antibiotika (nähere Erläuterungen in Abschnitt 7.7.2) [135]. Der hydrophobe Charakter der PGT, sowie der Umstand, dass Lipid II an beide Bindungsstellen bindet, erschweren jedoch Untersuchungen auf diesem Gebiet.

Im Zuge einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Mohammed Terrak (Centre d'Ingénierie des Protéines, Universität Liège (Belgien)) sollte der SPR-Biosensor-Assay dazu verwendet werden (ggf. nach Modifikation), einige substratanaloge Inhibitoren bezüglich ihres Wirkmechanismus zu untersuchen und die so gewonnen Erkenntnisse zur Entwicklung neuer PGT-Inhibitoren zu nutzen. Außerdem sollte ein SPR-Biosensor-Assay zur Beurteilung der Bindungsfähigkeit von GT-Mutanten für das Donorsubstrat (die wachsende Peptidoglykankette) etabliert werden. Dieser sollte dazu verwendet werden, um Mutanten mit günstigeren physikochemischen Eigenschaften auf ihre Eignung zur Inhibitor- und Substraterkennung zu testen.

6 Aufbau der möglichen Assayformate

Hier werden zunächst die in den Experimenten genutzten Assayformate und die hierzu ggf. erforderlichen, vorausgehenden Synthesen beschrieben. Die damit erzielten Ergebnisse finden sich in Abschnitt 7.

6.1 Direkter Assay für die Futtermittelanalytik

Direkte Assays sind im Allgemeinen nur für die Analyse von Makromolekülen hinreichend empfindlich. Die im Zuge der Kooperation mit der Universität Liège erhaltenen PGT verfügten über eine His₆-Markierung, was eine einfache Immobilisierung auf einem mit Ni²⁺-Ionen beladenen NTA-Chip erlauben sollte (s. Abschnitt 4.1.5). Daher sollte geprüft werden, ob ein direkter Assay für den Nachweis von Flavophospholipol in Futtermitteln realisierbar ist. Dieser Assay hätte den Vorteil, dass keine Synthese von Moenomycin-Derivaten als Liganden erforderlich wäre. Im Vergleich zu einem direkten Assay mit Immobilisierung des Proteins per Aminkopplung ergäbe sich außerdem der Vorteil, dass keine schonenden Regenerationsbedingungen gefunden werden müssten, bei denen es nicht zur Inaktivierung des Proteins käme. Die Regeneration würde durch Entfernen des Nickels mitsamt PGT mittels EDTA erfolgen können, wodurch in jedem Analysenzyklus frisch immobilisiertes Protein verwendet würde.

6.2 Kompetitive Assayformate

6.2.1 Derivate für die Immobilisierung

Aufgrund der bereits in Abschnitt 4 erwähnten Massenabhängigkeit des SPR-Response und der damit verbundenen erhöhten Empfindlichkeit von kompetitiven Assays für kleinere Moleküle im Vergleich zu direkten Assays, war die Entwicklung eines kompetitiven Assays für die Futtermittelanalytik am aussichtsreichsten. Bei

Aufbau der möglichen Assayformate

einem kompetitiven Assay für Flavophospholipol wäre ein Derivat eines Moenomycins auf der Sensorchipoberfläche immobilisiert und würde mit Moenomycinen aus der Probe um einen in Lösung befindlichen biomolekularen Erkennungspartner der Moenomycine konkurrieren (s. Abbildung 20).

Die Synthese verschiedener Moenomycin A-Derivate ist beschrieben, durch die beispielsweise ein Biotinrest, eine Amino- oder eine Thiolfunktion in das Molekül eingeführt wird [279, 289-292]. Diese Derivate erlauben eine chemisch selektive und somit sterisch definierte Anknüpfung an entsprechende, zuvor aktivierte Oberflächen. Die Immobilisierung eines Aminderivats, sowie eines Biotinderivats auf Biosensorchipoberflächen ist ebenfalls bereits beschrieben (s. auch Abschnitt 4.3) [133, 278, 281].

Da die für die Amin-Kopplung erforderlichen Carboxymethyldextran-Biosensorchips die am weitesten verbreiteten und auch kostengünstigsten Sensorchips sind, sollte primär eine Immobilisierung des von Stembera et al. [278] verwendeten Aminderivats verfolgt werden. Die Darstellung des Derivats geht von Moenomycin A und 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid aus (s. Abbildung 25).

Aufbau der möglichen Assayformate

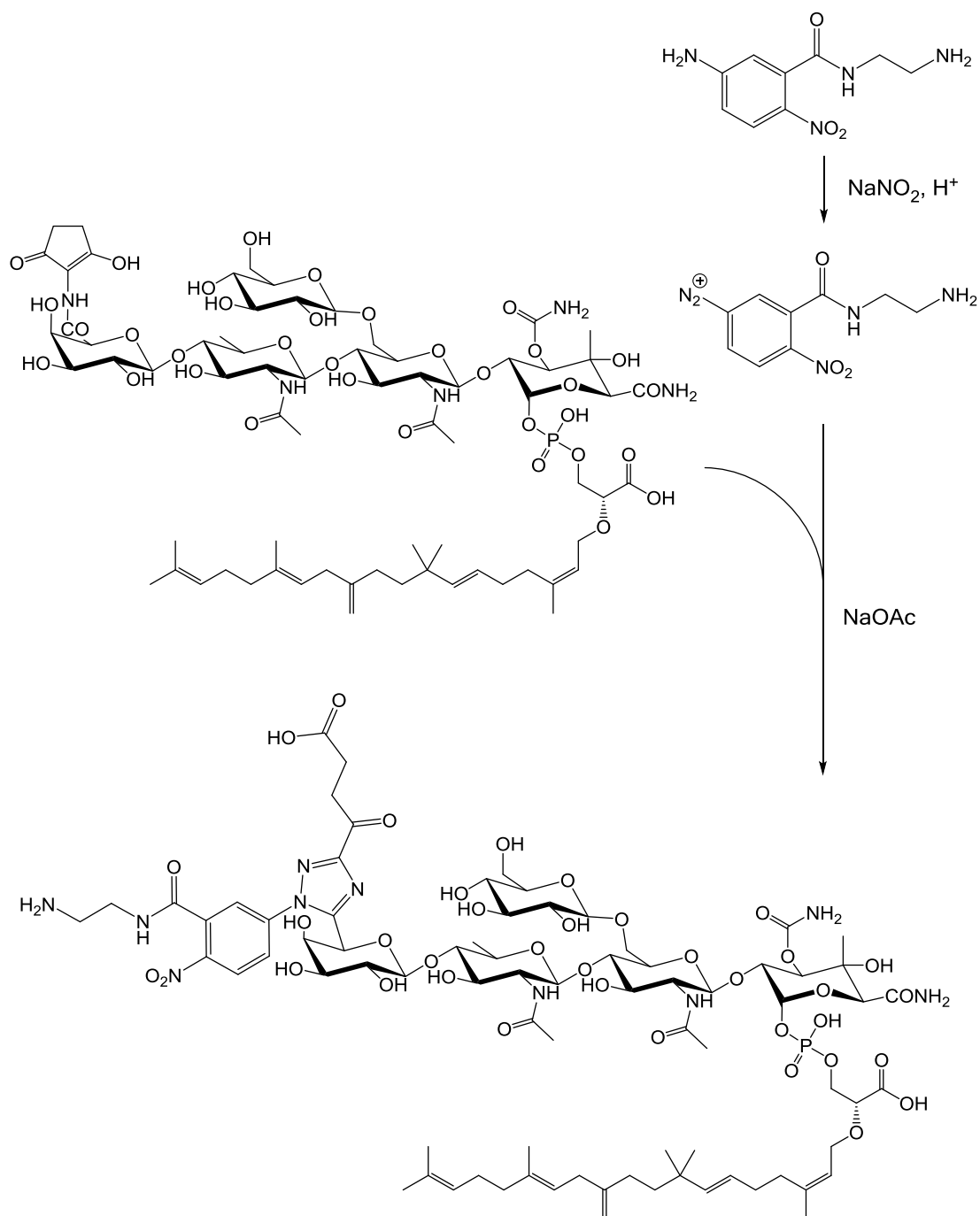


Abbildung 25: Synthese des Aminderivats von Moenomycin A (Substanz 3b in [278])

Aufbau der möglichen Assayformate

Die Synthese basiert auf einer von Kempin et al. [289, 293] beschriebenen Kopplungsmethode für Moenomycine bei der ein aromatisches Amin in das entsprechende Diazoniumsalz überführt wird und *in situ* an die chromophore 2-Amino-Cyclopentan-1,3-dion-Gruppe des Moenomycins koppelt (s. Abbildung 26). Die auf diesem Wege erhaltenen Moenomycin-Derivate bieten den Vorteil, dass das Pharmakophor (s. Abschnitt 2.4.2) nicht verändert wird. Für die Charakterisierung von PGT-Mutanten und PGT-Inhibitoren sind die Derivate folglich geeignet.

Die zunächst durch Addition der enolisierten Diketongruppe des Moenomycins an die Diazogruppe gebildete Azoverbindung wird über eine Japp-Klingemann-Reaktion zum entsprechenden Amidrazon gespalten [294]. Das Amidrazon cyclisiert im Anschluss zum 1,2,4-Triazol [295].

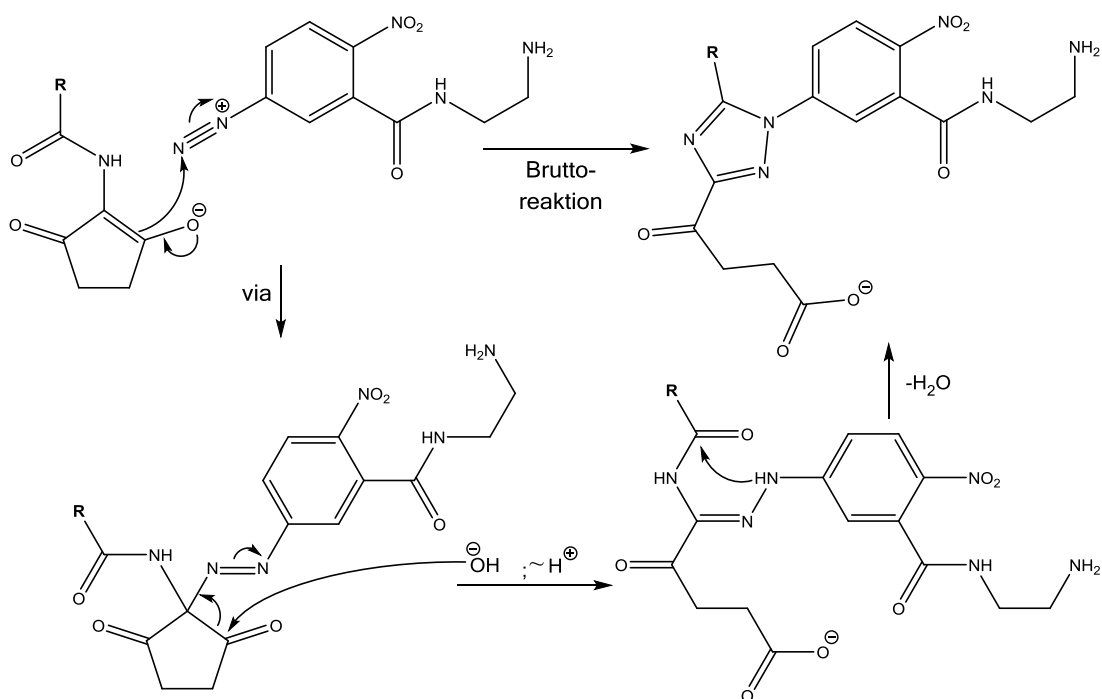


Abbildung 26: Kopplung von Moenomycinen (R = C5 des β -D-Galactopyranuronamid-Rings) mit dem Diazoniumsalz von 5-Amino-N-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid

Aufbau der möglichen Assayformate

Das für die Synthese benötigte 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid wird aus 5-Amino-2-nitrobenzoesäure und Ethylendiamin nach Aktivierung der Säure als Imidazolid mit *N,N'*-Carbonyldiimidazol (CDI) synthetisiert (s. Abbildung 27).

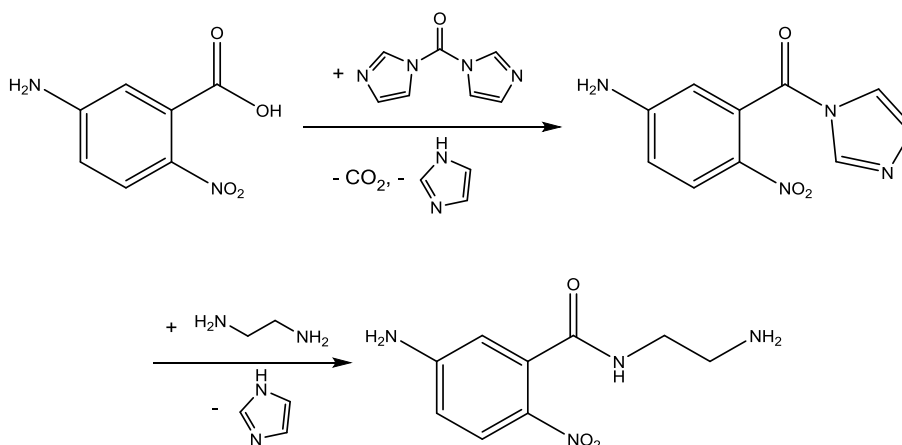


Abbildung 27: Synthese von 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid

Da eine Vorkonzentrierung des Liganden während der Immobilisierung im Allgemeinen nur bei Makromolekülen zu beobachten ist, war fraglich, ob mit dem Aminderivat ausreichend hohe Immobilisierungslevel für einen empfindlichen Assay erreicht werden würden. Daher sollten parallel Derivatisierungsreagenzien für eine ggf. erforderliche Herstellung eines Biotinderivats synthetisiert werden. Dies würde eine Immobilisierung über Streptavidin-Biotin-Einfang als alternative Immobilisierungstechnik erlauben, bei der die hohe Affinität von Streptavidin zu Biotin ausgenutzt wird (s. Abschnitt 4.1.5). Bei dem von Rühl et al. [290] immobilisierten Biotinderivat handelt es sich um eine modellhafte biotinylierte Photoaffinitätsprobe zur Markierung von PBP1b. Über die Moenomycin A-Gruppe bindet die Sonde reversibel an das PBP1b, nach Aktivierung der Aryltrifluormethyldiazirin-Gruppe durch UV-Strahlung soll die Sonde kovalent an das PBP1b binden und anschließend über die Biotin-Gruppe per Affinitätschromatographie aufgereinigt werden können. Außerdem verfügt die Photoaffinitätsprobe über eine mit Butylamin spaltbare Urethan-Gruppe, die zur Abspaltung der Moenomycin A- und der Biotin-Gruppe nach Aufreinigung des markierten PBP1b dienen soll. Für die Immobilisierung von Moenomycin A über eine Biotin-Markierung ist das von Rühl et al. beschriebene

Aufbau der möglichen Assayformate

Derivat unnötig komplex, was einerseits hohen Aufwand bei der Synthese und zum anderen möglicherweise unerwünschte Reaktionen während des Assays zur Folge hätte. Daher sollte ein einfacheres Biotinderivat verwendet werden. Buchynskyy et al. [291] beschreiben die Synthese eines Biotinderivats ausgehend von Moenomycin A, Biotin und dem bereits für das Aminderivat benötigten Reagenz 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid in drei Reaktionsstufen. Zunächst wird Biotin mit 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid gekoppelt. Hierzu wird es DCC-
vermittelt in den NHS-Ester überführt. Der isolierte NHS-Ester wird anschließend mit dem 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid umgesetzt (s. Abbildung 28).

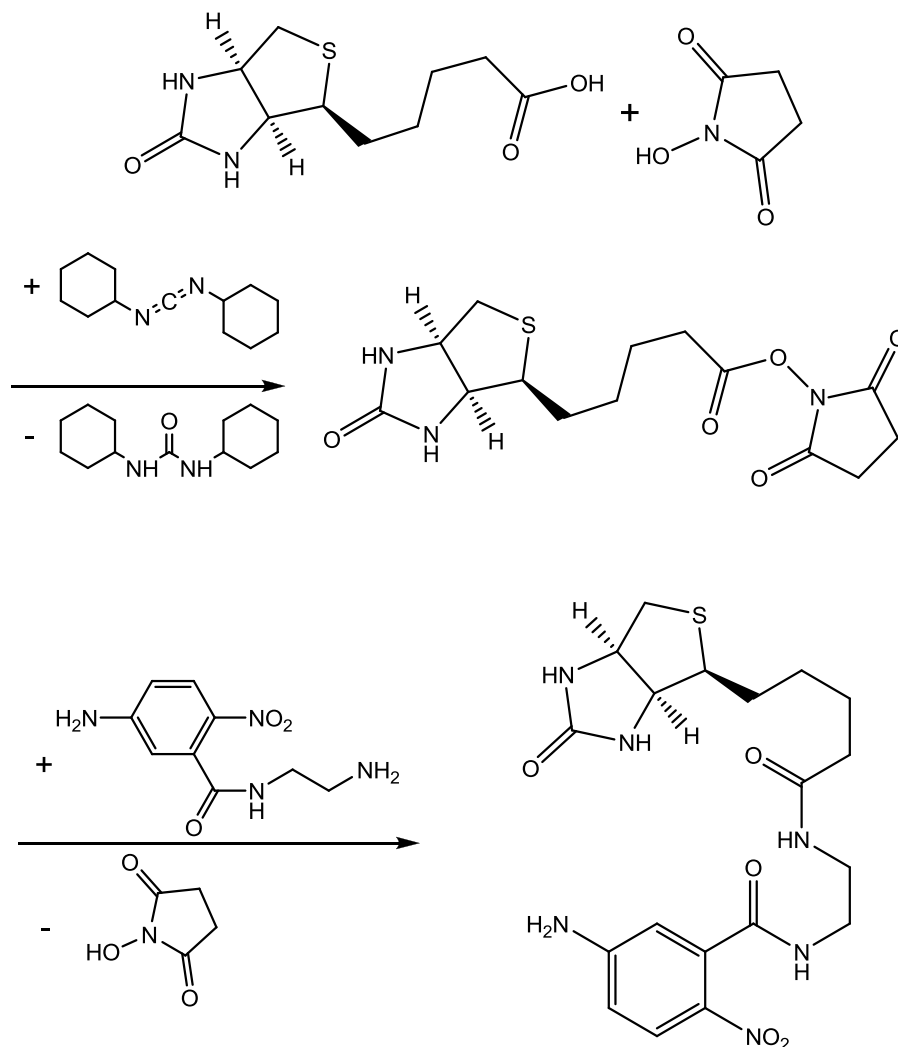


Abbildung 28: Synthese des Biotinylierungsreagenzes

Aufbau der möglichen Assayformate

Die darauf folgende Umsetzung des Biotinylierungsreagenzes mit Moenomycin A zum Biotinderivat (s. Abbildung 29) entspricht mechanistisch der Synthese des Aminderivats (s. Abbildung 25 u. Abbildung 26).

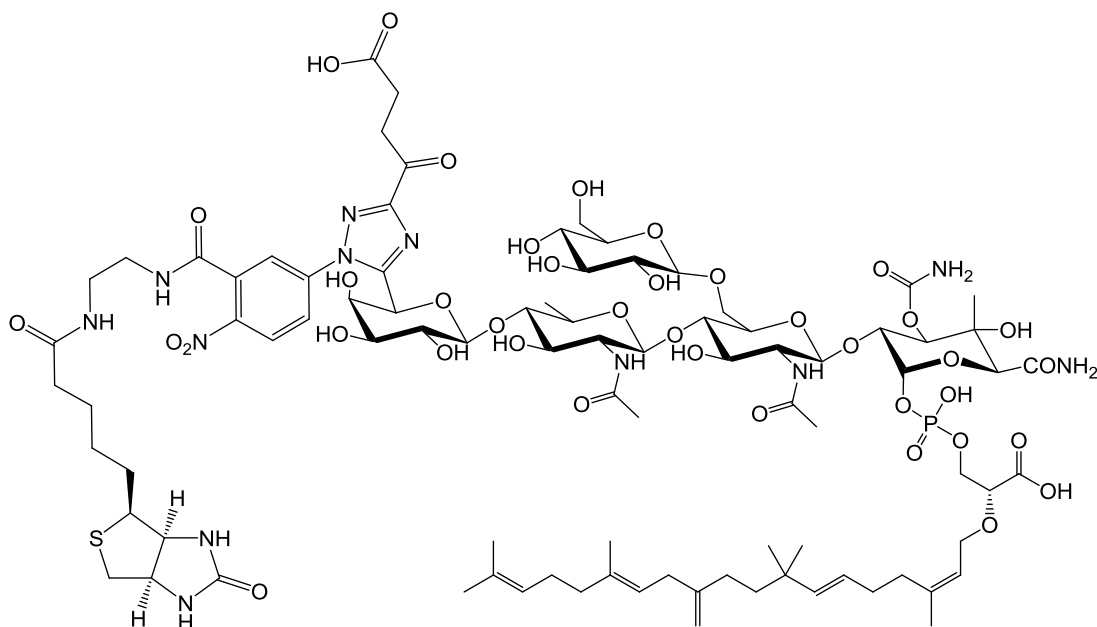


Abbildung 29: Biotinderivat von Moenomycin A (Substanz 3d in [291])

Bei einer ggf. erforderlichen Regeneration der Chipoberfläche mit Säuren (s. Abschnitt 4.1.6) könnte es zu einer Schädigung des immobilisierten Moenomycin-Derivats kommen, da im Säuren der Moenocinolrest aufgrund der labilen Allyletherbindung abgespalten werden kann (s.u.) [31]. Decahydromoenomycin A (s. Abbildung 30) weist eine deutlich höhere pH-Beständigkeit auf und hemmt bakterielles Wachstum, ebenso wie die Transglykosylierung *in vitro* in vergleichbarem Maße wie Moenomycin A [31, 101]. Somit sollten Derivate von Decahydromoenomycin A als Ersatz für Moenomycin A-Derivate als Liganden für den SPR-Assay geeignet sein. Daher sollte parallel zur Entwicklung des Biosensor-Assays die Synthese eines Decahydromoenomycin A-Derivats als Ligand vorbereitet werden. Die Synthese von Decahydromoenomycinen kann durch Hydrierung der entsprechenden Moenomycine an Platin in Methanol oder Methanol/Essigsäure

Aufbau der möglichen Assayformate

20:1 (v/v) erfolgen [31, 35, 101]. Die Kopplung an den Sensorchip sollte analog zu Moenomycin A möglich sein.

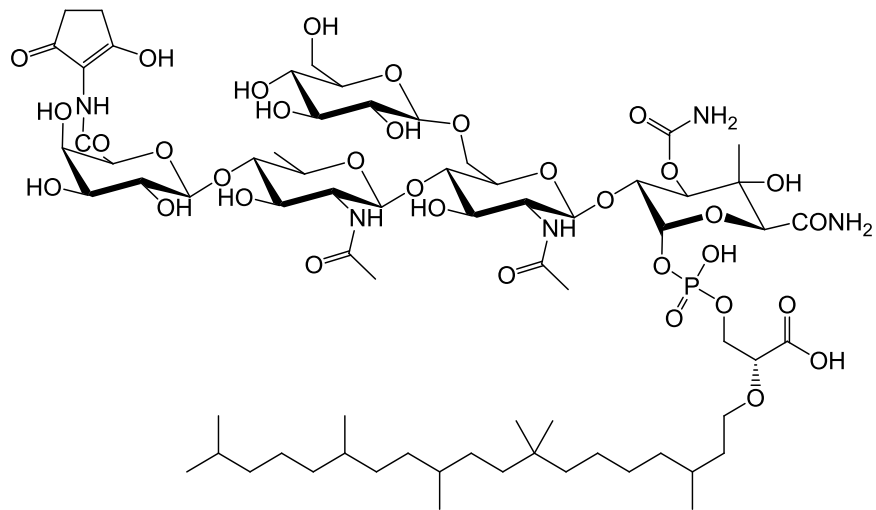


Abbildung 30: Decahydromoenomycin A (im Vergleich zu Moenomycin A sind die fünf Doppelbindungen des Moenocinols hydriert)

Aufbau der möglichen Assayformate

6.2.2 Biomolekulare Erkennungspartner

Als biomolekulare Bindungspartner zur Erkennung von Moenomycin A sind Peptidoglykan-Glykosyltransferasen (s. z.B. Methoden in Abschnitt 4.3), Anti-Moenomycin A-Antikörper und Aptamere beschrieben [279, 296, 297]. Die beschriebenen Aptamere weisen eine hohe Affinität zum ungesättigten Moenocinolrest von Moenomycin A und praktisch keine Affinität zu Delipido-Moenomycin A auf. Darüber hinaus wurden bei der Entwicklung der Aptamere ähnliche Konsensussequenzen selektiert, wie bei einer Entwicklung von Aptameren gegen das Protein Farnesyl-Ras, was erwarten lässt, dass die Aptamere unspezifisch mehrfach ungesättigte Lipidreste binden [297]. Daher war davon auszugehen, dass die in der Literatur beschriebenen Aptamere gegen Moenomycin A keine spezifische Detektion der Moenomycine erlauben würden und das Risiko ausgeprägter Matrixeffekte bei der Analyse von Futtermitteln hoch wäre.

PGT sind das Target der Moenomycine und werden deshalb in vielen Assays für Glykosyltransferase-Inhibitoren verwendet (s. Abschnitt 4.3). Ihre Gewinnung als rekombinante Proteine (z.T. auch als Mutanten oder trunkierte Proteine) ist gut etabliert (s. z.B. [87, 89, 97, 127, 298-300]) und sie verfügen über eine definierte und reproduzierbare Affinität zu den Moenomycinen. Ein kompetitiver Assay mit PGT als biomolekularem Erkennungspartner sollte außerdem dazu geeignet sein, die Fähigkeit von PGT-Inhibitoren zu beurteilen, an die Donorbindungsstelle der PGT zu binden. Daher wurden Peptidoglykan-Glykosyltransferasen als bevorzugte biomolekulare Erkennungspartner ausgewählt.

Als alternativer Ansatz sollte die Gewinnung von Antikörpern vorbereitet werden. Die Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen Moenomycin A durch Immunisierung von Hasen mit einem Moenomycin A-BSA-Konjugat (BSA: Rinderserumalbumin) ist beschrieben, ebenso wie erste SPR-Experimente zur Bestätigung der Affinität der erhaltenen Antikörper zu Moenomycin A [279]. Da mit der beschriebenen Methode polyklonale Antikörper gegen das vollständige Moenomycin A-Molekül gewonnen werden, war nicht auszuschließen, dass ein Teil der Antikörper eine hohe Affinität zu Lipiden aufweisen würde, was zu ausgeprägten Matrixeffekten führen könnte. Daher sollte für die Immunisierung ein Konjugat von Moenomycin A mit abgespaltenem

Aufbau der möglichen Assayformate

Lipidrest synthetisiert werden. Für die Abspaltung des Lipidrests von Moenomycin A sind verschiedene Methoden publiziert. Ein Ansatz ist die enzymatische Spaltung mit dem Bakterium *Bacillus spec.* DSM 4675 [103, 301], daraus gewonnenen zellfreien Extrakten [302, 303], oder dem isolierten Enzym Moenomycinase [304]. Hierbei kommt es zur Spaltung der glykosidischen Bindung zur Phosphatgruppe in Moenomycinen (s. Abbildung 31) [301-304].

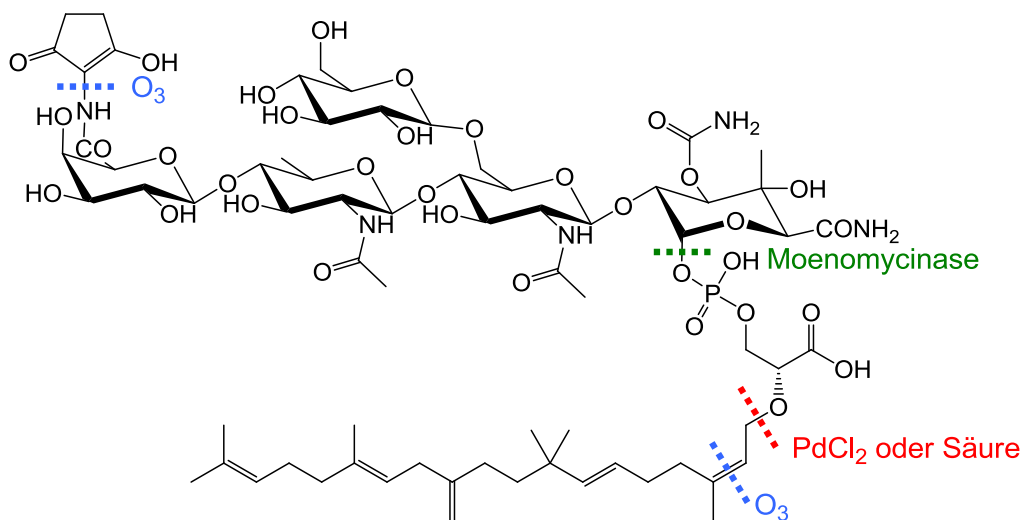


Abbildung 31: Spaltstellen verschiedener Methoden zur Abspaltung des Moenocinolrests

Marzian et al. [65] beschreiben eine selektive Abspaltung des Moenocinolrests durch Isomerisierung des Allylethers zum labilen Enolether [305], katalysiert durch Palladium(II)-chlorid, und anschließende Hydrolyse im schwach Sauren (s. Abbildung 31 u. Abbildung 32). Diese Allyletherspaltung findet ebenfalls bereits im schwach Sauren in Abwesenheit weiterer Katalysatoren statt [66] (s. Abbildung 31).

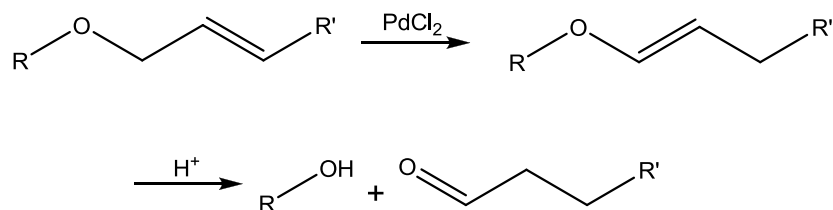


Abbildung 32: Isomerisierung des Allylethers in Moenomycin zum Enolether gefolgt von säurekatalysierter Hydrolyse

Aufbau der möglichen Assayformate

Eine weitere Möglichkeit zur Abspaltung des Moenomycinolrests ist die Spaltung der C-C-Doppelbindungen durch Ozonolyse, wobei als Nebenreaktion auch die Cyclopentan-1,3-dion-Gruppe abgespalten wird [66, 116] (s. Abbildung 31 u. Abbildung 33). Durch anschließende reduktive Aminierung der gebildeten Aldehydfunktion wird eine sekundäre Aminofunktion erhalten [115], die für Kopplungsreaktionen genutzt werden kann [279].

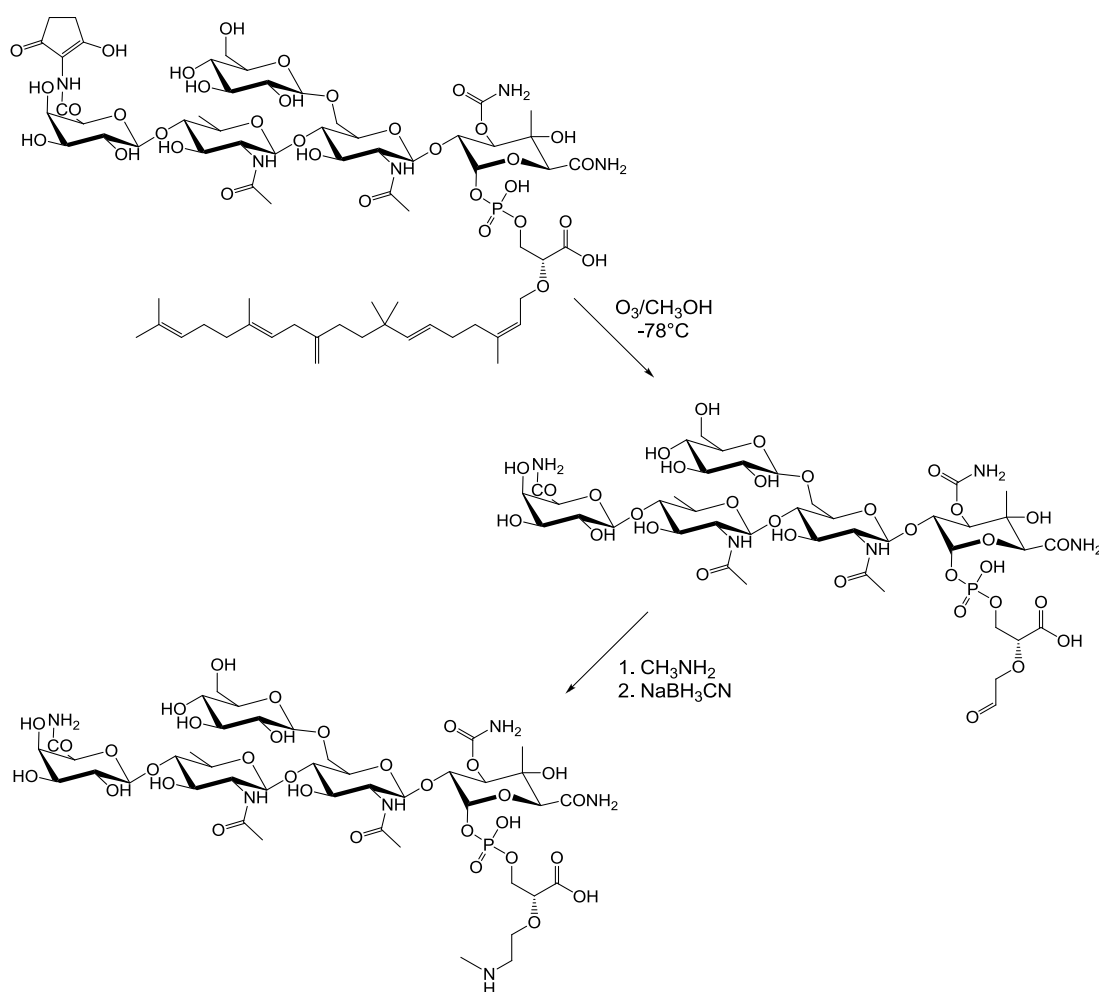


Abbildung 33: Ozonolyse von Moenomycin A gefolgt von reduktiver Aminierung

Aufbau der möglichen Assayformate

Aufgrund des höheren präparativen Aufwands und des Verlusts des für die Reaktionskontrolle und Produktaufreinigung nützlichen Chromophors bei der Reaktionsfolge aus Ozonolyse und reduktiver Aminierung sollte die enzymatische Spaltung oder die Allyletherspaltung angewendet werden.

Buchynskyy et al. [279] beschreiben die Synthese von BSA-Konjugaten des oben genannten Moenomycin A-Aminderivats oder des bereits erwähnten reduktiv aminierten Ozonolyseprodukts von Moenomycin A über Kopplung mit Quadratsäurediethylester (3,4-Diethoxy-3-Cyclobuten-1,2-dion). Die Methode sollte geeignet sein, um das Moenomycin A-Spaltprodukt mit BSA zu koppeln. Erster Schritt wäre die Synthese eines Aminderivats in Anlehnung an die oben beschriebene Synthese des Moenomycin A-Aminderivats, mit 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid (s. Abbildung 25). Die Synthese eines Quadratsäureesteramids, das mit BSA gekoppelt werden kann, sollte in der von Stembera et al. [278] für das Moenomycin A-Aminderivat beschriebenen Weise erfolgen können (s. Abbildung 34).

Aufbau der möglichen Assayformate

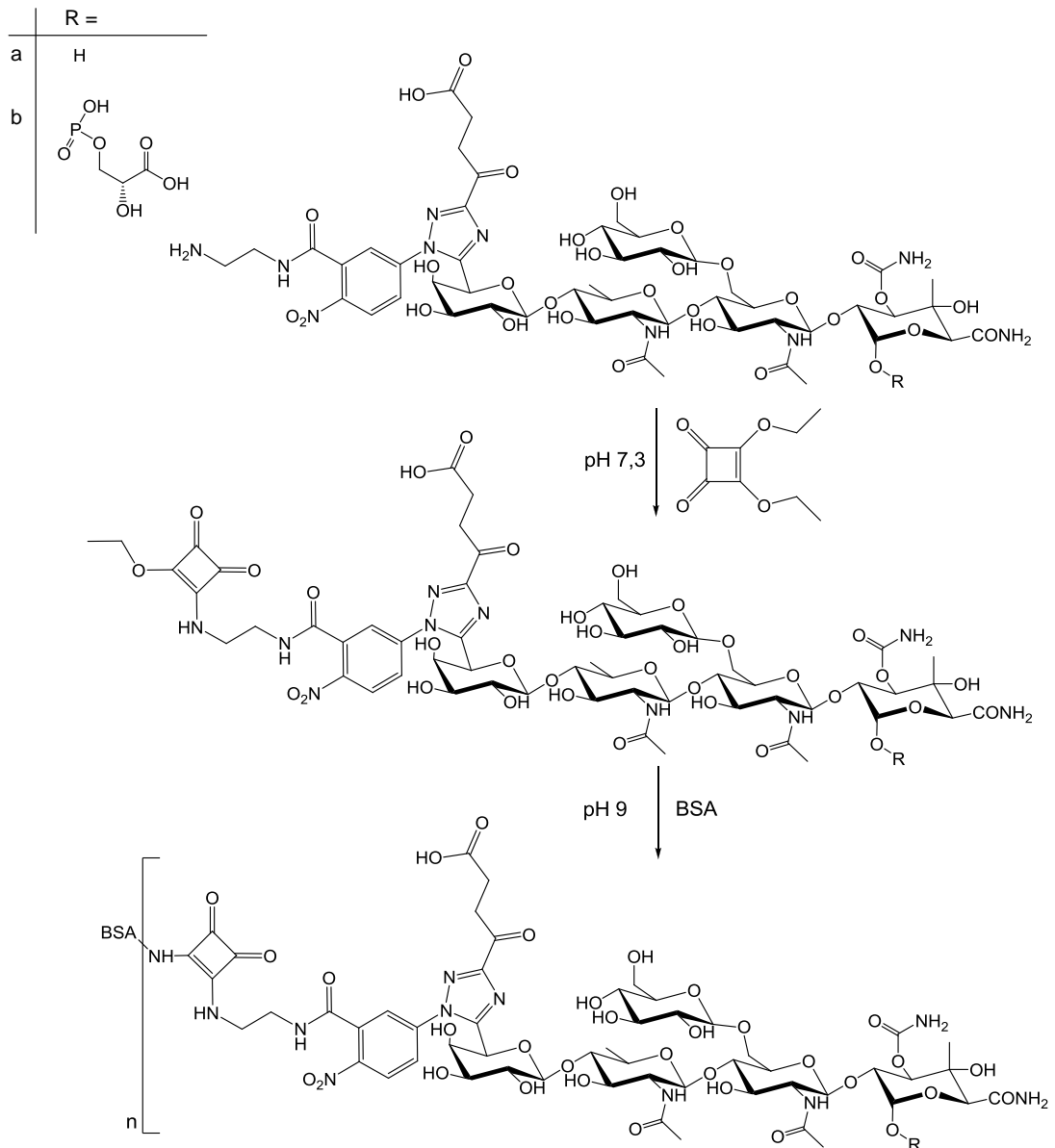


Abbildung 34: Synthesestrategie für die Gewinnung eines BSA-Konjugats von Moenomycin A nach Abspaltung des Moenocinols - a) mit Moenomycinase bzw. b) durch Allyletherspaltung - und Umsetzung mit 5-Amino-N-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid. Der erste Schritt ist die Aktivierung des Aminderivats mit Quadratsäurediethylester in Anlehnung an die Synthese von Substanz 11 in [278]. Anschließend erfolgt die Umsetzung des Quadratsäureesteramids mit BSA in Anlehnung an die Synthese von Konjugat 8 und 9d in [279].

Aufbau der möglichen Assayformate

6.3 Direkter Assay für Peptidoglykan-GTs

Die Wechselwirkungen zwischen der wachsenden Peptidoglykankette und einzelnen Aminosäureresten der PGT sind bislang nicht beschrieben. Moenomycin A bildet aber Kontakte zu einigen konservierten Resten der GT-Domäne aus, die bedeutsam für die enzymatische Aktivität sind (s. Abschnitt 2.4.2). Deshalb ist anzunehmen, dass dieser Inhibitor sehr effizient das natürliche Substrat imitiert. Inaktive Mutanten, die aber imstande sind, das Donorsubstrat zu binden, sollten daher auch an Moenomycine binden. Im Unterschied dazu sollten inaktive Mutanten, die (z.B. aufgrund falscher Faltung) nicht imstande sind, das Donorsubstrat zu binden, nicht an Moenomycine binden. Dies könnte mit einem direkten Assay untersucht werden, der einen Biosensorchip mit immobilisiertem Moenomycin-Derivat verwendet, wie er für den kompetitiven Assay für Moenomycine benötigt wird. Aufgrund von Unterschieden in der Substratbindung und der Bindung von Moenomycin A wären allerdings quantitative Aussagen bezüglich der Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Substratbindung nicht möglich.

7 Ergebnisse und Diskussion

7.1 Direkter Flavophospholipol-Assay

Das zur Verfügung stehende *E. coli* PBP1b (His tag (M46-N844) PBP1b_y aus [127])⁷ verfügte über einen N-terminalen His₆-Tag, über den es möglich war, das Protein an einer mit Ni²⁺ beladenen NTA-Chipoberfläche (s. Abschnitt 4.1.5) einzufangen. Dies wurde für einen direkten Assay für Flavophospholipol genutzt, der den Vorteil hatte, dass keine Moenomycin-Derivate benötigt wurden (s. Methode in Abschnitt 9.2). Das Prinzip des Assays ist in Abbildung 35 dargestellt. Der Analysenzyklus beginnt mit der Injektion von His₆-PBP1b, welches an die mit Nickel(II)-Ionen beladene Chipoberfläche bindet. Anschließend wird die Flavophospholipol-haltige Lösung injiziert. Die Moenomycine binden an das PBP1b. Zur Regeneration wird zunächst eine EDTA-Lösung injiziert, die das Nickel und mit ihm das eingefangene PBP1b und daran gebundene Moenomycine entfernt. Danach werden durch Injektion einer Nickel(II)chlorid-Lösung die NTA-Gruppen der Chipoberfläche wieder in die Nickelform überführt.

⁷ Freundlicherweise von Dr. Mohammed Terrak (Centre d'Ingénierie des Protéines der Universität Liège; Belgien) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse und Diskussion

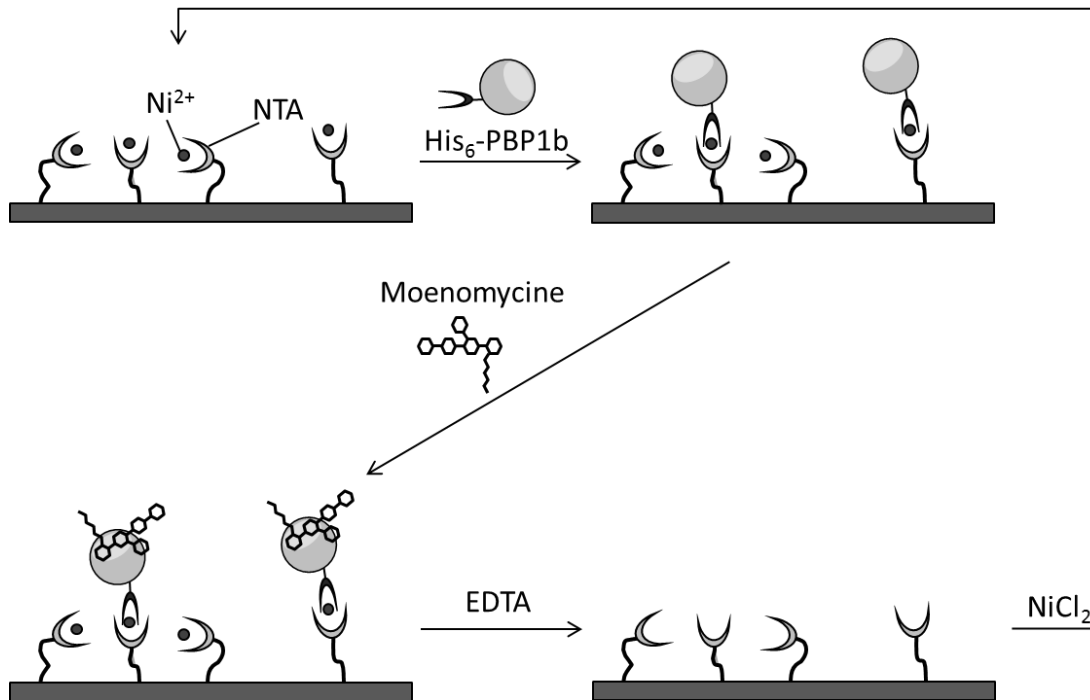


Abbildung 35: Direkter Flavophospholipol-Assay (Erläuterungen s. Text)

Abbildung 36 zeigt exemplarisch die Sensorgramme einer Lösung von 2 mg/mL Flavophospholipol (Flavomycin®) in Laufpuffer und einer Blindprobe (Laufpuffer). Bei beiden Zyklen war ein deutlicher Signalanstieg während der PBP1b-Injektion infolge der Bindung des Proteins an die Chipoberfläche festzustellen. Die Bindung war stabil genug, dass nach Beendigung der PBP1b-Injektion keine Dissoziation des Proteins zu beobachten war (besonders deutlich während der Injektion des Laufpuffers zu sehen). Bei Injektion der Flavophospholipol-Lösung war ein deutlicher Signalanstieg festzustellen. Die Bindung erfolgte spezifisch an das PBP1b (getestet durch Injektion einer 2 mg/mL Flavophospholipol-Lösung ohne vorherige PBP1b-Injektion, bei der keine Bindung zu beobachten war).

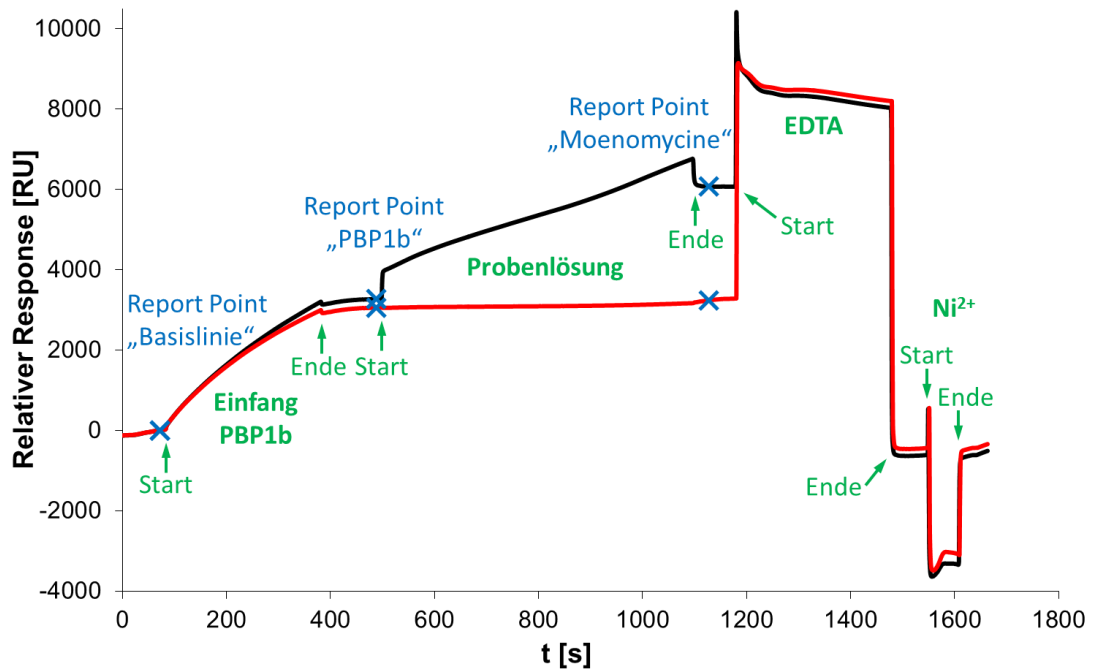


Abbildung 36: Sensorgramme der Analyse von 2 mg/mL Flavophospholipol in Laufpuffer (schwarz) und Laufpuffer ohne Flavophospholipol (rot). Die blauen Kreuze markieren die Report Points.

Die quantitative Auswertung erfolgte über drei Report Points („Basislinie“, „PBP1b“, „Moenomycine“ - s. Abbildung 36; zu den exakten Zeiten s. Abschnitt 9.2). Die Differenz aus dem Response am Report Point „Moenomycine“ und dem Report Point „PBP1b“ ergab den Moenomycin-Bindungslevel. Zusätzlich wurde der PBP1b-Bindungslevel aus der Differenz der Responses bei den Report Points „PBP1b“ und „Basislinie“ berechnet. Da der PBP1b-Bindungslevel starken Schwankungen unterlag (Variationskoeffizient ca. 20%), wurde für die Auswertung der über den PBP1b-Bindungslevel normierte Moenomycin-Bindungslevel herangezogen. Die erhaltenen Messdaten wiesen immer noch eine starke Streuung auf. Außerdem konnten erst Lösungen ab einem Flavophospholipol-Gehalt $\geq 200 \mu\text{g/L}$ von der Blindprobe unterschieden werden (s. Abbildung 37).

Ergebnisse und Diskussion

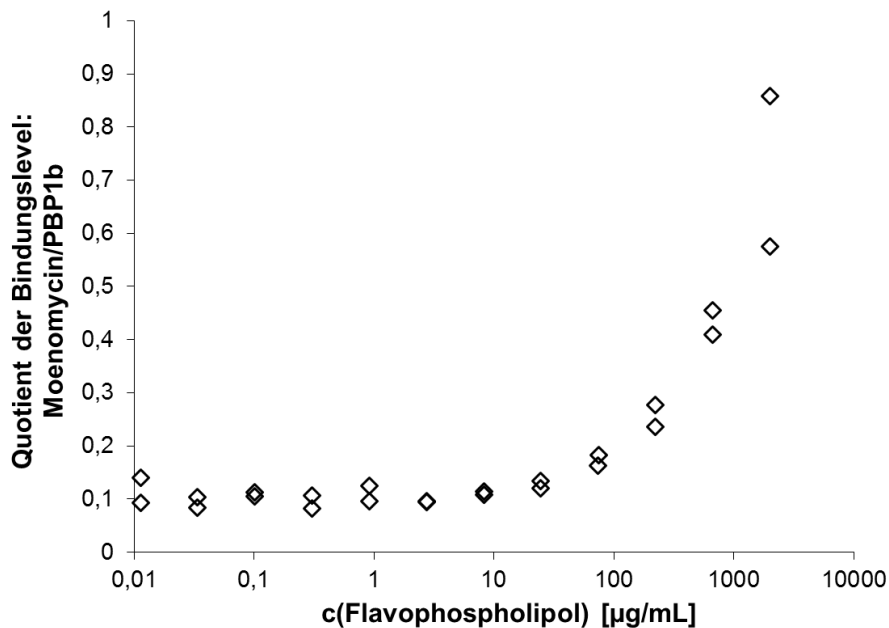


Abbildung 37: Auftragung der normierten Bindungslevel gegen den Flavophospholipol-Gehalt für eine Flavophospholipol-Konzentrationsreihe in Laufpuffer.

Auffällig war, dass die Moenomycin-Bindungslevel für die höchste untersuchte Flavophospholipol-Konzentration in derselben Größenordnung lagen, wie die PBP1b-Bindungslevel (s. Differenz zwischen den Report Points „PBP1b“ und „Basislinie“ bzw. „Moenomycine“ und „PBP1b“ in Abbildung 36). Die Molekulargewichte des Proteins (90 kDa) und der Moenomycine unterscheiden sich um mehr als den Faktor 50. Daher war ein deutlich geringerer Moenomycin-Bindungslevel zu erwarten gewesen, insbesondere da während der Flavophospholipol-Injektion kein Fließgleichgewicht erreicht wurde, was erwarten ließ, dass keine Sättigung des PBP1b mit Moenomycinen vorlag. Moenomycine werden in Lipidmembranen eingelagert und bilden auch selbst oberhalb von 0,03 bis 0,7 mM (je nach pH und Ionenstärke) Mizellen [62-64]. Eine Einlagerung in Triton X-100-Mizellen (1% Triton X-100) wurde bereits für das Tetramethylrhodamin-markierte Moenomycin-Derivat beobachtet, das bei dem von Rühl et al. [117] beschriebenen Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie-Assay (s. Abschnitt 4.3) verwendet wurde. Die Konzentration des verwendeten Tensids Triton X-100 lag oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC: 0,22 bis 0,25 mM [306] entsprechend <0,02%).

Ergebnisse und Diskussion

Daher ist anzunehmen, dass es nicht isolierte Moenomycin-Moleküle waren, sondern in Mizellen eingelagerte Moenomycine, die an das PBP1b gebunden haben. Dies könnte die große Streuung der Moenomycin-Bindungslevel und schlechte Reproduzierbarkeit erklären. Außerdem war anzunehmen, dass es bei der Analyse von Futtermittelextrakten zum Einschluss von Matrixbestandteilen in die Mizellen bzw. Tensidmembranen kommen würde, was starke Matrixeffekte erwarten ließ.

Der Assay funktionierte nur mit $MgCl_2$ im Laufpuffer. In Abwesenheit des Magnesiums lösten die Moenomycine das am Nickel gebundene His₆-PBP1b ab, statt daran zu binden. Zwar ist bekannt, dass die Transglykosylierungsreaktion durch *E. coli* PBP1b nur in Gegenwart zweiwertiger Metallkationen stattfindet [90], es wurden allerdings Kristallstrukturen von Peptidoglykan-GTs mit Moenomycin A in der Donor-Bindungsstelle untersucht, die keine Beteiligung von zweiwertigen Kationen an der Bindung zeigten (für *E. coli* PBP1b s. [123] und für *S. aureus* MtgA s. [124]). Daher sollte Magnesium nicht für die Bindung der Moenomycine an das *E. coli* PBP1b erforderlich sein. Eine naheliegende Erklärung wäre, dass die Moenomycine in Abwesenheit von Magnesium Komplexe mit dem Ni^{2+} bilden und dieses, analog dem zur Regeneration verwendeten EDTA, vom Chip ablösen. Das Magnesium würde nach dieser Hypothese von den Moenomycinen komplexiert, die damit keine Komplexbildung mit dem Nickel mehr eingehen könnten. Gegen diese Annahme spricht, dass Moenomycine zwar Komplexe mit verschiedenen Metallen (z.B. Zink, Eisen und Kupfer) bilden [13, 14], aber laut Huber et al. [14] nicht mit Alkali- oder Erdalkalimetallen.

Aufgrund der geringen Empfindlichkeit, starken Streuung der Moenomycin-Bindungslevel und zu erwartenden Anfälligkeit gegenüber Matrixeffekten wurde der direkte Flavophospholipol-Assay nicht zur Analyse von Futtermitteln angewendet. Stattdessen wurde die Entwicklung eines kompetitiven Assays weiter verfolgt.

7.2 Isolierung von Moenomycin A

Für den kompetitiven SPR-Biosensor-Assay wurde ein Derivat der Moenomycine benötigt, das auf der Oberfläche des Biosensorchips immobilisiert werden kann (auf die Synthese des Derivats wird in Abschnitt 7.3 eingegangen). Es war davon auszugehen, dass die verschiedenen Moenomycin-Kongener unterschiedliche Affinitäten zu dem biomolekularen Erkennungspartner (Antikörper oder Peptidoglykan-Glykosyltransferase) aufweisen würden. Für Peptidoglykan-Glykosyltransferasen ist bekannt, dass die verschiedenen Moenomycin-Kongener unterschiedlich starke Inhibitoren sind. So unterscheiden sich beispielsweise die MIC von Moenomycin A und dem strukturell sehr ähnlichen Moenomycin A₁₂ oder Moenomycin C₃ (s. Abbildung 1) zum Teil um ca. den Faktor 10 (Testkeime: *Staph. aureus* SG 511 und *Staph. aureus* 503 – Moenomycin A: 0,025 bis 0,05 µg/mL; Moenomycin A₁₂: 0,195 µg/mL bzw. 0,391 µg/mL; Moenomycin C₃: für beide Organismen 0,391 µg/mL [36, 37]). Um reproduzierbare Bedingungen für den SPR-Assay zu gewährleisten, sollte daher ein Derivat eines isolierten Moenomycin-Kongeners synthetisiert werden. Reine Moenomycine sind kommerziell nicht erhältlich, weshalb zunächst ein Kongener aus einem Flavomycin®-Standard isoliert werden musste. Zu diesem Zweck wurde Moenomycin A ausgewählt, da es das mengenmäßig bedeutsamste Kongener ist (s. Abschnitt 2.1.2).

7.2.1 Methode

Die Isolierung des Moenomycin A (schematisch in Abbildung 38) erfolgte per semi-präparativer HPLC an einer C18-Phase mit 50 mM Phosphatpuffer pH 2,3/Acetonitril 58:42 (v/v) als Eluent, gefolgt von einer Entfernung der Puffersalze mittels Festphasenextraktion (SPE) an einer Styrol-Divinylbenzol-Copolymerphase. Das im Eluat enthaltene Aceton wurde am Vakuum-Rotationsverdampfer abdestilliert und die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert (weitere Details s. Abschnitt 7.2.4 und 7.2.6 bzw. Abschnitt 9.5 und 9.6).

Vor der Entsalzung wurden die Fraktionen aus der semi-präparativen HPLC-Trennung mit analytischer HPLC auf ihre Reinheit geprüft (C18-Phase mit 100 mM

Ergebnisse und Diskussion

Ammoniumhydrogencarbonatpuffer (pH 8,0)/Acetonitril 55:45 (v/v) als Eluent; weitere Details s. Abschnitt 7.2.3 bzw. Abschnitt 9.3). Die Fraktionen, die neben Moenomycin A keine weiteren Moenomycine enthielten, wurden vereinigt und weiter aufgearbeitet. Eine Überprüfung, ob bei der SPE Moenomycin A bereits bei der Aufgabe oder bei einem der Waschschritte eluiert wurde, ebenso wie die Kontrolle der vollständigen Elution, erfolgte ebenfalls per analytischer HPLC.

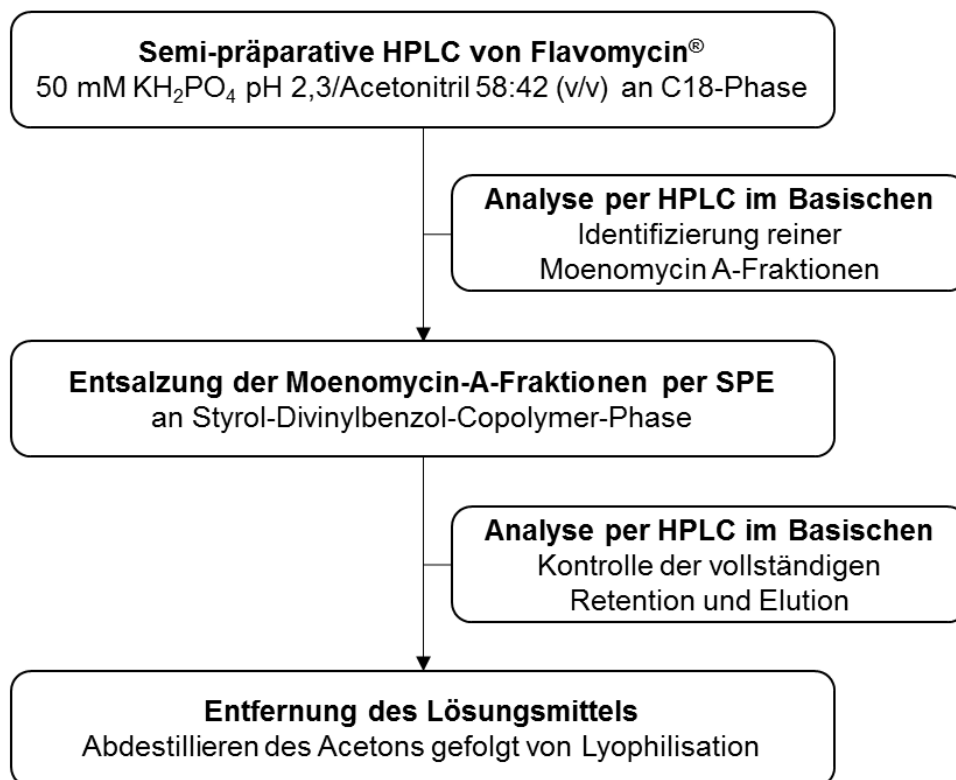


Abbildung 38: Schema der Isolierung von Moenomycin A aus Flavomycin®

Abbildung 39 a zeigt exemplarisch ein Chromatogramm der semi-präparativen HPLC-Trennung von Flavomycin®. In Teilabbildung b ist ein vergrößerter Ausschnitt dargestellt. Die Analyse der Fraktionen per HPLC im Basischen ergab, dass in ca. den ersten zwei Minuten des ersten Peaks (23% der Peakfläche) eine Mischfraktion aus Moenomycin A und A₁₂ eluiert wurde. Der restliche Peak war reines Moenomycin A (77% der Peakfläche).

Ergebnisse und Diskussion

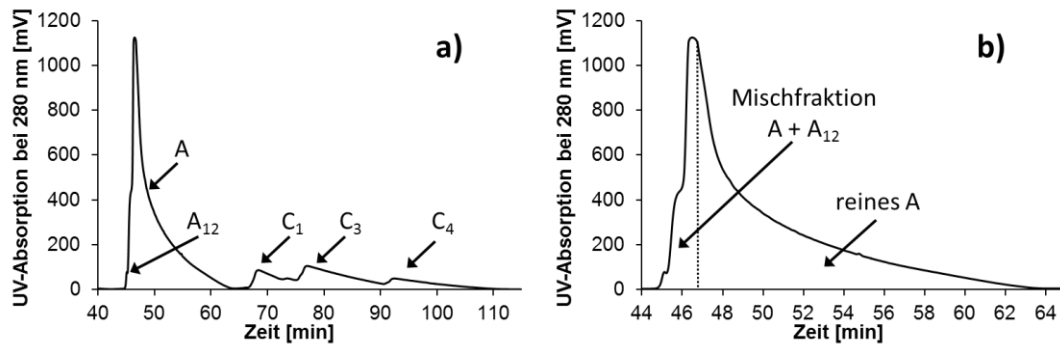


Abbildung 39: a) Semi-präparative HPLC-Trennung von 35 mg Flavomycin® (Bedingungen s. Abschnitt 9.5), A, A₁₂, C₁, C₃, C₄: Moenomycin A, A₁₂, C₁, C₃, C₄; b) vergrößerter Ausschnitt des Chromatogramms aus Teilabbildung a – vor der gestrichelten Linie wird eine Mischfraktion aus Moenomycin A und A₁₂ eluiert, dahinter reines Moenomycin A.⁸

Abbildung 40 zeigt exemplarisch ein Chromatogramm der Trennung des isolierten Moenomycin A im Vergleich zu Flavomycin® mit der analytischen HPLC-Methode. Die Trennung im Basischen (pH 8,0) eignet sich sehr gut zur Reinheitsprüfung der Eluate der semi-präparativen HPLC (pH 2,3), da sich bei den unterschiedlichen pH-Werten der Eluenten die Elutionsreihenfolge unterscheidet: Das kritische Peakpaar bei der semi-präparativen HPLC sind Moenomycin A und A₁₂. Diese beiden Kongenere sind im Basischen vollständig aufgelöst, sodass kleinere Mengen an Moenomycin A₁₂ nicht durch Coelution mit Moenomycin A kaschiert werden können. Moenomycin A und C₁ hingegen, die im Basischen schlecht aufgelöst sind, werden im Sauren auch bei massiver Massenüberladung der Säule basisliniengetrennt.

⁸ entnommen aus: Bury D, Dahmane I, Derouaux A, Dumbre S, Herdewijn P, Matagne A, Breukink E, Mueller-Seitz E, Petz M, Terrak M (2015) *Positive cooperativity between acceptor and donor sites of the peptidoglycan glycosyltransferase*. *Biochem Pharmacol* 93(2):141-150, Copyright (2014), abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Ergebnisse und Diskussion

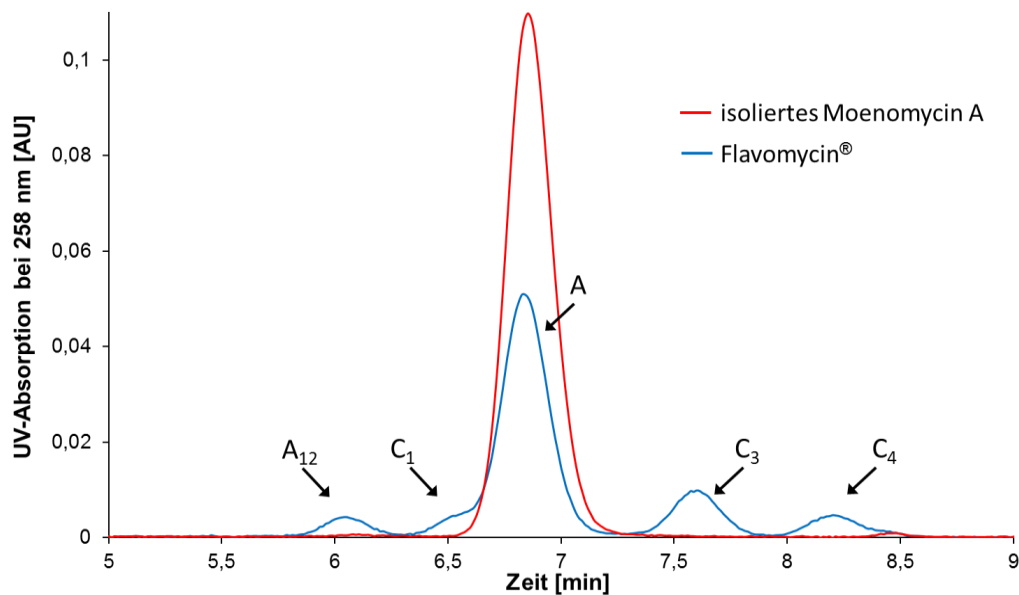


Abbildung 40: Analytische Trennung von Flavomycin® im Vergleich zu präparativ isoliertem Moenomycin A im Basischen (Bedingungen s. Abschnitt 9.2); A, A₁₂, C₁, C₃, C₄: Moenomycin A, A₁₂, C₁, C₃, C₄.⁹

7.2.2 Strategie

Verschiedene Methoden zur Isolierung von Moenomycin A sind in der Literatur beschrieben: Welzel et al. [31, 37] beschreiben ein Verfahren, bei dem zunächst eine Vortrennung von Flavomycin® an Silicagel mit Gemischen von 2-Propanol und 2 M Ammoniak erfolgt. Anschließend wird das Rohprodukt mittels präparativer HPLC an einer C18-Phase mit einem Methanol-Acetonitril-Wasser-Gemisch unter isokratischen Bedingungen getrennt und nach Abdampfen des Lösungsmittels lyophilisiert. Welzel et al. [31] berichten, dass aus 58 g Flavomycin® zunächst 15 g Rohprodukt erhalten wurden, von denen 3 g weiter aufgereinigt wurden, die zu 540 mg reinem Moenomycin A führten. Ausgehend von einem Moenomycin A-Gehalt

⁹ entnommen aus: Bury D, Dahmane I, Derouaux A, Dumbre S, Herdewijn P, Matagne A, Breukink E, Mueller-Seitz E, Petz M, Terrak M (2015) *Positive cooperativity between acceptor and donor sites of the peptidoglycan glycosyltransferase*. *Biochem Pharmacol* 93(2):141-150, Copyright (2014), abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

in Flavomycin® von 27-30% (bestimmt per HPLC-UV; s. Abschnitt 7.2.7) entspricht das einer Ausbeute von 16-17%.

Kurz et al. [21] wenden zur Gewinnung von Moenomycin A eine Kombination aus Ultrafiltration, Anionenaustauschchromatographie und RP-Chromatographie, gefolgt von (nicht näher beschriebener) Entsalzung an. Die Anionenaustauschchromatographie erfolgt an DEAE-Cellulose mit einem NaCl-Gradienten in Phosphatpuffer pH 7,4 mit 20% 2-Propanol und die RP-Chromatographie an einem Styrol-Divinylbenzol-Copolymer-Harz mit einem Propanol-Gradienten in Phosphatpuffer pH 7,4. Kurz et al. berichten die Isolierung von 4,5 g Moenomycin A aus 10 g reinem¹⁰ Moenomycin-Kongenerengemisch (nach Ultrafiltration erhalten) mit einer Reinheit von 98% (HPLC-UV). Ausgehend von einem Moenomycin A-Anteil am Kongenerengemisch von ca. 68-72% (s. Abschnitt 7.2.3 u. Abschnitt 7.2.4) entspricht das einer Ausbeute von ca. 63-66%.

Bei einem von Adachi et al. [132] beschriebenen Verfahren zur Isolierung von Moenomycin A aus Flavomycin® wird dieses zunächst mit Dichlormethan gewaschen und anschließend mit Methanol extrahiert. Der Extrakt wird im Vakuum aufkonzentriert, in Tris-Puffer aufgenommen und an einem Styrol-Divinylbenzol-Copolymer-Harz adsorbiert. Nach Waschen mit Wasser und Wasser/Methanol 2:1 (v/v) wird mit Methanol eluiert. Das nach Trocknung erhaltene Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit 2-Propanol/Wasser 7:3 (v/v) weiter aufgereinigt. Adachi et al. berichten, dass ausgehend von 500 g Flavomycin® 9,60 g Moenomycin A erhalten wurden. Das entspricht einer Ausbeute von 6-7%.

Pérez et al. [201] gewinnen einen Moenomycin-Standard aus einem Moenomycin-haltigen Futtermittel-Premix durch ASE (Accelerated Solvent Extraction) mit Methanol und anschließende SPE an einer C18-Phase zur Abtrennung mitextrahierter lipophiler Matrixbestandteile. Nach weiterer Aufreinigung per SPE an einer starken Anionenaustauscher-Phase wird ein Standard gewonnen, der neben Moenomycin A weitere Moenomycin-Kongenere enthält [201]. Der Moenomycin-Gehalt wird per UV-Absorption bei 258 nm bestimmt, wobei allerdings alle Moenomycin-Kongenere in Summe erfasst werden, die über die chromophore 2-Amino-Cyclopentan-1,3-dion-

¹⁰ gegenüber Flavomycin®, das neben dem Kongenerengemisch noch ca. 60% an Nebenbestandteilen enthält

Ergebnisse und Diskussion

Gruppe verfügen. Der exakte Moenomycin A-Gehalt ist folglich nicht bekannt. Dieses Verfahren ist aufgrund der Selektivität des Massenspektrometers für die Masse/Ladung-Verhältnisse der aus Moenomycin A gebildeten Ionen in der LC-MS-Analytik anwendbar. Für die Herstellung von Derivaten für die SPR-Analytik ist es aber nicht geeignet, da es nicht zur Abtrennung der anderen Kongenere kommt. Die Verfahren von Welzel et al. [31, 37], Kurz et al. [21] und Adachi et al. [132] hingegen erlauben zwar die Gewinnung von reinem Moenomycin A, allerdings versprochen sie zu geringe Ausbeuten oder waren zu aufwendig. Daher wurde ein effizienteres Verfahren zur Isolierung von Moenomycin A entwickelt. Grundlage hierfür sollte ein geeignetes chromatographisches Verfahren bilden.

Die in Abschnitt 3.4 erwähnten Verfahren zur Trennung der Moenomycin-Kongenere an Kieselgel ermöglichen eine Abtrennung der C-Kongenere von den A-Kongeneren [14, 31, 35, 37, 47, 49]. Ohne weitere Aufreinigung (s.o. [31, 37]) werden mit diesen Verfahren nur sehr geringe Ausbeuten an reinem Moenomycin A erzielt. Donnerstag et al. [37] beispielsweise berichten, dass durch Säulenchromatographie einer nicht bezifferten Menge an Flavomycin[®] 54 g reines Moenomycin A und 240 g einer Mischfraktion aus Moenomycin A und A₁₂ erhalten wurden.

Bei der von Subramaniam-Niehaus et al. [54] beschriebenen HPLC-Methode zur Trennung der Moenomycin-Kongenere an einer C₁₈-Phase mit einem Gemisch aus Methanol, Acetonitril und schwach alkalischem Phosphatpuffer als Eluent (Abschnitt 3.4) kommt es zur Coelution von Moenomycin A und C₃. Diese beiden werden wiederum nicht von Moenomycin C₁ basisliniengetrennt. Auch die von Subramaniam-Niehaus et al. [54] und von Eichhorn und Aga [56] beschriebenen Trennungen an C₁₈-Phasen mit Acetonitril und wässriger Ameisensäure bzw. Trifluoressigsäure (TFA) als Eluenten führen nur zur Antrennung der Moenomycin-Kongenere.

Die von Donnerstag et al. [37] und Endler et al. [53] verwendete HPLC-Methode ist für eine Basislinientrennung der fünf Moenomycin-Kongenere A, A₁₂, C₁, C₃ und C₄ geeignet und war daher als erster Ansatz am vielversprechendsten [37]. Die Trennung an einer C₁₈-Phase erfolgt mit 3 g/L Natriumheptansulfonat in schwach

alkalischem Phosphatpuffer im Verhältnis 80:20 (v/v) [37] bzw. 63:37 (v/v) [53] mit Acetonitril gemischt. Das Natriumheptansulfonat würde nach einer präparativen Trennung im isolierten Moenomycin A in erheblichen Mengen als Verunreinigung vorliegen und müsste wieder entfernt werden. Da sowohl Heptansulfonat, als auch Moenomycin A im Wässrigen als Anionen vorliegen und Tensidcharakter aufweisen, war zu erwarten, dass sich eine Abtrennung des Heptansulfonats schwierig gestalten würde. Daher wurde ohne diesen Zusatz gearbeitet. Das isolierte Moenomycin A würde zudem erhebliche Mengen an Puffersalzen enthalten, die weitere Arbeitsschritte oder die Stabilität des Produkts beeinflussen könnten. Um sich die Möglichkeit offen zu halten, nach der Isolierung die Pufferbestandteile destillativ entfernen zu können (s. hierzu Abschnitt 7.2.6), sollte ein flüchtiger Puffer verwendet werden. Außerdem wäre so eine Peakzuordnung per LC-MS möglich. Für den gewünschten pH-Wert von 8,0 ist Ammoniumhydrogencarbonat als flüchtiger Puffer für die LC-MS üblich [307]. Daher wurde anstelle der Kaliumphosphate Ammoniumhydrogencarbonat verwendet.

7.2.3 Trennung der Moenomycine im Basischen

Mit einem Eluentengemisch aus 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0) und Acetonitril im Verhältnis 64:36 (v/v) bei 30 °C (weitere Details s. Abschnitt 9.3) gelang auf einer C18-Phase die Basislinientrennung der Kongenere Moenomycin A₁₂, C₃ und C₄, sowie die Antrennung von Moenomycin A und C₁ (s. Abbildung 41). Die Elutionsreihenfolge wurde per LC-ESI-MS im Negativionenmodus in Übereinstimmung mit Donnerstag et al. [37] aufgeklärt.¹¹

¹¹ Die Methode zur analytischen Trennung der Moenomycine im Basischen wurde durch Frau Annabel Sand im Zuge ihrer durch den Autor betreuten wissenschaftlichen Abschlussarbeit „Synthese und Charakterisierung von Flavomycin-Konjugaten für die SPR-Biosensoranalytik“ im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker/innen entwickelt. Die LC-MS-Messung zur Aufklärung der Elutionsreihenfolge der Moenomycine erfolgte durch die Serviceabteilung für Massenspektrometrie des Fachbereichs C der Bergischen Universität Wuppertal.

Ergebnisse und Diskussion

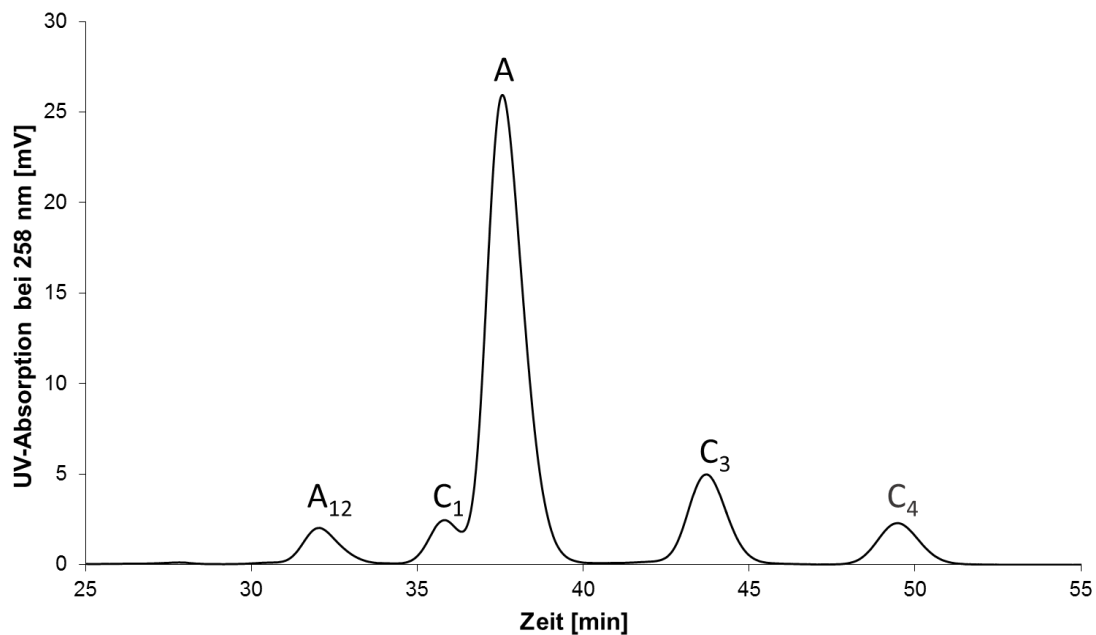


Abbildung 41: Analytische Trennung von 100 μ L einer 150 mg/L Flavomycin[®]-Lösung (Bedingungen s. Abschnitt 9.3; abweichend davon wurde ein Mischungsverhältnis der Eluenten 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0) und ACN von 64:36 (v/v) bei 30 °C angewendet)

Eine Basislinientrennung von Moenomycin A und C₁ konnte auch durch Verringerung des Acetonitril-Anteils im Eluenten und Erhöhung der Temperatur nicht erreicht werden.

Insbesondere hinsichtlich der langen Analysendauer der hier beschriebenen Methode wäre es für eine zeit- und materialeffiziente Isolierung des Moenomycin A mittels semi-präparativer HPLC sinnvoll, unter Massenüberladung der Säule zu arbeiten. Daher wurde geprüft, wie stark die Säule überladen werden kann. Auf der verwendeten analytischen HPLC-Säule kam es bereits bei Injektion von 0,5 mg Flavomycin[®] zur Coelution von Moenomycin C₁ und A und diese waren nicht mehr basisliniengetreunt von Moenomycin A₁₂. Bei Injektion von 1 mg Flavomycin[®] kam es zur Coelution der drei Moenomycine. Ausgehend von einem Skalierungsfaktor von ca. 5 (berechnet über die Säulenquerschnitte der analytischen Säule und der semi-präparativen Säule) wäre auf der semi-präparativen Säule von einer Trennung von Moenomycin A und A₁₂ bei Injektion von maximal 2,5 mg Flavomycin[®] auszugehen,

Ergebnisse und Diskussion

wobei das Moenomycin A mit Moenomycin C₁ verunreinigt wäre. Daher sollte eine leistungsstärkere Trennmethode entwickelt werden.

Die Methode erlaubte aber eine erste Charakterisierung des verwendeten Flavomycin®-Standards: Da alle fünf Kongenere über dasselbe Chromophor verfügen (die 2-Amino-Cyclopentan-1,3-dion-Gruppe), wurde angenommen, dass die molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten aller fünf Kongenere in etwa gleich sind. Basierend auf dieser Annahme wurde die quantitative Zusammensetzung der im Flavomycin®-Standard enthaltenen Moenomycine über deren relative Peakflächen abgeschätzt. (s. Tabelle 3). Die gefundenen Verhältnisse stimmen mit der in der Literatur beschriebenen Zusammensetzung von Flavophospholipol überein (s. Abschnitt 2.1.2).

Tabelle 3: Abgeschätzte Zusammensetzung des Moenomycin-Kongenere-Gemischs im verwendeten Flavomycin®-Standard

Kongener	molare Masse [g/mol]	Stoffmengen- anteil	Massenanteil
Moenomycin A	1582,6	69,9%	71,9%
Moenomycin A ₁₂	1568,6	4,9%	5,0%
Moenomycin C ₁	1390,4	4,8%	4,4%
Moenomycin C ₃	1404,4	13,5%	12,3%
Moenomycin C ₄	1420,4	6,9%	6,3%

Bei Trennung per DC an Kieselgel mit Gemischen aus Ammoniak und 1-Propanol oder 2-Propanol (Detektion mittels Fluoreszenzlösung oder Anisaldehyd/Schwefelsäure-Sprühreagenz) konnten in Übereinstimmung mit Scherckenbeck et al. [35] die von Tyaglov et al. [49] und Schacht et al. [47] beschriebenen B-Kongenere nicht gefunden werden. Bezüglich des Vorhandenseins weiterer Moenomycin-Kongenere s. Abschnitt 7.2.4.

Im weiteren Verlauf der Arbeit erwies es sich als vorteilhaft, die Reinheit des isolierten Moenomycin A in den gesammelten Fraktionen mit der hier beschriebenen HPLC-

Ergebnisse und Diskussion

Methode zu bestimmen, da das bei der präparativen Trennung kritische Peakpaar Moenomycin A und A₁₂ im Basischen basisliniengetrennt wird (s. Abschnitt 7.2.1). Zur Steigerung der Elutionskraft wurde der Acetonitril-Anteil von 36% auf 45% erhöht, was zwar zu einer Verschlechterung der Trennung von Moenomycin A und C₁ führte, aber die Analysenzeit von 55 min auf 9 min verkürzte (s. Abbildung 40) und somit einen höheren Probendurchsatz und geringeren Eluentenverbrauch ermöglichte.

Eichhorn und Aga [56] berichten für eine Antrennung der Moenomycine an einer C18-Phase mit 0,3% wässriger Ameisensäure und Acetonitril per Gradientenelution eine abweichende Elutionsreihenfolge: Moenomycin A wird vor Moenomycin C₁ eluiert. Da eine ähnliche stationäre Phase und ebenfalls Acetonitril als organischer Modifizierer verwendet wurden, lag es nahe, dass die umgekehrte Elutionsreihenfolge dieser beiden Kongenere auf Unterschiede im pH zurückzuführen ist. Wenn demnach im Sauren die relative Retention von Moenomycin C₁ bezogen auf Moenomycin A größer ist, als im Basischen, könnte im Gegenzug eine Erhöhung des pH-Werts des Eluenten über 8,0 hinaus zu einer Verringerung der relativen Retention führen. Dies sollte zu einer Verbesserung der Auflösung von Moenomycin A und C₁ führen. Da die verwendete RP18-Phase nach Herstellerangaben für pH-Werte bis 11 ausgelegt ist [308], wurde geprüft, ob eine Trennung bei pH 9,0 zu einer verbesserten Auflösung des kritischen Peakpaars führt. Dies war allerdings nicht der Fall. Diese Beobachtung deckt sich damit, dass gemäß den von Lantzsch et al. [62] ermittelten pK_s-Werten für Moenomycin A oberhalb von etwa pH 7 keine merklichen Änderungen im Protonierungsgrad des Moleküls erfolgen sollten (der pK_s der Carbonsäurefunktion wurde mit 5,3 als höchster der drei Werte abgeschätzt). Da auch die anderen Moenomycin-Kongenere über dieselben sauren funktionellen Gruppen verfügen, ist hier ein ähnliches Verhalten zu erwarten.

Ein Absenken des pH-Werts des Eluenten auf pH 7,0 führte zu einer Verschlechterung der Trennung von Moenomycin A und C₁, daher wurde für die Analyse der Moenomycin-Fractionen, die bei der semi-präparativen HPLC erhalten wurden, an 100 mM NH₄HCO₃ bei pH 8 festgehalten.

7.2.4 Trennung der Moenomycine im Sauren

In Übereinstimmung mit den publizierten HPLC-Methoden zur Trennung der Moenomycin-Kongenere im Sauren ([54, 56]) ergab die Trennung per RP-HPLC mit Eluenten bestehend aus Acetonitril und wässriger Ameisensäure oder TFA keine Trennung der fünf Kongenere. Abbildung 42 zeigt exemplarisch die Trennung der Moenomycine mit 0,1% TFA in Wasser/ACN 40:60 (v/v) an einer RP-Phase mit eingebetteten polaren Gruppen (Ultra IBD).

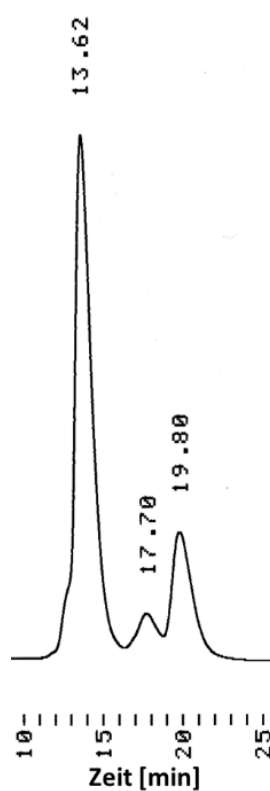


Abbildung 42: Analytische Trennung von 10 μ L einer 1 g/L Flavomycin[®]-Lösung an Ultra IBD (5 μ m, 150 * 2,1 mm) mit 0,5 mL/min 0,1% TFA in Wasser/ACN 40:60 (v/v). Detektion im UV bei 258 nm.

Eine Trennung mit gepuffertem, saurem Eluenten führte hingegen zu einer Trennung der Kongenere. Abbildung 43 zeigt die Trennung der Moenomycine mit 50 mM Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 2,3/ACN 58:42 (v/v) an einer C18-Phase. Eine erste Peakzuordnung erfolgte, indem Flavomycin[®] mit der in Abschnitt 7.2.3

Ergebnisse und Diskussion

beschriebenen Methode getrennt, das Eluat fraktioniert gesammelt und die Fraktionen im Sauren analysiert wurden. Später erfolgte eine Bestätigung durch fraktioniertes Sammeln des Eluats bei Trennung im Sauren, Entsalzung per SPE (s. Abschnitt 7.2.6) und Analyse mittels ESI-MS im Negativionenmodus per Direktinfusion der erhaltenen Isolate. Die Elutionsreihenfolge der fünf Kongenere entsprach der von Eichhorn und Aga [56] beschriebenen für die Trennung mit Ameisensäure und Acetonitril.

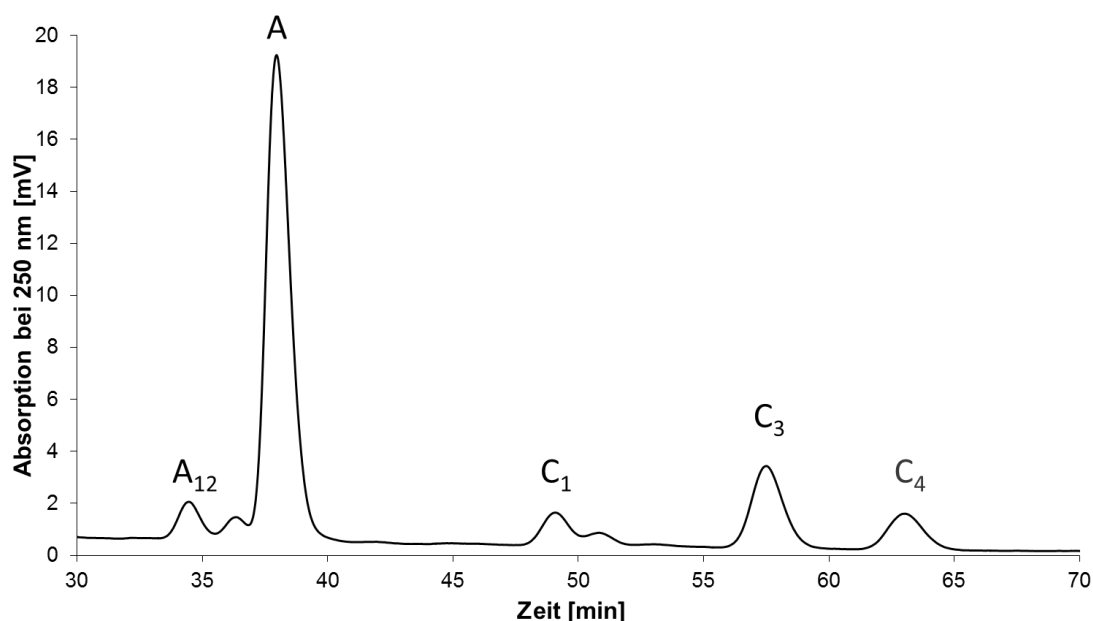


Abbildung 43: Analytische Trennung von 100 μL einer 150 mg/L Flavomycin[®]-Lösung an NUCLEODUR C18 HTec (250 mm * 4,6 mm, Partikelgröße 5 μm) mit 1 mL/min 50 mM KH_2PO_4 pH 2,3/ACN 58:42 (v/v) bei 30 °C. Detektion im UV bei 250 nm.

Da die Trennung im Sauren zu einer besseren Auflösung der fünf Kongenere führte, als die Trennung im Basischen, wurde diese Methode für die semi-präparative HPLC-Trennung der Moenomycine ausgewählt (Details s. Abschnitt 9.5).

Für die Übertragung der Methode von der analytischen auf die semi-präparative HPLC-Säule ergab sich aufgrund der Innendurchmesser der Säulen (4,6 mm und 10,0 mm) und somit der Querschnitte (16,6 mm^2 und 78,5 mm^2) ein Skalierungsfaktor von ca. 5. Da Vorversuche aber gezeigt hatten, dass die Flussrate einen geringen

Einfluss auf die Trenneffizienz hat (ca. 4% Unterschied in der Auflösung bei einem Unterschied der Flussraten von 0,2 mL/min auf der analytischen Säule), wurde zwecks einer schnelleren und somit im Endeffekt effizienteren Trennung mit einer Flussrate von 6,0 mL/min gearbeitet (der Hersteller gibt als typische Flussraten für die verwendete semi-präparative Säule 3 bis 9 mL/min an [308]). Außerdem wurde die Trennung bei 45 °C durchgeführt, da sich gezeigt hatte, dass eine Erhöhung der Temperatur von 30 °C auf 45 °C zu einer Verbesserung der Auflösung des kritischen Peakpaars Moenomycin A und A₁₂ von 19% führte. Da der verwendete UV/VIS-Detektor nicht über eine präparative Flusszelle, sondern über eine Flusszelle im Halbmikro-Maßstab verfügte, erfolgte die Detektion nicht am Absorptionsmaximum (245-247 nm im Sauren [14]), sondern bei 280 nm. Somit wurde, trotz der hohen Moenomycin-Konzentrationen im Eluat, zu keinem Zeitpunkt der Vollausschlag des Detektors erreicht.

Im Chromatogramm (Abbildung 43) sind zwischen Moenomycin A₁₂ und A, sowie nach Moenomycin C₁ zwei zusätzliche Peaks zu erkennen, die das Vorhandensein weiterer Moenomycin-Kongenere vermuten ließen. Im Rahmen der Referenzanalytik für Flavophospholipol in Futtermitteln per LC-MS (s. Abschnitt 7.5.3) wurden auch Lösungen des verwendeten Flavomycin[®]-Standards per LC-MS mit hochauflösender Massenspektrometrie (Orbitrap-MS) analysiert¹². Die Messdaten wurden retrospektiv auf das Vorhandensein weiterer bekannter Phosphoglykolipide der Moenomycin-Gruppe (s. Abschnitt 2.1.1) geprüft. Hierzu wurden die exakten Massen der Kongenere berechnet und in Massenfenstern einer Breite von m/z 0,02 um die exakten Massen die Ionenchromatogramme extrahiert (s. Abbildung 44). Neben den fünf bereits gefundenen Moenomycin-Kongeneren wurden im selben Retentionszeitfenster zwei Substanzen gefunden, deren Masse/Ladungsverhältnisse denen von Moenomycin A₇ (6C-Hydroxy-Moenomycin A) und 6E-Hydroxy-Moenomycin C₁ entsprechen [41]. Die Trennung erfolgte an einer C18-Phase mit saurem Eluenten und Acetonitril als organischem Modifier

¹² Die LC-HRMS-Messungen wurden freundlicherweise von Herrn Breuer-Grau am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Ruhr-Wupper (CVUA-RRW) in Krefeld durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

(0,1% Ameisensäure in Wasser und in Acetonitril als Eluenten - weitere Details s. Abschnitt 9.18). Da Messungen mit vier verschiedenen C18-Phasen (s.u.) im Rahmen der Methodenentwicklung keine Selektivitätsunterschiede bei der Trennung der Moenomycine gezeigt hatten, kann von einer ähnlichen Elutionsreihenfolge bei den in Abbildung 43 und Abbildung 44 gezeigten Chromatogrammen ausgegangen werden. Bei dem Peak zwischen Moenomycin A₁₂ und A in Abbildung 43 sollte es sich daher um Moenomycin A₇ und bei dem Peak hinter Moenomycin C₁ um 6E-Hydroxy-Moenomycin C₁ handeln. Außerdem wurden im Retentionszeitfenster, in dem die Moenomycine eluiert wurden, vier weitere Substanzen gefunden, deren Masse/Ladungs-Verhältnisse denen von Nosokomycin A, B, B₂ und D entsprechen. Die Nosokomycine verfügen nicht über die chromophore 2-Amino-Cyclopentan-1,3-dion-Gruppe und können daher per HPLC-UV nicht detektiert werden. Die gemessenen akkuraten Massen der tentativ identifizierten Moenomycin-Kongenere weichen um maximal 3,0 ppm von der jeweiligen berechneten exakten Masse ab (s. Abschnitt 9.4).

Nosokomycin B₂ und Nosokomycin D wurden bislang nur durch heterologe Expression gewonnen [42-45], nicht aber als Produkt von Streptomyceten identifiziert, die zur Flavophospholipol-Produktion verwendet werden. Die anderen vier Kongenere sind bekannte Minorkomponenten in Flavomycin® [1, 41]. Bei Nosokomycin A handelt es sich um den Prekursor von Moenomycin A. Die Nosokomycine B, B₂ und D sind Nebenprodukte der Biosynthese von Moenomycin A, A₇ und C₄ (s. Abschnitt 2.3).

Ergebnisse und Diskussion

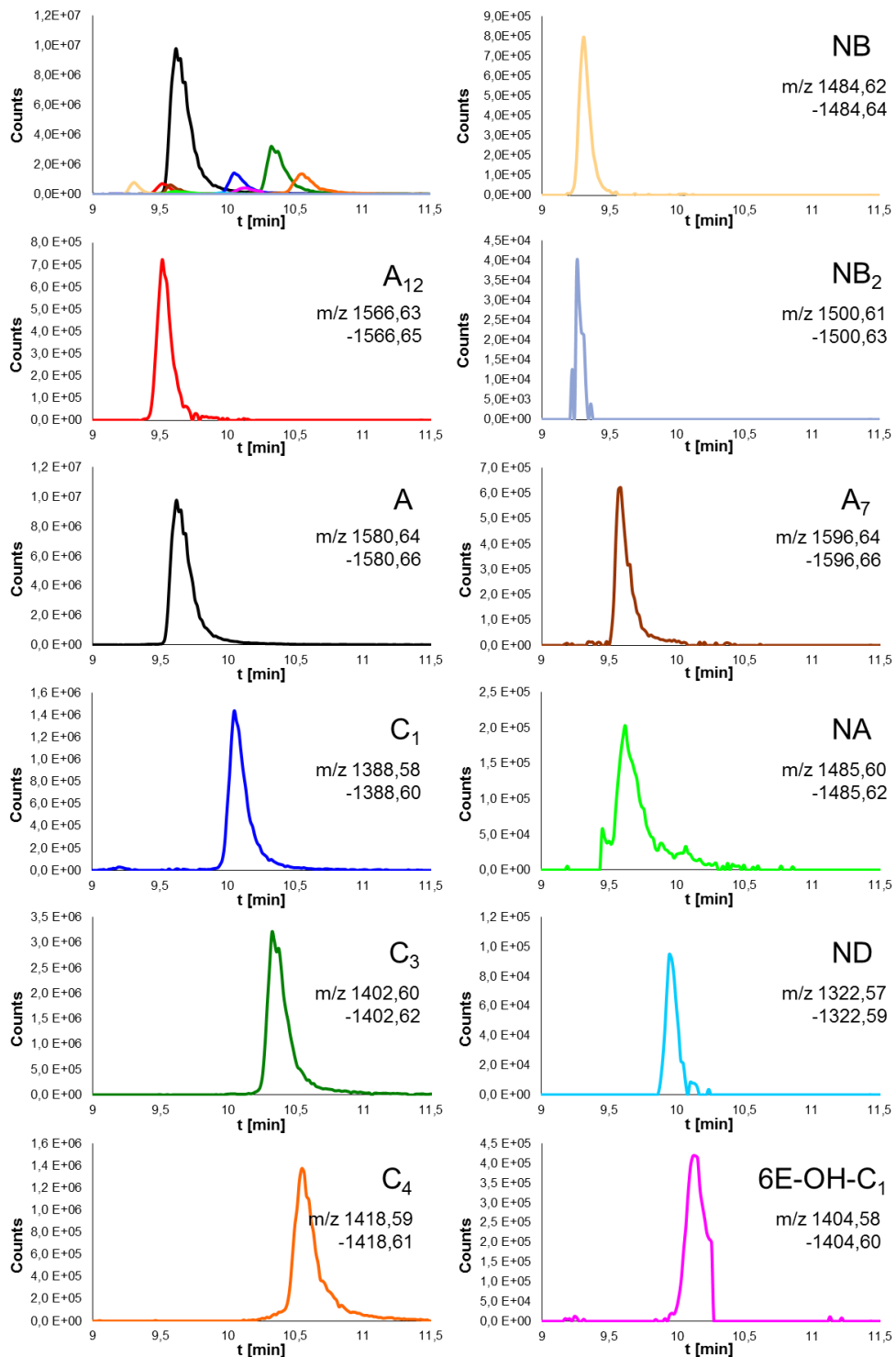


Abbildung 44: Analyse von 25 mg/L Flavomycin® per LC-HRMS (Bedingungen s. Abschnitt 9.18). Die Massenfenster der extrahierten Ionenchromatogramme sind jeweils angegeben. A, A₇, A₁₂, C₁, C₃, C₄: Moenomycin A, A₇, A₁₂, C₁, C₃, C₄; 6E-OH-C₁: 6E-Hydroxy-Moenomycin C₁; NA, NB, NB₂, ND: Nosokomycin A, B, B₂, D.

Ergebnisse und Diskussion

Analog zur Trennung im Basischen wurde die Zusammensetzung des Flavomycins[®] über die relativen Peakflächen abgeschätzt (s. Tabelle 4). Zum Vergleich sind die Ergebnisse der Trennung im Basischen mit aufgelistet.

Tabelle 4: Abgeschätzte Zusammensetzung des Moenomycin-Kongeneren-Gemischs im verwendeten Flavomycin[®]-Standard. Vergleich zwischen der Analyse bei pH 2,3 und pH 8,0.

Kongener	molare Masse [g/mol]	Stoffmengenanteil		Massenanteil	
		bestimmt bei pH 2,3	bestimmt bei pH 8,0	bestimmt bei pH 2,3	bestimmt bei pH 8,0
Moenomycin A	1582,6	65,5%	69,9%	67,6%	71,9%
Moenomycin A ₁₂	1568,6	4,6%	4,9%	4,7%	5,0%
Moenomycin C ₁	1390,4	4,8%	4,8%	4,3%	4,4%
Moenomycin C ₃	1404,4	14,2%	13,5%	13,0%	12,3%
Moenomycin C ₄	1420,4	7,0%	6,9%	6,5%	6,3%
Moenomycin A ₇	1598,6	2,4%	-	2,5%	-
6E-Hydroxy-Moenomycin C ₁	1406,4	1,6%	-	1,4%	-

Die relativen Abweichungen zwischen den im Sauren abgeschätzten Stoffmengenanteilen der Moenomycin-Kongenere und den im Basischen Abgeschätzten betragen 2% bis 7%. Die höchste absolute Abweichung ergibt sich für Moenomycin A. Hier ist der im Sauren abgeschätzte Gehalt um 4,4%-Punkte geringer. Da Moenomycin A₇ und 6E-Hydroxy-Moenomycin C₁ im Basischen nicht als separate Peaks detektiert wurden, ist anzunehmen, dass hier mindestens eins der beiden Kongenere mit Moenomycin A coeluiert.

7.2.5 Weitere verfolgte Ansätze für die chromatographische Trennung

Im Zuge der Methodenentwicklung wurde die Trennung der Moenomycine an einer C18-Phase auch bei den pH-Werten 4,0; 4,5; 5,0 und 7,0 getestet. Mit keiner dieser Bedingungen wurden vergleichbar gute Auflösungen erreicht, wie bei pH 2,3.

Wurde, anstelle von Säure oder Puffer, Wasser als Eluent verwendet, kam es zur vollständigen Elution der Moenomycine mit der Totzeit. Die Eignung von Methanol oder Acetonitril/Tetrahydrofuran 9:1 (v/v) als organischem Modifier, anstelle von reinem Acetonitril, wurde ebenfalls geprüft. In beiden Fällen wurde eine schlechtere Trennung erreicht.

Neben zwei C18-Phasen mit Endcapping (LiChrospher® 100 RP-18 endcapped und NUCLEODUR® C18 HTec) wurden auch weitere stationäre Phasen auf ihre Eignung zur Trennung der Moenomycine geprüft. Eine C18-Phase mit eingebetteten polaren Gruppen (Ultra IBD) und eine hochbelegte C18-Phase mit daraus resultierender ausgeprägter Formerkennung (shape selectivity; SUPELCOSIL LC-PAH) ergaben keine verbesserte Trennung. Im RP-Modus wurde mit einer C8-Phase (Superspher® 60 RP-8), einer Pentafluorphenyl-Phase (Hypersil™ Gold PFP) und einer Cyanopropylphase (NUCLEODUR® 100-3 CN-RP) anscheinend dieselbe Elutionsreihenfolge erzielt (abgeschätzt aufgrund der Peakflächen, keine Identifizierung der Kongenere per MS), wie mit den C18-Phasen (im Sauren ebenso wie im Basischen). Die Auflösung war allerdings schlechter, als bei Verwendung der C18-Phasen, weshalb auch auf eine experimentelle Bestätigung der Elutionsreihenfolge verzichtet wurde. Mit einer Aminopropylphase (LiChrospher® 100 NH₂) wurde lediglich eine schwache Antrennung und mit einer Diolphase (LiChrospher® 100 Diol) keine Trennung der Moenomycin-Kongenere im RP-Modus erzielt.

Zusätzlich zur RP-Chromatographie wurde auch die Eignung der hydrophilen Interaktionschromatographie (HILIC) zur Trennung der Moenomycine geprüft. Mit einer Sulfobetain-Phase (SeQuant® ZIC®-HILIC) und einer vernetzten Diol-Phase (Luna® HILIC) wurden vier schlecht aufgelöste Peaks eluiert (s. Abbildung 45). Mit der Aminophase wurde unter HILIC-Bedingungen keine Trennung erzielt.

Ergebnisse und Diskussion

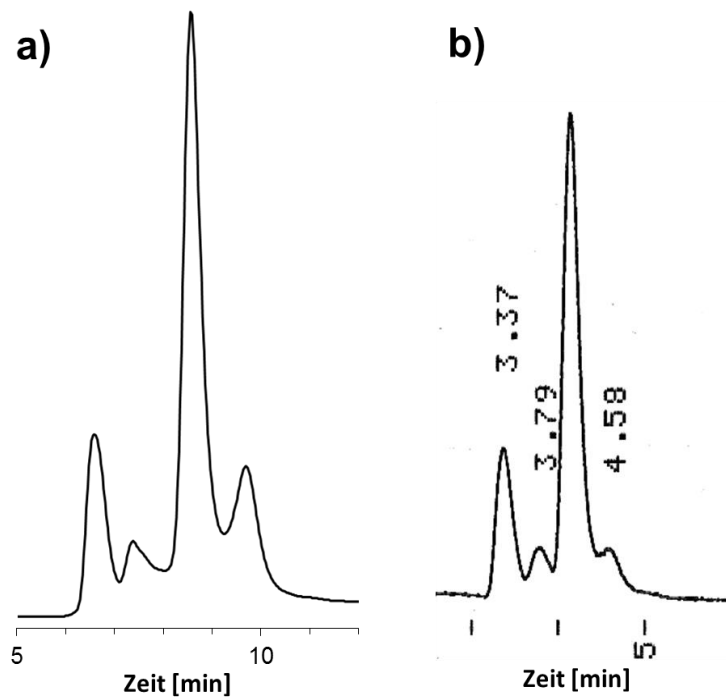


Abbildung 45: Trennung von Flavomycin[®] an zwei verschiedenen HILIC-Phasen: a) ZIC[®]-HILIC mit 50 mM Ammoniumacetat/ACN 25:75 (v/v); b) Luna[®] HILIC mit 100 mM Ammoniumacetat/ACN 20:80 (v/v)

7.2.6 Entsalzung der Fraktionen der semi-präparativen HPLC

Das Eluat der semi-präparativen HPLC enthielt noch große Mengen gelöster Puffersalze (>95% der Trockenmasse). Die Entfernung dieser Puffersalze erfolgte mittels SPE an einer Styrol-Divinylbenzol-Copolymer-Phase (s. Abbildung 46). Eine detaillierte Beschreibung der Methode findet sich in Abschnitt 9.6.

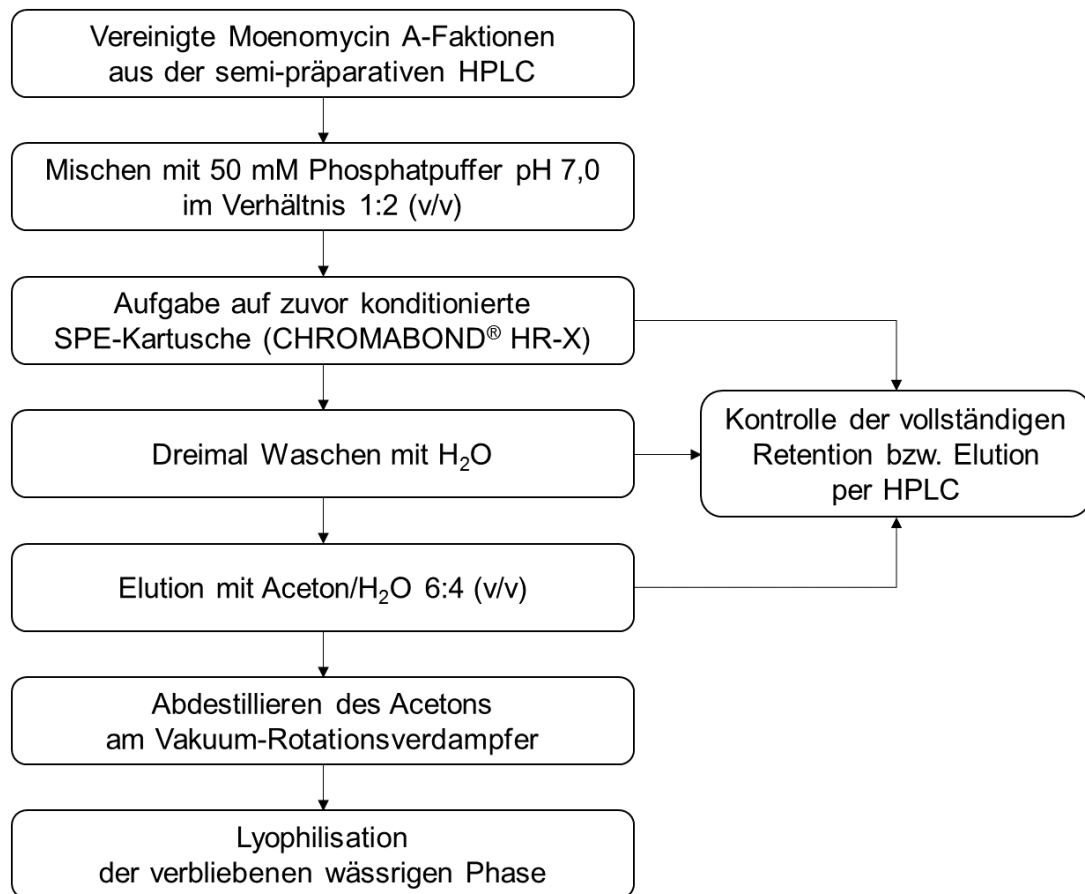


Abbildung 46: Schema der Isolierung von Moenomycin A aus den vereinigten Fraktionen der semi-präparativen HPLC durch Entsalzung per SPE.

Für die Entsalzung per SPE war aufgrund des amphiphilen Charakters von Moenomycin A sowohl die Anwendung einer hydrophoben RP-Phase, als auch die Anwendung einer gemischt polaren SPE-Phase denkbar.

Gallo et al. [57] wendeten zur Aufreinigung von Futtermittlextrakten für die LC-MS-Analytik SPE an einer gemischt polaren *N*-Vinylpyrrolidon/Divinylbenzol-Copolymer-

Ergebnisse und Diskussion

Phase (Oasis® HLB, Waters) an. Pérez et al. [201] wendeten im Zuge der Isolierung der Moenomycine aus einem Futtermittel-Premix SPE an einer C18-Phase zur Abtrennung lipophiler Begleitstoffe an. Für die Aufreinigung von Hühnermist-Extrakten für die LC-MS-Analytik wendeten Pérez et al. SPE an einer C4-Phase an. Begründet wird die Wahl dieser Phase mit einer zu hohen Retention an der ebenfalls getesteten C18-Phase und damit verbundener unvollständiger Elution mit Methanol [201]. Ein Teilschritt der von Adachi et al. [132] beschriebenen Isolierungsmethode für Moenomycin A sieht die Aufreinigung der Moenomycine an einem Styrol-Divinylbenzol-Copolymer-Harz vor.

Aufgrund der Erfahrung im Zuge der HPLC-Methodenentwicklung, dass die Moenomycine mit Wasser/Acetonitril-Gemischen an einer C18-Phase nicht retardiert wurden, wurde keine Alkyl-modifizierte Silicaphase verwendet. Stattdessen wurden bei der Methodenentwicklung, in Anlehnung an Adachi et al. [132], eine stark hydrophobe Polymerphase (Styrol-Divinylbenzol-Copolymer; CHROMABOND® HR-X, Macherey-Nagel) und die bei Gallo et al. [57] verwendete Oasis® HLB getestet. Für die Elution wurden Gemische aus Acetonitril, Methanol oder Aceton mit Wasser in verschiedenen Mischungsverhältnissen getestet. Aceton/Wasser 6:4 (v/v) hatte die höchste Elutionskraft.

Da die Moenomycin A-Fractionen aus der semi-präparativen HPLC einen Acetonitril-Anteil von 42% (v/v) hatten, war zweifelhaft, ob es zur vollständigen Retention an der SPE-Phase kommen würde. Um zu prüfen, ob der Acetonitril-Anteil vor der SPE verringert werden müsste, wurde auf beiden Phasen (jeweils 6cc-Kartusche mit 200 mg Sorbent) eine Flavomycin®-Lösung (entsprechend 3,2 mg Flavomycin®) in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 aufgegeben, sequentiell mit Puffer/Acetonitril-Gemischen mit ansteigendem Acetonitril-Anteil (5%-Schritte) eluiert und die Eluate per HPLC analysiert (s. Tabelle 5). Da von der CHROMABOND® HR-X-Phase erst bei höheren Acetonitril-Anteilen im Eluenten Flavomycin® eluiert wurde, wurde diese Phase für die Entsalzung verwendet.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5: SPE von je 3,2 mg Flavomycin® an zwei verschiedenen SPE-Phasen (Oasis® HLB und CHROMABOND® HR-X; 6cc, 200 mg). Anteil des aufgegebenen Flavomycins® im Eluat (50 mM Phosphatpuffer pH 7,0/Acetonitril) bei steigendem Acetonitril-Anteil (5%-Schritte)

Acetonitril-Anteil im Eluenten	Oasis® HLB	CHROMABOND® HR-X
5%	-	-
10%	-	-
15%	-	-
20%	-	-
25%	<5%	-
30%	90%	55%

Für die Verringerung des Acetonitril-Anteils kam eine destillative Abtrennung oder Verdünnung mit Puffer in Frage. Gegen die Abtrennung des Acetonitrils sprachen die vergleichsweise zeitaufwendige Destillation und die dabei auftretende thermische Belastung. Bei Verdünnung mit Puffer wiederum würde das Aufgabevolumen erhöht, wodurch, trotz Verringerung der Elutionskraft, ein Durchbruch des Moenomycin A bei der Aufgabe denkbar war. Zudem würde bei Verdünnung stets ein Bruchteil des ursprünglichen Acetonitril-Anteils erhalten bleiben.

Eine Verringerung des Acetonitril-Anteils auf <15% durch Mischen der Moenomycin A-Fractionen vor der SPE mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 im Verhältnis 1:2 (v/v) reichte aus, um einen Durchbruch des Moenomycin A zu verhindern (auf diese Weise wurde auch eine Abstumpfung auf pH>6,5 erreicht). Dies wurde bei jeder SPE geprüft, indem die letzten 10 mL der aufgegebenen Moenomycin A-Lösung separat aufgefangen und per HPLC (im Basischen) analysiert wurden. In gleicher Weise wurden die Eluate der Waschschrte und Elutionsschritte analysiert. Die Entsalzung per SPE erwies sich als sehr robust: bei keinem Durchgang konnte Moenomycin A im Eluat bei der Aufgabe oder in einem der ersten beiden Waschschrte nachgewiesen werden. Gelegentlich wurden im dritten (und letzten) Waschschrte Spuren von Moenomycin A nachgewiesen. Wurde bei der Elution die Flussrate von maximal 1 mL/min eingehalten, reichten 2 * 10 mL Aceton/Wasser

Ergebnisse und Diskussion

6:4 (v/v) für eine praktisch vollständige Elution des Moenomycin A (<1% der aufgegebenen Menge an Moenomycin A in der dritten Fraktion) aus.

Neben der Entsalzung per SPE wurde auch die destillative Abtrennung flüchtiger Puffer getestet. Dies geschah bereits im Rahmen der HPLC-Methodenentwicklung mit basischem Eluenten: Eine Flavomycin®-Lösung in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonatpuffer wurde am Vakuum-Rotationsverdampfer eingeeengt. Hierbei wurde ein gelblicher, süßlich riechender Sirup erhalten, weshalb davon auszugehen war, dass es in erheblichem Maße zum Abbau der enthaltenen Moenomycine gekommen war. Aufgrund dieser Erfahrung war die Verwendung flüchtiger Puffer für eine Isolierung von Moenomycin A (im Falle der Trennung im Sauren z.B. Ammoniumformiat) nicht weiter verfolgt worden.

7.2.7 Charakterisierung des isolierten Moenomycin A

Die Identität des isolierten Moenomycin A wurde in Übereinstimmung mit Hennig et al. [309] per ^1H NMR-Spektroskopie bestätigt (s. Abbildung 47, Signalzuordnung s. Abschnitt 9.7)¹³.

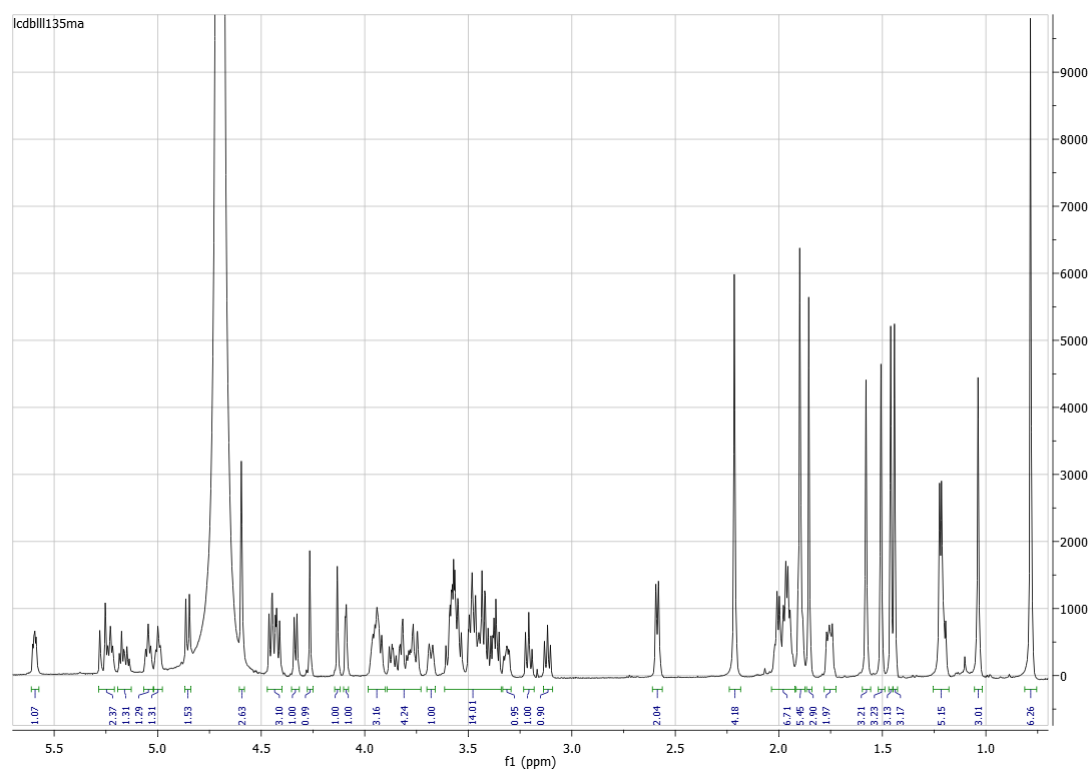


Abbildung 47: ^1H NMR-Spektrum des isolierten Moenomycin A (600 MHz, 0,5 mmol/L in D_2O)

Mittels LC-HRMS (s. Abschnitt 9.18; s. Fußnote 12 auf Seite 113) wurde als akkurate Masse für das isolierte Moenomycin A m/z 1580,6496 (-2,8 ppm) gemessen. Das Massenspektrum des Moenomycin A-Peaks ist in Abbildung 48 wiedergegeben. Die Massenpeaks bei m/z 1580,6496; 800,8127 und 789,8219 sind auf die aus Moenomycin A gebildeten Ionen $[\text{M}-\text{H}]^-$, $[\text{M}-3\text{H}+\text{Na}]^{2-}$ und $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ zurückzuführen. Die Massenpeaks bei m/z 1596,6445 und 797,8194 stammen hingegen von einer

¹³ Die Aufnahme der NMR-Spektren erfolgte durch Herrn Andreas Siebert aus der Serviceabteilung für Kernresonanzspektroskopie des Fachbereichs C der Bergischen Universität Wuppertal.

Ergebnisse und Diskussion

Verunreinigung des isolierten Moenomycin A mit Moenomycin A₇ ([M-H]⁻ und [M-2H]²⁻).

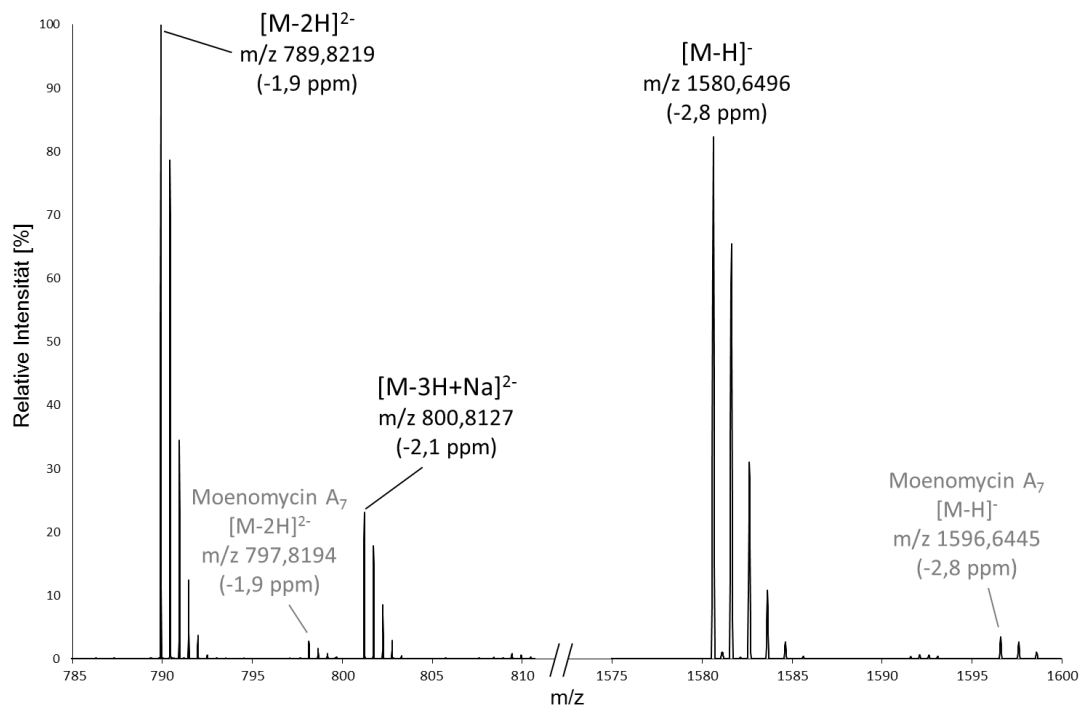


Abbildung 48: Hochaufgelöstes Massenspektrum des isolierten Moenomycin A (extrahiertes Massenspektrum des Moenomycin A-Peaks im LC-HRMS-Chromatogramm nach Subtraktion des Hintergrundspektrums)

Mit HPLC-UV im Basischen (258 nm; Methode s. Abschnitt 9.3) wurde eine Reinheit des isolierten Moenomycin A von >99% bestimmt. Moenomycin A₁₂, C₁, C₃ und C₄ konnten nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 40).

Mit LC-HRMS konnten Moenomycin A₇ und Nosokomycin B als Verunreinigungen nachgewiesen werden. Veränderungen in der Eluentenzusammensetzung und Coelution (der Analyten miteinander oder mit anderen Substanzen) können bei Detektion mittels ESI-MS zu Ionensuppression und -verstärkung führen [310]. Somit kann nicht von einem identischen Ansprechverhalten der verschiedenen Moenomycin-Kongenere ausgegangen werden und eine Abschätzung der Gehalte oder Anteile der einzelnen Kongenere ist nicht möglich. Über Vergleich der relativen Peakflächen der Ionen [M-H]⁻ von Moenomycin A, Moenomycin A₇ und

Ergebnisse und Diskussion

Nosokomycin B (Anteil der Peakfläche an der Summe der Peakflächen der Moenomycin-Kongenere) in Flavomycin[®] und dem isolierten Moenomycin A kann allerdings die An- bzw. Abreicherung der beiden Verunreinigungen abgeschätzt werden (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Relative Peakflächen der Ionen [M-H]⁻ von Moenomycin A, Moenomycin A₇ und Nosokomycin B im isolierten Moenomycin A und in Flavomycin[®]. In Klammern sind die Variationskoeffizienten der relativen Peakflächen angegeben (n = 2).

Kongener	relative Peakfläche [%]		Anreicherung
	in Flavomycin [®]	im isolierten Moenomycin A	
Moenomycin A	55,8 (3,0%)	95,7 (0,5%)	171%
Moenomycin A ₇	1,7 (21%)	3,4 (17%)	204%
Nosokomycin B	2,3 (2,0%)	0,9 (13%)	39%

Moenomycin A₇ wurde im Vergleich zu Moenomycin A stärker angereichert (Anreicherung relativ zu Moenomycin A um ca. 20%). Aufgrund der hohen statistischen Unsicherheit der relativen Peakflächen von Moenomycin A₇ ist dieser Wert allerdings mit einer hohen Unsicherheit behaftet. Nosokomycin B wurde um ca. 60% abgereichert (Anreicherung 39%; Abreicherung relativ zu Moenomycin A um ca. 80%).

Es wurden insgesamt 225 mg Moenomycin A aus 1050 mg Flavomycin[®] isoliert. Mit dem isolierten Moenomycin A als Standard wurde der Moenomycin A-Gehalt des verwendeten Flavomycins[®] per HPLC bestimmt. In drei untersuchten Chargen wurden Gehalte zwischen 27% und 30% (w/w) festgestellt. Die erzielte Ausbeute liegt demnach zwischen 71% und 79%. Das hier vorgestellte Verfahren ist deutlich effizienter, als die von Welzel et al. [31, 37] (16-17% Ausbeute) und Adachi et al. [132] (6-7% Ausbeute) beschriebenen Methoden. Im Vergleich zu Kurz et al. [21] wird mit weniger Aufreinigungsschritten eine vergleichbare Ausbeute und Reinheit erzielt (dort 98% Reinheit und ca. 63-66% Ausbeute).

7.3 Synthese von Moenomycin A-Derivaten

7.3.1 Synthese von 5-Amino-N-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid

Als Ligand für den kompetitiven Assay (zur Flavophospholipol-Analytik in Futtermitteln und zur Charakterisierung von GT-Inhibitoren) und für den direkten Assay für GT-Mutanten wurde das Moenomycin A-Aminderivat 3b aus [278] synthetisiert (s. Abschnitt 6.1 und Abbildung 25). Erster Schritt war die Synthese des 5-Amino-N-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamids (s. Abbildung 27), worauf im Folgenden eingegangen wird¹⁴ (auf die Synthese des Aminderivats selbst wird in Abschnitt 7.3.2 eingegangen).

Die Synthese erfolgte gemäß Stembera et al. [278], wobei abweichend die aktivierte 5-Amino-2-nitrobenzoesäure langsam unter Rühren zur gekühlten Ethylendiamin-Lösung gegeben wurde (s. Methode in Abschnitt 9.8). Wurde, wie bei Stembera et al. beschrieben, die Ethylendiamin-Lösung direkt zur Lösung des Imidazolid der 5-Amino-2-nitrobenzoesäure gegeben, kam es zur Abscheidung einer roten öligen Substanz. Hierbei handelte es sich vermutlich um die in Abbildung 49 gezeigte Verbindung. Dass sich die Bildung des Nebenprodukts durch das langsame Zugeben der aktivierten Säure verhindern ließ, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass so stets ein Überschuss an Ethylendiamin vorlag.

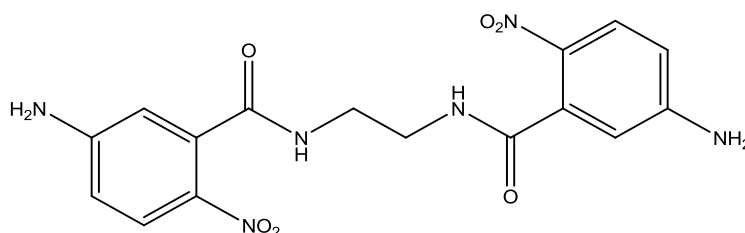


Abbildung 49: Postuliertes Nebenprodukt der Synthese von 5-Amino-N-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid

¹⁴ Die Synthesen des 5-Amino-N-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamids und des Biotinylierungsreagenzes, sowie die Versuche zur Abspaltung des Moenocinolrests mit Palladium(II)-chlorid, Phosphatasen, Phospholipase C und im Säuren wurden durch Frau Annabel Sand im Zuge ihrer durch den Autor betreuten wissenschaftlichen Abschlussarbeit „Synthese und Charakterisierung von Flavomycin-Konjugaten für die SPR-Biosensoranalytik“ im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker/innen durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Die Aufreinigung des Produkts erfolgte abweichend von Stembera et al. nicht mittels Flash-Chromatographie an Kieselgur mit Methanol als Eluent, da mit diesem System keine scharfe Trennung von Edukt und Produkt erreicht wurde. Mit Säulenchromatographie an Kieselgel und 25% Ammoniak/Methanol 1:25 (v/v) als Eluent hingegen war dies möglich.

7.3.2 Synthese des Aminderivats von Moenomycin A

Die Synthese des Aminderivats 3b aus [278] (s. Abschnitt 6.1 und darin Abbildung 25) erfolgte ausgehend vom isolierten Moenomycin A (s. Abschnitt 7.2) und 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid (s. Abschnitt 7.3.1) gemäß Stembera et al. [278], wobei abweichend kein Schutzgas verwendet wurde, die Reaktionskontrolle per HPLC unter abweichenden Bedingungen erfolgte und das Produkt mittels SPE aufgereinigt wurde (s. Methode in Abschnitt 9.9).

Mit dem bei Stembera et al. für die Reaktionskontrolle verwendeten HPLC-Eluentensystem (Phosphatpuffer (pH 8,0)/Acetonitril) wurde auf der verwendeten C18-Phase keine Trennung von Moenomycin A und dem daraus intermediär gebildeten Amidrazon bzw. dem Endprodukt erreicht (in einem ersten Testansatz der Synthese geprüft). Da sowohl das Intermediat, als auch das Produkt UV-Strahlung der Wellenlänge 258 nm absorbieren, war eine spezifische Detektion des Moenomycin A nicht möglich und eine chromatographische Trennung daher unerlässlich. Mit 50 mM KH₂PO₄ (pH 2,3)/Acetonitril 50:50 (v/v) wurde eine Trennung erreicht: Moenomycin A eluierte bei einer Bruttoretentionszeit von 17 min, das Amidrazon bei 9,5 min und das Aminderivat bei 10 min. Eine Differenzierung zwischen Amidrazon und Aminderivat war über die bei Stembera et al. berichteten lokalen Absorptionsmaxima bei 380 nm (Amidrazon) und 280 nm (Aminderivat) möglich. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Reaktionsprodukts im Säuren mussten aus dem Reaktionsansatz entnommene Aliquote nach Verdünnung mit Phosphatpuffer membranfiltriert werden, um ausgefallenes Produkt zu entfernen. Somit war zwar eine quantitative Bestimmung der Produktkonzentration im entnommenen Aliquot nicht möglich, da das Produkt allerdings bereits während der

Reaktion als roter Feststoff am Magnetrührkern abgeschieden wurde, war eine quantitative Erfassung der Produktbildung ohnehin nicht möglich.

Bereits unmittelbar nach Beendigung der Zugabe des Diazoniumsalzes des 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamids war es zur Bildung des Amidrazons gekommen und es waren nur noch Spuren von Moenomycin A nachweisbar. Das Aminderivat war nach 21 h nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt war noch ein Bruchteil des zwischenzeitlich gebildeten Amidrazons vorhanden; nach 25 h war es nicht mehr nachweisbar.

Bei Stembera et al. erfolgte die Aufarbeitung des Rohprodukts durch Entfernung der Salze mittels Flash-Chromatographie an einer C18-Phase oder Ultrafiltration gefolgt von einer Aufreinigung per Flash-Chromatographie an Kieselgel mit 1-Propanol/Wasser 7:3 (v/v). In Anlehnung an die Entfernung der Puffersalze bei der Isolierung des Moenomycin A (Abschnitt 7.2.6) konnte die Entsalzung mittels SPE an einer Styrol-Divinylbenzol-Copolymerphase erfolgen. Dies hatte den Vorteil, dass der Großteil des nicht umgesetzten 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamids durch einen Waschschrift mit 50 mM K₂HPO₄ (pH 7,5)/Acetonitril 8:2 (v/v) entfernt werden konnte. Nach der SPE und Lyophilisation wurde so ein Produkt erhalten, das 0,06% (w/w) (\cong Stoffmengenanteil von 0,5%) 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid enthielt. Da auch der Gehalt an nicht umgesetztem Moenomycin A mit 4% akzeptabel war (zumal dieses bei der Immobilisierung nicht reagieren sollte), wurde auf eine weitere Aufreinigung verzichtet.

7.3.3 Synthese des Biotinylierungsreagenzes

In Vorbereitung auf eine gegebenenfalls erforderliche Synthese des Biotinderivats Substanz 3d in [291] (s. Abschnitt 6.2.1 und darin Abbildung 29) wurde das in Abbildung 28 gezeigte Biotinylierungsreagenz (5-Amino-2-nitro-*N*-{2-[5-((3a*S*,4*S*,6a*R*)-2-oxohexahydrothieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-pentanamido]-ethyl}benzamid) synthetisiert (s. Fußnote 14 auf Seite 127). Die Synthese erfolgte gemäß Buchynskyy et al. [291], wobei abweichend die Umsetzung des Biotin-NHS-Esters mit dem 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid bei 60 °C anstelle von 20 °C stattfand, da das aktivierte Biotin in 10 mL kaltem DMF nicht vollständig in

Ergebnisse und Diskussion

Lösung ging. Außerdem erfolgte die Aufreinigung per Flash-Chromatographie abweichend mit Dichlormethan/Methanol 5:1 (v/v) und im aufgereinigten Produkt enthaltenes Kieselgel wurde anschließend mittels Ultrafiltration entfernt (s. Methode in Abschnitt 9.10).

Da mit dem Moenomycin A-Aminderivat problemlos ausreichend hohe Immobilisierungslevel erreicht werden konnten, war die Synthese des Moenomycin A-Biotinderivats nicht mehr erforderlich und wurde daher nicht durchgeführt.

7.3.4 Synthese von Decahydromoenomycin

Wie in Abschnitt 6.2.1 ausgeführt, sollte ein Decahydromoenomycin A-Derivat als Ligand drastischeren Regenerationsbedingungen beim SPR-Assay standhalten können, als ein Moenomycin A-Derivat. Die Synthese wurde testweise mit Flavomycin® durchgeführt, da zu dem Zeitpunkt noch kein reines Moenomycin A zur Verfügung stand. Die Hydrierung der Doppelbindungen des Moenocinolrests wurde in Anlehnung an Welzel et al. [31] an Platin in Methanol mit Wasserstoff unter Atmosphärendruck durchgeführt. Zusätzlich wurde in einem parallelen Ansatz bei 4 bar Überdruck im Autoklaven hydriert (s. Methode in Abschnitt 9.11). Die Analyse der Produkte per LC-MS (exemplarisch anhand von Moenomycin A; s. Tabelle 7) ergab, dass bei Hydrierung mit 4 bar Wasserstoff eine 99,5%ige Umsetzung zum erwünschten Produkt stattfand, während bei Atmosphärendruck nur 91,5% Decahydromoenomycin A und daneben auch ca. 7% partiell hydriertes Moenomycin A gebildet wurden¹⁵.

¹⁵ Die Charakterisierung des Produkts per LC-HRMS wurde freundlicherweise von Frau Helma Geltenpoth am Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften - ISAS - e.V. Dortmund durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7: Produktanalyse per LC-MS. Relative Peakflächen der Hydrierungsprodukte und des Edukts (0 * hydriert: Moenomycin A; 10 * hydriert: Decahydromoenomycin A; n.n.: nicht nachweisbar)

Substanz	H ₂ bei Atmosphärendruck	4 bar H ₂
0 * hydriert	1,6%	0,5%
2 * hydriert	n.n.	n.n.
4 * hydriert	n.n.	n.n.
6 * hydriert	0,5%	n.n.
8 * hydriert	6,4%	n.n.
10 * hydriert	91,5%	99,5%

Die Moenomycine weisen bei pH 7 bis 9 die höchste Stabilität auf [13] (bestätigt durch eigene Lagerungsversuche: bei pH 8,0 u. 9,5 über 25 d Lagerung bei Raumtemperatur kein Abbau feststellbar). Die SPR-Messungen beim kompetitiven Assay konnten bei pH 7,4 durchgeführt werden und die Regeneration musste nicht mit Säure oder Lauge erfolgen, sondern die Chipoberfläche konnte mit SDS regeneriert werden (s. Abschnitt 7.4). Daher war es nicht erforderlich, als Ligand ein Derivat von Decahydromoenomycin A zu verwenden, sondern es konnte das in Abschnitt 7.3.2 beschriebene Moenomycin A-Aminderivat verwendet werden.

7.3.5 Abspaltung des Moenocinolrests

Für die Gewinnung von spezifischen Antikörpern gegen Moenomycine sollte der Moenocinolrest von Moenomycin A abgespalten werden (s. Abschnitt 6.2.2). Die Allyletherspaltung mit Palladium(II)-chlorid nach Marzian et al. [65] ließ sich zwar nachstellen (s. Fußnote 14 auf Seite 127), wäre allerdings mit vergleichsweise großem präparativem Aufwand bei der Aufreinigung des Produkts verbunden gewesen. Daher wurde geprüft, ob mit Bis(benzonitril)palladium(II)-chlorid,¹⁶ das als

¹⁶ von Herrn Bernd Mell im Labor von Professor Dr. Fabian Mohr (Anorganische Chemie, Bergische Universität Wuppertal) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Katalysator der Isomerisierung von Olefinen bekannt ist [311, 312], anstelle von Palladium(II)-chlorid eine Abspaltung des Moenocinolrests gelingt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass sich Bis(benzonitril)palladium(II)-chlorid im Gegensatz zu Palladium(II)-chlorid mit Dichlormethan aus Wasser extrahieren lässt, was eine einfache Abtrennung vom hydrophilen Spaltprodukt des Moenomycins erlauben sollte. Anstelle des Natriumacetatpuffers, der bei Marzian et al. [65] durch Gelfiltration entfernt wird, sollte ein stark saurer Kationenaustauscher in der Säureform als Katalysator der Hydrolyse des Enolethers dienen. Dieser Katalysator sollte sich durch Abpipettieren der Lösung des Reaktionsprodukts entfernen lassen.

Die Synthese wurde in einem Testansatz mit 5 mg Flavomycin® (Moenomycin A stand zu dem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung) durchgeführt (s. Methode in Abschnitt 9.12). Die Reaktionskontrolle erfolgte per DC auf Kieselgel mit dem bei Marzian et al. [65] beschriebenen Fließmittelgemisch. Die Detektion der chromophoren 2-Amino-Cyclopentan-1,3-dion-Gruppe erfolgte über Fluoreszenzlöschung bei 254 nm. Zusätzlich wurde Anisaldehyd/Schwefelsäure-Sprühreagenz als unspezifisches Reagenz angewendet.

Nach Stehen über Nacht hatte sich ein farbloser Niederschlag gebildet, der nach Zugabe von Wasser in Lösung ging. Vermutlich handelte es sich hierbei um das polare Spaltprodukt. Die Reaktionskontroll-DC zeigte eine vollständige Umsetzung der Moenomycine an.

Ein Direktvergleich mit der Methode nach Marzian et al. [65] zeigte, dass sich die Spaltung mit der hier beschriebenen Methode schneller vollzog, obwohl Marzian et al. die doppelte Stoffmenge an Palladium einsetzen. Grund hierfür dürfte die im Vergleich schlechte Löslichkeit des Palladium(II)-chlorids sein.

Da die ersten Versuche eines kompetitiven Assays mit Peptidoglykan-Glykosyltransferasen erfolgreich waren, wurde die Gewinnung von Antikörpern gegen das Spaltprodukt nicht weiter verfolgt.

Die von Vogel et al. [66] beschriebene Spaltung im Säuren ohne weiteren Katalysator wurde ebenfalls nachgestellt, wobei die Effizienz dieses Verfahrens erheblich geringer war, als die Palladium-vermittelte Spaltung. Nach Größe der Substanzflecken und Intensität der Fluoreszenzlöschung bei der Reaktionskontroll-

Ergebnisse und Diskussion

DC zu urteilen, war es nur in geringem Maße zur Spaltung der Moenomycine gekommen.

Versuche, die Moenomycine mit *Bacillus spec.* DSM 4675 bzw. daraus isolierten Membranfraktionen zu spalten, waren nicht erfolgreich (Durchführung nach [301, 302]; Spaltungsversuche nach [304] mit Kontrolle per DC, wie in Abschnitt 9.12 beschrieben). Ebenso wurde mit verschiedenen Phosphatasen und Phospholipase C (Auflistung in Abschnitt 9.12) keine Abspaltung des Moenocinols erreicht (s. Fußnote 14 auf Seite 127). Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Wallhäusser et al. [13], die ebenfalls berichten, dass Moenomycin durch eine Vielzahl von Enzymen, unter anderem Phosphomonoesterasen und Lipasen, nicht gespalten wird.

7.4 Kompetitiver SPR-Assay

Es wurde ein empfindlicher kompetitiver SPR-Biosensor-Assay (Inhibitions-Assay – s. Abschnitt 4.1.4) zum Nachweis der Moenomycine entwickelt (s. Methode in Abschnitt 9.14). Der Assay basiert auf der Wechselwirkung zwischen der monofunktionellen Glykosyltransferase MtgA aus *Staphylococcus aureus* und dem bereits von Stempera et al. [133, 278] verwendeten (s. Abschnitt 4.3) kovalent immobilisierten Moenomycin A-Derivat (s. Abschnitt 7.3.2).¹⁷ Das Prinzip des Assays ist in Abbildung 50 dargestellt. Zunächst wird die zu analysierende Lösung mit MtgA gemischt, wobei es zur Bindung der Moenomycine an das Enzym kommt (Schritt a in Abbildung 50). Die Mischung wird anschließend über die Sensorchipoberfläche injiziert, auf der das Moenomycin A-Aminderivat (s. Abschnitt 7.3.2) immobilisiert ist (Schritt b in Abbildung 50). Hierbei kommt es zur Bindung der freien MtgA an das immobilisierte Moenomycin A-Derivat, während MtgA-Moenomycin-Komplexe nicht binden können. Die Regeneration der Sensorchipoberfläche erfolgt, wie bei Stempera et al. [133, 278], mit 1% SDS (Schritt c in Abbildung 50).

¹⁷ Die verwendeten PGT wurden freundlicherweise von Dr. Mohammed Terrak (Centre d'Ingénierie des Protéines der Universität Liège; Belgien) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse und Diskussion

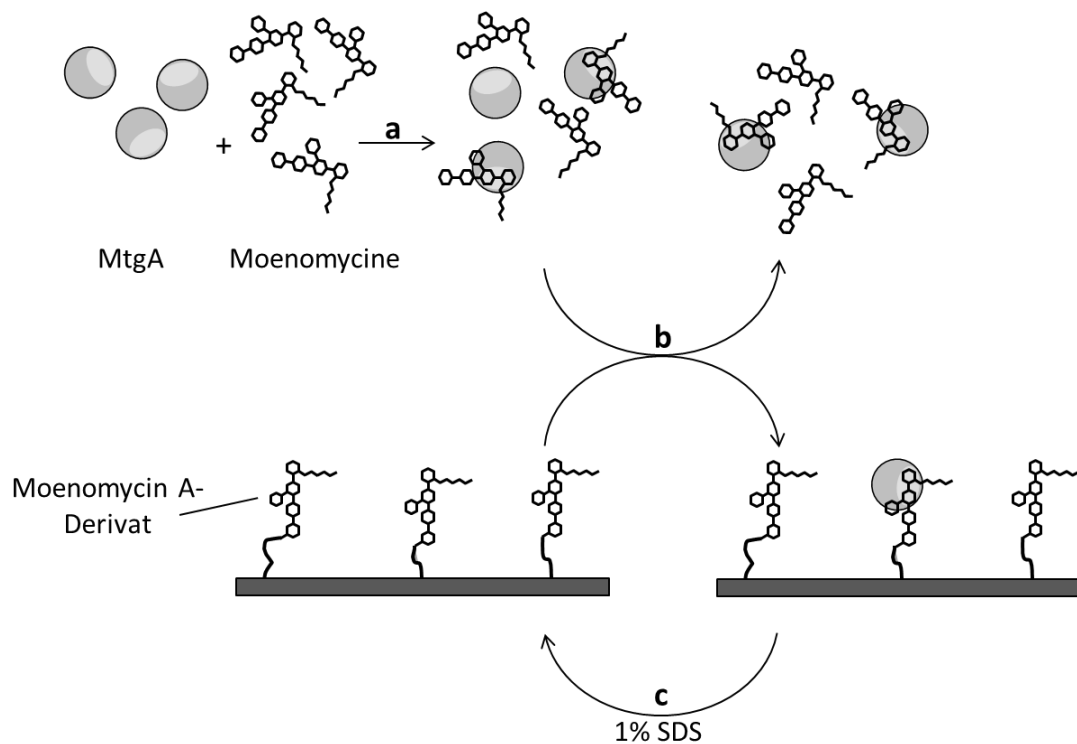


Abbildung 50 - Inhibitions-Assay: a) Mischen der Probenlösung mit *S. aureus* MtgA; b) Injektion der Mischung; c) Regeneration mit 1% SDS.

7.4.1 Chipoberfläche

Für den Assay wurde der von Stempera et al. [133, 278] beschriebene Sensorchip verwendet. Die Immobilisierung des Moenomycin A-Aminderivats auf einem Carboxymethyldextran-Sensorchip erfolgte mittels Aminkopplung (s. Abschnitt 4.1.5; Methode in Abschnitt 9.13). In Abbildung 51 ist die Anknüpfung des Moenomycin A-Derivats an das Carboxymethyldextran veranschaulicht.

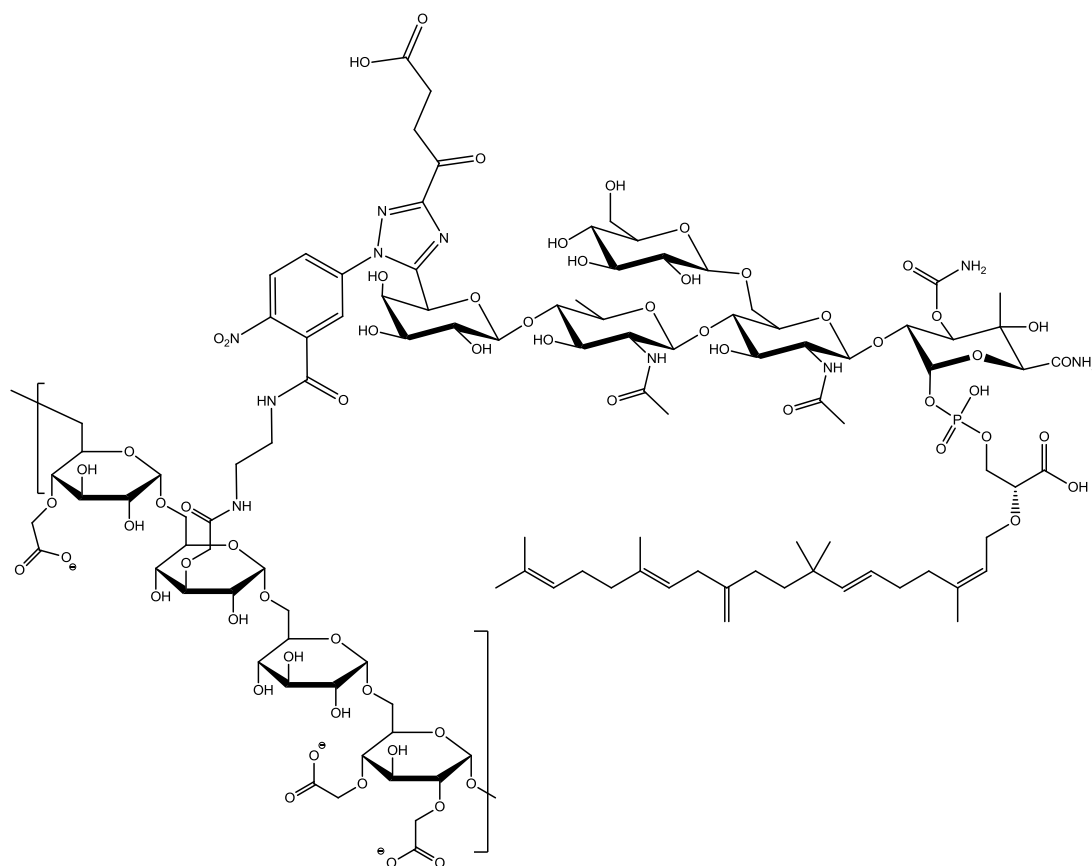


Abbildung 51: Kopplungsprodukt des Moenomycin A-Aminderivats mit Carboxymethyldextran (exemplarischer Ausschnitt der CMD-Kette).

Zwischen den Analysen wurde der Sensorchip kurzfristig unter niedrigem Laufpufferfluss ($5 \mu\text{L}/\text{min}$ – Standby-Modus des Biosensors) gehalten und längerfristig nach Abblasen von Laufpufferresten bei $6 \text{ }^\circ\text{C}$ außerhalb des Geräts gelagert.

Ergebnisse und Diskussion

7.4.2 Sensorgramme

Abbildung 52 zeigt exemplarisch die Sensorgramme einer Lösung von 10 µg/mL Flavophospholipol (Flavomycin®) in Laufpuffer (schwarz) und einer Blindprobe (Laufpuffer; rot) – jeweils nach Mischung mit MtgA. Bei Injektion der Flavophospholipol-Lösung war erwartungsgemäß ein deutlich geringerer Signalanstieg infolge der Bindung von MtgA festzustellen. Aufgrund des ausgeprägten Bulk-Effekts der SDS-Lösung liegt der Response während der Regeneration außerhalb des gewählten Bildausschnitts. Die anschließende Pufferinjektion diente dazu, das Injektionssystem von verbliebenem SDS zu reinigen (die Signalspitze zu Beginn der Injektion ist auf verbliebenes SDS zurückzuführen, das sich vermutlich noch in den Kanälen der IFC befand) und dient zusätzlich der Stabilisierung des Messsignals (s. Drift nach der Regeneration).

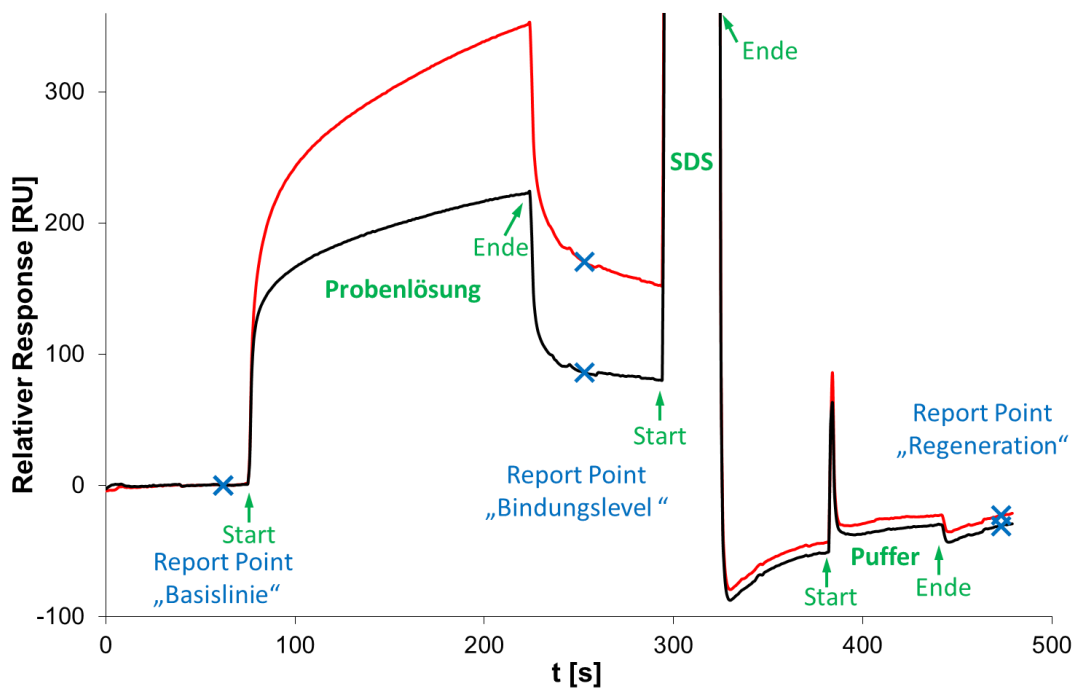


Abbildung 52: Sensorgramme der Analyse von 10 µg/mL Flavophospholipol in Laufpuffer (schwarz) und Laufpuffer ohne Flavophospholipol (rot). Die blauen Kreuze markieren die Report Points.

Die quantitative Auswertung erfolgte über die beiden Report Points „Basislinie“ und „Bindungslevel“ (s. Abbildung 52; der Report Point „Regeneration“ diente der Kontrolle der Effizienz der Regeneration; wegen der exakten Zeiten s. Abschnitt 9.14). Die Differenz aus dem Response am Report Point „Bindungslevel“ und dem Report Point „Basislinie“ ergab den MtgA-Bindungslevel, der sich reziprok proportional zum Flavophospholipol-Gehalt verhielt.

7.4.3 Empfindlichkeit

Wie in Abschnitt 5 erwähnt, sollte der SPR-Assay dazu geeignet sein, Flavophospholipol-Gehalte von 1 mg/kg im Futtermittel nachzuweisen. Da sich für die Probenvorbereitung keine selektive Extraktion der Moenomycine anbot, sondern stattdessen nur eine grobe Abtrennung der Futtermittelmatrix möglich war (s. Abschnitt 7.5.2), sollten die erhaltenen Extrakte möglichst nicht aufkonzentriert werden. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, ca. 1 µg/mL Flavophospholipol in Lösung nachweisen zu können. In Abbildung 53 sind die Sensorgramme von 1 µg/mL bis 30 µg/mL Flavophospholipol in Laufpuffer, sowie von einer Blindprobe (Laufpuffer) und die zugehörigen Bindungslevel wiedergegeben. Der entwickelte Assay war ausreichend empfindlich, um auch die Lösung mit 1 µg/mL Flavophospholipol sicher von der Blindprobe zu unterscheiden. Die Nachweisempfindlichkeit war folglich um mehr als den Faktor 200 besser, als beim direkten Assay (Abschnitt 7.1).

Ergebnisse und Diskussion

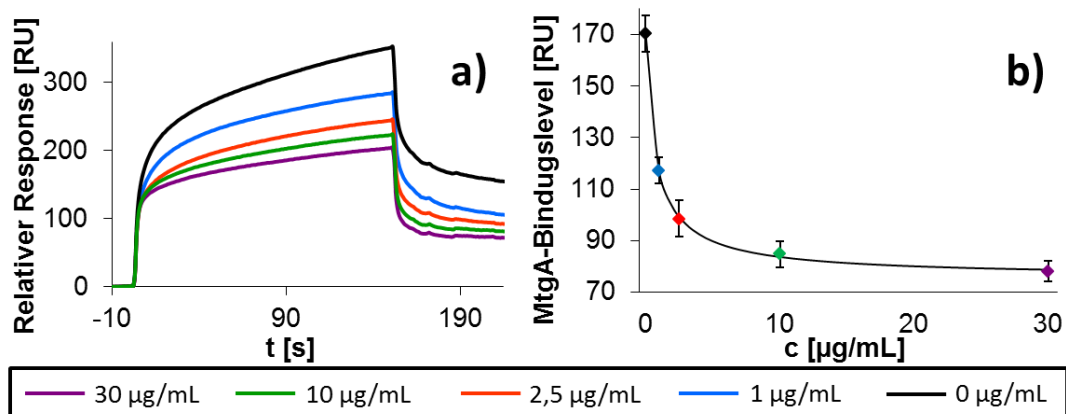


Abbildung 53 - Flavophospholipol-Kalibrierreihe: a) Sensorgramme; b) Auftragung des MtgA Bindungslevels (Mittelwert; n=3) gegen den Flavophospholipol-Gehalt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

7.4.4 Einfluss der verwendeten GT und des Tensids

Im Zuge der Entwicklung des kompetitiven Assays wurde eingangs geprüft, ob mit dem bei Stembera et al. [133] beschriebenen Inhibitions-Assay (geringfügig modifiziert; s. Methode in Abschnitt 9.15) ein Nachweis von 1 µg/mL Flavophospholipol möglich sei. Erst ab einer Flavophospholipol-Konzentration von ca. 100 µg/mL war eine Unterscheidung von der Blindprobe möglich (s. Abbildung 54 a und b). Somit wies dieser Assay eine vergleichbare Empfindlichkeit auf, wie der in Abschnitt 7.1 vorgestellte direkte Assay. Als Alternative zu *E. coli* PBP1b wurde *S. aureus* MtgA als biomolekularer Erkennungspartner zunächst ebenfalls mit Triton X-100 als Tensid getestet, wobei abweichend zu Stembera et al. Puffer mit einem pH-Wert von 7,5 gewählt wurde, bei dem MtgA maximale Enzymaktivität zeigt [87]. Außerdem wurde in Anlehnung an die bei Terrak und Nguyen-Distèche [87] durchgeführten Experimente mit einem NaCl-Gehalt von 0,3 mM gearbeitet (Methode analog Abschnitt 9.15, abweichend 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl mit 1% Triton X-100 als Laufpuffer; MtgA-Gehalt vor Mischung 25 µg/mL (1 µM)). Hierbei war keine Abhängigkeit der MtgA-Bindungslevel vom Flavophospholipol-Gehalt zu erkennen (s. Abbildung 54 c und d).

Ergebnisse und Diskussion

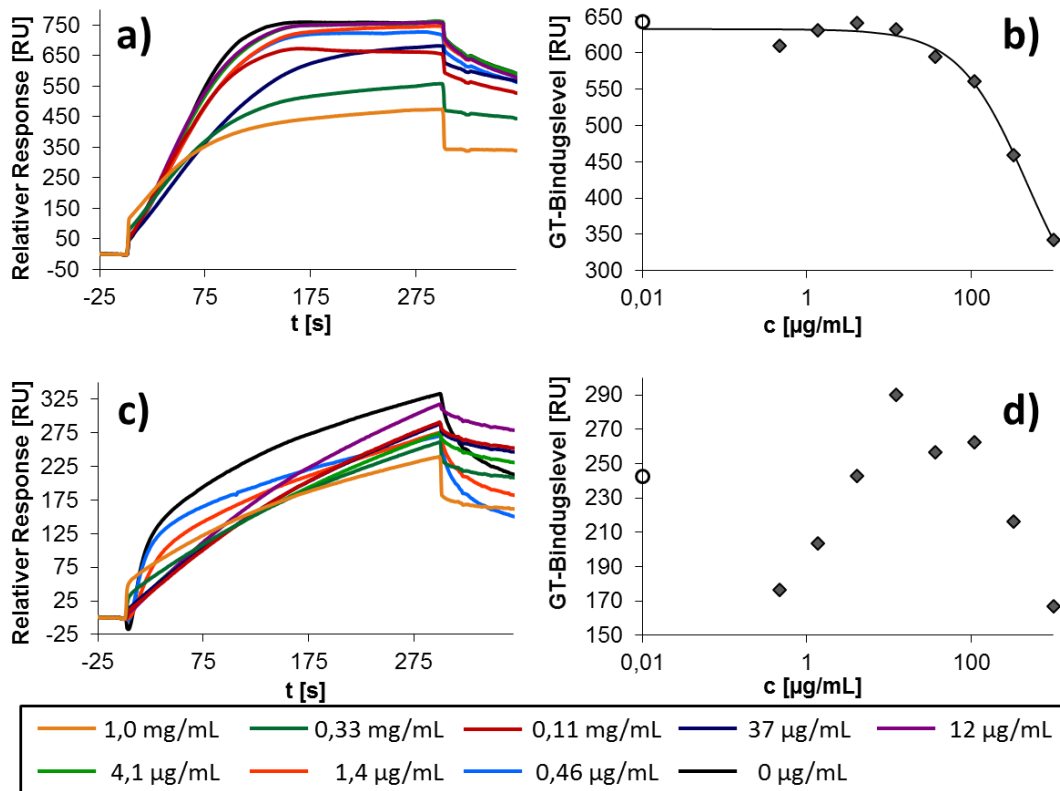


Abbildung 54 - Vergleich von *E. coli* PBP1b (a) u. b) und *S. aureus* MtgA (c) u. d) mit Triton X-100 als Tensid: a) u. c) Sensorgramme einer Flavophospholipol-Konzentrationsreihe; b) u. d) Auftragung der GT-Bindungslevel gegen die Flavophospholipol-Konzentration, die Kreise markieren die Messwerte der Blindprobe. Zur besseren Darstellung der großen Konzentrationsspanne ist die Abszisse logarithmisch skaliert.

In anderen PGT-Inhibitions-Assays führte Moenomycin A bereits in einstelligen mikromolaren Konzentrationen zur 50%igen Hemmung (Hemmung der Enzymkatalyse bzw. Blockierung der PGT) [185, 313]. Daher wurde eine bessere Empfindlichkeit erwartet, als mit PBP1b erreicht worden war.¹⁸ Wie schon in Zusammenhang mit dem direkten Assay diskutiert, bildet Triton X-100 bereits bei Gehalten von <0,02% Mizellen. Insbesondere aufgrund des abnorm hohen Bindungslevels beim direkten Assay wurde angenommen, dass sich Moenomycine in

¹⁸ Es sei angemerkt, dass die publizierten IC_{50} Werte (Konzentration des Inhibitors, die zur 50%igen Hemmung der Enzymreaktion *in vitro* bzw. 50%igen Besetzung der PGT führen) von weiteren Einflussgrößen (z.B. Substratkonzentration, Michaelis-Menten-Konstante der Enzymreaktion, Konzentration des Kompetitors) abhängen, was einen direkten Vergleich erschwert.

Ergebnisse und Diskussion

die Mizellen einlagern (s. Diskussion in Abschnitt 7.1), was auch die Ursache für die schlechte Empfindlichkeit sein könnte. Einige weitere Tenside (Octyl- β -D-glucosid, Sarkosyl, Natriumdeoxycholat) waren bereits von Stembera et al. [278] auf ihre Eignung getestet worden und wurden daher außer Acht gelassen.

CHAPS ([3-(3-Cholanamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan sulfonat) hat eine vergleichsweise hohe kritische Mizellbildungskonzentration (0,49% in Wasser [313] und $>0,3\%$ in ≤ 500 mM NaCl [314]) und ist gut geeignet, die Polydispersität von *E. coli* PBP1b [313, 315] und *S. aureus* MtgA [87] zu vermindern. Um die Mizellbildung zu verhindern, wurden 0,3% CHAPS verwendet. Zwar wurde in der Kristallstruktur einer PGT (*Aquifex aeolicus* PBP1A) ein CHAPS-Molekül im hydrophoben Kanal der Donorbindungsstelle (s. Abschnitt 2.4.2) gefunden [121], allerdings hatten CHAPS-Gehalte bis zum Doppelten der Konzentration im SPR-Laufpuffer keinen Einfluss auf die Enzymaktivität der PGT.¹⁹ Daher war nicht von Störeinflüssen durch die Verwendung von CHAPS auszugehen. Mit CHAPS anstelle des Triton X-100 wurden sowohl MtgA, als auch PBP1b als biomolekulare Erkennungspartner getestet. Da für die Transglykosylierungsreaktion [127] und bei SPR-Messungen (Interaktion mit anderen bakteriellen Proteinen [300, 316]) mit *E. coli* PBP1b erfolgreich HEPES- oder Tris-Puffer pH 7,5 eingesetzt wurden (bei [127] sogar in Gegenwart von 0,046% CHAPS als Tensid) und für Aufreinigung und Lagerung von PBP1b bis zu 1 M NaCl angewendet werden [127], sprach nichts dagegen, für beide Proteine Tris-Puffer pH 7,5 mit 300 mM NaCl zu verwenden (Methode analog Abschnitt 9.15, abweichend 25 mM Tris pH 7,5, 300 mM NaCl mit 0,3% CHAPS als Laufpuffer; als Proteinkonzentrationen vor Mischung mit den Flavophospholipol-Lösungen wurden 5 $\mu\text{g/mL}$ (56 nM) PBP1b und 5 $\mu\text{g/mL}$ (0,2 μM), 10 $\mu\text{g/mL}$ (0,4 μM) und 25 $\mu\text{g/mL}$ (1 μM) MtgA getestet). Bei Verwendung von PBP1b konnte die Nachweisempfindlichkeit verbessert werden, sodass Lösungen mit 40 $\mu\text{g/mL}$ von Blindproben unterschieden werden konnten, allerdings ergaben sich im niedrigen untersuchten Konzentrationsbereich starke Abweichungen von der erwarteten Proportionalität (s. Abbildung 55 a und b). Vermutlich kam es hier infolge hoher Oberflächenkonzentrationen von PBP1b zur Aggregation des Enzyms auf der

¹⁹ Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Dr. Mohammed Terrak (Centre d'Ingénierie des Protéines der Universität Liège; Belgien).

Ergebnisse und Diskussion

Chipoberfläche, was sich in einer starken Streuung der Bindungslevel äußern sollte (im Unterschied zur verwendeten MtgA verfügte PBP1b über die Transmembranhelix). Wie bereits oben für die optimierten Assay-Bedingungen (s.u.) gezeigt, war es bei Verwendung von CHAPS als Tensid und MtgA als biomolekularem Erkennungspartner möglich, die benötigte Empfindlichkeit des Assays zu erreichen (s. Abbildung 55 c und d).

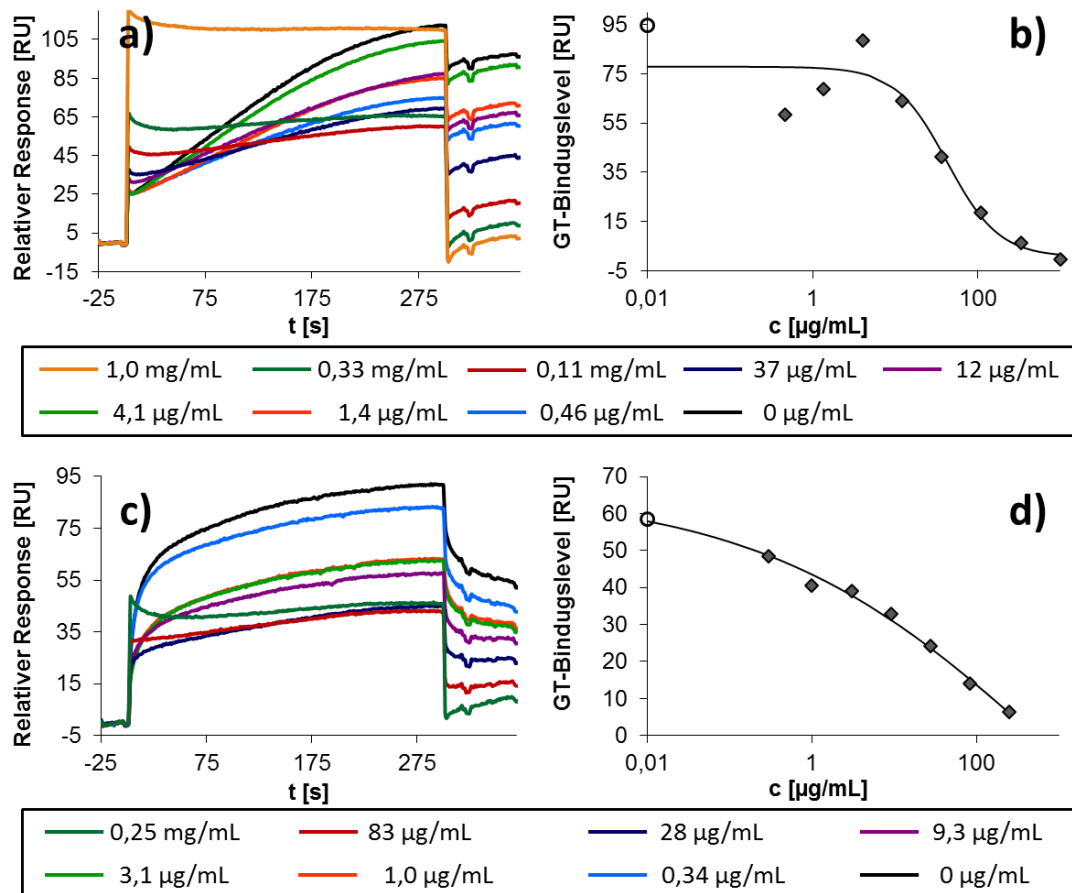


Abbildung 55 - Vergleich von *E. coli* PBP1b (a u. b)) und *S. aureus* MtgA (c u. d)) mit CHAPS als Tensid: a) u. c) Sensorgramme einer Flavophospholipol-Konzentrationsreihe; b) u. d) Auftragung der GT-Bindungslevel gegen die Flavophospholipol-Konzentration; die Kreise markieren die Messwerte der Blindprobe. Zur besseren Darstellung der großen Konzentrationsspanne ist die Abszisse logarithmisch skaliert.

Ein Unterschied in der Empfindlichkeit war zwischen den getesteten MtgA-Konzentrationen nicht feststellbar. Da mit höheren Proteinkonzentrationen aber

Ergebnisse und Diskussion

insgesamt höhere Bindungslevel erzielt wurden, was eine größere Robustheit gegenüber unspezifischer Bindung von Matrixkomponenten bedeutet, wurde mit einer MtgA-Konzentration von 20 µg/mL (800 nM) vor Mischung gearbeitet. Um eine kürzere Analysenzeit zu gewährleisten und den Proteinverbrauch zu reduzieren, wurde die Kontaktzeit der Probenlösung auf 150 s verkürzt und die Flussrate von 40 µL/min auf 10 µL/min gesenkt.

Die beobachtete schlechtere Empfindlichkeit bei Verwendung von *E. coli* PBP1b findet bei Stembera et al. [133] Bestätigung. Hier führten 100 µM (158 µg/mL) Moenomycin A zu einer deutlichen Hemmung, während bei 10 µM keine Hemmung festzustellen war. Mit dem hier vorgestellten Assay und der Verwendung von *S. aureus* MtgA führten bereits 1 µg/mL Flavophospholipol zu einer deutlichen Hemmung. Ausgehend von dem in Abschnitt 7.2 ermittelten Moenomycin A-Gehalt in Flavomycin® und Moenomycin A-Anteil an den Moenomycin-Kongeneren entspricht das einem Moenomycin-Gehalt (alle Kongenere) von 0,4 µg/mL. Dieser Gehalt entspricht einer Konzentration von ca. 0,3 µM Moenomycinen, was sich mit den erwarteten Werten auf Grundlage anderer Inhibitions-Assays deckt (s.o.) [185, 313]. Die hier verwendete *S. aureus* MtgA-Mutante verfügt im Gegensatz zu *E. coli* PBP1b nicht über die Transmembranhelix des Wildtyps und neigt daher weniger zur Aggregation. Dies könnte die bessere Empfindlichkeit des Assays mit MtgA erklären.

7.4.5 Assaystabilität

Zur Beurteilung der Effizienz der Regeneration wurde sowohl der absolute Response am Report Point „Basislinie“ (Basislinienniveau) als auch der relative Response (relativ zu „Basislinie“) am Report Point „Regeneration“ für jeden Zyklus aufgetragen. Abbildung 56 zeigt beide Auftragungen für 16 verschiedene Analysenserien mit insgesamt 299 Zyklen, die über einen Zeitraum von 4 Monaten auf derselben Chipoberfläche gemessen wurden. Der Beginn einer Analysenserie ist jeweils durch eine rote Raute markiert.

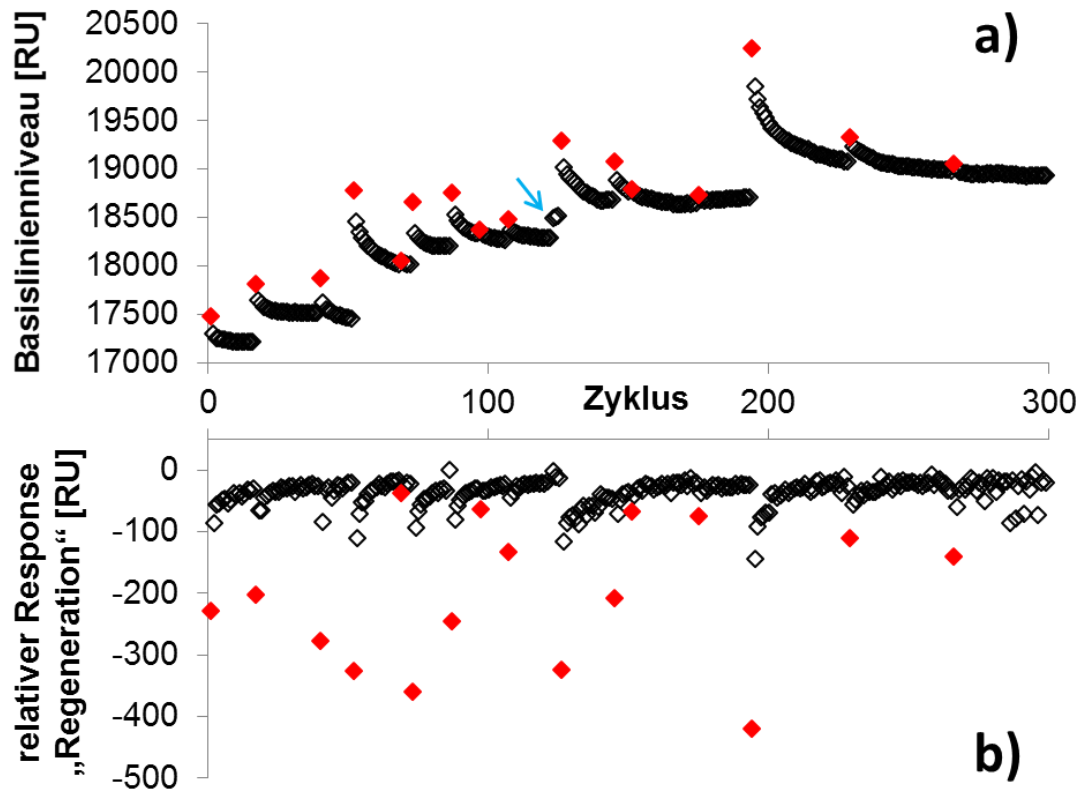


Abbildung 56 - Regenerationseffizienz über einen Zeitraum von 4 Monaten (299 Zyklen): a) Auftragung des Basislinienniveaus; b) Auftragung der Regenerationslevel. Der jeweils erste Zyklus einer neuen Analysenserie ist rot markiert.

Es fällt auf, dass das Basislinienniveau im Verlauf einer Analysenserie abnahm. Die Änderung war in den ersten Zyklen jeder Serie am stärksten ausgeprägt, wohingegen in den späteren Zyklen nur noch geringe Veränderungen zu beobachten waren. Wie anhand des Sensorgramms in Abbildung 52 zu erkennen ist, fiel das Signal nach der SDS-Injektion unter das Basislinienniveau des jeweiligen Zyklus ab und stieg danach langsam an. Dieser Effekt wird auf die Veränderung des Quellungs Zustands des Carboxymethyldextrans zurückzuführen sein. Dabei hängt der Quellungs Zustand der CMD-Schicht unter anderem vom pH und der Ionenstärke der umgebenden Lösung ab [227]. Durch Änderung des Quellungs Zustands des CMD verändern sich auch die dielektrischen Eigenschaften des Mediums innerhalb des evaneszenten Feldes der SP-Oberflächenwellen, was direkten Einfluss auf den SPR-Winkel hat (ein vergleichbares Verhalten ließ sich bei Injektion von Natronlauge über eine CMD-

Ergebnisse und Diskussion

Chipoberfläche beobachten). Der Übergang in einen asymptotischen Verlauf in den späten Zyklen wird auf eine allmähliche Equilibrierung der Chipoberfläche zurückzuführen sein (die letzten beiden Serien wurden praktisch unmittelbar hintereinander gemessen, weshalb in der letzten Serie keine merkliche Veränderung mehr auftritt). Hierfür spricht auch, dass der relative Response am Report Point „Regeneration“ (Abbildung 56 b) von anfänglich sehr kleinen (negativen) Werten im Laufe der Analysenserie auf Werte nahe 0 anstieg. Ein Einfluss des Quellungs Zustands des CMD auf die MtgA-Bindungslevel war nicht festzustellen. Zur Sicherheit wurden aber zu Beginn jeder Analyse ein bis drei Zyklen gemessen, die nicht zur Auswertung herangezogen wurden, sondern nur der Equilibrierung des Systems dienten („Aufwärmzyklen“).

Über alle Zyklen hinweg ist eine steigende Tendenz des Basislinienniveaus zu erkennen, was auf Veränderungen der Chipoberfläche schließen lässt. Auffällig ist außerdem der sprunghafte Anstieg des Basislinienniveaus von Zyklus 122 auf 123 (in Abbildung 56 durch einen blauen Pfeil markiert). In der entsprechenden Analysenserie wurden stark Matrix-haltige Futtermittlextrakte injiziert (nach Verfahren A in Abschnitt 9.17 gewonnen) und es ist davon auszugehen, dass es zu Verschleppungen von Matrixbestandteilen im fluiden System des SPR-Biosensors gekommen ist (s. Diskussion in Abschnitt 7.5.2). In Zyklus 122 waren wiederholt unregelmäßige Anstiege des SPR-Response zu beobachten, die eine verstärkte Verschleppung und Ablagerung von Matrixbestandteilen in der sensitiven Schicht des Sensorchips erwarten ließen.

Zur Beurteilung der Vollständigkeit der Regeneration wurde der relative Response am Report Point „Regeneration“ gegen den Flavophospholipol-Gehalt der im jeweiligen Zyklus injizierten Lösung aufgetragen. Abbildung 57 zeigt die Auftragung für 16 verschiedene Analysenserien mit insgesamt 299 Zyklen, die über einen Zeitraum von 4 Monaten auf derselben Chipoberfläche gemessen wurden. Da eine eventuell vorhandene Konzentrationsabhängigkeit der Daten abgebildet werden sollte und nicht die Unterschiede aufgrund des Quellungs Zustands des CMD, wurden jeweils die ersten 5 Zyklen jeder Serie ausgelassen, in denen das System am weitesten vom Equilibrierungszustand entfernt ist. Außerdem wurde nur der für den Assay relevante Konzentrationsbereich von 0 bis 30 µg/mL Flavophospholipol

Ergebnisse und Diskussion

berücksichtigt. Höhere Konzentrationen, die im Laufe der Methodenentwicklung getestet wurden, wurden nicht aufgetragen.

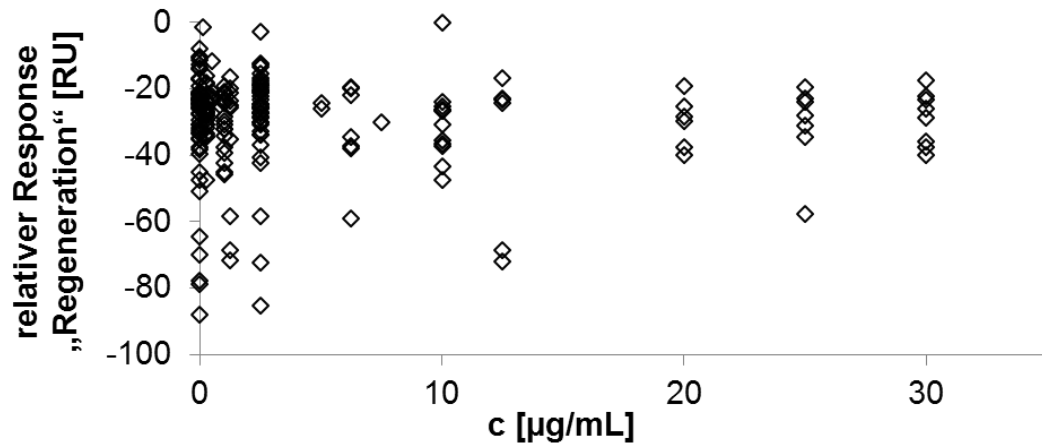


Abbildung 57: Konzentrationsabhängigkeit der Regeneration über einen Zeitraum von 4 Monaten (299 Zyklen). Aufgetragen sind die Daten für alle Zyklen im relevanten Konzentrationsbereich (0 bis 30 µg/mL) unter Auslassung der jeweils ersten 5 Zyklen jeder Serie (198 Zyklen).

Bei niedrigen Flavophospholipol-Konzentrationen bindet mehr MtgA an die Chipoberfläche, sodass im Falle einer unvollständigen Regeneration eine entsprechend höhere absolute Menge an MtgA auf der Chipoberfläche verbleiben müsste, als bei höheren Flavophospholipol-Konzentrationen. Dies würde für niedrigere Flavophospholipol-Konzentrationen in einem höheren relativen Response für den Report Point „Regeneration“ resultieren. Die Daten für jede einzelne Konzentration zeigen erwartungsgemäß immer noch eine erhebliche Streuung, da der Response auch nach den ersten fünf Zyklen weiter driftet (s. Abbildung 56 b). Es ist allerdings keine Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen. Somit kann gefolgert werden, dass mit 1% SDS in Laufpuffer eine vollständige Regeneration der Chipoberfläche gewährleistet war.

Insbesondere hinsichtlich der vermuteten Veränderungen der Sensorchipoberfläche sollte die MtgA-Bindungsfähigkeit der Chipoberfläche auf zeitliche Trends geprüft werden. Hierzu wurden die MtgA-Bindungslevel von 36 Blindwert-Injektionen aus 12 Analysenserien, die auf derselben Chipoberfläche über einen Zeitraum von

Ergebnisse und Diskussion

4 Monaten (insgesamt 272 Zyklen) gemessen wurden, aufgetragen (s. Abbildung 58). Der jeweils erste Blindwert einer Analysenserie ist durch eine rote Raute markiert.

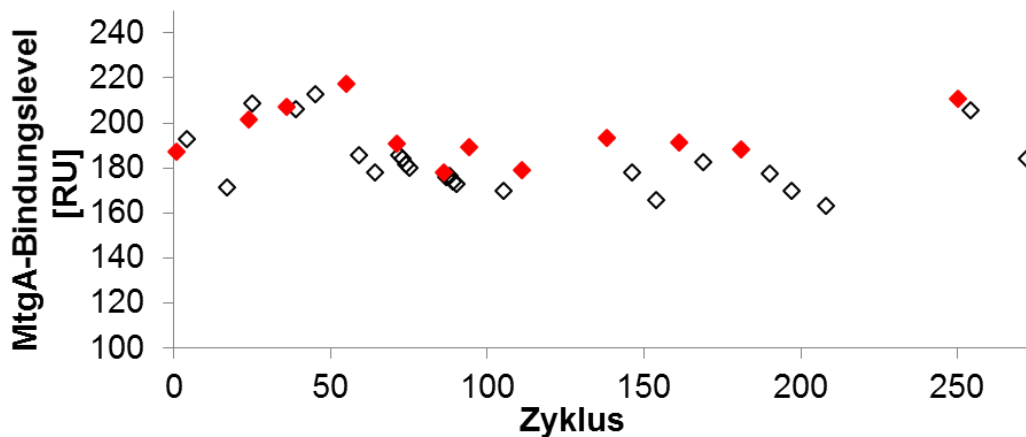


Abbildung 58: MtgA-Bindungslevel von 46 Blindwert-Injektionen über einen Zeitraum von 4 Monaten (insgesamt 272 Zyklen). Der jeweils erste Blindwert einer Serie (mit jeweils frischem MtgA) ist rot markiert.

Über die Gesamtheit der Analysen ist allenfalls ein schwacher Abwärtstrend der Bindungslevel zu erkennen. Somit kann angenommen werden, dass eventuell aufgetretene Veränderungen der Chipoberfläche nicht zu einer Abnahme der MtgA-Bindungsfähigkeit geführt haben. Auffällig ist allerdings, dass innerhalb einer Serie in der Regel eine abnehmende Tendenz der MtgA-Bindungslevel zu beobachten war. Mögliche Ursachen hierfür sind Aktivitätsverlust des Enzyms (bzw. genauer: Veränderungen der Proteinstruktur, die zum Verlust der Moenomycin-Bindungsfähigkeit führen), ebenso wie ein Ausfallen des Proteins bzw. Adsorption an Gefäßwänden. Eine Aggregation oder Adsorption der GT kann eine Folge ihrer Hydrophobizität sein. Zwar handelt es sich bei der verwendeten MtgA um eine trunkierte Mutante ohne Transmembranregion, dennoch verfügt auch dieses Protein über eine hydrophobe Oberfläche (s. Abschnitt 2.4.2 u. Abbildung 10 b). Für eine Adsorption an Gefäßwänden spricht auch, dass bei Verwendung von Polystyrol-Mikrotiterplatten (Rotilabo®-Mikrotest-Platten aus Polystyrol U-Profil; Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland) anstelle von Polypropylen-Röhrchen 5-10% niedrigere MtgA-Bindungslevel erzielt wurden. Mit PBP1b wurde bei Befüllen der

Kavitäten bis zur Oberkante sogar nahezu vollständiger Verlust der GT-Bindung beobachtet. Ursache hierfür wird eine Adsorption an der Abdeckfolie (Microplate Foils (96 well); GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) sein, die mit dem Meniskus der Lösung in Kontakt kam. Es wurden Bemühungen unternommen, schwächer hydrophobe MtgA-Mutanten zu gewinnen, die möglicherweise eine bessere Stabilität in Lösung aufweisen. Hierauf wird in Abschnitt 7.6.3 näher eingegangen. MtgA-Stammlösungen (200 µg/mL) in Laufpuffer, die bis zum Zeitpunkt der Analyse bei 6°C gelagert wurden, zeigten praktisch keinen Verlust an Moenomycin-Bindfähigkeit. Daher ist es denkbar, dass eine Kühlung der Lösungen bis zur Analyse den Verlust der Bindungsfähigkeit verlangsamt. Da der Autosampler des verwendeten SPR-Biosensors nicht über eine Thermostatisierung verfügte, ließ sich dies nicht realisieren. Um Veränderungen der MtgA-Aktivität im Laufe einer Analysenserie zu kompensieren, wurde die Kalibrierreihe je einmal zu Beginn und am Ende der Serie gemessen und die Kalibrierfunktion über alle Datenpunkte gebildet.

7.4.6 Einfluss der Proteincharge

Bei einer der drei getesteten MtgA-Chargen kam es bei der Analyse von Futtermitteln (s. Abschnitt 7.5) zu erheblich stärker ausgeprägten Matrixeffekten. So war der relative Response für das undotierte Rindermastfutter und Ferkelaufzuchtfutter nahezu doppelt so hoch wie der Messwert für die Pufferinjektionen. Dementsprechend wurden die niedrig dotierten Proben falsch negativ bewertet. Lediglich die höchsten Dotierungsstufen wurden als positive Proben erkannt. PGT verfügen als Transmembran-Proteine über hydrophobe Oberflächen. Selbst die hier verwendete *S. aureus* MtgA, deren Transmembranregion trunkiert ist, verfügt aufgrund ihrer Kieferregion (s. Abschnitt 2.4.2 u. Abbildung 10 b) über hydrophobe Oberflächen. Es ist denkbar, dass aufgrund des hydrophoben Charakters des Enzyms bei dieser Charge andere Membranbestandteile unvollständig abgetrennt wurden und diese im SPR-Assay mit hydrophoben Matrixkomponenten interagierten. Da die Neigung der PGT zur Aggregation die Analyse der Interaktion mit Inhibitoren generell erschwert, wurden Bemühungen unternommen, hydrophilere Mutanten zu

Ergebnisse und Diskussion

gewinnen (hierauf wird in Abschnitt 7.6.3 näher eingegangen). Solche Mutanten könnten ebenfalls eine robustere Futtermittelanalytik erlauben.

Es wurde versucht, die postulierte Interaktion zwischen Matrixbestandteilen und MtgA zu minimieren, indem ein Assay-Format getestet wurde, bei dem zuerst eine Lösung des Proteins injiziert wird und anschließend die zu analysierende Lösung. Ein solches Elutions-Assay-Format, bei dem die Moenomycine die PGT von der Chipoberfläche ablösen, ist bereits beschrieben worden [133, 281]. Auch mit diesem Assay-Format wurden erneut für die niedrig dotierten und undotierten Proben Response-Werte oberhalb derer der Pufferinjektionen gemessen.

7.5 Analyse von Futtermitteln

7.5.1 Herstellung des Probenmaterials

Da authentische Proben aus der amtlichen Überwachung als Probenmaterial nicht zur Verfügung standen, mussten realistische Proben nachgestellt werden. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Flavophospholipol-freie Futtermittel mit einem außerhalb der EU handelsüblichen Flavophospholipol-Premix (Flavomycin 80; Flavophospholipol-Gehalt laut Hersteller: 8,1% (w/w); weitere Zusammensetzung s. Abschnitt 12.2) gemischt. Bei den Futtermitteln handelte es sich um ein Alleinfuttermittel zur Ferkelaufzucht (bis zu einem Höchstalter von 12 Wochen), ein Alleinfuttermittel für Legehennen und ein Ergänzungsfuttermittel für die Rindermast. Tabelle 8 gibt einen allgemeinen Überblick über die Zusammensetzung der Futtermittel laut Herstellerangaben (Zusammensetzung im Detail s. Abschnitt 12.1).

Tabelle 8: Zusammensetzung der verwendeten Futtermittel (laut Herstellerangaben)

Inhaltsstoff	Alleinfuttermittel zur Ferkelaufzucht	Alleinfuttermittel für Legehennen	Ergänzungsfuttermittel für die Rindermast
Rohprotein	17,5%	17,0%	24,0%
Rohfett	4,0%	6,0%	3,8%
Rohfaser	4,0%	3,3%	8,2%
Rohasche	4,8%	12,6%	8,1%

Das Rindermastfutter und das Ferkelaufzuchtfutter lagen in pelletierter Form vor (Abbildung 59 a), bei dem Legehennenfutter handelte es sich um fein geschrotetes Material (Abbildung 59 b). Der Flavophospholipol-Premix bestand aus einem braunen Pulver (Partikelgröße: 97,0% <800 µm - Abbildung 59 c).

Ergebnisse und Diskussion



Abbildung 59 - Verwendete Futtermittel: a) Pellets (exemplarisch abgebildet: deuka primo pro); b) Alleinfutter für Legehennen deuka all-mash; c) Flavophospholipol-Premix Flavomycin 80.

Um homogenes Probenmaterial zu erhalten, wurden die Futtermittel unter Wasserkühlung gemahlen (s. Abschnitt 9.16), wobei eine Temperatur von 30 °C nicht überschritten wurde (mit Infrarotthermometer unmittelbar nach Beendigung des Mahlvorgangs geprüft). Die Pulver wurden im Anschluss gesiebt. Sie bestanden zu >99% aus Partikeln <0,63 mm. Die Dotierung der Futtermittel erfolgte durch Zugabe definierter Mengen des Flavophospholipol-Premix und anschließendes Homogenisieren mittels Universalmühle, Sieben (Vibrationssiebmaschine) und abschließend manuelles Durchmischen (Löffelspatel) (s. Abschnitt 9.16). Die Dotierung der Futtermittel wurde so gewählt, dass die in der Praxis für den jeweiligen Bestimmungszweck des Futters relevanten Minimal- und Maximalgehalte abgedeckt sind (s. Abschnitt 2.5.1). Somit ergaben sich für das Ferkelaufzuchtfutter die Dotierungen 1 mg/kg und 20 mg/kg, für das Legehennenfutter 2 mg/kg und 5 mg/kg und für das Rindermastfutter 2 mg/kg und 10 mg/kg. Beim Ferkelaufzuchtfutter wurde zusätzlich eine Dotierung von 2 mg/kg untersucht, um einen direkten Vergleich zu den anderen beiden Futtermitteln zu ermöglichen, bei denen dies die minimale Dotierung war. Im Falle des Rindermastfutters wurde eine konservative Herangehensweise gewählt. Es handelt sich um ein Ergänzungsfuttermittel, das laut Hersteller aufgrund der hohen Gehalte an Vitamin A und Spurenelementen maximal 25% der Tagesration ausmachen darf. Die Gehalte an Flavophospholipol in einem solchen Futtermittel sollten demnach in der Praxis mindestens das Vierfache betragen.

7.5.2 Extraktion der Futtermittel und Matrixabreicherung

Die Futtermittel wiesen Rohproteingehalte zwischen 17% und 24% und Rohfettgehalte zwischen 3,8% und 6,0% auf (s. Tabelle 8). Das Ferkelaufzuchtfutter und das Legehennenfutter enthielten als Hauptbestandteile Getreide (s. Abschnitt 12.1). Das Rindermastfutter hatte außerdem einen im Vergleich hohen Rohfasergehalt. Bei allen drei Futtermitteln lagen deshalb hohe Kohlenhydratgehalte vor. Die Futtermittelbestandteile waren zum Teil thermisch vorbehandelt, was in einer effizienteren Extraktion von z.B. enthaltener Stärke resultieren sollte. Die Anwesenheit bestimmter Matrixbestandteile (z.B. Stärke) beeinflusst die antibiotische Wirksamkeit von Moenomycinen [1]. Eine Aufreinigung der Extrakte zur Abtrennung von Proteinen und Polysacchariden oder eine selektive Extraktion der Moenomycine schienen daher sinnvoll, um Matrixeffekte zu minimieren. Da sich Moenomycine außer in THF nur in Wasser und wenigen polaren Lösungsmitteln lösen (z.B. Methanol, DMF oder DMSO; nicht hingegen in reinem Acetonitril) [61], war die Wahl der Extraktionsmittel eingeschränkt. Aufgrund von Toxizität bzw. hohem Siedepunkt sollten DMF und DMSO als Extraktionsmittel vermieden werden. THF sollte zu einer praktisch vollständigen Extraktion der Fette führen, was nicht erwünscht war, da diese voraussichtlich durch unspezifische Bindung an die Chipoberfläche zu starken Matrixeffekten führen würden. Mit Methanol war zu erwarten, dass zumindest ein Teil der enthaltenen Fette extrahiert würde. Mit Wasser und zum Teil auch mit Methanol sollte es zur Extraktion von Proteinen und löslichen Kohlenhydraten kommen.

Zunächst wurde eine Extraktion der Futtermittel mit 25 mM Tris-Puffer pH 7,5 mit 300 mM NaCl (SPR-Laufpuffer ohne CHAPS; CHAPS wurde den geklärten Extrakten zugegeben) bei Raumtemperatur mit anschließender Klärung nach Carrez als Probenvorbereitung getestet (Verfahren A in Abschnitt 9.17). Da überschüssiges Zink aus der Carrez-Lösung stören könnte (z.B. aufgrund der Bildung schwacher Komplexe mit Moenomycinen; s. Abschnitt 2.2), wurde dieses vor der Filtration als Hydroxid gefällt. Die Abtrennung der mitextrahierten Matrixbestandteile war jedoch nicht ausreichend, sodass es zur Verschleppung von Matrixbestandteilen und zur Kontamination des fluiden Systems des Biosensors kam. In der Kalibrierreihe, die im Anschluss an die Probenextrakte gemessen wurde, kam es daher zu massiven Matrixeffekten, wie an den Störungen im Sensorgramm zu erkennen ist

Ergebnisse und Diskussion

(s. Abbildung 60). Die Störungen führten zu einer massiven Verfälschung der Ergebnisse, sodass beispielsweise bei der Kalibrierlösung mit 7,5 µg/mL Flavophospholipol ein höherer Response gemessen wurde, als bei der Blindprobe der Kalibrierreihe, die vor den Proben gemessen wurde.

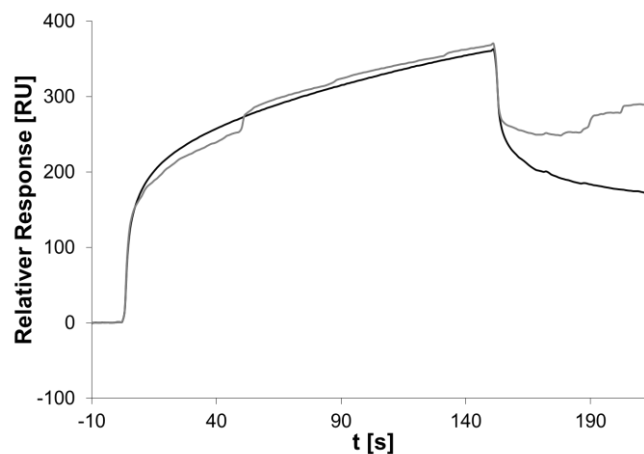


Abbildung 60: Sensorgramme von Flavophospholipol-Kalibrierstandards vor und nach Messung von Futtermittlextrakten, die durch Extraktion mit SPR-Laufpuffer ohne CHAPS und anschließender Klärung nach Carrez gewonnen wurden (Verfahren A aus Abschnitt 9.17). Dargestellt sind die Sensorgramme des vor den Extrakten gemessenen Kalibrierstandards mit 0 µg/mL (schwarz) und des nach den Extrakten gemessenen Kalibrierstandards mit 7,5 µg/mL (grau).

Um schwächer matrixbelastete Extrakte zu erhalten, wurde im nächsten Schritt mit Acetonitril/Wasser im Verhältnis 2,5:1 (v/v) extrahiert, ein Aliquot zur Trockne eingedampft und in Laufpuffer ohne CHAPS aufgenommen (weiteres Vorgehen analog zu oben – s. Verfahren B in Abschnitt 9.17). Durch den hohen Acetonitril-Anteil sollten weniger Proteine und Kohlenhydrate extrahiert werden. Bei der anschließenden Analyse war der Response aller Probenextrakte höher, als der Response sämtlicher Kalibrierstandards. Ursache hierfür kann die direkte Bindung von Matrixbestandteilen an die Sensorchipoberfläche und auch die Bindung von Matrixbestandteilen an die MtgA (z.B. über den hydrophoben Bereich der Kieferregion, s.u.) sein. Auch hier wurde wieder, wenn auch in geringerem Maße, eine Kontamination des fluiden Systems mit Matrixeffekten in den nachfolgenden Kalibrationszyklen beobachtet.

Ergebnisse und Diskussion

Die vorangegangenen Experimente hatten gezeigt, dass eine Matrixabreicherung nach der Extraktion zwingend erforderlich ist und die Klärung nach Carrez hierzu nicht ausreicht. Bei der von Gallo et al. [57] beschriebenen LC-MS/MS-Methode erfolgt die Matrixabreicherung im Anschluss an die Extraktion der Futtermittel mit 25% Ammoniak/Methanol 1:9 (v/v), Eindampfen der Extrakte und Aufnehmen in Methanol/Wasser 1:20 (v/v) per SPE an einer *N*-Vinylpyrrolidon/Divinylbenzol-Copolymer-Phase (Oasis® HLB). Vor der Elution mit 25% Ammoniak/Methanol 1:9 (v/v) wird mit Wasser gewaschen. Auch Pérez et al. [201] reinigen die zu analysierenden Hühnermistextrakte, sowie der Gewinnung eines Moenomycin-Standards dienende Extrakte eines Flavophospholipol-Premixes mittels SPE auf. Die per ASE erhaltenen methanolischen Extrakte werden nach Verdünnung mit Wasser auf das 10-fache Volumen an einer C18- (Premix) oder einer C4-Phase (Hühnermist) retardiert (Gallo et al. berichten, dass sich bei der Analyse der Hühnermistextrakte die C18-Phase als ungeeignet erwies, da die Moenomycine mit geringer Wiederfindung eluiert wurden). Vor der Elution mit Methanol wird die Kartusche nacheinander mit Hexan/Dichlormethan 1:1 (v/v), Ethylacetat und Ethylacetat/Methanol 3:1 (v/v) gewaschen. Pérez et al. erzielten für die Hühnermistextrakte im Höchstfall eine Wiederfindungsrate von 55%. Da sich außerdem im Zuge der Methodenentwicklung zur Isolierung des Moenomycin A gezeigt hatte, dass die Oasis® HLB-Phase eine vollständige Retention des Moenomycins aus neutralem Phosphatpuffer und eine Elution bereits mit moderatem Anteil an organischem Lösungsmittel im Eluenten erlaubt (s. Abschnitt 7.2.6), sollte diese Phase verwendet werden.

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass bei wässrigen Extraktionsmitteln ein hochviskoses Gemisch entsteht und auch nach der Zentrifugation ein trüber Überstand verbleibt. Bei Extraktion mit Methanol hingegen war das Gemisch im Horizontalschüttler leicht durchmischbar und das Sediment setzte sich vor der Zentrifugation rasch nahezu vollständig ab. Nach Zentrifugation wurde ein klarer Überstand erhalten. Daher wurde die Extraktion mit Methanol bevorzugt. Hier sollte allerdings ein Waschschrift mit Wasser, wie er bei Gallo et al. angewendet wird, nicht ausreichen, da die Futtermittelmatrix auch störende Fette enthält. Ein Waschschrift mit unpolarem organischem Lösungsmittel, in dem Moenomycine unlöslich sind, wäre

Ergebnisse und Diskussion

hingegen sinnvoll. Die von Pérez et al. beschriebene Waschprozedur bot den Vorteil, dass Lösungsmittelgemische steigender Polarität angewendet werden und somit lipophile Matrixbestandteile unterschiedlicher Polarität (z.B. unpolare und polare Lipide oder unpolare Proteine) eluiert werden sollten.

Schließlich wurde die Extraktion mit ASE (Accelerated Solvent Extraction) bei 100 °C und 120 bar durchgeführt. Die Aufarbeitung ist schematisch in Abbildung 61 dargestellt (detaillierte Beschreibung in Abschnitt 9.17 Verfahren D)²⁰.

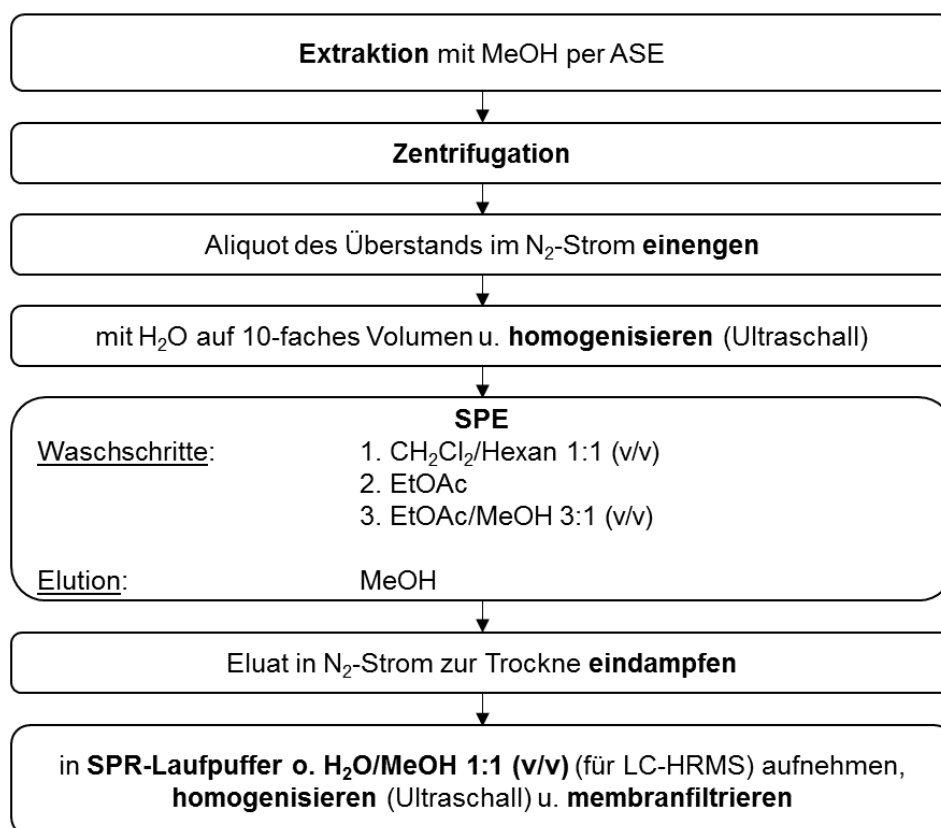


Abbildung 61: Schema der Aufarbeitung der Futtermittelproben mit Extraktion per ASE und Matrixanreicherung per SPE (Verfahren D aus Abschnitt 9.17).

In Abbildung 62 sind die Messwerte (relativer Response) für die drei Futtermittel nach der beschriebenen Aufarbeitung graphisch aufgetragen. Im Falle des

²⁰ Die Aufarbeitung ist angelehnt an die am CVUA-RRW in Krefeld angewendete LC-MS/MS-Screening-Methode für Flavophospholipol.

Ergebnisse und Diskussion

Ferkelaufzuchtfeeders und des Rindermastfeeders war eine deutliche Unterscheidung der undotierten von den dotierten Proben möglich und in allen dotierten Proben konnten Moenomycine nachgewiesen werden. Beim Legehennenfutter hingegen wurde die undotierte Probe falsch positiv bewertet. Auch in den dotierten Proben sind die Messwerte deutlich niedriger, als bei den anderen Futtermitteln.

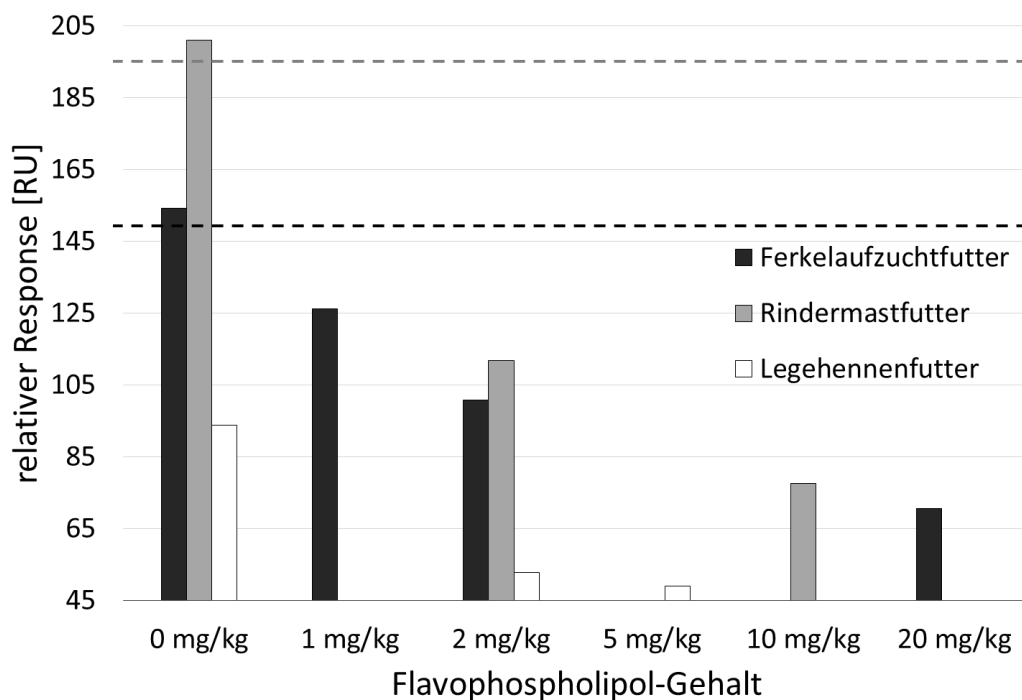


Abbildung 62: Vergleich der drei Futtermittel nach Extraktion per ASE und Matrixabreicherung mittels SPE. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei Messungen. Die hellgraue gestrichelte Linie markiert den Mittelwert für die Pufferinjektionen (195 RU) und die dunkelgraue den Mittelwert abzüglich der dreifachen Standardabweichung (149 RU).

Es ist davon auszugehen, dass Matrixbestandteile des Legehennenfeeders die Fähigkeit der MtgA, an Moenomycine zu binden, verringern, wodurch zu niedrige Messwerte erhalten werden, die zu hohe Flavophospholipol-Gehalte im Futtermittel vortäuschen. Dies kann durch Denaturierung des Enzyms oder auch durch sterische Hinderung (spezifische oder unspezifische Bindung von Matrixbestandteilen an das Enzym, wodurch der Zugang zur Donorbindungsstelle blockiert wird) geschehen. Eine Blockierung des immobilisierten Moenomycin A-Derivats durch Bindung von Matrixbestandteilen an die Chipoberfläche (an das CMD-Gel oder das immobilisierte

Ergebnisse und Diskussion

Moenomycin A) ist unwahrscheinlich, da sich dies vermutlich in einem erhöhten Response geäußert hätte (s.o.). Im Falle einer Bindung von Matrixbestandteilen an das immobilisierte Moenomycin A selbst wäre es außerdem zu einer Bindung an freie Moenomycine aus der Probe gekommen, was zu einem Verlust der Konzentrationsabhängigkeit der MtgA-Bindung geführt hätte. Auffällige Unterschiede in der Zusammensetzung zwischen dem Legehennenfutter und den anderen beiden ist der ca. 50% höhere Fettgehalt und der im Vergleich höchste Rohaschegehalt. Aufgrund der Extraktion mit Methanol und der aller Voraussicht nach schlechten Retention von Salzen bei der anschließenden SPE sollte allerdings nur ein geringer Anteil der Salze in der analysierten Lösung enthalten gewesen sein (dies deckt sich mit den Beobachtungen zur Bildung von Natrium- und Kalium-Addukten bei der LC-HRMS; s.u.). Es ist auch nicht plausibel, dass ein relativer Unterschied von 50% im Fettgehalt die beobachteten deutlichen Unterschiede in den Matrixeffekten zur Folge hat. Dies gilt insbesondere, da extrahierte Fette mit der verwendeten SPE-Methode abgereichert werden sollten. Ein weiterer offensichtlicher Unterschied ist die physikalische Beschaffenheit des Futtermittels. Im Gegensatz zu den anderen beiden Futtermitteln, die als Pellets vorlagen, bestand das Legehennenfutter aus fein geschrotetem Material. Möglicherweise ergeben sich aufgrund der Verarbeitungsunterschiede (z.B. Denaturierungsgrad der enthaltenen Proteine, Verkleisterungsgrad der enthaltenen Stärke) Unterschiede in den Matrixeffekten. Ein Verzicht auf das Vermahlen von nicht pelletierten Futtermitteln und stattdessen eine Entnahme einer repräsentativen Teilprobe mittels Riffelteiler könnte hier Abhilfe schaffen. Eine systematische Untersuchung mit weiteren Futtermitteln wäre hier sinnvoll. Dies wurde allerdings nicht getestet, da ein homogenes Einbringen des Premix in die unvermahlene Probenmatrix aufgrund der deutlichen Korngrößenunterschiede mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht gewährleistet gewesen wäre.

Bei keinem der Futtermittel kam es zur Verfälschung der Ergebnisse durch unspezifische Bindung von Matrixbestandteilen. Auch eine Beeinträchtigung der Zyklen, in denen Kalibrierlösungen analysiert wurden, war nicht zu beobachten. Somit war die Kombination aus ASE-Extraktion und Matrixabreicherung per SPE geeignet,

Ergebnisse und Diskussion

die bei den anderen beiden Verfahren beobachteten Matrixeffekte (s.o.) zu eliminieren.

Zusätzlich zur Extraktion per ASE wurde auch eine Extraktion mit Methanol auf dem Horizontalschüttler durchgeführt (Verfahren C in Abschnitt 9.17). Hier wurden höhere Messwerte erhalten, die zu schlechteren Wiederfindungen führten.

Für die Filtration der zu analysierenden Lösungen wurden verschiedene Membranmaterialien (s. Abschnitt 9.17) auf ihre Eignung geprüft. Hierzu wurde eine Flavophospholipol-Lösung in SPR-Laufpuffer (125 µg/mL) mit den verschiedenen Spritzenvorsatzfiltern filtriert und die Filtrate im Vergleich zur unfiltrierten Lösung mittels HPLC-UV (Methode s. Abschnitt 9.3) analysiert. Praktisch vollständige Wiederfindungen wurden mit der Polyestermembran und dem hydrophilisierten Polytetrafluorethylen erhalten. Mit regenerierter Cellulose wurde noch eine Wiederfindung von 95% erreicht, während die Membran aus Polyvinylidendifluorid die Moenomycine nahezu vollständig adsorbierte (s. Abbildung 63).

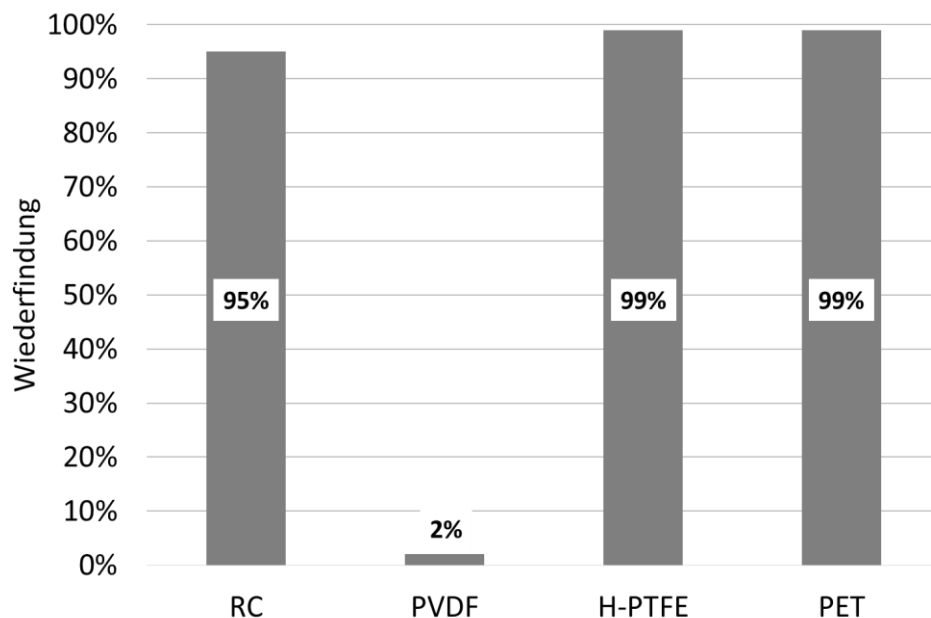


Abbildung 63: Eignung verschiedener Membranmaterialien für die Filtration der Extrakte. RC: regenerierte Cellulose, PVDF: Polyvinylidendifluorid, H-PTFE: hydrophilisiertes Polytetrafluorethylen, PET: Polyethylenterephthalat (Polyester)

Ergebnisse und Diskussion

7.5.3 Richtigkeit

Um einen Vergleich der mittels SPR bestimmten Flavophospholipol-Gehalte der dotierten Futtermittel mit dem in der amtlichen Überwachung üblichen Screening per LC-MS zu erlauben, wurden die Futtermittlextrakte (abweichend nicht in SPR-Laufpuffer, sondern in Methanol/Wasser 1:1 (v/v) aufgenommen; s. Abbildung 61) parallel per LC-ESI-HRMS analysiert²¹. Die Methode wird im CVUA-RRW zum Screening auf Antibiotika angewendet. Die Quantifizierung erfolgte über die Peakfläche des im Negativionenmodus aus Moenomycin A gebildeten Ions [M-H]⁻ (Beispielchromatogramm eines Kalibrierstandards mit 25 µg/mL Flavophospholipol in Abbildung 44). Die Proben und Kalibrierstandards wurden jeweils an zwei verschiedenen Tagen gemessen und die gefundenen Flavophospholipol-Gehalte gemittelt. In keiner der undotierten Futtermittelproben war Flavophospholipol nachweisbar. In Tabelle 9 sind die mit SPR und LC-HRMS bestimmten Gehalte und erreichten Wiederfindungen aufgelistet.

²¹ Die Messung der Extrakte mit LC-HRMS wurde freundlicherweise von Herrn Breuer-Grau am Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Rhein-Ruhr-Wupper (CVUA-RRW) in Krefeld durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 9: Mittels SPR und LC-HRMS gefundene Flavophospholipol-Gehalte der dotierten Futtermittel (Mittelwerte aus je zwei Messungen).

Futtermittel	Soll	mit SPR bestimmt		mit LC-HRMS bestimmt	
	c [mg/kg]	c [mg/kg]	Wieder- findung	c [mg/kg]	Wieder- findung
Ferkelaufzucht- futter	1,01	0,5	49%	0,30	30%
	2,03	1,2	59%	0,58	29%
	20,3	10,3	51%	3,8	19%
Rindermastfutter	2,03	0,8	40%	0,65	32%
	10,1	4,2	41%	2,9	29%
Legehennenfutter	2,03	-	-	0,44	22%
	5,06	-	-	0,98	19%

Abbildung 64 zeigt einen Vergleich der Wiederfindungen für Flavophospholipol in den dotierten Futtermitteln zwischen SPR und LC-HRMS.

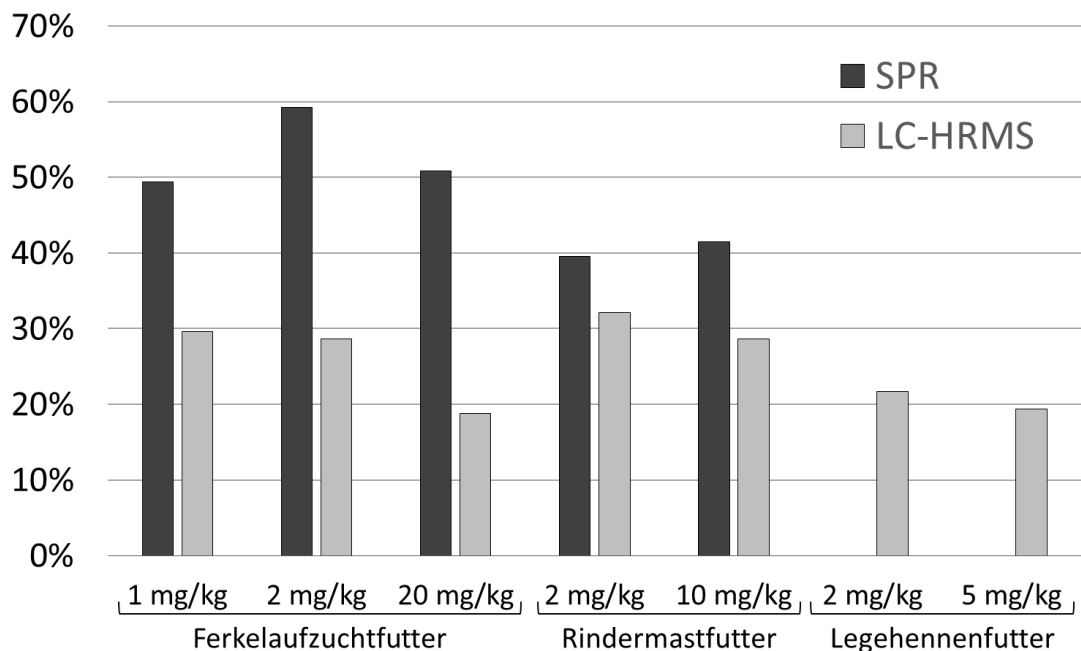


Abbildung 64: Vergleich der Wiederfindungen zwischen SPR und LC-HRMS.

Ergebnisse und Diskussion

Mit Ausnahme des Legehennenfutters, für das mit SPR kein Flavophospholipol-Gehalt ermittelt werden konnte (s.o.), wurden mittels SPR durchweg höhere Wiederfindungen erreicht, als mit der angewendeten LC-HRMS-Methode. Die Wiederfindungen mit SPR lagen zwischen 40% und 59% und mit LC-HRMS zwischen 19% und 32%.

Mögliche Ursachen für Verluste an Moenomycinen sind eine unvollständige Extraktion, sowie Verluste bei der Aufreinigung der Extrakte mittels SPE. Mit Extraktion der dotierten Futtermittel bei Raumtemperatur (Verfahren C in Abschnitt 9.17) wurden deutlich niedrigere Wiederfindungen erzielt, als bei Extraktion mittels ASE. Extraktion des reinen Premix mit Methanol bei Raumtemperatur (analog Verfahren C in Abschnitt 9.17, abweichend ohne anschließende SPE) ergab eine Ausbeute von 85% (bestimmt durch mehrmalige Extraktion in Folge und Analyse der einzelnen Extrakte mittels LC-MS). Eine praktisch vollständige Extraktion der Moenomycine im Premix wurde bei dreimaliger Extraktion erreicht. Da mittels ASE in drei statischen Zyklen bei 100 °C extrahiert wurde, ist davon auszugehen, dass dieses Verfahren eine vollständige Extraktion der Moenomycine gewährleistet. Daneben sind Verluste durch thermische Belastung während der ASE denkbar. Um richtigere quantitative bzw. semiquantitative Informationen zu erhalten, sollte es erforderlich sein, die Aufreinigung per SPE zu optimieren. Da die Ergebnisse eines Screenings mittels SPR aber ohnehin durch ein Bestätigungsverfahren (LC-MS/MS mit Standardaddition – s.u.) abgesichert werden müssten, ist die quantitative Aussage des Assays von nachrangigem Interesse.

Die im Vergleich zur SPR noch niedrigeren Wiederfindungen bei der Analyse mit LC-HRMS dürften in der Matrix-bedingten stärkeren Ionensuppression bei Analyse der Futtermittelextrakte im Vergleich zu den Flavophospholipol-Standards begründet sein. Moenomycin A neigt außerdem bei Ionisation mittels ESI in Gegenwart von Natriumionen zur Adduktbildung [56]. Daher wurde überprüft, ob die geringe Wiederfindung in den Futtermittelextrakten auch durch Bildung von Addukten zu erklären sei. Verstärkte Bildung von Natrium-, Kalium- oder Ammonium-Addukten war nicht zu beobachten (s. Tabelle 10). Im Gegenteil machte das Natrium-Addukt des dreifach deprotonierten Moenomycin A ($[M-3H+Na]^{2-}$) bei den Flavophospholipol-

Ergebnisse und Diskussion

Standards und den Premix-Extrakten eine relative Peakfläche von 10% aus, während es bei den Futtermittlextrakten bis maximal 5% ausmachte.

Tabelle 10: Relative Peakflächen der verschiedenen Ionenspezies und Verhältnis zwischen einfach und zweifach deprotoniertem Moenomycin A. Für die Kalibrierstandards und den Premix ist der Mittelwert aller analysierten Lösungen und in Klammern die Standardabweichung angegeben. Für die Futtermittel sind die Werte beider Messungen angegeben. (F: Ferkelaufzuchtfutter, R: Rindermastfutter, L: Legehennenfutter)

Probe	relative Peakflächen [%]				Flächenverhältnis [M-H] ⁻ / [M-2H] ²⁻
	[M-H] ⁻	[M-2H] ²⁻	[M-3H+Na] ²⁻	[M-3H+K] ²⁻	
Kalibrierstandards	43 (2)	47 (1)	9 (1)	0,3 (0,2)	0,92 (0,07)
Premix	42 (1)	49 (1)	10 (1)	0,0 (0,0)	0,85 (0,02)
F 1 mg/kg	53; 55	47; 45	0; 0	0,0; 0,0	1,15; 1,21
F 2 mg/kg	55; 56	45; 44	0; 0	0,0; 0,0	1,20; 1,29
F 20 mg/kg	54; 56	44; 44	2; 1	0,0; 0,0	1,24; 1,28
R 2 mg/kg	48; 51	49; 46	3; 3	0,0; 0,0	1,00; 1,12
R 10 mg/kg	45; 46	50; 49	5; 5	0,0; 0,2	0,91; 0,93
L 2 mg/kg	61; 61	40; 39	0; 0	0,0; 0,0	1,53; 1,57
L 5 mg/kg	59; 57	41; 43	0; 0	0,0; 0,0	1,43; 1,30

Das dementsprechende Kalium-Addukt [M-3H+K]²⁻ war nur in den Kalibrierstandards und in der höchsten Dotierung beim Rindermastfutter nachweisbar und machte eine relative Peakfläche von <1% (maximal 0,6%) aus. Ammonium-Addukte ([M-2H+NH₄]⁻ u. [M-3H+NH₄]²⁻) waren nicht nachweisbar. Das Vorhandensein der einfach negativ geladenen Addukte [M-2H+Na]⁻ und [M-2H+K]⁻ konnte nicht überprüft werden, da ihre Masse/Ladung-Verhältnisse außerhalb des mit der verwendeten Methode erfassten Massenbereichs lagen. Auffällig war zudem, dass das Peakflächenverhältnis der dominanten Ionenspezies [M-H]⁻ und [M-2H]²⁻ zueinander bei den Futtermittlextrakten zum Teil deutlich von dem der Kalibrierstandards abwich.

Ergebnisse und Diskussion

Bei der verwendeten LC-HRMS-Methode handelte es sich um eine Multi-Analyt-Screening-Methode, weshalb davon auszugehen ist, dass die chromatographischen Bedingungen und die Ionisationsbedingungen nicht für den Flavophospholipol-Nachweis optimiert sind. Am CVUA-RRW steht ebenfalls eine dedizierte Methode für den Flavophospholipol-Nachweis (LC-MS/MS) zur Verfügung, deren Probenvorbereitung im Wesentlichen der hier vorgestellten Methode entspricht (s. Fußnote 20 auf Seite 156; ASE-Extraktion mit nur einem statischen Zyklus und SPE an einer C18-Phase anstelle der hier verwendeten *N*-Vinylpyrrolidon/Divinylbenzol-Copolymer-Phase). Da bei dieser Methode allerdings ebenfalls mit ESI ionisiert wird, sollte auch dieses Verfahren in vergleichbarem Maße anfällig für die beobachteten Matrixeffekte sein. Dementsprechend ist bei dieser Methode vorgesehen, dass jede zu analysierende Probe mit einer Flavomycin[®]-Stammlösung dotiert wird, um die individuellen Wiederfindungen abzuschätzen. Außerdem ist auch bei dieser Methode im Falle eines positiven Nachweises eine Bestätigung durch Standardaddition (Dotierung der Futtermittel und erneute Aufarbeitung) erforderlich, bei der die Matrixeffekte kompensiert werden. (Prinzipiell wäre eine Kompensation der Matrixeffekte auch zeitsparender mittels Stabilisotopenverdünnungsanalyse möglich, was allerdings daran scheitert, dass hierfür benötigte Stabilisotopen-markierte Moenomycin A-Standards nicht verfügbar sind.)

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der in dieser Arbeit entwickelte SPR-Biosensor-Assay stark anfällig für Matrixeffekte ist. Trotz aufwendiger Matrixabreicherung kam es daher bei einem von drei untersuchten Futtermitteln zu einer Überschätzung der Flavophospholipolgehalte und falsch positiven Befunden. Zwar wurden bei den übrigen beiden Futtermitteln bessere Wiederfindungen erzielt, als mittels LC-MS, eine präzise Quantifizierung und Bestätigung per Standardaddition mit einem geeigneten Bestätigungsverfahren (LC-MS/MS) ist allerdings in beiden Fällen erforderlich. Die LC-MS bietet außerdem gegenüber der SPR den Vorteil, dass in einem Screening weitere Analyten parallel erfasst werden können.

Für eine Routineanwendung ist der SPR-Biosensor-Assay daher gegenüber der LC-MS nicht konkurrenzfähig.

7.6 Charakterisierung von PGT-Mutanten

Untersuchungen der Interaktion zwischen PGT und dem natürlichen Substrat bzw. Inhibitoren werden durch die Hydrophobizität der PGT erschwert. Daher wurde versucht, schwächer hydrophobe Mutanten von MtgA zu entwickeln.²² Hierbei wurden zwei enzymatisch inaktive Mutanten erhalten, von denen eine vollständig monodispers war.

Für eine enzymatisch inaktive PGT-Mutante (*S. aureus* MtgA E100Q) ist eine Kristallstruktur im Komplex mit Moenomycin A publiziert [124]. Auch für eine enzymatisch inaktive Mutante von PBP1a aus *Thermotoga maritima* wurde gezeigt, dass diese sowohl Moenomycin A, als auch Lipid II binden kann [313]. Daher bestand die Möglichkeit, dass die monodisperse MtgA-Mutante über Substratbindungsfähigkeit und die Fähigkeit zur Interaktion mit Inhibitoren verfügen könnte. Diese Möglichkeit sollte mit dem hier vorgestellten SPR-Biosensor-Assay geprüft werden (s. Abbildung 65; Methode in Abschnitt 9.19).

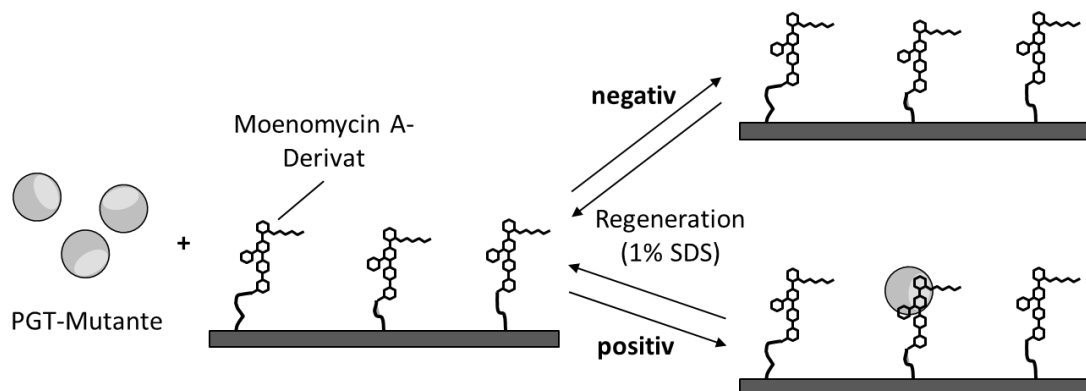


Abbildung 65 - Direkter Assay für PGT-Mutanten: Nur Mutanten, die imstande sind, an das Donorsubstrat zu binden, binden an die Sensorchipoberfläche.

²² Die Gewinnung, Aufreinigung und Charakterisierung (mit Ausnahme der SPR-Messungen) der entsprechenden MtgA-Mutanten wurde durch Ismahene Dahmane im Zuge ihrer Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. Mohammed Terrak (Centre d'Ingénierie des Protéines der Universität Liège; Belgien) durchgeführt. Alle weiteren PGT wurden von Dr. Mohammed Terrak im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse und Diskussion

7.6.1 Eignung des SPR-Assays

Moenomycin A bindet anstelle der wachsenden Peptidoglykankette an die Donorbindungsstelle der PGT. Dabei geht es Wechselwirkungen mit mehreren konservierten und zum Teil für die enzymatische Aktivität essentiellen Aminosäuren ein (s. Abschnitt 2.4.2) [118]. Trotz ausgedehnter Untersuchungen wurden bislang nur zwei für die enzymatische Aktivität nicht essentielle Aminosäuren identifiziert, deren Mutation dazu führt, dass die PGT nicht durch Moenomycine inhibiert wird [1, 148]. Die entsprechenden Mutanten bilden allerdings kürzere Peptidoglykanketten, als der Wildtyp. Folglich imitiert Moenomycin A sehr gut die wachsende Peptidoglykankette, weshalb der hier vorgestellte Assay dazu geeignet sein sollte, die Fähigkeit von PGT zur Interaktion mit dieser, zu testen.

Zunächst wurde die prinzipielle Eignung des Assays anhand des Wildtyps von *E. coli* PBP1b und *S. aureus* MtgA geprüft. Beide PGT banden in konzentrationsabhängiger Weise an das immobilisierte Moenomycin A (s. Abbildung 66).

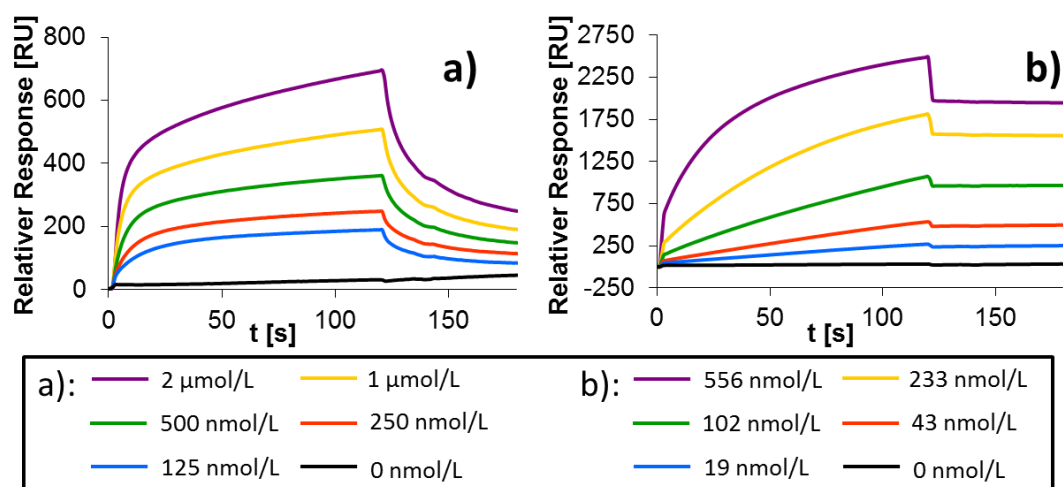


Abbildung 66: Konzentrationsabhängige Bindung der PGT (a: *S. aureus* MtgA; b: *E. coli* PBP1b) an das immobilisierte Moenomycin A-Derivat.²³

²³ Teilabbildung a entnommen aus: Bury D, Dahmane I, Derouaux A, Dumbre S, Herdewijn P, Matagne A, Breukink E, Mueller-Seitz E, Petz M, Terrak M (2015) *Positive cooperativity between acceptor and donor sites of the peptidoglycan glycosyltransferase*. *Biochem Pharmacol* 93(2):141-150, Copyright (2014), abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Ergebnisse und Diskussion

Zusätzlich wurden einige enzymatisch inaktive PGT-Mutanten und Mutanten mit verringerter enzymatischer Aktivität untersucht (*S. aureus* MtgA E100Q und F104A und *E. coli* PBP1b E233Q, D234N, H240A, K274A und E290Q) [87, 89, 127]. Wie eingangs erwähnt, war für die Mutante E100Q bereits bekannt, dass sie Moenomycin A binden kann, was sich auch hier bestätigte. Alle anderen untersuchten Mutanten führten ebenfalls zu einem Bindungsresponse, wobei im Falle von MtgA F104A eine deutlich schwächere Bindung beobachtet wurde (s. Abbildung 67). Die Spezifität der Bindung wurde für fünf der sieben Mutanten (beide MtgA-Mutanten und *E. coli* PBP1b-Mutanten E233Q, E234N und E290Q) durch Konkurrenz mit zugesetztem Moenomycin A (analog dem Inhibitions-Assay aus Abschnitt 7.4) überprüft und bestätigt.

Bezüglich der Eignung von CHAPS als Tensid sei auf Abschnitt 7.4.4 verwiesen.

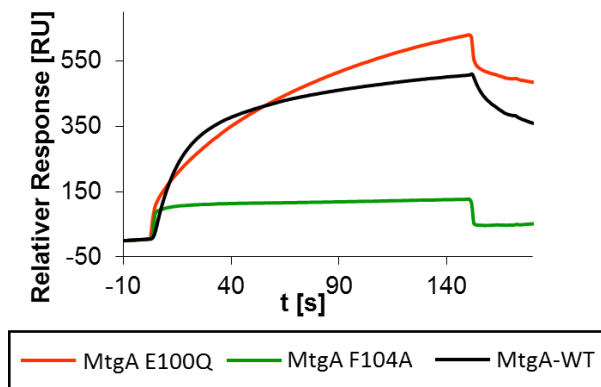


Abbildung 67: Bindung verschiedener *S. aureus* MtgA-Mutanten (400 nM) an das immobilisierte Moenomycin A-Derivat.²⁴

7.6.2 Komplexität der Sensorgramme

Wie in Abschnitt 4.1.3 ausgeführt, sollten die Sensorgramme für eine einfache 1:1-Interaktion zwischen zwei Bindungspartnern durch eine Exponentialfunktion (Gleichung 4.10) beschrieben werden. Die Sensorgramme für die Interaktion

²⁴ entnommen aus: Bury D, Dahmane I, Derouaux A, Dumbre S, Herdewijn P, Matagne A, Breukink E, Mueller-Seitz E, Petz M, Terrak M (2015) *Positive cooperativity between acceptor and donor sites of the peptidoglycan glycosyltransferase*. *Biochem Pharmacol* 93(2):141-150, Copyright (2014), abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Ergebnisse und Diskussion

zwischen dem immobilisierten Moenomycin A und *S. aureus* MtgA oder *E. coli* PBP1b hingegen erreichen keinen Fließgleichgewichtszustand. Stattdessen gehen die Sensorgramme nach einer anfänglichen exponentiellen Phase in eine Phase mit praktisch konstanter (und vergleichsweise geringer) Steigung über (s. Abbildung 66 a). Diese Komplexität der Sensorgramme wurde auch bei einem geringeren Immobilisierungslevel des Moenomycin A-Derivats (310 RU statt 720 RU) und selbst bei sehr niedrigen MtgA-Konzentrationen beobachtet (s. Abbildung 68). Trotz der längeren Injektionsdauer wurde auch hier kein Fließgleichgewichtszustand erreicht.

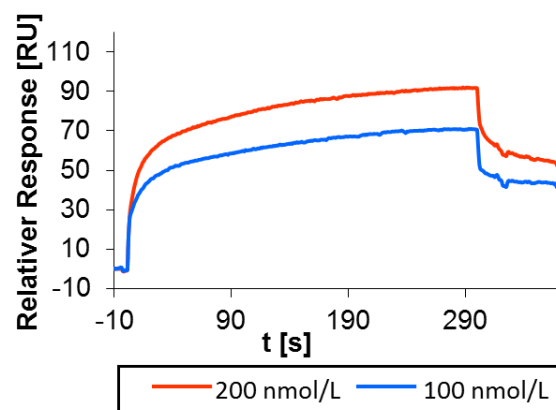


Abbildung 68: Komplexer Bindungsresponse bei niedrigen MtgA-Konzentrationen (Immobilisierungslevel 310 RU).²⁵

Bei MtgA-Konzentrationen $<5 \mu\text{M}$ trat keine unspezifische Bindung der PGT an eine unmodifizierte Sensorchipoberfläche auf. Daher ist anzunehmen, dass die Komplexität auf die Bildung von MtgA-Aggregaten auf der Chipoberfläche nach Erreichen einer kritischen Oberflächenkonzentration zurückzuführen ist. Ursache für die Aggregatbildung sollte die hydrophobe Region in der Kieferregion der MtgA (s. Abschnitt 2.4.2 u. Abbildung 10 b) sein.

²⁵ entnommen aus: Bury D, Dahmane I, Derouaux A, Dumbre S, Herdewijn P, Matagne A, Breukink E, Mueller-Seitz E, Petz M, Terrak M (2015) *Positive cooperativity between acceptor and donor sites of the peptidoglycan glycosyltransferase*. *Biochem Pharmacol* 93(2):141-150, Copyright (2014), abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Eine eindeutige quantitative Beschreibung der Interaktionskinetik ist aufgrund der Komplexität der Daten nicht möglich (s. hierzu Ausführungen in [239]). Da kein Fließgleichgewichtszustand erreicht wird und die gebildeten MtgA-Aggregate eine Verfälschung der Bindungslevel zur Folge hätten, ist auch eine Fließgleichgewichtsanalyse zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten nicht möglich. Der Assay ist dennoch geeignet, qualitative oder semiquantitative Aussagen über die Bindungsfähigkeit der PGT-Mutanten zu erhalten.

7.6.3 MtgA-Mutante mit modifizierter hydrophober Region

Untersuchungen der Interaktion zwischen PGT und dem natürlichen Substrat bzw. Inhibitoren werden durch die Lipophilie des Substrats einerseits und die hydrophoben Bereiche der Proteinoberfläche andererseits erschwert. So neigen selbst trunkierte PGT-Mutanten ohne Transmembranregion in Abwesenheit von Detergenzien zur Aggregation [124, 315]. Auch einige der in dieser Arbeit aufgetretenen Probleme (Abschnitt 7.4.5, 7.4.6 und 7.5.2) könnten auf den hydrophoben Charakter der MtgA zurückzuführen sein.

Ursache für das Verhalten der trunkierten Mutanten ist die hydrophobe Oberfläche der Kieferregion der GT-Domäne (s. Abschnitt 2.4.2 u. Abbildung 10 b). Modifikation der Seitenketten dieser Region könnte zu katalytisch aktiven Mutanten mit hydrophilerem Charakter führen. Austausch von drei in diesem Bereich liegenden Aminosäureresten (V154, L157, F158) gegen Threonin führte zwar zu katalytisch aktiven Mutanten, die allerdings wie der Wildtyp zur Aggregation neigten [124]. F110 könnte essentiell für die Aktivität des Enzyms sein [124], weshalb eine Modifikation dieses Rests nicht sinnvoll erschien. Es wurde versucht, zwei Einzelmutanten (F120S und F150S), eine Doppelmutante (L119N-F120S; „MtgA-NS“) und eine Mutante mit sechs Modifikationen (L112N, L119N, F120S, F150S, V154S, F158S; „MtgA-6M“) herzustellen (s. Fußnote 22 auf Seite 165). Lediglich die Mutanten F120S und MtgA-NS konnten in löslicher Form exprimiert werden. Bei Abwesenheit von Tensid bildete der MtgA-Wildtyp (MtgA-WT) erwartungsgemäß Aggregate, während die Mutante F120S teilweise als Monomer vorlag (Gelfiltration). MtgA-NS (2 mg/mL) hingegen lag vollständig als Monomer vor, dennoch war die Mutante im Stande, an

Ergebnisse und Diskussion

Lipidvesikel zu binden. Die Sekundärstruktur beider Mutanten wies keine signifikanten Unterschiede zu der des Wildtyps auf (Fern-UV-Circulardichroismus). Beide Mutanten waren enzymatisch inaktiv. Für weitere Details wird auf [317] verwiesen.

Es wurde geprüft, ob MtgA-NS analog den anderen untersuchten enzymatisch inaktiven PGT-Mutanten (s. Abschnitt 7.6.1) imstande ist, Moenomycin A zu binden. Dies würde auf eine intakte Donorbindungsstelle hindeuten. Erst bei sehr hohen Proteinkonzentrationen (17 μM und 40 μM) wurde eine Bindung von MtgA-NS an die Sensorchipoberfläche beobachtet (s. Abbildung 69).

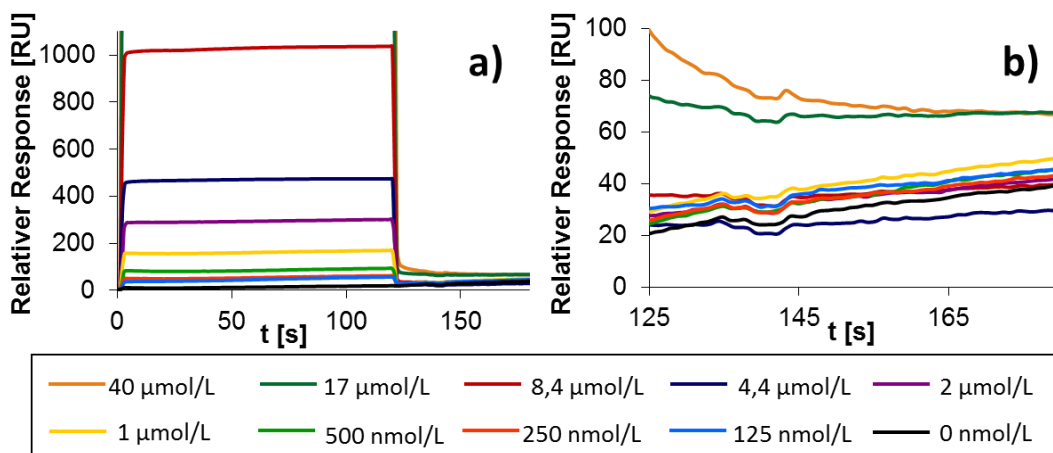


Abbildung 69: Sensorgramme von MtgA NS (in Teilabbildung b ist die Dissoziationsphase vergrößert dargestellt).²⁶

Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um eine unspezifische Bindung des Proteins an die Sensorchipoberfläche oder um eine spezifische, aber niedrigaffine Bindung handelte, wurde erneut eine MtgA-NS-Konzentrationsreihe gemessen, wobei die Messung zusätzlich auf einer unmodifizierten Flusszelle (Referenzzelle) erfolgte. Als Kontrolle wurde 400 nM MtgA-WT analysiert.

²⁶ entnommen aus: Bury D, Dahmane I, Derouaux A, Dumbre S, Herdewijn P, Matagne A, Breukink E, Mueller-Seitz E, Petz M, Terrak M (2015) *Positive cooperativity between acceptor and donor sites of the peptidoglycan glycosyltransferase*. *Biochem Pharmacol* 93(2):141-150, Copyright (2014), abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

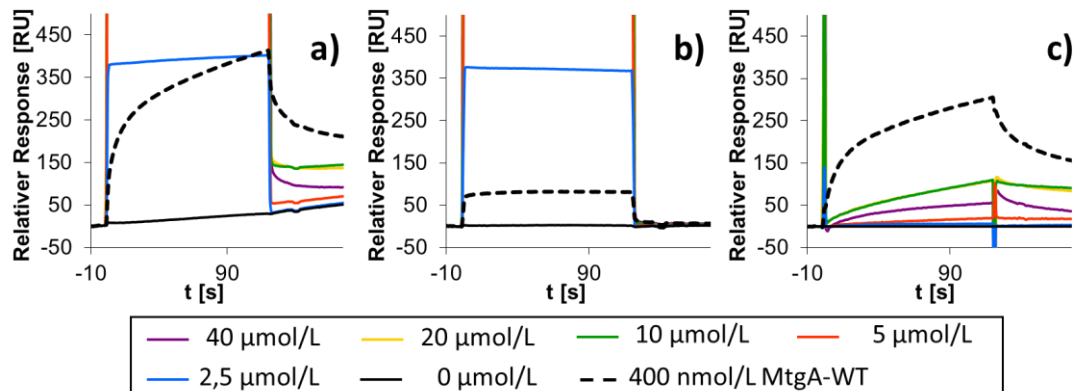


Abbildung 70 - Sensorgramme von MtgA-NS mit Double Referencing: a) Messungen auf der Reaktionszelle (Moenomycin A); b) Referenzzelle (unmodifiziert); c) doppelt referenzierte Daten.²⁷

Auf der Reaktionszelle (mit immobilisiertem Moenomycin A) binden sowohl MtgA-NS (ab 5 μM), als auch MtgA-WT (Abbildung 70 a). Auf der Referenzzelle ist hingegen für keins der beiden Proteine eine Bindung festzustellen (Abbildung 70 b). Somit bindet MtgA-NS nicht unspezifisch an die unmodifizierte Chipoberfläche. Die hohen Responses während der Injektion auf der Referenzzelle sind nur auf den Bulk-Effekt (s. Abschnitt 4.1.7) der injizierten Proteinlösungen zurückzuführen. Die Daten wurden zusätzlich mittels Double Referencing (s. Abschnitt 4.1.7) nachbearbeitet (Abbildung 70 c). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Bindungslevel für MtgA-NS keinem konzentrationsabhängigen Zusammenhang folgen, was dafür spricht, dass MtgA-NS unspezifisch an Moenomycin A bindet (z.B. über Wechselwirkungen hydrophober Bereiche des Proteins mit dem Moenocinolrest des Moenomycins).

Die beiden simultanen Mutationen L119N und F120S bei MtgA-NS führten zu einer monodispersen Mutante. Diese ist allerdings weder enzymatisch aktiv, noch imstande, Moenomycin A zu binden. Daher ist anzunehmen, dass die Hydrophobizität in dem entsprechenden Bereich der Kieferregion entweder für die korrekte Faltung dieser Region oder für die Bindung von Substrat und Moenomycin A bedeutsam ist.

²⁷ entnommen aus: Bury D, Dahmane I, Derouaux A, Dumbre S, Herdewijn P, Matagne A, Breukink E, Mueller-Seitz E, Petz M, Terrak M (2015) *Positive cooperativity between acceptor and donor sites of the peptidoglycan glycosyltransferase*. *Biochem Pharmacol* 93(2):141-150, Copyright (2014), abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Ergebnisse und Diskussion

Die Modifikationen betreffen die äußere Helix, die Teil der mobilen Region der PGT ist. Es wäre daher denkbar, dass MtgA nur in einer definierten Konformation dieser mobilen Region imstande ist, Moenomycin A bzw. das Donorsubstrat zu binden und dass die Modifikation die entsprechende, für die Bindung erforderliche Konformationsänderung behindert.

7.6.4 Zusammenfassung der Daten

Tabelle 11 fasst die Ergebnisse für alle untersuchten PGT (Wildtyp (WT) und Mutanten) zusammen.

Tabelle 11: Enzymatische Aktivität (bezogen auf den Wildtyp) und Fähigkeit zur spezifischen Moenomycin A-Bindung (++: dieselbe Größenordnung wie WT; +: vorhanden, aber deutlich schwächer als bei WT; -: keine spezifische Bindung) der untersuchten PGT

PGT	Enzymatische Aktivität	Moenomycin A-Bindung
<i>S. aureus</i> MtgA-WT	100%	++
<i>S. aureus</i> MtgA E100Q	0,2% ^a	++
<i>S. aureus</i> MtgA F104A	1% ^b	+
<i>S. aureus</i> MtgA-NS	0% ^b	-
<i>E. coli</i> PBP1b-WT	100%	++
<i>E. coli</i> PBP1b E233Q	0,2% ^c	++
<i>E. coli</i> PBP1b E234N	14% ^c	++
<i>E. coli</i> PBP1b H240A	0% ^c	++
<i>E. coli</i> PBP1b K247A	0% ^c	++
<i>E. coli</i> PBP1b E290Q	2% ^c	++

^a: Daten aus [87]

^b: Daten aus [317]

^c: Daten aus [89]

7.7 Charakterisierung von Glykosyltransferase-Inhibitoren

Stembera et al. [133, 278] demonstrierten bereits die Anwendbarkeit ihres SPR-Biosensor-Assays für die Identifizierung von Moenomycin-analogen Inhibitoren. Der in Abschnitt 7.4 beschriebene kompetitive Assay bedient sich desselben Prinzips. Beide machen sich die Wechselwirkung zwischen Moenomycin A und der Donorbindungsstelle einer PGT (*E. coli* PBP1b bei Stembera et al. und *S. aureus* MtgA bei dem hier vorgestellten Assay) zunutze. Auch einige weitere Assays, die auf dieser Wechselwirkung basieren, werden zum Screening auf PGT-Inhibitoren genutzt (s. Abschnitt 4.3).

Aufgrund seines Prinzips sollte der hier beschriebene Assay dazu geeignet sein, PGT-Inhibitoren zu identifizieren, die mit Moenomycin A um die Donorbindungsstelle konkurrieren (Abbildung 71 a; Details zur Methode in Abschnitt 9.20).

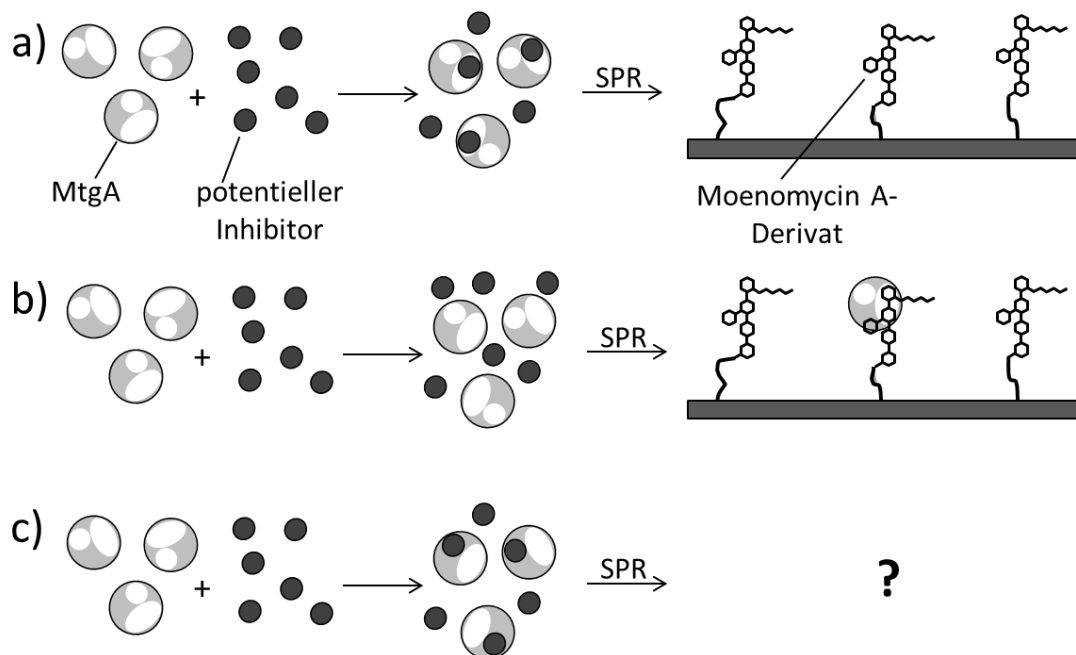


Abbildung 71: - Identifizierung von PGT-Inhibitoren (Akzeptorbindungsstelle als Kreis, Donorbindungsstelle als Oval dargestellt): a) Inhibitoren, die an die Donorbindungsstelle von *S. aureus* MtgA binden, hemmen die MtgA-Bindung an die Sensorchipoberfläche; b) Inhibitoren, die weder an die Donor-, noch an die Akzeptorbindungsstelle der MtgA binden, führen nicht zur Hemmung der MtgA-Bindung; c) Der Effekt von Inhibitoren, die nur an die Akzeptorbindungsstelle der MtgA binden, war nicht bekannt.

Ergebnisse und Diskussion

Inhibitoren, die über einen unspezifischen Mechanismus die Transglykosylierung hemmen (also an keine der beiden Bindungsstellen binden), sollten nicht mit der Wechselwirkung zwischen MtgA und Moenomycin A interagieren (Abbildung 71 b). Für Inhibitoren, die an die Akzeptorbindungsstelle binden (Abbildung 71 c), war anzunehmen, dass sie keinen Einfluss auf die MtgA-Bindung an die Chipoberfläche haben. Das Auftreten allosterischer Effekte war allerdings nicht auszuschließen, auch wenn diese bislang in der Literatur nicht beschrieben sind.

Aufgrund der in Abschnitt 7.6.2 diskutierten Komplexität der MtgA-Bindung sind auch für die untersuchten PGT-Inhibitoren nur qualitative oder semi-quantitative Aussagen möglich.

7.7.1 Einfluss von DMSO auf die Assayempfindlichkeit

Um Löslichkeitsprobleme mit den untersuchten hydrophoben Inhibitoren zu vermeiden, enthielt der Laufpuffer 10% Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO wird häufig bei *in vitro*-Assays der Glykosyltransferase-Aktivität von PGT als Lösungsvermittler für Lipid II verwendet. Als Resultat ist die Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zu Puffern ohne DMSO erhöht (Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit bei 5% DMSO; darüber hinaus bis 10% DMSO keine weitere Steigerung) [90]. Daher war nicht zu erwarten, dass DMSO sich nachteilig auf den SPR-Assay auswirkt. In Übereinstimmung mit dieser Erwartung führten unter den in Abschnitt 9.20 beschriebenen Bedingungen bereits 0,5 μM Moenomycin A zu einer deutlichen Hemmung (Abbildung 72). Der Assay weist demnach in Gegenwart von 10% DMSO eine vergleichbare Empfindlichkeit auf, wie in Abwesenheit von DMSO und ist deutlich empfindlicher, als der von Stembera et al. [133] beschriebene (s. Abschnitt 7.4.4).

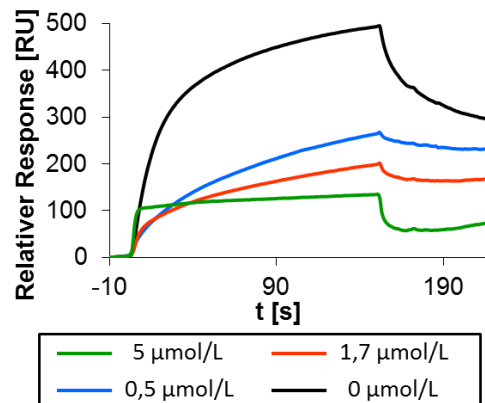


Abbildung 72: Sensorgramme von Moenomycin A-Lösungen (0; 0,5; 1,7; 5 μM).²⁸

7.7.2 Positive Kooperativität der Donor- und Akzeptorbindungsstelle

Der Undecaprenylrest von Lipid II und der der wachsenden Peptidoglykankette ist für die Substraterkennung von Bedeutung (s. Abschnitt 2.4.2). Bezüglich der Anforderungen an den Lipidrest unterscheiden sich die Donor- und die Akzeptorbindungsstelle. Die Akzeptorbindungsstelle bindet bereits Derivate mit einer Alkylkettenlänge von 10 Kohlenstoffen, für eine fortlaufende Synthese ist allerdings eine Alkylkettenlänge von 20 Kohlenstoffen erforderlich [129]. Aufgrund dieses Unterschiedes könnte die Entwicklung von Liganden der Akzeptorbindungsstelle mit kurzer Lipidkette einen vielversprechenden Ansatz für neue pharmakologische Leitstrukturen darstellen [135]. Die gezielte Untersuchung der Affinität von Lipid II und davon strukturell abgeleiteten Inhibitoren zur Donor- oder Akzeptorbindungsstelle der PGT wird jedoch dadurch erschwert, dass Lipid II an beide Bindungsstellen binden kann. Dumbre et al. [135] synthetisierten eine Reihe von Lipid I- und Lipid II-Analoga, die *in vitro* die Peptidoglykansynthese hemmen und beurteilten den Einfluss der verschiedenen funktionellen Gruppen auf das Ausmaß der Hemmung. Wegen der Ähnlichkeit zu Lipid II nahmen die Autoren an, dass die Disaccharidderivate sowohl

²⁸ entnommen aus: Bury D, Dahmane I, Derouaux A, Dumbre S, Herdewijn P, Matagne A, Breukink E, Mueller-Seitz E, Petz M, Terrak M (2015) *Positive cooperativity between acceptor and donor sites of the peptidoglycan glycosyltransferase*. *Biochem Pharmacol* 93(2):141-150, Copyright (2014), abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Ergebnisse und Diskussion

an die Donor- als auch an die Akzeptorbindungsstelle binden können. Bezüglich der Monosaccharidderivate wurde keine Vermutung angestellt. Die durchgeführten Untersuchungen ermöglichten allerdings keine differenzierte Betrachtung der Wirkungsweise. Der hier verwendete Assay erlaubt es hingegen, gezielt die Bindung von Inhibitoren an die Donorbindungsstelle der PGT zu untersuchen. Daher wurde er dazu genutzt, einige von Dumbre et al. synthetisierte Inhibitoren zu untersuchen.

Die hier verwendete *S. aureus* MtgA verfügt nicht über die Transmembranhelix. Wie in Abschnitt 2.4.2 erwähnt, ist diese für die Substratbindung bedeutsam. Die Deletion der Transmembranregion hat allerdings keinen Einfluss auf die Proteinstruktur [124]. Da bei der Untersuchung der Lipid I- und Lipid II-Analoga das Augenmerk auf den polaren Regionen (Zuckerreste, Peptidseitenkette, Phosphat- oder Phosphoglyceratbrücke) der Inhibitoren lag, war das verwendete Konstrukt somit besser geeignet, als das Volllängenprotein.

In Abbildung 73 sind die untersuchten Inhibitoren dargestellt.²⁹ Zwecks einfacher Vergleichbarkeit wurde die Benennung von Dumbre et al. beibehalten.

²⁹ Die Lipid I- und Lipid II-Analoga wurden von Dr. Shrinivas Dumbre im Labor von Professor Dr. Piet Herdewijn (Laboratory of Medicinal Chemistry, Rega Institute for Medical Research, Universität Leuven, Belgien) hergestellt (Synthese beschrieben in [135]) und freundlicherweise im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Mohammed Terrak (Centre d'Ingénierie des Protéines der Universität Liège; Belgien) zur Verfügung gestellt.

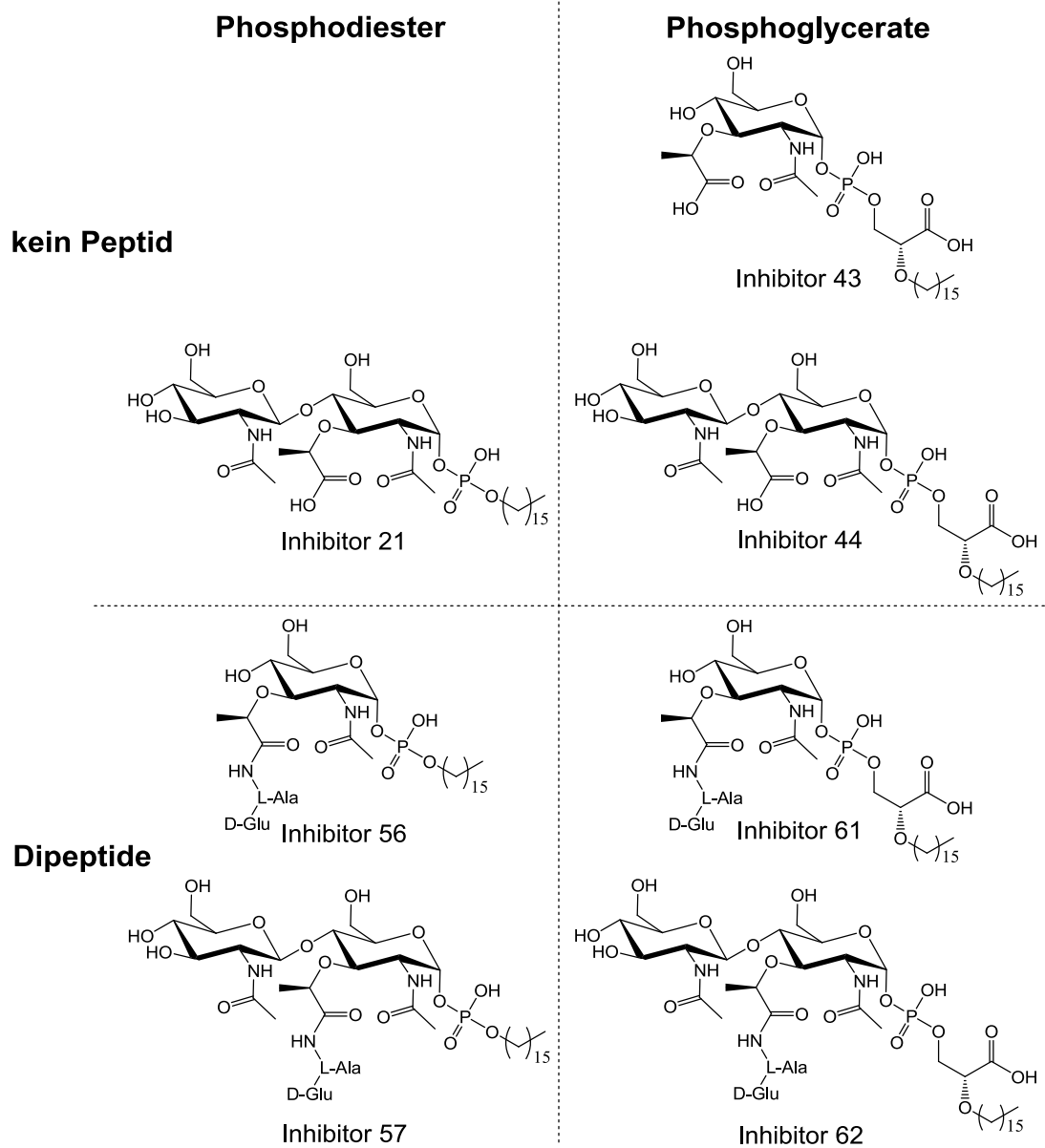


Abbildung 73: Strukturformeln der untersuchten Lipid I- und Lipid II-Analoga aus Dumbre et al. [135].

Von jeder Substanz wurde eine Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 3; Konzentrationsspannen s. Abschnitt 9.20) hergestellt und in randomisierter Reihenfolge doppelt gemessen. Die Berechnung der Bindungslevel erfolgte in gleicher Weise, wie beim kompetitiven Flavophospholipol-Assay (s. Abschnitt 7.4.2).

Ergebnisse und Diskussion

Bei hohen Konzentrationen führten alle sieben Inhibitoren zu verringerter MtgA-Bindung. Folglich sind alle sieben Substanzen imstande, die Donorbindungsstelle der PGT zu besetzen. Interessanterweise wurden bei den Disaccharidderivaten Inhibitor 21, 44 und 62 bei Konzentrationen unterhalb von ca. 50 μM höhere MtgA-Bindungslevel beobachtet, als in Abwesenheit des Inhibitors (s. Abbildung 74 a). Das vierte Disaccharidderivat (Inhibitor 57) könnte sich in gleicher Weise verhalten, der Effekt war hier aber weniger stark ausgeprägt (s. Abbildung 74 c).

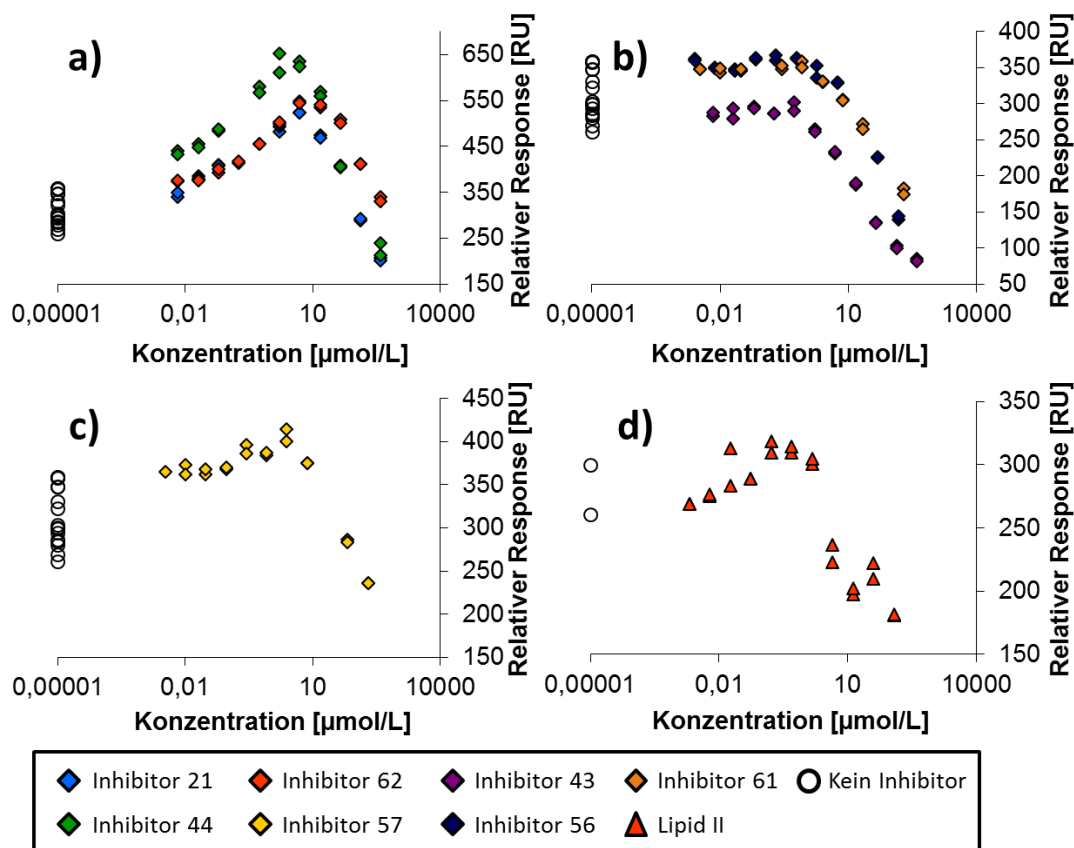


Abbildung 74 - MtgA-Bindungslevel in Gegenwart der Lipid I- und Lipid II-Inhibitoren oder von Lipid II: a) Disaccharidderivat Inhibitor 21, 44 und 62; b) Monosaccharidderivat Inhibitor 43, 56 und 61; c) Disaccharidderivat Inhibitor 57; d) Lipid II.³⁰

³⁰ entnommen aus: Bury D, Dahmane I, Derouaux A, Dumbre S, Herdewijn P, Matagne A, Breukink E, Mueller-Seitz E, Petz M, Terrak M (2015) *Positive cooperativity between acceptor and donor sites of the peptidoglycan glycosyltransferase*. *Biochem Pharmacol* 93(2):141-150, Copyright (2014), abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Bei den Monosaccharidderivaten (Inhibitor 43, 56 und 61) war dieser Effekt nicht zu beobachten (s. Abbildung 74 b).

Sechs *S. aureus* MtgA-Mutanten (E100Q, F104A, sowie vier weitere Mutanten³¹) wurden in Gegenwart von unterschiedlichen Konzentrationen des Disaccharidderivats Inhibitor 21 (0 μ M; 0,5 μ M; 1,7 μ M; 5 μ M) analysiert. Bei allen sechs Mutanten wurden bei 5 μ M des Inhibitors (in unterschiedlich starkem Maße) ebenfalls erhöhte Bindungslevel gemessen.

Prinzipiell könnten erhöhte Bindungslevel durch unspezifische Bindung der Disaccharidderivate an die Sensorchipoberfläche zustande kommen. Dies würde allerdings, trotz möglicherweise gleichzeitig auftretender Hemmung der MtgA-Bindung, nicht die geringen Bindungslevel bei hohen Inhibitorkonzentrationen erklären. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Disaccharidderivate zum MtgA-Substrat Lipid II ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Inhibitoren nicht nur an die Donor- sondern auch an die Akzeptorbindungsstelle des Enzyms binden können. Bindung der Inhibitoren an die Akzeptorbindungsstelle könnte zur heteroallosterischen Aktivierung führen, wodurch die Affinität der Donorbindungsstelle zu Moenomycin A erhöht würde. Dies hätte erhöhte MtgA-Bindungslevel zur Folge. Gleichzeitig führt die Konkurrenz mit Moenomycin A um die Donorbindungsstellen zu einer Verringerung der Bindungslevel. Der beobachtete Effekt auf die MtgA-Bindungslevel ließe sich dadurch erklären, dass bei niedrigen Inhibitorkonzentrationen der postulierte Effekt der allosterischen Aktivierung überwiegt, während bei hohen Konzentrationen der Effekt der Konkurrenz überwiegt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ebenfalls das MtgA-Substrat selbst (Lipid II; s. Abbildung 75) analysiert.³² Um eine Polymerisation zu verhindern, wurde dem Laufpuffer EDTA zugesetzt (*S. aureus* MtgA benötigt zweiwertige Kationen für die Katalyse [87]). Bei hohen Konzentrationen war auch für das Substrat Hemmung der MtgA-Bindung festzustellen. Allerdings wiesen die Messwerte insgesamt eine sehr starke Streuung auf (s. Abbildung 74 d), weshalb keine klare Aussage bezüglich einer möglichen allosterischen Aktivierung getroffen werden konnte. Ursache für die

³¹ Gegenstand laufender Forschung des Projektpartners und daher nicht benannt.

³² Lipid II wurde freundlicherweise von Dr. Eefjan Breukink (Membrane Biochemistry and Biophysics, Universität Utrecht, Niederlande) zur Verfügung gestellt (Synthese beschrieben in [318]).

Ergebnisse und Diskussion

Streuung der Messwerte war vermutlich die schlechte Löslichkeit des Substrats, das über einen Lipidrest mit 55 Kohlenstoffatomen verfügt. Es wurde versucht, die Löslichkeit durch einen höheren DMSO-Gehalt (20%) zu verbessern. Der hieraus resultierende Brechungsindex des Laufpuffers führte allerdings zu SPR-Winkeln außerhalb des Messbereichs des verwendeten SPR-Biosensors.

Daneben könnte auch eine Komplexbildung des immobilisierten Moenomycin A mit dem im Laufpuffer enthaltenen EDTA (s. Abschnitt 2.2) mit zur schlechten Reproduzierbarkeit der Daten beigetragen haben. Aufgrund der konstanten EDTA-Konzentration im Laufpuffer ist es aber eher wahrscheinlich, dass ein konstanter Teil des immobilisierten Moenomycins im Komplex vorlag.

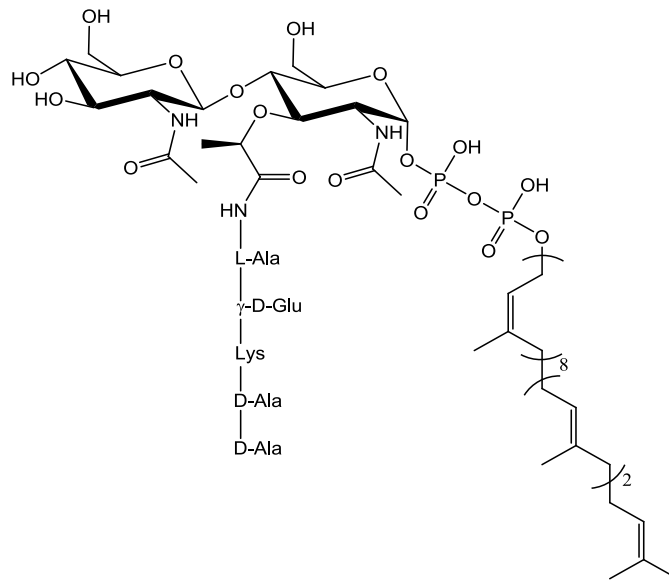


Abbildung 75: Struktur des verwendeten Lipid II aus *Staphylococcus simulans*.

Da sich im Falle der postulierten allosterischen Aktivierung die Affinität zu Moenomycin A (i.e. K_D) geändert hätte, müsste sich auch die Assoziations- und/oder Dissoziationsratenkonstante des Moenomycin-MtgA-Komplexes geändert haben (wegen $K_D = k_d/k_a$). Abbildung 76 zeigt die Sensorgramme für Inhibitor 62 im Konzentrationsbereich um das Maximum der MtgA-Bindung. Für 4,9 μM des Inhibitors wurde der maximale MtgA-Bindungslevel gemessen. Sowohl mit

Ergebnisse und Diskussion

steigender, als auch mit sinkender Konzentration des Inhibitors wurden niedrigere MtgA-Bindungslevel gemessen.

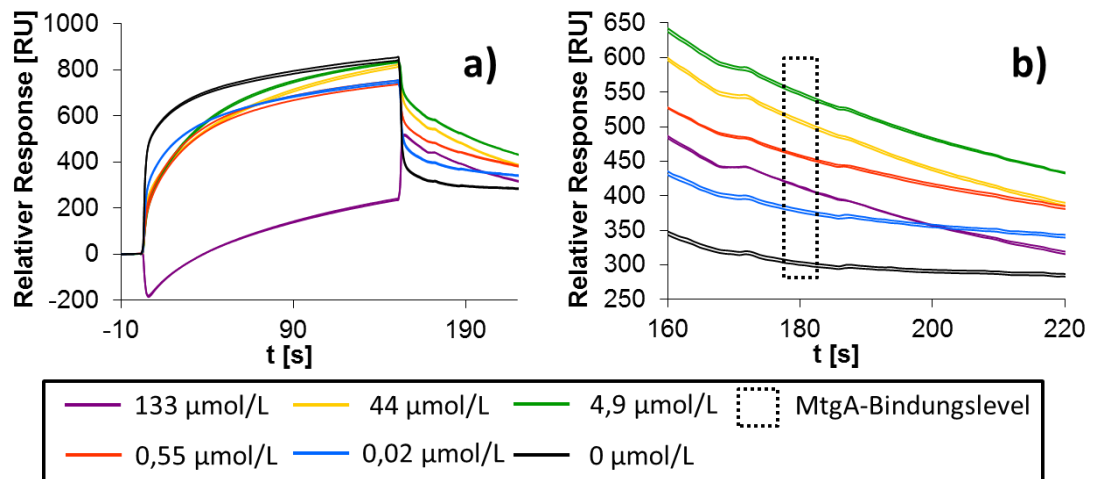


Abbildung 76 - Sensorgramme von 0,02 µM bis 133 µM Inhibitor 62 (n = 2): a) vollständiges Sensorgramm; b) Vergrößerte Darstellung der Dissoziationsphase (der gestrichelte Rahmen markiert das Zeitfenster, in dem der MtgA-Bindungslevel gemessen wird). Sprunghafter Signalabfall zu Beginn der Injektion und -anstieg zum Ende der Injektion bei 133 µM bedingt durch einen geringfügigen Unterschied im DMSO-Gehalt zwischen injizierter Lösung und Laufpuffer.³³

Die Dissoziation der Komplexe aus MtgA und Moenomycin A folgt einer Kinetik erster Ordnung (s. Gleichung 4.11 auf Seite 58). Käme es nicht zur allosterischen Aktivierung wäre die Dissoziationsratenkonstante k_d für alle Konzentrationen gleich und gemäß Gleichung 4.11 wäre die Dissoziationsrate nur von der Konzentration der Komplexe aus MtgA und Moenomycin abhängig. Das Sensorgramm für den höchsten MtgA-Bindungslevel (4,9 µM) müsste demnach die steilste Steigung aufweisen. Im Widerspruch hierzu fällt aber bei den beiden höchsten Inhibitorkonzentrationen das Signal am schnellsten ab (s. Abbildung 76 b; besonders deutlich nach 180 s), was für eine Änderung von k_d und somit für eine allosterische Aktivierung spricht.

³³ entnommen aus: Bury D, Dahmane I, Derouaux A, Dumbre S, Herdewijn P, Matagne A, Breukink E, Mueller-Seitz E, Petz M, Terrak M (2015) *Positive cooperativity between acceptor and donor sites of the peptidoglycan glycosyltransferase*. *Biochem Pharmacol* 93(2):141-150, Copyright (2014), abgedruckt mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Ergebnisse und Diskussion

Es wird angenommen, dass die flexible Region in der Kieferregion der PGT, die die beiden Bindungsstellen voneinander trennt, die Translokation des Syntheseprodukts in die Donorbindungsstelle begünstigt (s. Abschnitt 2.4.2). Demnach würde die GT-Domäne zwei verschiedene Konformationen einnehmen. In der „geschlossenen“ Konformation wäre die Translokation des Produkts nicht möglich. Diese Konformation könnte für die Katalyse erforderlich sein und auch eine höhere Affinität zu den Substraten haben. Für die Translokation würde entsprechend eine zweite, offene oder weniger geordnete Konformation eingenommen, die die Translokation ermöglicht, aber vermutlich in geringeren Affinitäten zu den Substraten resultiert. Eine von Lovering et al. [122] bei *S. aureus* PBP2 identifizierte β -Haarnadelschleife, die C-terminal an die äußere Helix angrenzt, wurde in vielen anderen Kristallstrukturen von PGT nicht nachgewiesen. Stattdessen war dieser Bereich unstrukturiert. Außerdem nimmt die äußere Helix in den Kristallstrukturen von Komplexen verschiedener PGT mit Moenomycin A eine identische räumliche Orientierung ein, während sie in Kristallstrukturen derselben PGT in der Apof orm unterschiedlich orientiert ist [85]. Beides spricht für die Existenz einer offenen oder ungeordneten Konformation. Äußere und innere Helix der Kieferregion bilden einen Teil des hydrophoben Kanals, in dem der Lipidrest von Moenomycin A und der wachsenden Peptidoglykankette gebunden wird. Somit sollte die Konformation der äußeren Helix Einfluss auf die Stärke der Substratbindung haben. In dem bei Lovering et al. [122] formulierten Bindungsmodell geht das in der Akzeptorbindungsstelle gebundene Lipid II Wechselwirkungen mit der β -Haarnadelschleife der flexiblen Region ein, die an die äußere Helix angrenzt. Außerdem zeigt die Kristallstruktur von *S. aureus* MtgA mit einem Lipid II-Analogon in der Akzeptorbindungsstelle Wechselwirkungen eines Argininrests der äußeren Helix (R117) mit dem Pyrophosphatrest und dem Sauerstoff der glykosidischen Bindung zwischen MurNAc und GlcNAc von Lipid II [85]. Daher ist es plausibel, dass die Substratbindung in der Akzeptorbindungsstelle zur Einnahme einer definierten Konformation der äußeren Helix führt und diese sich wiederum auf die Affinität zur wachsenden Peptidoglykankette auswirkt. Moenomycin A imitiert die wachsende Peptidoglykankette und bildet Kontakte zu einigen konservierten Resten der GT-Domäne aus, die bedeutsam für die enzymatische Aktivität sind (s. Abschnitt 2.4.2). Daher ist es plausibel, dass eine allosterische Aktivierung, die zu

Ergebnisse und Diskussion

einer erhöhten Affinität der Donorbindungsstelle zur wachsenden Peptidoglykankette führt, auch die Affinität zu Moenomycin A erhöht. Die postulierte Kooperativität der beiden Bindungsstellen ist demnach in Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen und Hypothesen zur Bedeutung der flexiblen Region der GT-Domäne von PGT. Die postulierte Kooperativität könnte auch während der Initiationsphase der Peptidoglykansynthese biologisch relevant sein. Die bevorzugte Bindung von Lipid II an die Donorbindungsstelle von MtgA-Molekülen, die bereits ein weiteres Molekül Lipid II in der Akzeptorbindungsstelle gebunden haben (oder umgekehrt), könnte sich in einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit äußern, da weniger unproduktive Komplexe aus PGT und nur einem Molekül Lipid II gebildet würden.

Die vorgestellten Ergebnisse stellen den ersten Hinweis auf eine Kooperativität zwischen der Donor- und der Akzeptorbindungsstelle von PGT dar. Ein konzentrationsabhängiger Effekt von Lipid II-analogen Inhibitoren auf die MtgA-Bindung konnte gezeigt werden. Die Strukturanalogie der Inhibitoren zu Lipid II und die bisher erhaltenen Daten lassen dasselbe Verhalten für Lipid II erwarten. Bedingt durch Löslichkeitsprobleme konnte jedoch keine gründliche Analyse des Effekts von Lipid II erfolgen. Hier sind alternative Ansätze erforderlich, um die Wechselwirkung zwischen MtgA (und ggf. weiteren PGT) und dem Substrat zu untersuchen. Die Verstärkung der MtgA-Bindung an Moenomycin A, das die wachsende Peptidoglykankette imitiert, wurde hier demonstriert. Um biologisch relevant zu sein, müsste diese Verstärkung auch für die Bindung an die wachsende Peptidoglykankette selbst erfolgen. Weitere Untersuchungen mittels SPR auf einem Biosensorchip mit darauf immobilisiertem Lipid IV (erstes Polymerisationsprodukt von Lipid II) anstelle des Moenomycins wären dazu geeignet, dies zu überprüfen.

Ergebnisse und Diskussion

7.7.3 Einfluss der Substituenten substratanaloger Inhibitoren

Im Folgenden wird unter Annahme der im vorangegangenen Abschnitt diskutierten Kooperativität der Einfluss der Strukturelemente der untersuchten Inhibitoren auf die Affinität zur Akzeptorbindungsstelle diskutiert.

Während die Monosaccharidderivate ausschließlich eine Hemmung der MtgA-Bindung bewirkten, zeigten die Disaccharidderivate eine deutliche (Inhibitoren 21, 44 und 62) bzw. rudimentäre (Inhibitor 57) Verstärkung der MtgA-Bindung. Die Disaccharidgruppe GlcNAc-MurNAc ist demnach für die Affinität zur Akzeptorbindungsstelle essentiell. Diese Beobachtung deckt sich mit dem Umstand, dass die GlcNAc-Gruppe von Lipid II Wechselwirkungen mit mehreren, z.T. konservierten Aminosäureresten in der Akzeptorbindungsstelle eingeht (s. Abbildung 11). Durch die Kristallstruktur von *S. aureus* MtgA im Komplex mit einem Lipid II-Analogon mit dem Disaccharid-Baustein GalNAc-MurNAc ist außerdem bekannt, dass die Akzeptorbindungsstelle auch die axiale Position der 4-Hydroxyfunktion am nichtreduzierenden Ende akzeptiert [85].

Die Disaccharidderivate Inhibitor 21 und 57 unterscheiden sich dadurch, dass Inhibitor 57 im Gegensatz zu Inhibitor 21 über die Dipeptidseitenkette L-Ala-D-Glu verfügt. Inhibitor 21 führt zu einer deutlichen Verstärkung der MtgA-Bindung, während der Effekt bei Inhibitor 57 weit weniger stark ausgeprägt ist. Das deutet darauf hin, dass die Peptidseitenkette ungünstig für die Bindung in der Akzeptorbindungsstelle ist. Inhibitor 21 ist außerdem ein wirksamerer Inhibitor der Transglykosylierungsreaktion *in vitro* als Inhibitor 57 (s. Tabelle 12) [135]. Nach dem gängigen Bindungsmodell sind die Peptidseitenketten der Substrate aus dem aktiven Zentrum des Enzyms in Richtung Lösung orientiert [85, 122, 123, 126, 135]. In Einklang damit ist für die Substraterkennung zwar die Lactylethergruppe erforderlich und geht Wechselwirkungen mit einem Lysinrest in der Akzeptorbindungsstelle der MtgA ein. Die Peptidseitenkette hingegen ist nicht essentiell für die Substraterkennung und Kontakte zum Enzym wurden nicht beobachtet (s. Abschnitt 2.4.2).

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 12: Ausmaß der Enzymhemmung (Restaktivität der PGT in Gegenwart von 500 μ M Inhibitor und Hemmkonstante K_i ; Daten aus [135]) und Verstärkung der MtgA-Bindung (++: sehr stark; +: stark; (+): schwach; -: keine Verstärkung) durch die Lipid I- und Lipid II-Analoga

Inhibitor	21	43	44	56	57	61	62
Restaktivität	7%	3,5%	2,3%	43%	16%	15%	1,7%
K_i [μM]	26 \pm 6	21 \pm 9	32,7 \pm 5	n.b. ^e	48 \pm 11	46 \pm 7,5	17,6 \pm 2
PD/PG^a	PD	PG	PG	PD	PD	PG	PG
Dipeptid^b	-	-	-	+	+	+	+
Saccharid^c	D	M	D	M	D	M	D
Verstärkung^d	+	-	++	-	(+)	-	+

^a: Phosphodiester (PD) oder Phosphoglycerat (PG)

^b: Dipeptidseitenkette vorhanden (+) oder nicht (-)

^c: Monosaccharid (M) oder Disaccharid (D)

^d: Verstärkung der MtgA-Bindung

^e: n.b. = nicht bestimmt

Die Phosphoglycerate erwiesen sich bei Dumbre et al. im Vergleich zu den Phosphodiestern als die besseren Inhibitoren (s. Tabelle 12). Ursache hierfür sind die stärkeren Wechselwirkungen der zweifach negativ geladenen Phosphoglyceratgruppe mit den positiv geladenen Oberflächen in beiden Bindungsstellen (s. Abschnitt 2.4.2). Inhibitor 57 und 62 sind Disaccharidderivate mit Dipeptidseitenkette, wobei Inhibitor 57 über eine Phosphodiester-Brücke und Inhibitor 62 über eine Phosphoglyceratgruppe (wie bei den Moenomycinen) verfügt. Wie bereits erwähnt, bewirkt Inhibitor 57 allenfalls eine schwache Verstärkung der MtgA-Bindung. Inhibitor 62 hingegen führt zu einer vergleichbaren Verstärkung, wie Inhibitor 21. Die höhere negative Ladung der Phosphoglyceratgruppe ist folglich für die Bindung an die Akzeptorbindungsstelle relevant. Das genannte Beispiel zeigt, dass der Effekt der höheren negativen Ladung den nachteiligen Einfluss der Peptidseitenkette auf die Affinität zur Akzeptorbindungsstelle aufwiegt. Inhibitor 44 wiederum führte zur größten Verstärkung der MtgA-Bindung, was die Bedeutung von Peptidseitenkette und Phosphoglyceratgruppe auf die Affinität zur Akzeptorbindungsstelle unterstreicht.

Ergebnisse und Diskussion

Wie bereits erwähnt, bewirkte keins der Monosaccharidderivate eine Verstärkung der MtgA-Bindung. Die Affinität dieser Inhibitoren zur Akzeptorbindungsstelle scheint somit gering zu sein. Dennoch zeigte das Monosaccharidderivat Inhibitor 43 vergleichbare Aktivität *in vitro*, wie das strukturanaloge Disaccharidderivat Inhibitor 44 und wie der wirksamste Inhibitor 62 (s. Tabelle 12). Inhibitor 43 scheint daher eine niedrige Affinität zur Akzeptor- aber eine hohe Affinität zur Donorbindungsstelle zu haben.

Cokristallisation von MtgA mit Inhibitor 43 einerseits und Inhibitor 44 andererseits und Röntgenstrukturanalyse der Kristalle sollte dazu geeignet sein, die Struktur-Wirkungsbeziehungen näher zu beleuchten und wertvolle Hinweise für die Entwicklung neuer Inhibitoren zu liefern.

8 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein kompetitiver SPR-Biosensor-Assay (Inhibitions-Assay) zum empfindlichen Nachweis von Antibiotika der Moenomycin-Gruppe entwickelt.

Der verwendete Biosensor basiert auf dem Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz (SPR). Als spezifischer Bindungspartner der Moenomyeine dient eine trunkierte monofunktionelle Peptidoglykan-Glykosyltransferase (MtgA aus *Staphylococcus aureus*) ohne Transmembranregion.³⁴ Es wird ein bereits von Stembera et al. [133, 278] beschriebener Biosensorchip verwendet, auf dessen Oberfläche ein Derivat von Moenomycin A, dem Hauptkongener in Flavophospholipol, kovalent immobilisiert ist. Die zu untersuchende Probe wird mit MtgA gemischt und analysiert. MtgA bindet an das immobilisierte Moenomycin-Derivat und die resultierende Massenänderung an der Chipoberfläche wird mittels SPR detektiert. In der Probe enthaltene Moenomyeine belegen die Bindungsstellen der MtgA und verhindern so deren Bindung an das immobilisierte Moenomycin-Derivat. Das Messsignal ist folglich reziprok proportional zur Moenomycin-Konzentration. Die Sensorchipoberfläche wird am Ende jedes Analysenzyklus durch Ablösung der MtgA mit Natriumdodecylsulfat regeneriert.

Für die Synthese des zur Immobilisierung verwendeten Moenomycin-Derivats wurde Moenomycin A benötigt. Dieses ist weder kommerziell erhältlich, noch sind Verfahren beschrieben, die eine Isolierung aus Flavophospholipol in hoher Reinheit und Ausbeute mit vertretbarem Material- und Zeitaufwand erlauben. Es wurde ein Verfahren entwickelt, das eine Isolierung von Moenomycin A aus kommerziell erhältlichem Flavophospholipol (Flavomycin®) mit einer Reinheit von >99% (HPLC-UV) und >70% Ausbeute erlaubte.

Die Isolierung von Moenomycin A gelang mittels semi-präparativer HPLC an einer C18-Phase mit einem Phosphatpuffer/Acetonitril-Gemisch als Eluent bei pH 2,3. Die

³⁴ Peptidoglykan-Glykosyltransferasen (PGT) lassen sich in monofunktionelle Glykosyltransferasen (MGT) und Penicillin-Bindeproteine (PBP) unterteilen.

Zusammenfassung und Ausblick

enthaltenen Puffersalze wurden mittels SPE an einer Styrol-Divinylbenzol-Copolymerphase entfernt. Nach Abdestillieren des bei der Elution verwendeten Acetons wurde das reine Moenomycin A durch Lyophilisation erhalten. Zur Reinheitskontrolle der HPLC- und SPE-Fractionen wurde analytische HPLC an einer C18-Phase mit Ammoniumhydrogencarbonatpuffer/Acetonitril als Eluent bei pH 8,0 angewendet. Das bei der präparativen Trennung kritische Peakpaar (Moenomycin A und A₁₂) ist im Basischen besser aufgelöst.

Bei der Charakterisierung des verwendeten Flavophospholipols mittels LC-HRMS wurden neben den bereits in der Literatur beschriebenen Bestandteilen von Flavomycin[®] die beiden Nosokomycine B₂ und D tentativ identifiziert. Diese Antibiotika der Moenomycin-Gruppe wurden bislang nur durch heterologe Expression gewonnen [42-45], nicht aber als Produkt der Streptomyceten beschrieben, die zur Flavophospholipol-Produktion verwendet werden.

Die als Mastförderer eingesetzten Moenomycine (Flavophospholipol), deren Verwendung in der EU verboten ist, bilden keine Rückstände in tierischen Geweben, Eiern oder Milch. Daher werden spezifische Verfahren zum Screening in Futtermitteln benötigt.

Ein von Stembera et al. [133, 278] beschriebener Assay mit *Escherichia coli* PBP1b als biomolekularem Erkennungspartner war nicht empfindlich genug, um in Futtermitteln relevante Moenomycin-Gehalte ($\geq 1 \mu\text{g/mL}$ Flavophospholipol; $\cong 0,4 \mu\text{g/mL}$ Moenomycine) nachzuweisen. Stembera et al. berichten, dass bei $100 \mu\text{M}$ ($158 \mu\text{g/mL}$) Moenomycin A, nicht aber bei $10 \mu\text{M}$ ($15,8 \mu\text{g/mL}$) Hemmung der Enzymbindung auftrat. In Übereinstimmung damit konnten unter vergleichbaren Bedingungen Flavophospholipol-Gehalte ab ca. $100 \mu\text{g/mL}$ ($\cong 40 \mu\text{g/mL}$ Moenomycine) nachgewiesen werden. Mit der in dem hier beschriebenen Assay verwendeten Kombination aus PGT (MtgA) und Tensid konnte hingegen die erforderliche Empfindlichkeit erreicht werden, sodass $1 \mu\text{g/mL}$ Flavophospholipol bzw. $0,5 \mu\text{M}$ Moenomycin A ($0,79 \mu\text{g/mL}$) nachgewiesen werden konnten.

PGT neigen in Abwesenheit von Tensiden zur Aggregation, was den Einsatz von Tensiden im Laufpuffer erforderlich machte. Stembera et al. verwendeten zu diesem

Zusammenfassung und Ausblick

Zweck Triton X-100. Als alternatives Tensid wurde CHAPS anstelle von Triton X-100 ausgewählt, da es eine hohe kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) hat und zur Verminderung der Polydispersität von PGT geeignet ist. Mit *S. aureus* MtgA als Erkennungspartner wurde so die erforderliche Empfindlichkeit erreicht. Mit *E. coli* PBP1b konnte eine Steigerung der Empfindlichkeit um mehr als den Faktor 2,5 gegenüber dem Assay mit Triton X-100 erreicht werden. Allerdings streuten die Messwerte für die PGT-Bindung bei niedrigen Flavophospholipol-Konzentrationen. Als Ursache hierfür wird das Aggregationsverhalten des Enzyms (PBP1b) angenommen, das im Gegensatz zu MtgA über die Transmembranhelix verfügt.

Die Robustheit des Assays ist zufriedenstellend. Über einen Zeitraum von 4 Monaten (272 Zyklen) kam es nicht zu einer Abnahme der MtgA-Bindungsfähigkeit der Chipoberfläche. Wiederholte Regeneration und Lagerung des getrockneten Chips zwischen den Analysen bei 6 °C führten demnach nicht zu einer Schädigung der Chipoberfläche. Bei Lagerung der MtgA-Stammlösungen in Laufpuffer bei 6 °C wurde keine merkliche Abnahme der MtgA-Bindungsfähigkeit beobachtet. Während der Analysen hingegen war eine leichte Abnahme der MtgA-Bindung festzustellen, die durch Messung der Kalibration zu Beginn und zum Ende der Analysenserie kompensiert wurde. Ursache hierfür können Aggregation des Enzyms oder eine Adsorption an Gefäßwänden aufgrund hydrophober Oberflächenbereiche der MtgA sein.

In einer Pilotstudie wurde die Eignung des SPR-Biosensor-Assays für die Futtermittelanalytik geprüft.

Flavophospholipol-haltige Realproben aus der amtlichen Überwachung standen nicht zur Verfügung. Daher wurden drei kommerziell erhältliche Futtermittel mit einem außerhalb der EU erhältlichen Flavophospholipol-Premix gemischt. Die Futtermittel wurden in den jeweils für die vorgesehenen Tierarten minimal und maximal praxisüblichen Konzentrationen mit Flavophospholipol dotiert.

Die Analyse der Futtermittelproben erfolgte nach Extraktion mit Methanol per ASE (Accelerated Solvent Extraction) bei 120 bar und 100 °C und anschließender Matrixabreicherung mittels Festphasenextraktion (SPE) in Anlehnung an eine in der

Zusammenfassung und Ausblick

amtlichen Futtermittelüberwachung angewendete LC-MS/MS-Methode (nicht publiziert).

Die methanolischen Extrakte enthielten störende Fette und weitere lipophile Begleitstoffe (z.B. unpolare Proteine). Daher wurde bei der anschließenden Matrixabtrennung per SPE (*N*-Vinylpyrrolidon/Divinylbenzol-Copolymer-Phase) in Anlehnung an Pérez et al. [201] mit einer Sequenz aus organischen Lösungsmittelgemischen steigender Polarität gewaschen, bevor die Moenomycine mit Methanol eluiert wurden.

Bei zwei der untersuchten Futtermittel (Ferkelaufzuchtfutter und Rindermastfutter) war eine korrekte Unterscheidung zwischen positiven und negativen Proben möglich und für keines der untersuchten Futtermittel wurden dotierte Proben falsch negativ bewertet. Für das Ferkelaufzuchtfutter und das Rindermastfutter wurde die Wiederfindung mit der eines parallel angewendeten LC-HRMS-Verfahrens verglichen. Mit beiden Verfahren wurde der Gehalt an Flavophospholipol unterbestimmt, wobei die Wiederfindungen des SPR-Verfahrens höher waren. Beim dritten Futtermittel (Legehennenfutter) führten allerdings beim SPR-Assay Matrixeffekte zu starker Hemmung der MtgA-Bindung, weshalb die undotierte Probe falsch positiv bewertet wurde. Mittels LC-HRMS war hingegen eine korrekte Unterscheidung der dotierten und undotierten Proben auch in dieser Matrix möglich. Mittels LC-MS ist außerdem ein paralleles Screening mehrerer Analyten möglich. Daher ist der hier vorgestellte SPR-Biosensor-Assay gegenüber der LC-MS für das Screening von Futtermitteln auf Flavophospholipol nicht konkurrenzfähig.

Peptidoglykan-Glykosyltransferasen (PGT) sind an der bakteriellen Zellwandsynthese beteiligt, indem sie das Monomer Lipid II zur Peptidoglykankette polymerisieren. Die Hemmung dieses Syntheseschritts ist ein Ansatz für die Entwicklung neuer Antibiotika. Die Neigung der PGT zur Aggregation erschwert allerdings die Analyse der Interaktion mit Inhibitoren. Daher wird versucht, hydrophilere Mutanten zu gewinnen [124], wie dies in der Arbeitsgruppe des Kooperationspartners Dr. Mohammed Terrak (Universität de Liège) mit einer monodispersen, allerdings enzymatisch inaktiven MtgA-Mutante (MtgA-NS) gelungen

Zusammenfassung und Ausblick

ist. Trotz fehlender enzymatischer Aktivität wäre diese Mutante interessant für die Verwendung in biologischen Assays, wenn sie im Stande wäre, Substrate und Inhibitoren zu binden.

Moenomycine hemmen die Transglykosylierung, indem sie reversibel an die Bindungsstelle der PGT für die wachsende Peptidoglykankette (Donorbindungsstelle) binden. Untersuchungen zur Bedeutung der Aminosäurereste der PGT für deren enzymatische Aktivität sowie die Moenomycin- und Substrat-Bindung hatten eine enge Korrelation zwischen der Fähigkeit der PGT, Moenomycin A zu binden und das Substrat zu binden, gezeigt [1, 118, 120, 124, 148, 313]. Mit dem hier vorgestellten SPR-Biosensor-Assay konnte gezeigt werden, dass die monodisperse MtgA-Mutante MtgA-NS, im Gegensatz zu einigen anderen enzymatisch inaktiven PGT-Mutanten, nicht imstande ist, an das immobilisierte Moenomycin A zu binden. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass die monodisperse Mutante auch nicht im Stande ist, die wachsende Peptidoglykankette zu binden, was eine Ursache für die fehlende enzymatische Aktivität ist.

Die Anwendbarkeit des Biosensor-Assays zum empfindlichen Screening von PGT-Inhibitoren, die in Konkurrenz zu Moenomycin A an die Donorbindungsstelle der PGT binden, wurde demonstriert. Eine Reihe von PGT-Inhibitoren, die das natürliche Substrat Lipid II bzw. dessen biosynthetischen Prekursor Lipid I imitieren, wurde mit dem hier beschriebenen SPR-Biosensor-Assay untersucht. Alle sieben Inhibitoren binden an die Donorbindungsstelle der PGT. Für die Lipid II-Analoga (Disaccharidderivate) war zusätzlich bei niedrigen Konzentrationen eine verstärkte MtgA-Bindung an die Sensorchipoberfläche festzustellen. Es ist anzunehmen, dass diese Lipid II-Analoga an die Akzeptorbindungsstelle von MtgA binden und eine heteroallosterische Aktivierung der Donorbindungsstelle (erhöhte Affinität zu Moenomycin A) bewirken, was sich auch in Änderungen in der Dissoziationskinetik der MtgA-Moenomycin A-Komplexe zeigte. Diese Ergebnisse stellen den ersten Hinweis auf eine positive Kooperativität zwischen der Donor- und der Akzeptorbindungsstelle von PGT dar. Aufgrund von Löslichkeitsproblemen konnte der Effekt von Lipid II nicht eindeutig geklärt werden. Möglicherweise würde sich die Lipid II-Bindung auch auf die Affinität zur wachsenden Peptidoglykankette auswirken.

Zusammenfassung und Ausblick

SPR-Experimente mit immobilisiertem Lipid IV anstelle von Moenomycin A sollten geeignet sein, dies zu überprüfen.

Für die Entwicklung neuer Antibiotika könnten, aufgrund unterschiedlicher Ansprüche der beiden Bindungsstellen der PGT für die Lipidkettenlänge des Substrats, Liganden der Akzeptorbindungsstelle mit kurzer Lipidkette einen vielversprechenden Ansatz für neue Leitstrukturen darstellen [122, 124, 129, 131, 135]. Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen werden jedoch dadurch erschwert, dass Lipid II an beide Bindungsstellen binden kann. Unter der Annahme der Hypothese einer positiven Kooperativität zwischen den Bindungsstellen der PGT erlauben die Daten zu den sieben untersuchten Lipid I- und Lipid II-Analoga einige Schlussfolgerungen bezüglich der Interaktion mit der Akzeptorbindungsstelle. Die Disaccharidgruppe GlcNAc-MurNAc (bzw. GalNAc-MurNAc [85]) ist von essenzieller Bedeutung, die Peptidseitenkette führt hingegen zu verringerter Affinität. Die doppelt negativ geladene Phosphoglyceratgruppe wiederum resultiert in einer höheren Affinität, als die einfach negativ geladene Phosphodiestergruppe. Cokristallisation geeigneter Substratanaloga mit MtgA oder anderen PGT und Röntgenstrukturanalyse sollten geeignet sein, die Struktur-Wirkungsbeziehungen näher zu beleuchten und wertvolle Hinweise für die Entwicklung neuer Inhibitoren zu liefern und damit zu neuen Antibiotika für die Humanmedizin führen.

9 Material und Methoden

9.1 Verwendete Geräte, Chemikalien und Materialien

SPR-Biosensoranalysen wurden mit einem Biacore Q[®] SPR-Biosensor (Biacore AB, Uppsala, Schweden) mit Steuerungssoftware Biacore Q[®] Control Software Version 3.0.3 und Auswertesoftware Biacore Q[®] Evaluation Software Version 1.0 durchgeführt.

NMR-Messungen durch die Service-Abteilung für Kernresonanz-Spektroskopie an der Bergischen Universität Wuppertal wurden an einem Bruker AVANCE III 600 (1H-Messfrequenz 600,13 MHz) oder einem Bruker AVANCE 400 (1H-Messfrequenz 400,13 MHz) (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Deutschland) durchgeführt.

Für semi-präparative Trennungen wurde eine HPLC bestehend aus einer HPLC-Pumpe Modell Merck-Hitachi LaChrom[®] L7100 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan), einem manuellen Probeninjektionsventil Model 7125 (Rheodyne Inc., Cotati, USA), einem Säulenofen Modell ERC 125 (ERC GmbH, Riemerling, Deutschland) und einem UV/VIS-Detektor Modell Merck-Hitachi LaChrom[®] L-7420 mit Semi-micro-Flusszelle (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) verwendet. Die Datenaufzeichnung erfolgte per EDV mittels Signal-Interface Modell 162 (Autochrom Inc., Milford, USA) und PC mit der Software APEX Chromatography Workstation for Windows Version 3.10b (Autochrom Inc., Milford, USA).

Für analytische HPLC-Trennungen wurde je nach Verfügbarkeit eines der beiden folgenden HPLC-Systeme verwendet: Das erste System bestand aus einer HPLC-Pumpe Modell Merck-Hitachi LaChrom[®] L7100 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan), einem Autosampler Modell Merck-Hitachi LaChrom[®] L-7250 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan), einem Säulenofen Modell Merck LaChrom[®] L-7350 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und einem Dioden-Array-Detektor Modell Merck-Hitachi LaChrom[®] L-7450 (Hitachi Ltd. Tokyo, Japan). Die Steuerung, Datenaufzeichnung und Auswertung erfolgte per EDV mittels eines Merck-Hitachi Interface D-7000 (Hitachi

Material und Methoden

Ltd., Tokyo, Japan) und eines PC mit der Software Merck-Hitachi Model D-7000 Chromatography Data Station Software HPLC System Manager Version 3.0 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland/ Hitachi Instruments Inc., San Jose, USA). Das zweite HPLC-System bestand aus einer HPLC-Pumpe Modell PU-980 (Jasco Corp., Tokio, Japan), einem ternären Gradientenmischer Modell LG-980-02 (Jasco Corp., Tokio, Japan), einem Degasser Modell DG-1580-53 (Jasco Corp., Tokio, Japan) einem Autosampler Modell AS-950 (Jasco Corp., Tokio, Japan), einem UV/VIS-Detektor Modell UV-975 (Jasco Corp., Tokio, Japan) und einem Integrator Modell Merck Hitachi D-2500A (Hitachi Ltd., Tokio, Japan).

Flash-Chromatographie wurde mit einem Superformance[®] Universal-Glaskartuschen-System (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit daran angeschlossenen UV/VIS-Filter-Photometer (Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

Für die Dünnschichtchromatographie wurden Kieselgel 60-DC-Platten mit Fluoreszenzindikator (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Reinstwasser wurde aus voll entsalztem Wasser mittels einer Milli-Q[®] Gradient A10 Reinstwasser-Anlage (Millipore, Molsheim, Frankreich) gewonnen.

Eluenten für die HPLC und Laufpuffer für die SPR wurden vor der Verwendung durch Whatman[®] OE 67 Celluloseacetat-Membranfilter (Porengröße 0,45 µm; Durchmesser 50 mm; Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) filtriert. HPLC-Eluenten wurden vor Verwendung durch Einleiten von Helium entgast. SPR-Puffer wurden durch Anlegen von Vakuum (Membran-Vakuumpumpe) für 15 min entgast.

Zum Entgasen der SPR-Puffer, für die Membranfiltration und für die SPE wurde eine Membran-Vakuumpumpe ME 2C (Vacuubrand GmbH u. Co., Wertheim, Deutschland) verwendet.

Zum Abdestillieren von Lösungsmitteln wurde ein Heidolph VV 2000 Vakuumrotationsverdampfer mit Wasserbad Heidolph WB 2000 (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) und vacuubrand Membran-

Material und Methoden

Vakuumpumpe MZ 2C (Vacuubrand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland) verwendet.

Für die Lyophilisation wurde eine Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) mit Scroll-Vakuumpumpe Model: nXDS6iC (Edwards Ltd., Crawley, UK) verwendet.

Die Zugabe des Diazoniumsalzes des 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamids bei der Synthese des Moenomyin A-Aminderivats erfolgte mit einer Aladdin AL-1000 Spritzenpumpe (World Precision Instruments, Sarasota, USA).

Für das Vermahlen der Futtermittel wurde eine M20 Universalmühle und für das Mischen der dotierten Futtermittel eine A 10 B Universalmühle (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) verwendet. Zum Sieben der gemahlten dotierten oder undotierten Futtermittel wurde eine Vibrationssiebmaschine AS 200 basic (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) mit Testsieben nach DIN ISO 3310-1 der Maschenweiten 0,630 mm und 0,850 mm aus Edelstahl (VWR International GmbH, Darmstadt, BRD) verwendet.

Die Extraktion der Futtermittel wurde mit einem Horizontalschüttler SM 25 (Edmund Bühler GmbH, Tübingen, BRD) oder alternativ mittels ASE mit einem ASE 200 Accelerated Solvent Extractor (Dionex GmbH, Idstein, Deutschland) durchgeführt. Die Zentrifugation der Extrakte erfolgte mit einer Heraeus Multifuge 4 KR mit Rotor Sorvall Heraeus 75006476 mit Rundbechereinsatz 75006477 bzw. im Falle der Extraktion per ASE mit einer Heraeus Megafuge 2.0 mit Rotor 75008155 und Rundbechereinsatz 75008160 (Heraeus, Hanau, Deutschland).

Als Ultraschallbad wurde ein Sonorex Super RK 106 (Bandelin electronic, Berlin, Deutschland) und als Heizblock zum Abdampfen im Stickstoffstrom ein Lab-Line Multi-Blok® Heater (Lab-Line Instruments Inc., Melrose Park, USA) verwendet.

Für die SPR-Analysen wurden folgende Probenfläschchen und -deckel verwendet: Kunststofffläschchen mit Gewinde 2,0 mL von Sorensen BioScience Inc. (Salt Lake

Material und Methoden

City, USA), Probenfläschchen 4 mL aus Braunglas von Carl Roth GmbH + Co. (Karlsruhe, Deutschland) und Kunststofffläschchen 7 mm sowie Rubber Caps type 2 und type 3 von GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Schweden).

Helium 5.0, Wasserstoff 5.0 und Stickstoff 5.0 wurden von Messer Industriegase GmbH (Bad Soden, Deutschland) bezogen. Aceton (VWR International, Fontenais-Sous-Bois, Frankreich), Acetonitril (Fisher Scientific UK Limited, Loughborough, UK), Chloroform (Fisher Scientific UK Limited, Loughborough, UK), Dichlormethan (VWR International, Leuven, Belgien), Ethylacetat (VWR International, Leuven, Belgien und Fisher Scientific UK Limited, Loughborough, UK), Hexan (VWR International, Leuven, Belgien), Methanol (VWR International, Fontenais-Sous-Bois, Frankreich) und 2-Propanol (VWR International, Fontenais-Sous-Bois, Frankreich) wurden in der Reinheit HPLC grade bezogen. Acetonitril (reinst, $\geq 99,5\%$) für die semi-präparative HPLC, Ethanol (p.a., $\geq 99,8\%$), Dimethylsulfoxid (p.a., $\geq 99,8\%$), 25% Ammoniak, Natriumhydroxid ($\geq 99\%$), Natriumchlorid (p.a., $\geq 99,5\%$), HEPES (p.a., $\geq 99,5\%$), Tris ($\geq 99,9\%$), EDTA (Dinatriumsalz, Dihydrat; p.a., $\geq 99\%$) und Kieselgel 60 (0,04-0,063 mm) für die Säulenchromatographie wurden von Carl Roth GmbH + Co (Karlsruhe, Germany) bezogen. Das Kieselgel für die Säulenchromatographie wurde vor Gebrauch gemäß Esterbauer mit Salzsäure gewaschen und der Wassergehalt auf 7% (w/w) eingestellt [319]. Ethanolamin ($\geq 98\%$), Kaliumdihydrogenphosphat (puriss, p.a., $\geq 99,5\%$), wasserfreies Dikaliumhydrogenphosphat (purum, p.a., $\geq 98\%$), TWEEN® 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat), Triton™ X-100 (Polyethylenglykol-*p-tert*-Octylphenylether, Laboratory grade), SDS (Natriumdodecylsulfat, $\geq 99,0\%$), 5-Amino-2-nitrobenzoesäure (97%), Biotin ($\geq 99\%$), *N,N*-Carbonyldiimidazol ($> 90\%$), *N,N*-Cyclohexylcarbodiimid (puriss., $\geq 99,0\%$), *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (purum, $\geq 98\%$), *N*-Hydroxysuccinimid (98%) und *N,N*-Dimethylformamid ($\geq 99\%$) wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) bezogen. 85% *ortho*-Phosphorsäure (p.a.), Ammoniumhydrogencarbonat (reinst), Natriumacetat-Trihydrat (p.a., $\geq 99,5\%$), Natriumnitrit (p.a.), Magnesiumchlorid-Hexahydrat (p.a., $\geq 99\%$), Zinksulfat-Heptahydrat (p.a.), Nickel(II)-chlorid-Hexahydrat (p.a.) und Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat (p.a.) wurden von Merck KGaA (Darmstadt,

Material und Methoden

Deutschland) bezogen. Maleinsäure (zur Synthese, $\geq 99\%$) und Platin(IV)-oxid (Hydrat, 80% Pt) wurden von Merck Schuchardt OHG (Hohenbrunn, Deutschland), wasserfreies Pyridin (p.a.) und Anisaldehyd (98%) von Fluka (Seelze, Deutschland), Salzsäure ($\sim 36\%$) von Fisher Scientific UK Limited (Loughborough, UK), Schwefelsäure (96%) von Bergchemie J.C. Bröcking & Co.GmbH (Wuppertal, Deutschland) und CHAPS ($\geq 98.0\%$) von A.G. Scientific, Inc. (San Diego, USA) bezogen. Flavomycin[®] Reference Standard (Standard No. 12) und Flavomycin 80 wurden von biovet[®] (Peshtera, Bulgarien) bezogen.

Sämtliche verwendeten Peptidoglykan-Glykosyltransferasen wurden freundlicherweise von Dr. Mohammed Terrak (Universität Liège, Belgien) zur Verfügung gestellt. PGT-Mutanten wurden von Ismahene Dahmane im Rahmen ihrer von Dr. Terrak betreuten Doktorarbeit hergestellt. His₆-markiertes *Escherichia coli* PBP1b wurde unter Verwendung des pDML924-Plasmids gemäß [127] und His₆-markierte *Staphylococcus aureus* Monofunktionelle Glykosyltransferase (*S. aureus* MtgA) unter Verwendung des pDML2004-Plasmids gemäß [87] exprimiert und aufgereinigt. Die PGT-Mutanten wurden unter Verwendung des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Diegem, Belgien) und des pDML920C-Plasmids gemäß [89, 127] (PBP1b), bzw. des pDML2004-Plasmids gemäß [87] (MtgA-Mutanten, außer MtgA-6M) hergestellt und analog dem Wildtyp aufgereinigt. Für die Mutante MtgA-6M wurde ein modifiziertes *mtga*-Gen bezogen (GeneArt[®]; Life technologies) (s. auch [317]).

Lipid II (Lysinform aus *Staphylococcus simulans*) wurde freundlicherweise von Dr. Eefjan Breukink (Universität Utrecht, Niederlande) zur Verfügung gestellt (Herstellung beschrieben in [318]). Die Lipid II-Analoga 21, 43, 44, 56, 57, 61 und 62 aus [135] wurden von Dr. Shrinivas Dumbre im Labor von Professor Piet Herdewijn (Universität Leuven, Belgien) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Synthese beschrieben in [135]). Bis(benzonitril)palladium(II)chlorid wurde von Bernd Mell im Labor von Professor Fabian Mohr (Bergische Universität Wuppertal, Deutschland) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Material und Methoden

Die Futtermittel deuka primo pro, deuka all-mash LH-V und deuka bullkraft 243 wurden freundlicherweise von der Firma Deutsche Tiernahrung Cremer GmbH & Co. KG (Düsseldorf, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

9.2 Direkter Flavophospholipol-Assay

Die Analyse wurde mit einem Sensor Chip NTA (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Der Laufpuffer enthielt 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ und 0,5% (w/v) Triton X-100 und wurde vor der Zugabe des Triton X-100 mit 0,5 M Maleinsäure auf pH 6,5 eingestellt und membranfiltriert; nach Zugabe des Tensids wurde entgast.

Dispenserpuffer (zum Spülen der Autosampler-Spritzenpumpe) und Regenerationslösung A wurden wie der Laufpuffer angesetzt, allerdings enthielt der Dispenserpuffer 3 mM EDTA und Regenerationslösung A 175 mM EDTA anstelle des MgCl₂. Regenerationslösung B war 500 µM NiCl₂ in Wasser.

10 µg/mL (111 nM) *E. coli* PBP1b in Laufpuffer wurde für 5 min injiziert. Anschließend wurde die zu analysierende Lösung für 10 min injiziert. Die Regeneration erfolgte durch Injektion von Regenerationslösung A für 5 min, gefolgt von Regenerationslösung B für 1 min. Alle Injektionen erfolgten mit einer Flussrate von 10 µL/min.

Folgende Report Points wurden verwendet: „Basislinie“ 10 s vor Beginn der PBP1b-Injektion, „PBP1b“ 10 s vor Beginn der Injektion der Flavophospholipol-Lösung und „Moenomycine“ 30 s nach Ende der Injektion der Flavophospholipol-Lösung.

9.3 Analytische HPLC-Trennung der Moenomycin-Kongenerere

Die Moenomycin-Kongenerere wurden an einer C18-Phase getrennt (NUCLEODUR® C18 HTec; 250 * 4,6 mm, 5 µm, 110 Å; mit Vorsäule EC 4/3 NUCLEODUR® C18 HTec, 5 µm in Column-Protection-System Vorsäulenhalter; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland). Die Trennung erfolgte isokratisch bei 45 °C mit 1 mL/min 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0)/ACN 55:45 (v/v) als Eluent.

Die Detektion erfolgte im UV bei 258 nm. Das Injektionsvolumen betrug 100 μ L. Als Autosampler-Waschlösung wurde ACN/H₂O 1:1 (v/v) verwendet.

Die Aufklärung der Elutionsreihenfolge erfolgte per LC-ESI-MS im Negativionen-Modus an einer C18-Phase (Perfect Sil[®] Target ODS-3 HD; 100 mm * 4,6 mm, 5 μ m, 100 Å; MZ Analysentechnik, Mainz, Deutschland) mit 1,5 mL/min 100 mM NH₄HCO₃ (pH 8,0)/ACN 64:36 (v/v). Das LC-MS-System bestand aus einer binären Pumpe Modell Agilent 1100 Series G1312A, einem Autosampler Modell Agilent 1100 Series ALS G1313A und einem Flugzeit-Massenspektrometer (ToF-MS) Modell Bruker MicrOTOF (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland). Zusätzlich verfügte das LC-MS-System über einen UV/VIS-Detektor Modell Agilent 1100 Series VWD G1314A. Folgende MS-Einstellungen wurden verwendet: Kapillarspannung 4,5 kV, Verneblerdruck 1,6 bar, Trocknungsgasflussrate 8,0 mL/min, Trocknungsgas-temperatur 200 °C, Endplatten-Offset -500 V. Die Massenspektren wurden im Bereich m/z 800 bis 2500 aufgenommen.

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden außerdem folgende HPLC-Säulen auf ihre Eignung geprüft: LiChropher[®] 100 RP-18 Endcapped (5 μ m, 100 Å in LiChroCART[®]-Kartusche 250 * 4 mm; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Ultra IBD (150 * 2,1 mm, 5 μ m, 100 Å; Restek Corporation, Bellefonte, USA), SUPELCOSIL[™] LC-PAH (250 * 2,1 mm, 5 μ m, 120 Å; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), Superspher[®] 60 RP-8 (4 μ m, 60 Å in LiChroCART[®]-Kartusche 250 * 3 mm; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Hypersil[™] Gold PFP (150 * 2,1 mm, 3 μ m, 175 Å; Thermo Fisher Scientific, Langerwehe, Deutschland), NUCLEODUR[®] 100-3 CN-RP (250 * 2 mm, 3 μ m, 110 Å; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren), LiChrospher[®] 100 NH₂ (5 μ m, 100 Å in LiChroCART[®]-Kartusche 250 * 4 mm; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), LiChrospher[®] 100 Diol (5 μ m, 100 Å in LiChroCART[®]-Kartusche 250 * 4 mm; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), SeQuant[®] ZIC[®]-HILIC PEEK (150 * 4,6 mm, 3,5 μ m, 100 Å; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Luna HILIC (150 * 2 mm, 3 μ m, 200 Å; Phenomenex; Aschaffenburg, Deutschland).

Material und Methoden

9.4 Akkurate Massen der tentativen Moenomycin-Kongenere

Mittels LC-HRMS (weitere Details s. Abschnitt 9.18) wurden die folgenden akkuraten Massen für die tentativ identifizierten Moenomycin-Kongenere gemessen (in Klammern ist die Abweichung von der berechneten exakten Masse angegeben):

Moenomycin A: m/z 1580,6494 (-3,0 ppm); Moenomycin A₁₂: m/z 1566,6359 (-1,6 ppm); Moenomycin C₁: m/z 1388,5877 (-2,2 ppm); Moenomycin C₃: m/z 1402,6032 (-2,2 ppm); Moenomycin C₄: m/z 1418,5988 (-1,7 ppm); 6C-Hydroxy-Moenomycin A: m/z 1596,6462 (-1,8 ppm); 6E-Hydroxy-Moenomycin C₁: m/z 1404,5828 (-2,0 ppm); Nosokomycin A: m/z 1485,6151 (-1,2 ppm); Nosokomycin B: m/z 1484,6307 (-1,5 ppm); Nosokomycin B₂: m/z 1500,6274 (-0,3 ppm); Nosokomycin D: m/z 1322,5776 (-1,9 ppm).

9.5 Semi-präparative HPLC-Trennung der Moenomycin-Kongenere

Die präparative Trennung der Moenomycin-Kongenere erfolgte an einer C18-Phase (NUCLEODUR® C18 HTec; 250 * 10 mm, 5 µm, 110 Å; mit Vorsäule VP 10/8 NUCLEODUR® C18 HTec in VarioPrep Vorsäulenhalter für 8 mm ID Vorsäulenkartuschen; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren). Die Trennung erfolgte isokratisch bei 45 °C mit 6 mL/min 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat (pH 2,3)/ACN 58:42 (v/v) als Eluent und Detektion im UV bei 280 nm. Mit jedem chromatographischen Lauf wurden ca. 35 mg Flavomycin® in 100 µL H₂O/ACN 8:2 (v/v) in die 300 µL-Probenschleife injiziert. Die Spritze wurde mit 100 µL desselben Lösungsmittels gespült und dieses ebenfalls in die Probenschleife injiziert. Erst danach erfolgte die Ventilschaltung. Anschließend wurden Spritze und Injektionsventil mehrfach mit ACN/H₂O 1:1 (v/v) gespült. Fraktionen wurden von Hand gesammelt, wobei die Dimensionen der Ausgangskapillare des UV-Detektors so gewählt waren, dass das Eluat mit 10 s Verzögerung austrat. Die Analyse der Fraktionen erfolgte mit der in Abschnitt 9.3 beschriebenen Methode.

9.6 Entsalzung der Eluate der semi-präparativen HPLC per SPE

Chromatographisch reine (Abschnitt 9.3) Moenomycin A-Fractionen der semi-präparativen HPLC (Abschnitt 9.5) wurden vereinigt und mit 50 mM K_2HPO_4 pH 7,0 auf das dreifache Volumen verdünnt (diese Verdünnungen wurden bis zu einer Woche bei 6 °C gelagert). Als SPE-Kartuschen wurden CHROMABOND® HR-X 15 mL / 1000 mg (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) verwendet. Die Konditionierung erfolgte mit Methanol, gefolgt von Wasser und 50 mM K_2HPO_4 pH 7,0 (je 15 mL). Anschließend wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 mL/min die vereinigten Moenomycin A-Fractionen von 3 semi-präparativen HPLC-Läufen (\approx 100 mg Flavomycin®) auf die Kartusche gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit je 5 mL H_2O wurde mit Aceton/ H_2O 6:4 (v/v) mit maximal 1 mL/min eluiert (2 * 10 mL erwiesen sich als ausreichend, um praktisch alles Moenomycin A zu eluieren). Das Aceton wurde am Vakuum-Rotationsverdampfer abdestilliert und die verbliebene wässrige Lösung lyophilisiert.

Im Zuge der Methodenentwicklung wurden CHROMABOND® HR-X 3 mL / 200 mg (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) und Oasis® HLB 6cc / 200 mg (Waters Corp., Milford, USA) verwendet.

Material und Methoden

9.7 ^1H NMR des isolierten Moenomycin A

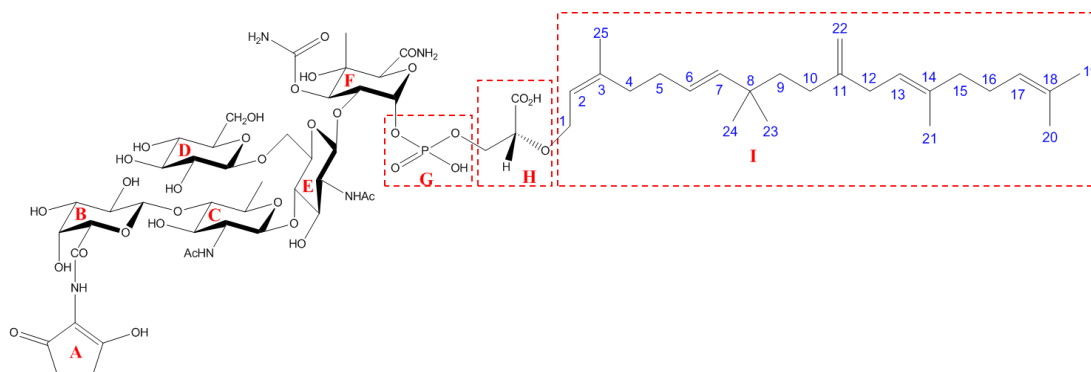


Abbildung 77: Zur Signaluordnung des ^1H NMR-Spektrums des isolierten Moenomycin A

^1H NMR (600 MHz, 0,5 mmol/L in D_2O ; weitere Messparameter s. bei Hennig et al. [309]): δ 0,78 (s, 6H, CH_3 -23^I,24^I), 1,04 (s, 3H, CH_3 -4^F), 1,21 (m, 2H, CH_2 -9^I), 1,22 (d, $J_{5,6} = 5,6$ Hz, 3H, CH_3 -6^C), 1,44 (s, 3H, CH_3 -20^I), 1,6 (s, 3H, CH_3 -21^I), 1,51 (s, 3H, CH_3 -19^I), 1,58 (s, 3H, CH_3 -25^I), 1,75 (m, 2H, CH_2 -10^I), 1,86 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{CONH}^{\text{C}}$), 1,90 (m, 5H, CH_2 -15^I, $\text{CH}_3\text{CONH}^{\text{E}}$), 1,92-2,04 (m, 6H, CH_2 -4^I, CH_2 -16^I, CH_2 -5^I), 2,22 (s, 4H, CH_2 -5^A, CH_2 -4^A), 2,59 (d, $J_{12,13} = 7,4$ Hz, 2H, CH_2 -12^I), 3,12 (dd, $J_{2,3} = 9,1$ Hz, $J_{1,2} = 8,1$ Hz, 1H, 2-H^D), 3,21 (dd, $J_{4,5} = 9,5$ Hz, 1H, 4-H^D), 3,29-3,33 (m, 1H, 5-H^D), 3,34-3,61 (m, 13H, 6-H^{yD}, 6-H^{yE}, 3-H^B, 2-H^C, 5-H^E, 3-H^E, 4-H^E, 2-H^E, 5-H^C, 2-H^B, 3-H^C, 4-H^C, 3-H^D), 3,68 (dt, $J_{2,3} = 10,4$ Hz, $J_{1,2} = \sim 3$ Hz, 1H, 2-H^F), 3,73-3,89 (m, 4H, 3-H^{yH}, 2-H^H, 1-H^{yI}, 6-H^{xD}), 3,94 (m, 3H, 6-H^{xE}, 3-H^{xH}, 1-H^{xI}), 4,09 (dd, $J_{3,4} = 3,0$ Hz, $J_{4,5} < 1$ Hz, 1H, 4-H^B), 4,13 (d, $J_{4,5} < 1$ Hz, 1H, 5-H^B), 4,27 (s, 1H, 5-H^F), 4,33 (d, $J_{1,2} = 8,0$ Hz, 1H, 1-H^D), 4,40-4,47 (m, 3H, 1-H^B, 1-H^E, 1-H^C), 4,60 (s, 2H, CH_2 =22^I), 4,86 (d, $J_{2,3} = 10,5$ Hz, 1H, 3-H^F), 5,00 (t, $J_{16,17} = 6,9$ Hz, 1H, 17-H^I), 5,05 (t, $J_{12,13} = 7,3$ Hz, 1H, 13-H^I), 5,13-5,19 (dt, $J_{6,7} = 15,7$ Hz, $J_{5,6} = 6,7$ Hz, 1H, 6-H^I), 5,20-5,25 (dd, $J \approx 7$ Hz, 1H, 2-H^I), 5,25-5,29 (d, $J_{6,7} = 15,7$ Hz, 1H, 7-H^I), 5,60 (dd, $^3J_{1,P} = 6,3$ Hz, $J_{1,2} = 3,5$ Hz, 1H, 1-H^F).

9.8 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid

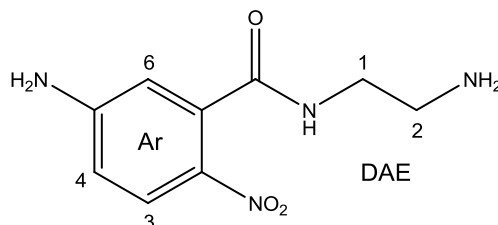


Abbildung 78: Zur Signalzuordnung des ^1H NMR-Spektrums des 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamids (Ar: Arylgruppe; DAE: Diaminoethylgruppe)

653 mg (3,6 mmol) 5-Amino-2-nitrobenzoesäure wurden unter Erwärmen in 20 mL Pyridin gelöst und nach Abkühlen auf Raumtemperatur unter Rühren 840 mg (5,2 mmol) *N,N*-Carbonyldiimidazol zugegeben und 1 h weiter gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde per DC auf Kieselgel mit Methanol/Chloroform 1:1 (v/v) als Fließmittel und Detektion über die gelbe Farbe der 5-Amino-2-nitrobenzoesäure und des Produkts verfolgt.

Die Lösung der aktivierten Säure wurde auf 0 °C abgekühlt und unter Rühren bei 0 °C zu einer Lösung von 1120 mg (14 mmol) Ethylendiamin in 20 mL Pyridin zugetropft. Anschließend wurde zunächst 1 h bei Raumtemperatur und danach 3 h bei 80 °C weiter gerührt. Der Reaktionsfortschritt wurde per DC auf Kieselgel mit Methanol als Fließmittel (Detektion über gelbe Farbe) verfolgt.

Das Rohprodukt wurde nach Abdestillieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer per Säulenchromatographie an Kieselgel mit 25% Ammoniak/Methanol 1:25 (v/v) als Eluent aufgereinigt. Es wurden 455 mg (2,0 mmol) des Produkts als gelbe Kristalle erhalten, was einer Ausbeute von 56% entspricht. ^1H NMR (400 MHz, $[\text{D}_6]$ DMSO): δ 2,65 (t, 2H, $J_{2-1} = 6,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-}2^{\text{DAE}}$), 3,17 (dt, 2H, $J_{1-2} = 6,0$ Hz, $J_{1-\text{NH}} = 5,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-}1^{\text{DAE}}$), 6,47 (d, 1H, $J_{6-4} = 2,5$ Hz, $6^{\text{Ar-H}}$), 6,59 (dd, 1H, $J_{4-3} = 9,1$ Hz, $J_{4-6} = 2,3$ Hz, $4^{\text{Ar-H}}$), 6,73 (s, 2H, NH_2^{Ar}), 7,88 (d, 1H, $J_{3-4} = 9,1$ Hz, $3^{\text{Ar-H}}$), 8,27 (t, 1H, $J_{\text{NH-1}} = 5,6$ Hz, CONH^{Ar}).

Material und Methoden

9.9 Moenomycin A-Aminderivat

17,0 mg (76 nmol) 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid (Synthese in Abschnitt 9.8) wurden in einem 5 mL-Spitzkolben in 667 μ L 6% Salzsäure im Wasserbad bei 80°C in Lösung gebracht. Die erhaltene Lösung wurde im Eisbad gekühlt, mit einer Geschwindigkeit von 10 μ L/min (Spritzenpumpe) 267 μ L einer 0,34 M Natriumnitrit-Lösung (\cong 91 nmol Natriumnitrit) zugegeben und unter Eiskühlung weitere 15 min gerührt.

100 mg Moenomycin A (63 nmol) (Isolierung in Abschnitt 9.5 und 9.6) wurden in einer Lösung von 1,66 g Natriumacetat-Trihydrat (\cong 1,00 g wasserfreiem Natriumacetat) in 50 mL Wasser gelöst und unter Rühren im Eisbad die Lösung des Diazoniumsalzes innerhalb einer halben Stunde zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde für weitere 20 min im Eisbad und anschließend bei Raumtemperatur weiter gerührt. Der Reaktionsverlauf wurde per HPLC verfolgt: Aliquote des Reaktionsansatzes wurden 1:9 (v/v) mit 50 mM KH_2PO_4 (pH 2,3) gemischt, membranfiltriert (CHROMAFIL® Xtra PET-45/25; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) und auf einer C18-Phase (NUCLEODUR® C18 HTec; 250 * 4,6 mm, 5 μ m, 110 Å; mit Vorsäule EC 4/3 NUCLEODUR® C18 HTec, 5 μ m in Column-Protection-System Vorsäulenhalter; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) mit 1 mL/min 50 mM KH_2PO_4 (pH 2,3)/Acetonitril 50:50 (v/v) und einer Säulenofentemperatur von 45°C getrennt. Die Detektion erfolgte mittels DAD. Moenomycin A eluierte bei $t_{\text{dr}} = 17$ min (258 nm), das intermediär gebildete Amidrazon bei $t_{\text{dr}} = 9,5$ min (lokales Absorptionsmaximum bei 380 nm) und das Aminderivat bei $t_{\text{dr}} = 10$ min (lokales Absorptionsmaximum bei 280 nm). 25 h nach Zugabe des Diazoniumsalzes war nur noch ein Bruchteil des intermediär gebildeten Amidrazons nachweisbar. Es wurde über Nacht weiter gerührt, es war allerdings kein weiterer Reaktionsfortschritt festzustellen.

Der Reaktionsansatz wurde mit 4 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt und per SPE auf CHROMABOND® HR-X-Kartuschen (drei separate 15 mL-Kartuschen mit je 1000 mg Sorbens; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) aufgereinigt. Nach Konditionierung mit Methanol, gefolgt von Wasser und 50 mM K_2HPO_4 pH 7,5 (je 15 mL) erfolgte die Aufgabe des Reaktionsansatzes mit einer Fließgeschwindigkeit von 2,5 bis 3 mL/min. Anschließend wurde zunächst mit 5 mL 50 mM K_2HPO_4

Material und Methoden

(pH 7,5), dann mit zweimal 5 mL 50 mM K_2HPO_4 (pH 7,5)/Acetonitril 8:2 (v/v) und zuletzt 5 mL Wasser gewaschen. Die Elution des Produktes erfolgte mit viermal 10 mL Aceton/Wasser 6:4 (v/v) mit einer Fließgeschwindigkeit von maximal 1 mL/min, wobei der Großteil des Produkts mit den ersten 20 mL eluiert wurde (Analyse analog zur Reaktionskontrolle). Die Produktfraktionen wurden vereinigt und nach Abdestillieren des Acetons lyophilisiert. Es wurden 87 mg Produkt gewonnen. Das Produkt wurde mit ESI-ToF-MS im Negativionenmodus analysiert (Kapillarspannung 4,5 kV, Verneblerdruck 0,4 bar, Trocknungsgasflussrate 4,0 mL/min, Trocknungsgas-temperatur 200 °C, Endplatten-Offset -500 V. Das Massenspektrum wurde im Bereich m/z 50 bis 2000 aufgenommen). Als intensivstes Massensignal wurde m/z 907,3681 bestimmt (theoretisch: $m/z([M-2H]^{2-})$ 907,3587). Das Isotopenmuster entsprach dem für das Produkt erwarteten. Per HPLC wurden die Restgehalte an Moenomycin A (analog zur Reaktionskontrolle - abweichend 50 mM KH_2PO_4 (pH 2,3)/Acetonitril 47:53 (v/v)) und an 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid (100 mM NH_4HCO_3 /Acetonitril 95:5 (v/v); Detektion bei 380 nm) bestimmt. Das Produkt enthielt 4% (w/w) Moenomycin A (\cong Stoffmengenanteil von 4,5%) und 0,06% (w/w) 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid (\cong Stoffmengenanteil von 0,5%). Ausgehend von einer entsprechenden Reinheit des Produkts von ca. 95% (w/w) betrug die Ausbeute 73%.

Material und Methoden

9.10 Biotinylierungsreagenz

(5-Amino-2-nitro-*N*-{2-[5-((3*a*S,4*S*,6*a*R)-2-oxohexahydrothieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl)-pentanamido]ethyl}benzamid)

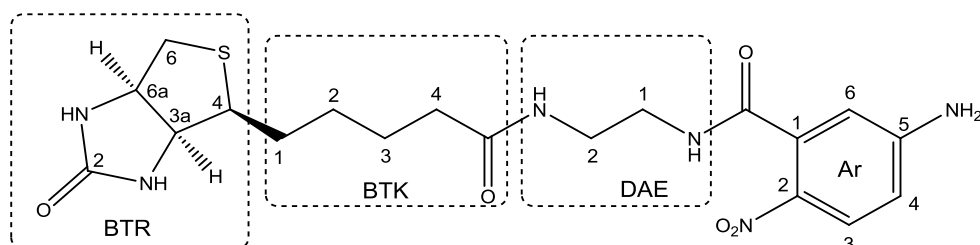


Abbildung 79: Zur Signalzuordnung der NMR-Spektren des Biotinylierungsreagenzes (Ar: Arylgruppe; DAE: Diaminoethylgruppe, BTR: Biotinring, BTK: Biotinseitenkette)

Zu einer Lösung von 200 mg (0,82 mmol) Biotin und 140 mg (1,04 mmol) *N*-Hydroxysuccinimid in 10 mL *N,N*-Dimethylformamid (DMF) wurde innerhalb von 10 min eine Lösung von 160 mg (0,78 mmol) *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 10 mL DMF zugetropft und das Gemisch bei 20 °C über Nacht gerührt. Nach Filtration und Abdestillieren des Lösungsmittels am Vakuumrotationsverdampfer wurde der Rückstand unter Erwärmen auf 60 °C in 10 mL DMF aufgenommen. Hierzu wurde eine Lösung von 225 mg (1 mmol) 5-Amino-*N*-(2-aminoethyl)-2-nitrobenzamid (Synthese in Abschnitt 9.8) in 5 mL DMF gegeben und bei 60 °C für 20 h gerührt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde das Rohprodukt per Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Dichlormethan/Methanol 5:1 (v/v) als Eluent und UV-Detektion bei 254 nm aufgereinigt. Im Produkt enthaltenes Kieselgel wurde nach Abdestillieren des Lösungsmittels und Aufnehmen in 10 mL 2 M Salzsäure durch Ultrafiltration (Amicon Ultra 4, CA, MWCO 3 kDa; Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) abgetrennt. Es wurden 342 mg (0,76 mmol) des aufgereinigten Produkts erhalten. Bezogen auf die eingesetzte Biotinmenge entspricht das einer Ausbeute von 93%. ¹H NMR (600 MHz, [D₆]DMSO)³⁵: δ 1,32 (m, 2H, CH₂-2^{BTK}), 1,47 (m, 1H, CH_A-1^{BTK}), 1,53 (m, 2H, CH₂-3^{BTK}), 1,63 (m, 1H, CH_B-1^{BTK}), 2,08 (t, 2H,

³⁵ Die Signalzuordnung für den Biotinrest erfolgte in Anlehnung an Ikura und Hikichi [320]. Für die Signalzuordnung beim ¹³C NMR wurde außerdem ein ¹³C DEPT-135-Spektrum aufgenommen.

CH₂-4^{BTK}), 2,59 (d, 1H, $J_{A_6,B_6} = 12,4$ Hz, CH_A-6^{BTR}), 2,83 (dd, 1H, $J_{B_6,A_6} = 12,4$ Hz, CH_B-6^{BTR}), 3,11 (m, 1H, CH-4^{BTR}), 3,18 (m, CH₂-1^{DAE}), 3,23 (m, 2H, CH₂-2^{DAE}), 4,14 (m, 1H, CH₂-3a^{BTR}), 4,31 (m, 1H, CH₂-6a^{BTR}), 6,35 (s, 1H, CONH^{BTR}), 6,41 (s, 1H, CONH^{BTR}), 6,48 (d, 1H, $J_{6,4} = 2,3$ Hz, 6^{Ar}-H), 6,61 (dd, 1H, $J_{4,3} = 9,0$ Hz, $J_{4,6} = 2,3$ Hz, 4^{Ar}-H), 6,73 (s, 2H, NH₂^{Ar}), 7,77 (s, 1H, CONH-2^{DAE}), 7,90 (d, 1H, $J_{3,4} = 9,0$ Hz, 3^{Ar}-H), 8,32 (m, 1H, CONH-1^{DAE}).

¹³C NMR (150 MHz, [D₆]DMSO)³¹: δ 25,1 (C-3^{BTK}), 28,0 (C-1^{BTK}), 28,1 (C-2^{BTK}), 35,2 (C-4^{BTK}), 38,0 (C-2^{DAE}), 38,8 (C-1^{DAE}), 39,9 (C-6^{BTR}), 55,3 (C-4^{BTR}), 59,2 (C-6a^{BTR}), 61,0 (C-3a^{BTR}), 111,9 (C-6^{Ar}), 112,4 (C-4^{Ar}), 127,4 (C-3^{Ar}), 132,9 (C-1^{Ar}), 137,0 (C-2^{Ar}), 154,6 (C-5^{Ar}), 162,7 (CO^{BTR}), 167,2 (CONH^{Ar}), 172,2 (CONH^{BTK}).

9.11 Decahydromoenomycin

10 mg Flavomycin[®] in 1 mL Methanol mit 2-3 mg Platin(IV)oxid wurden unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur für 3 d gerührt: a) im Autoklaven bei 4 bar; b) bei Atmosphärendruck. Das Platin wurde abfiltriert und der Filter mit Methanol nachgewaschen.

Das Produkt wurde mit LC-ESI-HRMS im Negativionenmodus charakterisiert.

Das LC-HRMS-System bestand aus einer Surveyor MS Pumpe, einem Surveyor Entgaser, einem Surveyor Autosampler und einem LTQ FT Ultra Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland). Die chromatographische Trennung erfolgte an einer C18-Phase (Knauer C18 100 * 2 mm, 5 μ m; Knauer Wissenschaftliche Geräte GmbH, Berlin, Deutschland) mit dem Eluentensystem A: Wasser/Acetonitril 95:5 (v/v) mit 0,1% Ameisensäure und B: Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure mit einer Flussrate von 200 μ L/min. Es wurde der folgende Gradient angewendet: 20% B für 1 min, auf 75% B in 29 min, 75% B gehalten für 6 min, auf 20% B in 2 min, 20% B gehalten für 7 min. Das Injektionsvolumen betrug 5 μ L. Massenspektren wurden im Bereich von m/z 200 bis 1800 mit einer Auflösung von R = 25.000 aufgenommen. Die Electrospray-Spannung betrug 3,0 kV und die Temperatur der Transferkapillare 275°C.

Material und Methoden

9.12 Abspaltung des Moenocinolrests

5 mg Flavomycin® und 3,6 mg Bis(benzonitril)palladium(II)chlorid wurden in einem Gemisch aus 300 µL Wasser und 560 µL Acetonitril gelöst, 3 mg des stark sauren Kationenaustauschers (Dowex 50 WX8-100; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) in der Säureform zugegeben (es resultierte ein pH-Wert der Lösung von ca. 5) und über Nacht stehen gelassen. Zum Reaktionsansatz wurden 3 mL Wasser gegeben und einmal mit 1 mL Hexan und anschließend zweimal mit je 1 mL Dichlormethan ausgeschüttelt, um den Katalysator sowie den abgespaltenen Lipidrest zu entfernen. Anschließend wurde die wässrige Phase vom Kationenaustauscher abpipettiert.

Die Reaktionskontrolle erfolgte per DC auf Kieselgel mit Ethylacetat/2-Propanol/Wasser 4:5:5 (v/v/v) als Fließmittelgemisch (Moenomycine $R_f = 0,45$; Spaltprodukte $R_f = 0$ und $0,20$). Zur Detektion wurden Fluoreszenzlösung bei 254 nm (chromophore 2-Amino-Cyclopentan-1,3-dion-Gruppe) sowie Anisaldehyd/konz. H_2SO_4 /Ethanol 1:1:18 (v/v/v) als unspezifisches Sprühreagenz gefolgt von Erhitzen für 15 min auf 125 °C angewendet.

Im Vorfeld wurden Versuche zur Abspaltung des Moenocinolrests mit *Bacillus spec.* DSM 4675 (bezogen über die DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) und den im Folgenden genannten Enzymen unternommen:

Alkalische Phosphatase aus Schweineniere (Lyophilisat 116 DEA units/mg Protein), alkalische Phosphatase aus Kaninchendarm (0,46 units/mg Protein), saure Phosphatase aus Kartoffel (Lyophilisat 4,6 units/mg Protein) und Phospholipase C Typ 1 von *Clostridium perfringens* (*C. welchii*; Lyophilisat 3,8 units/mg Protein) bezogen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland). Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP; 1 unit /µL in TRIS-HCl-Puffer) und alkalische Phosphatase aus Shrimps (SAP; 1 unit /µL in TRIS-HCl-Puffer) bezogen von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland).

9.13 Herstellung der Moenomycin A-Chipoberfläche

Als Biosensorchip wurde ein Biacore® Sensor Chip CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) und als Laufpuffer 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA und 0,005% (w/v) TWEEN® 20 („HBS-EP“) verwendet. Vor Zugabe des Tensids wurde der Puffer mit 0,5 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt, membranfiltriert und entgast.

Die Aktivierung der Chipoberfläche erfolgte durch Injektion einer 1:1-Mischung (v/v; direkt vor Injektion vom Autosampler gemischt) von 0,4 M EDC-HCl und 0,1 M NHS mit einer Flussrate von 10 µL/min für 7 min. Anschließend wurde für 15 min mit einer Flussrate von 5 µL/min 0,7 mg/mL Moenomycin A-Aminderivat (s. Abschnitt 9.9) in Laufpuffer injiziert. Zur Desaktivierung wurde 1 M Ethanolamin pH 8,5 (eingestellt mit HCl) für 7 min mit 10 µL/min injiziert.

9.14 Kompetitiver Flavophospholipol-Assay

Es wurde der Sensorchip mit darauf immobilisiertem Moenomycin A-Aminderivat (s. Abschnitt 9.13) verwendet. Als Laufpuffer diente 25 mM Tris, 300 mM NaCl mit 0,3% CHAPS. Vor Lösen des CHAPS wurde der Puffer mit 2 M HCl auf pH 7,5 eingestellt und membranfiltriert. Nach Zugabe des Tensids wurde entgast. Kalibrierlösungen (0; 1; 2,5; 10; 30 µg/mL Flavophospholipol (Flavomycin®) wurden in Laufpuffer angesetzt.

Die zu analysierende Lösung wurde vor der Injektion 1:1 (v/v) mit 20 µg/mL (800 nM) *S. aureus* MtgA in Laufpuffer gemischt. Diese Mischung wurde für 150 s mit 10 µL/min injiziert. Die Regeneration erfolgte mit 1% SDS in Laufpuffer bei einer Flussrate von 40 µL/min für 30 s. Danach wurde zur Reinigung des mikrofluiden Systems und zur Signalstabilisierung mit 40 µL/min für 60 s Laufpuffer injiziert, im Anschluss das Injektionssystem gespült (Funktion „Extra Wash“) und eine Stabilisierungszeit von 60 s abgewartet.

Material und Methoden

Folgende Report Points wurden verwendet: „Basislinie“ 10 s vor Beginn und „Bindungslevel“ 30 s nach Ende der Injektion der 1:1-Mischung aus zu analysierender Lösung und MtgA, sowie „Regeneration“ 30 s nach Ende der Laufpufferinjektion.

Der MtgA-Bindungslevel wurde aus der Differenz zwischen dem Response am Report Point „Bindungslevel“ und dem Response am Report Point „Basislinie“ berechnet. Die quantitative Auswertung erfolgte über die Biacore Q[®] Evaluation Software mittels 4-Parameter-Logistik-Fit (4-parameter equation). Die allgemeine Form der Kalibrierfunktion lautet [321]:

$$R(c) = R_{hi} - \frac{R_{hi} - R_{lo}}{1 + \left(\frac{c}{A_1}\right)^{A_2}}$$

mit:

c: Flavophospholipol-Konzentration

R(c): Bindungslevel (in Abhängigkeit der Flavophospholipol-Konzentration c)

R_{hi}: maximaler Bindungslevel (≙ Response bei 0% Hemmung)

R_{lo}: minimaler Bindungslevel (≙ Response bei 100% Hemmung)

A₁ und A₂: Fittingkonstanten

Zu Beginn jeder Analyse wurden drei Zyklen („Aufwärmzyklus“) gemessen, bei denen anstelle einer Analytlösung Laufpuffer gemessen wurde. Diese Zyklen dienten der Equilibrierung des Messsystems und wurden nicht zur Auswertung herangezogen. Wurde die Analyse unmittelbar im Anschluss an eine bereits laufende Analyse gemessen, wurde nur ein Aufwärmzyklus gemessen.

9.15 Kompetitiver Assay mit *E. coli* PBP1b

Es wurde der Sensorchip mit darauf immobilisiertem Moenomycin A-Aminderivat (s. Abschnitt 9.13) verwendet. Als Laufpuffer diente 10 mM Tris, 3 mM EDTA, 150 mM NaCl mit 1% Triton X-100. Vor Lösen des Triton X-100 wurde der Puffer mit 0,5 M Maleinsäure auf pH 6,6 eingestellt und membranfiltriert. Nach Zugabe des Tensids

wurde entgast. Flavophospholipol-Lösungen (0,46 µg/mL bis 1 mg/mL Flavomycin®) in Laufpuffer wurden vor der Injektion 1:1 (v/v) mit 5 µg/mL (56 nM) *E. coli* PBP1b in Laufpuffer gemischt. Diese Mischung wurde für 5 min injiziert. Die Regeneration erfolgte durch Injektion von 1% SDS in Laufpuffer für 30 s. Danach wurde zur Reinigung des mikrofluiden Systems und zur Signalstabilisierung für 60 s Laufpuffer injiziert, im Anschluss das Injektionssystem gespült (Funktion „Extra Wash“) und eine Stabilisierungszeit von 60 s abgewartet. Alle Injektionen erfolgten bei einer Flussrate von 40 µL/min.

Bezüglich Aufwärmzyklen s. Abschnitt 9.14.

9.16 Homogenisierung und Dotierung der Futtermittelproben

Zur Herstellung der drei verschiedenen dotierten Futtermittelmatrixen wurden die in Abschnitt 12.1 im Detail beschriebenen Futtermittel verwendet. Die Futtermittel wurden mit der Universalmühle unter Wasserkühlung vermahlen. Anschließend wurde das gemahlene Material mittels Vibrationssiebmaschine durch Testsiebe der Maschenweite 0,850 mm und 0,630 mm gesiebt. Fraktionen >0,63 mm wurden erneut gemahlen. Nach bis zu zweimaligem Mahlvorgang wurden Pulver erhalten, bei denen >99% der Partikel <0,63 mm waren. Das Pulver wurde abschließend mit einem Löffelspatel erneut durchmischt.

Zum Dotieren der vermahlenden Futtermittel wurde der Premix Flavomycin 80 verwendet (Details zur Zusammensetzung in Abschnitt 12.2). Es wurde jeweils eine definierte Menge (auf 0,01 g genau) des gemahlenden Futtermittels vorgelegt und mit einer exakt eingewogenen Menge (auf 0,1 mg genau) des Premix vermischt. Anschließend wurde die Mischung homogenisiert, indem sie zunächst in der Universalmühle durchmischt und dann mittels Vibrationssiebmaschine durch Testsiebe der Maschenweite 0,850 mm und 0,630 mm gesiebt und abschließend manuell (Löffelspatel) durchmischt wurde. Von jedem Futtermittel wurde zunächst eine Vorverdünnung mit einem Flavophospholipol-Gehalt von 10 g/kg angesetzt (3,750 g Flavomycin 80 mit dem jeweiligen Futtermittel auf 30,00 g). Diese Vorverdünnung wurde erneut mit Futtermittel auf einen Flavophospholipol-Gehalt von

Material und Methoden

100 mg/kg verdünnt (0,300 g der ersten Vorverdünnung mit dem jeweiligen Futtermittel auf 30,00 g). Die Dotierung der Futtermittel ausgehend von der zweiten Vorverdünnung ist für das Ferkelaufzuchtfutter in Tabelle 13, für das Legehennenfutter in Tabelle 14 und für das Rindermastfutter in Tabelle 15 beschrieben.

Tabelle 13: Schema zur Dotierung des Alleinfutters für die Ferkelmast

Verdünnungsstufe	Futtermittel [g]	2. Vorverdünnung [g]
1 ppm	29,70	0,300
2 ppm	29,40	0,600
20 ppm	24,00	6,000

Tabelle 14: Schema zur Dotierung des Alleinfutters für Legehennen

Verdünnungsstufe	Futtermittel [g]	2. Vorverdünnung [g]
2 ppm	29,40	0,600
5 ppm	28,50	1,500

Tabelle 15: Schema zur Dotierung des Ergänzungsfuttermittels für die Rindermast

Verdünnungsstufe	Futtermittel [g]	2. Vorverdünnung [g]
2 ppm	29,40	0,600
10 ppm	27,00	3,000

9.17 Aufarbeitung der Futtermittelproben

Für die Aufarbeitung der Futtermittelproben wurden die folgenden Verfahren auf ihre Eignung geprüft. Die Analyse mittels SPR erfolgte nach der in Abschnitt 9.14 beschriebenen Methode.

Verfahren A:

5 g des Probenmaterials wurden auf 0,01 g genau in ein 45 mL-Zentrifugenglas eingewogen, mit 20,00 mL 25 mM Tris-Puffer pH 7,5 mit 300 mM NaCl (SPR-Laufpuffer ohne CHAPS) versetzt und auf dem Horizontalschüttler bei 115 rpm für 30 min extrahiert. Nach Zentrifugation bei 4400 g für 10 min wurden 10,00 mL des Überstands mit je 100 µL Carrez I- und Carrez II-Lösung versetzt (Carrez I: 150 mg/mL $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$; Carrez II: 300 mg/mL $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$), mit 0,1 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt (um überschüssiges Zink zu fällen), geschüttelt und bei 4400 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen PET-Spritzenvorsatzfilter (CHROMAFIL® Xtra PET-20/15 MS; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) filtriert und 200 µL des Filtrats mit 10 µL 6,3% CHAPS versetzt.

Verfahren B:

5 g des Probenmaterials wurden auf 0,01 g genau in ein 45 mL-Zentrifugenglas eingewogen, mit 20,00 mL Acetonitril/Wasser 2,5/1 (v/v) versetzt und auf dem Horizontalschüttler bei 115 rpm für 30 min extrahiert. 5,00 mL des Überstands wurden im Stickstoffstrom bei 100 °C zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit 5,00 mL 25 mM Tris-Puffer pH 7,5 mit 300 mM NaCl (SPR-Laufpuffer ohne CHAPS) versetzt, für 5 min im Ultraschallbad suspendiert und in ein 15 mL-PE-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden je 100 µL Carrez I- und Carrez II-Lösung zugegeben (Zusammensetzung wie bei Verfahren A), mit 0,1 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt, geschüttelt und bei 4400 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen PET-Spritzenvorsatzfilter (CHROMAFIL® Xtra PET-20/15 MS; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) filtriert und 200 µL des Filtrats mit 10 µL 6,3% CHAPS versetzt.

Material und Methoden

Verfahren C:

5 g des Probenmaterials wurden auf 0,01 g genau in ein 45 mL-Zentrifugenglas eingewogen, mit 20 mL Methanol versetzt und auf dem Horizontalschüttler bei 115 rpm für 30 min extrahiert. Anschließend wurde für 10 min bei 4400 g zentrifugiert. 5,00 mL des Überstands wurden im Stickstoffstrom bei 45 °C auf ca. 1 mL eingengt und die leicht trübe Lösung mit Wasser auf 10 mL aufgefüllt. Die resultierende, stark trübe Lösung wurde im Ultraschallbad für 5 min homogenisiert und im Anschluss per SPE an einer Oasis® HLB-Kartusche (6cc / 200 mg; Waters Corp., Milford, USA) aufgereinigt. Die Kartusche wurde vor der Probenaufgabe zunächst mit Methanol, dann mit Wasser (je 6 mL) konditioniert. Nach der Probenaufgabe wurde das Sorbens unter Vakuum getrocknet, nacheinander mit Dichlormethan/Hexan 1:1 (v/v), Ethylacetat und Ethylacetat/Methanol 3:1 (v/v) gewaschen (je 2 * 3 mL) und das Sorbens erneut unter Vakuum getrocknet. Die Elution erfolgte mit Methanol (2 * 3 mL). Das Eluat wurde im Stickstoffstrom bei 60 °C zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit 1,00 mL SPR-Laufpuffer (25 mM Tris, 300 mM NaCl, 0,3% CHAPS, pH 7,5) versetzt und im Ultraschallbad (5 min) in Lösung gebracht. Anschließend wurde durch einen PET-Spritzenvorsatzfilter (CHROMAFIL® Xtra PET-20/15 MS; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) filtriert.

Verfahren D:

5 g des Probenmaterials (auf 0,01 g genau) wurden per ASE mit Methanol extrahiert. Hierzu wurde das Probenmaterial zunächst mit 7-8 Löffelspateln Hydromatrix (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) in einer Porzellanschale vermischt und in eine ASE-Extraktionszelle überführt. Bei der anschließenden ASE wurde in 3 statischen Zyklen bei 100 °C und 120 bar extrahiert. Ein Zyklus bestand aus 5-minütiger Extraktion mit anschließender Spülung mit 0,2 Zellenvolumina frischem Methanol. Abschließend wurde für 140 s mit Stickstoff in das Auffanggefäß gespült. Der Extrakt wurde in ein 50 mL-PE-Zentrifugenröhrchen überführt, mit Methanol auf 50 mL aufgefüllt und zentrifugiert (10 min; 1835 g). 12,50 mL des Überstands wurden im Stickstoffstrom bei 45 °C auf ca. 1 mL eingengt und die leicht trübe Lösung mit Wasser auf 10 mL aufgefüllt. Die resultierende, stark trübe Lösung wurde im Ultraschallbad für 5 min homogenisiert und im Anschluss per SPE an einer Oasis®

HLB-Kartusche (6cc / 200 mg; Waters Corp., Milford, USA) aufgereinigt. Die Kartusche wurde vor der Probenaufgabe zunächst mit Methanol, dann mit Wasser (je 6 mL) konditioniert. Nach der Probenaufgabe wurde das Sorbens unter Vakuum getrocknet, nacheinander mit Dichlormethan/Hexan 1:1 (v/v), Ethylacetat und Ethylacetat/Methanol 3:1 (v/v) gewaschen (je 2 * 3 mL) und das Sorbens erneut unter Vakuum getrocknet. Die Elution erfolgte mit Methanol (2 * 3 mL). Das Eluat wurde auf 10 mL aufgefüllt, in zwei aliquote Teile von je 5 mL aufgeteilt und beide Aliquote im Stickstoffstrom bei 45 °C zur Trockne eingedampft. Der Rückstand eines Aliquots wurde für die Vergleichsanalytik per LC-HRMS (Abschnitt 9.18) mit 500 µL Wasser/Methanol 1:1 (v/v) versetzt und der Rückstand des zweiten Aliquots wurde mit 500 µL SPR-Laufpuffer (25 mM Tris, 300 mM NaCl, 0,3% CHAPS, pH 7,5) versetzt. Beide Aliquote wurden im Ultraschallbad für 5 min in Lösung gebracht und durch einen PET-Spritzenvorsatzfilter (CHROMAFIL® Xtra PET-20/15 MS; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) filtriert.

Im Zuge der Methodenentwicklung wurden folgende weitere Spritzenvorsatzfilter auf ihre Eignung getestet:

CHROMAFIL® Xtra RC-45/25, CHROMAFIL® Xtra H-PTFE-45/25 und CHROMAFIL® PVDF-20/15 MS (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland).

9.18 Analyse der Futtermittlextrakte per LC-HRMS

Für die Vergleichsanalytik der Futtermittlextrakte wurde eine LC-HRMS bestehend aus einer Thermo Finnigan Surveyor MS Pump Plus (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland), einem Säulenofen Modell Merck LaChrom® L-7350 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), einem PAL Autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz) und einem Exactive Orbitrap™-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Deutschland) verwendet. Die Trennung erfolgte an einer C18-Phase (Phenomenex Kinetex C18; 100 * 2,1 mm; 2,6 µm; 100 Å) mit Wasser (A) und Acetonitril (B) (jeweils mit 0,1% Ameisensäure) als Eluenten mit einer Flussrate von 200 µL/min. Es wurde folgender Gradient angewendet: 2% B für 1 min, auf 80% B in 6 min, auf 99% B in 7 min, 99% B gehalten für 3 min, auf 2% B in 3 min, 2% B

Material und Methoden

gehalten für 5 min. Das Injektionsvolumen betrug 10 μL . Die Ionisation erfolgte per ESI bei einer Kapillarspannung von 4 kV mit Polaritätswechsel (20 ms-Intervalle) und deaktivierter Quellenfragmentierungs-Option (In-Source CID). Die Massenspektren wurden im Bereich m/z 150 bis 1600 mit einer Auflösung von $R = 25.000$ aufgenommen.

Die Auswertung wurde mit der Software Thermo Xcalibur 3.0.63 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) durchgeführt. Die quantitative Auswertung erfolgte über die Peakflächen des im Negativionenmodus aus Moenomycin A erzeugten Ions $[\text{M-H}]^-$ (m/z 1580,6494 gefunden (-3,0 ppm); Bestimmung über den Massenbereich m/z 1580,64-1580,66). Folgende weitere Ionenspezies wurden ebenfalls gefunden: $[\text{M-2H}]^{2-}$ (m/z 789,8214; +2,5 ppm), $[\text{M-3H+Na}]^{2-}$ (m/z 800,8134; +1,2 ppm), $[\text{M-3H+K}]^{2-}$ (m/z 808,8001; +1,5 ppm).

9.19 Direkter SPR-Assay für PGT-Mutanten

Es wurde der Sensorchip mit darauf immobilisiertem Moenomycin A-Aminderivat (s. Abschnitt 9.13) verwendet. Als Laufpuffer diente 25 mM Tris, 300 mM NaCl mit 0,3% CHAPS. Vor Lösen des CHAPS wurde der Puffer mit 2 M HCl auf pH 7,5 eingestellt und membranfiltriert. Nach Zugabe des Tensids wurde entgast.

Lösungen der zu untersuchenden PGT in Laufpuffer wurden injiziert. Die Regeneration erfolgte mit 1% SDS in Laufpuffer für 30 s. Danach wurde zur Reinigung des mikrofluiden Systems und zur Signalstabilisierung für 60 s Laufpuffer injiziert, im Anschluss das Injektionssystem gespült (Funktion „Extra Wash“) und eine Stabilisierungszeit von 60 s abgewartet. Alle Injektionen erfolgten bei einer Flussrate von 40 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Bezüglich Aufwärmzyklen s. Abschnitt 9.14.

9.20 Kompetitiver SPR-Assay auf PGT-Inhibitoren

Es wurde der Sensorchip mit darauf immobilisiertem Moenomycin A-Aminderivat (s. Abschnitt 9.13) verwendet. Als Laufpuffer wurde (25 mM Tris-Puffer pH 7,5 mit 300 mM NaCl)/DMSO 9:1 (v/v) mit 0,3% CHAPS verwendet. Für die Analyse von Lipid II enthielt der Laufpuffer außerdem 3,4 mM EDTA. Vor dem Mischen mit DMSO wurde der pH-Wert des Puffers mit 2 M HCl eingestellt und membranfiltriert. CHAPS wurde nach Mischen mit DMSO gelöst. Nach Zugabe des Tensids wurde entgast.

Die zu analysierende Lösung wurde vor der Injektion 1:1 (v/v) mit 20 µg/mL (800 nM) *S. aureus* MtgA in Laufpuffer gemischt. Diese Mischung wurde für 150 s mit 10 µL/min injiziert. Die Regeneration erfolgte mit 1% SDS in Laufpuffer bei einer Flussrate von 40 µL/min für 30 s. Danach wurde zur Reinigung des mikrofluiden Systems und zur Signalstabilisierung mit 40 µL/min für 60 s Laufpuffer injiziert, im Anschluss das Injektionssystem gespült (Funktion „Extra Wash“) und eine Stabilisierungszeit von 60 s abgewartet.

Report Points und Berechnung der MtgA-Bindungslevel analog zum kompetitiven Flavophospholipol-Assay (Abschnitt 9.14).

Es wurden Verdünnungsreihen (Verdünnungsfaktor 3; jeweils Mischung 1:2 mit Laufpuffer) der Inhibitoren analysiert. Die Konzentrationsspannen betragen 7 nM bis 400 µM (Inhibitoren 21, 43, 44 und 62), 3 nM bis 200 µM (Inhibitoren 57 und 61), 3 nM bis 148 µM (Inhibitor 56) und 2 nM bis 120 µM (Lipid II).

Bezüglich Aufwärmzyklen s. Abschnitt 9.14.

10 Abkürzungsverzeichnis

3-PG	3-Phosphoglycerat
5'dA	5'-Desoxyadenosin
ADI	acceptable daily intake
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin
AMP	Adenosinmonophosphat
ASE	accelerated solvent extraction
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Attenuated total reflection (abgeschwächte Totalreflexion)
BIA	biomolekulare Interaktionsanalyse (auch: biospezifische Interaktionsanalyse)
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CDI	<i>N,N</i> -Carbonyldiimidazol
CHAPS	[3-(3-Cholanamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
ChNAc	<i>N</i> -Acetylchinosamin (<i>N</i> -Acetyl-6-deoxy-D-glucosamin)
CMC	critical micelle concentration (kritische Mizellbildungskonzentration)
CMD	Carboxymethyldextran
CoA	Coenzym A
Cob(II)alamin	Cobalamin (Cobalt in der Oxidationsstufe +II)
Dabsyl-	4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzolsulfonyl-
DAD	Diodenarray-Detektor
Dansyl-	5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonyl-
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
D-Glu	D-Glutaminsäure
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid
EDC-HCl	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EU	Europäische Union
FIA	fluorescence immunoassay
FPP	Farnesylpyrophosphat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GalUA	D-Galacturonsäure
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
GlcUA	D-Glucuronsäure
GlmM	Phosphoglucosamin-Mutase
GlmS	Glutamin-Fructose-6-phosphat-Transaminase
GlmU	Glucosamin-1 phosphat-N-Acetyl-Transferase
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GPP	Geranylpyrophosphat
GT	Glykosyltransferase
HAP (Bakterien)	high-activity ammonia-producing
HBS	HEPES buffered saline : 10 mM HEPES-Puffer pH 7,4 mit 150 mM NaCl
HBS-EP	HEPES buffered saline - EDTA Surfactant P20 : wie HBS, zusätzlich 3,4 mM EDTA und 0,005% Surfactant P20
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazino]ethansulfonsäure
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
HPIC	high performance ion chromatography (Hochleistungsenchromatographie)
HPLC	high performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
Hsr	Homoserin

Abkürzungsverzeichnis

HTS	high throughput screening (Hochdurchsatz-Screening)
HyDap	<i>meso</i> -2,6-Diamino-3-hydroxypimelinsäure
Hyg	<i>threo</i> -3-Hydroxyglutaminsäure
HyLys	5-Hydroxylysin
IFC	Integrated μ -Fluidic Cartridge
L,L-Dap	L,L-2,6-Diaminopimelinsäure
LED	Light emitting diode (Licht emittierende Diode)
Lys	Lysin
ManNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-Mannosamin
m-Dap	<i>meso</i> -2,6-Diaminopimelinsäure
MeCbl	Methylcobalamin
MGT	monofunktionelle Glykosyltransferase
MIC	minimal inhibitory concentration (minimale Hemm-Konzentration)
MIP	molecular imprinting polymer
MPLC	medium pressure liquid chromatography
MraY	Phospho- <i>N</i> -Acetylmuramoylpentapeptid-Transferase
MS	Massenspektrometrie bzw. Massenspektrometer
MurA	UDP- <i>N</i> -Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferase
MurB	UDP- <i>N</i> -Acetylmuramat-Dehydrogenase
MurC	UDP- <i>N</i> -Acetylmuramat-L-Alanin-Ligase
MurD	UDP- <i>N</i> -Acetylmuramoyl-L-Alanin-D-Glutamat-Ligase
MurE	UDP- <i>N</i> -Acetylmuramoyl-L-Alanyl-D-Glutamat-2,6-Diaminopimelat-Ligase
MurF	UDP- <i>N</i> -Acetylmuramoyltri-peptid-D-Alanyl-D-Alanin-Ligase
MurG	Undecaprenyldiphosphomuramoylpentapeptid β - <i>N</i> -Acetylglucosaminyl-Transferase
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NIR	Nahinfrarot
NOEC	no observed effect concentration (=NOEL: no observed effect level)

Abkürzungsverzeichnis

NTA	Nitrilotriessigsäure
N ^γ Ac-L-Dab	γ-N-acetylierte L-Diaminobuttersäure
Orn	Ornithin
PBP	Penicillin- Bindeprotein
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGT	Peptidoglykan-Glykosyltransferase
P _i	Phosphat
PP _i	Pyrophosphat
RIA	radioimmunoassay
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAM	Self-assembled monolayer (Selbstorganisierende Monoschicht)
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
Ser	Serin
SP	Surface plasmon (Oberflächenplasmon)
SPA	Scintillation Proximity Assay
SPE	solid phase extraction (Festphasenextraktion)
SPR	surface plasmon resonance (Oberflächenplasmonresonanz)
TFA	Trifluoressigsäure
ToF-MS	Time of Flight-Massenspektrometer
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat

11 Literatur

1. Ostash B, Walker S (2010) *Moenomycin family antibiotics: chemical synthesis, biosynthesis, and biological activity*. Nat Prod Rep 27(11):1594-1617.
2. Wang J, MacNeil JD, Kay JF (Hrsg) (2012) *Chemical analysis of antibiotic residues in food*. (Wiley Series in Mass Spectrometry). Wiley, Hoboken (New Jersey, USA).
3. Rice LB (2008) *Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE*. J Infect Dis 197(8):1079-1081.
4. Bauer F, Dost G (1965) *Moenomycin in Animal Nutrition*. Antimicrob Agents Ch 5:749-752.
5. Schmidt U, Woltersdorf W, Cremmling K, Schraml G (1975) *Rückstände in Schlachttierkörpern von Schweinen nach Verabreichung von Flavophospholipol*. Fleischwirtschaft 55(3):396-398.
6. Mulder RWA, van der Hulst-Van Arkel MC (1977) *Rückstände von Antibiotika in Muskulatur und Organen von Schlachtgeflügel*. Arch Lebensmittelhyg 28(1):17-20.
7. Huber G *Moenomycin and Related Phosphorus-Containing Antibiotics*. In: Hahn FE (Hrsg) (1979) *Mechanism of Action of Antibacterial Agents*. Springer, Berlin, Heidelberg. S 135-153.
8. Hamann J, Heeschen W (1983) *Zum Einfluß von Flavomycin auf die Milchmengenleistung und Milchzusammensetzung beim Rind*. Milchwissenschaft 38(1):9-13.
9. Walsh CT, Wenczewicz TA (2014) *Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective*. J Antibiot 67(1):7-22.
10. Welzel P (2005) *Syntheses around the Transglycosylation Step in Peptidoglycan Biosynthesis*. Chem Rev 105(12):4610-4660.
11. Lindner F, Wallhäusser K, Huber G (Erfinder); Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft vormals Meister Lucius & Brüning, Frankfurt/M.; Patent US 3674866 (A) - *Moenomycin and process for producing same*. Anmeldenummer: US 393760; Anmeldedatum: 01.09.1964.
12. Lindner F, Wallhäusser K, Huber G (Erfinder); Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft vormals Meister Lucius & Brüning, Frankfurt/M.; Patent DE 1113791 (B) - *Herstellung und Gewinnung des Antibiotikums Moenomycin*. Anmeldenummer: DE 1960F030506; Anmeldedatum: 10.02.1960.
13. Wallhäusser KH, Neseemann G, Präve P, Steigler A (1965) *Moenomycin, a new antibiotic. I. Fermentation and isolation*. Antimicrob Agents Ch 5:734-736.
14. Huber G, Schacht U, Weidenmüller HL, Schmidt-Thomé J, Duphorn J, Tschesche R (1965) *Moenomycin, a new antibiotic. II. Characterization and chemistry*. Antimicrob Agents Ch 5:737-742.
15. *Deutsches Patent- und Markenamt DPMAregister*. Online verfügbar unter: <https://register.dpma.de/DPMAregister/marke/einsteiger>.

Literatur

16. *Internetauftritt des Unternehmens Sanofi; Firmengeschichte*. Online verfügbar unter: <http://www.sanofi.de/l/de/de/layout.jsp?scat=24CA385F-2796-4CB8-B76B-B23CF924FFD8>.
17. *Internetauftritt der Zeitung Bloomberg Business; Company Overview Hoechst Roussel Vet GmbH*. Online verfügbar unter: <http://investing.businessweek.com/research/stocks/private/snapshot.asp?privcapId=29488>.
18. *Internetauftritt des Unternehmens Biovet; Mitteilung "Biovet to acquire certain parts of Intervet's feed additives business"*. Online verfügbar unter: <http://www.biovet.com/news2c.html>.
19. Ostash B, Campbell J, Luzhetskyy A, Walker S (2013) *MoeH5: a natural glycorandomizer from the moenomycin biosynthetic pathway*. Mol Microbiol 90(6):1324-1338.
20. Donnerstag A, Hennig L, Findeisen M, Welzel P, Haessner R (1996) *¹H NMR as a tool for the structure elucidation of moenomycin antibiotics*. Magn Reson Chem 34(12):1031-1035.
21. Kurz M, Guba W, Vertesy L (1998) *Three-dimensional structure of moenomycin A. A potent inhibitor of penicillin-binding protein 1b*. Eur J Biochem 252(3):500-507.
22. Huber G (1967) *Moenomycin, IV. Säurehydrolyse und Charakterisierung der Spaltprodukte*. Liebigs Ann Chem 707(1):170-176.
23. Tschesche R, Lenoir D, Weidenmüller HL (1969) *Über die Struktur des "Chromophors" im Antibiotikum Moenomycin*. Tetrahedron Lett 10(3):141-144.
24. Welzel P, Buhlke H, Michalke P, Simons J, Winterfeld L, Tschesche R et al. (1973) *Zur Struktur eines 2-Amino-cyclopentandion-1.3, Galakturonsäure und Chinovosamin enthaltenden Hydrolysebruchstücks des Antibiotikums Moenomycin A*. Tetrahedron Lett 14(3):227-230.
25. Welzel P, Witteler FJ, Mueller D (1976) *Die Verknüpfung von Moenocinol, Glycerinsäure und Phosphorsäure im Antibiotikum Moenomycin A*. Tetrahedron Lett 17(20):1665-1668.
26. Langenfeld N, Welzel P (1978) *D-Moenuronsäure (4-C-Methyl-D-glucuronsäure), ein neuer Baustein des Antibiotikums Moenomycin A*. Tetrahedron Lett 19(21):1833-1836.
27. Witteler FJ, Welzel P, Duddeck H, Hoefle G, Riemer W, Budzikiewicz H (1979) *Zur Struktur des Antibiotikums Moenomycin A*. Tetrahedron Lett 37:3493-3496.
28. Welzel P, Knupp G, Witteler FJ, Schubert T, Duddeck H, Mueller D et al. (1981) *Moenomycin A: Spaltung des Antibiotikums mit Trifluoressigsäure/2-Propanol und Bestimmung der Verknüpfung von D-Glucose und 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucose*. Tetrahedron 37(1):97-104.
29. Welzel P, Witteler FJ, Hermsdorf L, Riemer W (1981) *Die Ringgröße des Galakturonsäurebausteins im Antibiotikum Moenomycin A*. Tetrahedron 37(1):113-118.

30. Welzel P, Witteler FJ, Hermsdorf L, Tschesche R, Buhlke H, Michalke P et al. (1981) *Die Verknüpfung von 2-Aminocyclopentan-1,3-dion, D-Galacturonsäure und D-Chinvosamin im Antibiotikum Moenomycin A.* Tetrahedron 37(1):105-112.
31. Welzel P, Wietfeld B, Kunisch F, Schubert T, Hobert K, Duddeck H et al. (1983) *Moenomycin A: further structural studies and preparation of simple derivatives.* Tetrahedron 39(9):1583-1591.
32. Welzel P, Bulian HP, Maulshagen A, Mueller D, Snatzke G (1984) *Moenuronic acid: synthetic studies and absolute configuration.* Tetrahedron 40(19):3657-3666.
33. Welzel P, Kunisch F, Kruggel F, Stein H, Ponty A, Duddeck H (1984) *Stepwise degradation of moenomycin A.* Carbohydr Res 126(1):C1-C5.
34. Fehlhaber H, Girg M, Seibert G, Hobert K, Welzel P, van Heijenoort Y et al. (1990) *Moenomycin A: A structural revision and new structure-activity reactions.* Tetrahedron 46(5):1557-1568.
35. Scherkenbeck J, Hiltmann A, Hobert K, Bankova W, Siegels T, Kaiser M et al. (1993) *Structures of some moenomycin antibiotics - inhibitors of peptidoglycan biosynthesis.* Tetrahedron 49(15):3091-3100.
36. Heßler-Klintz M, Hobert K, Biallaß A, Siegels T, Hiegemann M, Maulshagen A et al. (1993) *The first moenomycin antibiotic without the methyl-branched uronic acid constituent.- Unexpected structure activity relations.* Tetrahedron 49(35):7667-7678.
37. Donnerstag A, Marzian S, Mueller D, Welzel P, Boettger D, Staerk A et al. (1995) *A structurally and biogenetically interesting moenomycin antibiotic.* Tetrahedron 51(7):1931-1940.
38. Arai M, Torikata A, Enokita R, Fukatsu H, Nakayama R, Yoshida K (1977) *Pholipomycin, a new member of phosphoglycolipid antibiotics. I. Taxonomy of producing organism and fermentation and isolation of pholipomycin.* J Antibiot 30(12):1049-1054.
39. Takahashi S, Serita K, Arai M, Seto H, Furihata K, Otake N (1983) *Structure of pholipomycin.* Tetrahedron Lett 24(5):499-502.
40. Taylor JG, Li X, Oberthür M, Zhu W, Kahne DE (2006) *The total synthesis of moenomycin A.* J Am Chem Soc 128(47):15084-15085.
41. Zehl M, Pittenauer E, Rizzi A, Allmaier G (2006) *Characterization of Moenomycin Antibiotic Complex by Multistage MALDI-IT/RTOF-MS and ESI-IT-MS.* J Am Soc Mass Spectr 17(8):1081-1090.
42. Uchida R, Iwatsuki M, Kim Y, Ohte S, Omura S, Tomoda H (2010) *Nosokomycins, new antibiotics discovered in an in vivo-mimic infection model using silkworm larvae. I: Fermentation, isolation and biological properties.* J Antibiot 63(4):151-155.
43. Uchida R, Iwatsuki M, Kim Y, Omura S, Tomoda H (2010) *Nosokomycins, new antibiotics discovered in an in vivo-mimic infection model using silkworm larvae. II: Structure elucidation.* J Antibiot 63(4):157-163.

Literatur

44. Makitrynsky R, Rebets Y, Ostash B, Zaburanyi N, Rabyk M, Walker S et al. (2010) *Genetic factors that influence moenomycin production in streptomycetes*. J Ind Microbiol Biot 37(6):559-566.
45. Lopatniuk M, Ostash B, Luzhetskyy A, Walker S, Fedorenko V (2014) *Generation and study of the strains of streptomycetes-heterologous hosts for the production of moenomycin*. Russ J Genet 50(4):360-365.
46. He H, Shen B, Korshalla J, Siegel MM, Carter GT (2000) *Isolation and structural elucidation of AC326-alpha, a new member of the moenomycin group*. J Antibiot 53(2):191-195.
47. Schacht U, Tschesche R, Duphorn I (Erfinder); Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft vormals Meister Lucius & Brüning, Frankfurt/M.; Patent US 3660569 (A) - *Process for Separating Moenomycin*. Anmeldenummer: US 3660569; Anmeldedatum: 30.11.1965.
48. Schacht U, Huber G (1969) *Moenomycin. VII. Isolation and properties of further components of the antibiotic moenomycin*. J Antibiot 22(12):597-602.
49. Tyaglov BV, Zvenigorodskii VI, Sizova IA (1997) *Quantitative chromatographic determination of moenomycin antibiotics*. JPC-J Planar Chromat 10(3):200-203.
50. Dietrich J, Mracek M, Sukatsch D, Nesemann G (Erfinder); Hoechst AG; Patent DE 2435260 (A1) - *Verfahren zur Herstellung von Moenomycin*. Anmeldenummer: DE 19742435260; Anmeldedatum: 23.07.1974.
51. Dietrich J, Mracek M, Sukatsch D, Nesemann G (Erfinder); Hoechst Aktiengesellschaft; Patent US 3992263 (A) - *Process for the preparation of moenomycin*. Anmeldenummer: US 05597668; Anmeldedatum: 21.07.1975.
52. Öppinger H, Körnlein M, Nesemann G, Oppermann A (Erfinder); Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft vormals Meister Lucius & Brüning, Frankfurt/M.; Patent DE 1210514 (B) - *Verfahren zur Herstellung von Moenomycin*. Anmeldenummer: DE 1963F041297; Anmeldedatum: 16.11.1963.
53. Endler K, Schuricht U, Hennig L, Welzel P, Holst U, Aretz W et al. (1998) *Exploratory investigations into the biosynthesis of the antibiotic moenomycin A*. Tetrahedron Lett 39:13-16.
54. Subramaniam-Niehaus B, Schneider T, Metzger JW, Wohlleben W (1997) *Isolation and analysis of moenomycin and its biosynthetic intermediates from Streptomyces ghanaensis (ATCC 14672) wild type and selected mutants*. Z Naturforsch C 52:217-226.
55. Neundorf I, Köhler C, Hennig L, Findeisen M, Arigoni D, Welzel P (2003) *Evidence for the combined participation of a C10 and a C15 precursor in the biosynthesis of moenocinol, the lipid part of the moenomycin antibiotics*. ChemBioChem 4(11):1201-1205.
56. Eichhorn P, Aga DS (2005) *Characterization of moenomycin antibiotics from medicated chicken feed by ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization*. Rapid Commun Mass Sp 19(15):2179-2186.

57. Gallo P, Fabbrocino S, Serpe L, Fiori M, Civitareale C, Stacchini P (2010) *Determination of the banned growth promoter moenomycin A in feed stuffs by liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Sp 24(7):1017-1024.
58. *Verzeichnis der zugelassenen Futtermittel-Zusatzstoffe, veröffentlicht gemäß Artikel 9t Buchstabe b) der Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung (Mitteilung 2004/C 50/01)* Der Rat der Europäischen Union, 25.02.2004; Amtsblatt der Europäischen Union C 50 vom 25.2.2004, S. 1–144.
59. *Bambermycins: Monograph Number 954*. In: O'Neil MJ, Smith M, Heckelman PE (Hrsg) (2001) *The Merck Index*. 13. Auflage. Merck & Co., Inc., New Jersey (USA).
60. Tschesche R, Duphorn I, Schacht U (Erfinder); Farbwerke Hoechst Aktiengesellschaft vormals Meister Lucius & Brüning, Frankfurt/M.; Patent DE 1236726 (B) - *Verfahren zur Trennung von Moenomycin-Komplex*. Anmeldenummer: DE 1964F044660; Anmeldedatum: 10.12.1964.
61. Salvatore MJ, Katz SE (1993) *Solubility of antibiotics used in animal feeds in selected solvents*. J AOAC Int 76(5):952-956.
62. Lantzsch G, Binder H, Heerklotz H, Welzel P, Klose G (1998) *Aggregation Behavior of the Antibiotic Moenomycin A in Aqueous Solution*. Langmuir 14(15):4095-4104.
63. Volke F, Waschipky R, Pampel A, Donnerstag A, Lantzsch G, Pfeiffer H et al. (1997) *Characterization of antibiotic moenomycin A interaction with phospholipid model membranes*. Chem Phys Lipids 85(2):115-123.
64. Anikin A, Buchynskyy A, Kempin U, Stembera K, Welzel P, Lantzsch G (1999) *Membrane anchoring and inter-vesicle transfer of a derivative of the antibiotic moenomycin A*. Angew Chem Int Ed 38(24):3703-3707.
65. Marzian S, Happel M, Wagner U, Mueller D, Welzel P, Fehlhaber H et al. (1994) *Moenomycin A: reactions at the lipid part. New structure-activity relations*. Tetrahedron 50(18):5299-5308.
66. Vogel S, Buchynskyy A, Stembera K, Richter K, Hennig L, Muller D et al. (2000) *Some Selective Reactions of Moenomycin A*. Bioorgan Med Chem Lett 10(17):1963-1965.
67. Welzel P (2007) *A long research story culminates in the first total synthesis of moenomycin A*. Angew Chem Int Ed 46(26):4825-4829.
68. Ostash B, Doud EH, Lin C, Ostash I, Perlstein DL, Fuse S et al. (2009) *Complete characterization of the seventeen step moenomycin biosynthetic pathway*. Biochemistry-US 48(37):8830-8841.
69. Doud EH, Perlstein DL, Wolpert M, Cane DE, Walker S (2011) *Two Distinct Mechanisms for TIM Barrel Prenyltransferases in Bacteria*. J Am Chem Soc 133(5):1270-1273.
70. Zhang W, Bolla ML, Kahne D, Walsh CT (2010) *A three enzyme pathway for 2-amino-3-hydroxycyclopent-2-enone formation and incorporation in natural product biosynthesis*. J Am Chem Soc 132(18):6402-6411.

Literatur

71. Ostash B, Saghatelian A, Walker S (2007) *A streamlined metabolic pathway for the biosynthesis of moenomycin A*. Chem Biol 14(3):257-267.
72. Ostash B, Doud E, Walker S (2012) *ABC transporter genes from Streptomyces ghanaensis moenomycin biosynthetic gene cluster: roles in antibiotic production and export*. Arch Microbiol 194(11):915-922.
73. Ginsberg C, Brown S, Walker S *Bacterial Cell Wall Components*. S 1535-1600.
74. Turner RD, Vollmer W, Foster SJ (2014) *Different walls for rods and balls: the diversity of peptidoglycan*. Mol Microbiol 91(5):862-874.
75. Schleifer KH, Kandler O (1972) *Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications*. Bacteriol Rev 36(4):407-477.
76. Smith WG, Gilboe DP, Henderson LM (1965) *Incorporation of Hydroxylysine into the Cell Wall and a Cell-Wall Precursor in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 89:136-140.
77. Crick DC, Mahapatra S, Brennan PJ (2001) *Biosynthesis of the arabinogalactan-peptidoglycan complex of Mycobacterium tuberculosis*. Glycobiology 11(9):107R.
78. Mahapatra S, Scherman H, Brennan PJ, Crick DC (2005) *N Glycolylation of the Nucleotide Precursors of Peptidoglycan Biosynthesis of Mycobacterium spp. Is Altered by Drug Treatment*. J Bacteriol 187(7):2341-2347.
79. van Heijenoort J (2007) *Lipid Intermediates in the Biosynthesis of Bacterial Peptidoglycan*. Microbiol Mol Biol R 71(4):620-635.
80. Technische Universität Braunschweig *BRENDA: The Comprehensive Enzyme Information System*. Online verfügbar unter: www.brenda-enzymes.org.
81. Sham L, Butler EK, Lebar MD, Kahne D, Bernhardt TG, Ruiz N (2014) *Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis*. Science 345(6193):220-222.
82. Smith CA (2006) *Structure, Function and Dynamics in the mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases*. J Mol Biol 362(4):640-655.
83. Vollmer W, Blanot D, Pedro MA de (2008) *Peptidoglycan structure and architecture*. FEMS Microbiol Rev 32(2):149-167.
84. Goffin C, Ghuysen JM (1998) *Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs*. Microbiol Mol Biol R 62(4):1079-1093.
85. Huang C, Shih H, Lin L, Tien Y, Cheng TR, Cheng W et al. (2012) *Crystal structure of Staphylococcus aureus transglycosylase in complex with a lipid II analog and elucidation of peptidoglycan synthesis mechanism*. P Natl Acad Sci USA 109(17):6496-6501.
86. Perlstein DL, Zhang Y, Wang T, Kahne DE, Walker S (2007) *The Direction of Glycan Chain Elongation by Peptidoglycan Glycosyltransferases*. J Am Chem Soc 129(42):12674-12675.
87. Terrak M, Nguyen-Disteche M (2006) *Kinetic characterization of the monofunctional glycosyltransferase from Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 188(7):2528-2532.

88. Lovering AL, Castro LH de, Lim D, Strynadka NCJ (2007) *Structural Insight into the Transglycosylation Step of Bacterial Cell-Wall Biosynthesis*. Science 315(5817):1402-1405.
89. Terrak M, Sauvage E, Derouaux A, Dehareng D, Bouhss A, Breukink E et al. (2008) *Importance of the Conserved Residues in the Peptidoglycan Glycosyltransferase Module of the Class A Penicillin-binding Protein 1b of Escherichia coli*. J Biol Chem 283(42):28464-28470.
90. Schwartz B, Markwalder JA, Seitz SP, Wang Y, Stein RL (2002) *A Kinetic Characterization of the Glycosyltransferase Activity of Escherichia coli PBP1b and Development of a Continuous Fluorescence Assay*. Biochemistry-US 41(41):12552-12561.
91. Terrak M (2008) *Peptidoglycan Glycosyltransferase Inhibition: New Perspectives for An Old Target*. Antiinfect Agents Med Chem 7(3):180-192.
92. Höltje JV (1998) *Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol R 62(1):181-203.
93. Mayer C (2005) *Wie Bakterien ihre Verpackung wiederverwerten: Mureinabbau und Recycling*. BIOSpektrum (Heidelb.) 11(5):616-619.
94. Ostash B, Walker S (2005) *Bacterial transglycosylase inhibitors*. Curr Opin Chem Biol 9(5):459-466.
95. Ruzin A, Singh G, Severin A, Yang Y, Dushin RG, Sutherland AG et al. (2004) *Mechanism of Action of the Mannopectimycins, a Novel Class of Glycopeptide Antibiotics Active against Vancomycin-Resistant Gram-Positive Bacteria*. Antimicrob Agents Ch 48(3):728-738.
96. Walker S, Chen L, Hu Y, Rew Y, Shin D, Boger DL (2005) *Chemistry and biology of ramoplanin: a lipoglycopeptide with potent antibiotic activity*. Chem Rev 105(2):449-476.
97. Chen L, Walker D, Sun B, Hu Y, Walker S, Kahne D (2003) *Vancomycin analogues active against vanA-resistant strains inhibit bacterial transglycosylase without binding substrate*. P Natl Acad Sci USA 100(10):5658-5663.
98. Leimkuhler C, Chen L, Barrett D, Panzone G, Sun B, Falcone B et al. (2005) *Differential Inhibition of Staphylococcus aureus PBP2 by Glycopeptide Antibiotics*. J Am Chem Soc 127(10):3250-3251.
99. Schubert T, Welzel P (1982) *Optisch aktive Glycerin-Derivate aus 1,3(R):4,6(R)-Di-O-benzyliden-D-mannit - Erste Strukturanaloga von Moenomycin A*. Angew Chem Int Ed 94(2):135-136.
100. Schubert T, Hobert K, Welzel P (1983) *Erste Strukturanaloga des Antibiotikums Moenomycin A*. Tetrahedron 39(13):2219-2221.
101. Welzel P, Kunisch F, Kruggel F, Stein H, Scherckenbeck J, Hiltmann A et al. (1987) *Moenomycin A: minimum structural requirements for biological activity*. Tetrahedron 43(3):585-598.
102. Hohgardt H, Dietrich W, Kühne H, Müller D, Grzelak D, Welzel P (1988) *Synthesis of two structural analogues of the smallest antibiotically active degradation product of moenomycin a*. Tetrahedron 44(18):5771-5790.

Literatur

103. Metten KH, Hobert K, Marzian S, Hackler UE, Heinz U, Welzel P et al. (1992) *The first enzymic degradation products of the antibiotic moenomycin A*. Tetrahedron 48(39):8401-8418.
104. Luening J, Moeller U, Mueller D, Welzel P, Markus A, van Heijenoort V et al. (1993) *The first synthesis of a moenomycin-type transglycosylase inhibitor*. Tetrahedron 49(46):10587-10596.
105. Möller U, Hobert K, Donnerstrag A, Wagner P, Müller D, Fehlhaber H et al. (1993) *Moenomycin A - Structure-activity relations synthesis of the D-galacturonamide analogue of the smallest antibiotically active degradation product of moenomycin A*. Tetrahedron 49(8):1635-1648.
106. Heuer M, Hohgardt K, Heinemann F, Kuehne H, Dietrich W, Grzelak D et al. (1994) *Structural analogs of the antibiotic moenomycin A with a D-glucose-derived unit F*. Tetrahedron 50(7):2029-2046.
107. Luening J, Markus A, Welzel P (1994) *Moenomycin-type transglycosylase inhibitors: inhibiting activity vs. topology around the phosphoric acid diester group*. Tetrahedron Lett 35(12):1859-1862.
108. Kempin U, Hennig L, Welzel P, Marzian S, Mueller D, Fehlhaber H et al. (1995) *Introduction of a terminal hydroxy group into the lipid part of a moenomycin-type transglycosylase inhibitor suppresses antibiotic activity*. Tetrahedron 51(31):8471-8482.
109. Kosmol R, Hennig L, Welzel P, Findeisen M, Muller D, Markus A et al. (1997) *A moenomycin-type structural analog of lipid II. Some possible mechanisms of the mode of action of transglycosylase inhibitors can be discarded*. J Prakt Chem 339(4):340-358.
110. Range G, Krähmer R, Welzel P, Müller D, Herrmann GF, Kragl U et al. (1997) *A chemoenzymatic approach towards moenomycin structural analogues*. Tetrahedron 53(5):1695-1706.
111. Ritzeler O, Hennig L, Findeisen M, Welzel P, Müller D, Markus A et al. (1997) *Synthesis of a trisaccharide analogue of moenomycin A12 Implications of new moenomycin structure-activity relationships*. Tetrahedron 53(5):1675-1694.
112. El-Abadla N, Lampilas M, Hennig L, Findeisen M, Welzel P, Müller D et al. (1999) *Moenomycin A: The role of the methyl group in the moenuronamide unit and a general discussion of structure-activity relationships*. Tetrahedron 55(3):699-722.
113. Ferse F, Floeder K, Hennig L, Findeisen M, Welzel P, Muller D et al. (1999) *Acceptor site recognition of transglycosylase inhibitors A beta-D-glucopyranosyl-(1→2)-alpha-D-glucopyranuronamide-derived moenomycin analogue*. Tetrahedron 55(12):3749-3766.
114. Riedel S, Donnerstag A, Hennig L, Welzel P, Richter J, Hobert K et al. (1999) *Synthesis and transglycosylase-inhibiting properties of a disaccharide analog of moenomycin A lacking substitution at C-4 of unit F*. Tetrahedron 55(7):1921-1936.
115. Vogel S, Stempera K, Hennig L, Findeisen M, Giesa S, Welzel P et al. (2001) *Moenomycin analogs with long-chain amine lipid parts from reductive amination*. Tetrahedron 57(19):4147-4160.

116. Vogel S, Stembera K, Hennig L, Findeisen M, Giesa S, Welzel P et al. (2001) *Moenomycin analogues with modified lipid side chains from indium-mediated Barbier-type reactions*. Tetrahedron 57(19):4139-4146.
117. Rühl T, Daghish M, Buchynskyy A, Barche K, Volke D, Stembera K et al. (2003) *Studies on the interaction of the antibiotic moenomycin A with the enzyme penicillin-binding protein 1b*. Bioorgan Med Chem 11(13):2965-2981.
118. Yuan Y, Fuse S, Ostash B, Sliz P, Kahne D, Walker S (2008) *Structural Analysis of the Contacts Anchoring Moenomycin to Peptidoglycan Glycosyltransferases and Implications for Antibiotic Design*. ACS Chem Biol 3(7):429-436.
119. Yang G, Mansourova M, Hennig L, Findeisen M, Oehme R, Giesa S et al. (2004) *Studies on the Synthesis of Di- and Trisaccharide Analogues of Moenomycin A. Modifications in Unit E and in the Lipid Part*. Helv Chim Acta 87(7):1807-1824.
120. Gampe CM, Tsukamoto H, Wang TA, Walker S, Kahne D (2011) *Modular synthesis of diphospholipid oligosaccharide fragments of the bacterial cell wall and their use to study the mechanism of moenomycin and other antibiotics*. Tetrahedron 67(51):9771-9778.
121. Yuan Y, Barrett D, Zhang Y, Kahne D, Sliz P, Walker S (2007) *Crystal structure of a peptidoglycan glycosyltransferase suggests a model for processive glycan chain synthesis*. P Natl Acad Sci USA 104(13):5348-5353.
122. Lovering AL, Castro L de, Strynadka, Natalie C J (2008) *Identification of dynamic structural motifs involved in peptidoglycan glycosyltransferase*. J Mol Biol 383(1):167-177.
123. Sung M, Lai Y, Huang C, Chou L, Shih H, Cheng W et al. (2009) *Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from Escherichia coli*. P Natl Acad Sci USA 106(22):8824-8829.
124. Heaslet H, Shaw B, Mistry A, Miller AA (2009) *Characterization of the active site of S. aureus monofunctional glycosyltransferase (Mtg) by site-directed mutation and structural analysis of the protein complexed with moenomycin*. J Struct Biol 167(2):129-135.
125. Fuse S, Tsukamoto H, Yuan Y, Wang TA, Zhang Y, Bolla M et al. (2010) *Functional and Structural Analysis of a Key Region of the Cell Wall Inhibitor Moenomycin: ACS Chemical Biology*. ACS Chem Biol 5(7):701-711.
126. Lovering AL, Gretes M, Strynadka, Natalie C J (2008) *Structural details of the glycosyltransferase step of peptidoglycan assembly*. Curr Opin Struc Biol 18(5):534-543.
127. Terrak M, Ghosh TK, van Heijenoort J, van Beeumen J, Lampilas M, Aszodi J et al. (1999) *The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of Escherichia coli*. Mol Microbiol 34(2):350-364.
128. Derouaux A, Sauvage E, Terrak M (2013) *Peptidoglycan glycosyltransferase substrate mimics as templates for the design of new antibacterial drugs*. Frontiers in Immunology 4:78.

Literatur

129. Perlstein DL, Andrew Wang T, Doud EH, Kahne D, Walker S (2010) *The Role of the Substrate Lipid in Processive Glycan Polymerization by the Peptidoglycan Glycosyltransferases*. J Am Chem Soc 132(1):48-49.
130. Cheng TR, Sung M, Liao H, Chang Y, Chen C, Huang C et al. (2008) *Domain requirement of moenomycin binding to bifunctional transglycosylases and development of high-throughput discovery of antibiotics*. P Natl Acad Sci USA 105(2):431-436.
131. Helassa N, Vollmer W, Breukink E, Vernet T, Zapun A (2012) *The membrane anchor of penicillin-binding protein PBP2a from Streptococcus pneumoniae influences peptidoglycan chain length*. FEBS J 279(11):2071-2081.
132. Adachi M, Zhang Y, Leimkuhler C, Sun B, LaTour JV, Kahne DE (2006) *Degradation and Reconstruction of Moenomycin A and Derivatives: Dissecting the Function of the Isoprenoid Chain: Journal of the American Chemical Society*. J Am Chem Soc 128(43):14012-14013.
133. Stembera K, Vogel S, Buchynskyy A, Ayala Juan A, Welzel P (2002) *A surface plasmon resonance analysis of the interaction between the antibiotic moenomycin A and penicillin-binding protein 1b*. ChemBioChem 3(6):559-565.
134. Shih H, Chang Y, Li W, Meng F, Huang C, Ma C et al. (2012) *Effect of the peptide moiety of Lipid II on bacterial transglycosylase*. Angew Chem Int Ed 51(40):10123-10126.
135. Dumbre S, Derouaux A, Lescrinier E, Piette A, Joris B, Terrak M et al. (2012) *Synthesis of Modified Peptidoglycan Precursor Analogues for the Inhibition of Glycosyltransferase*. J Am Chem Soc 134(22):9343-9351.
136. Butaye P, van Damme K, Devriese LA, van Damme L, Baele M, Lauwers S et al. (2000) *In vitro susceptibility of Enterococcus faecium isolated from food to growth-promoting and therapeutic antibiotics*. Int J Food Microbiol 54(3):181-187.
137. Johnston LM, Jaykus L (2004) *Antimicrobial Resistance of Enterococcus Species Isolated from Produce*. Appl Environ Microb 70(5):3133-3137.
138. Torikata A, Yoshikawa H, Katayama T, Arai M, Nakahara M, Kitano N (1977) *Pholipomycin, a new member of phosphoglycolipid antibiotics. III. Biological properties*. J Antibiot 30(12):1060-1063.
139. Halliday J, McKeveney D, Muldoon C, Rajaratnam P, Meutermans W (2006) *Targeting the forgotten transglycosylases*. Biochem Pharmacol 71(7):957-967.
140. Pfaller MA (2006) *Flavophospholipol use in animals: positive implications for antimicrobial resistance based on its microbiologic properties*. Diagn Micr Infec Dis 56(2):115-121.
141. Tseng Y, Liou J, Hsu T, Cheng W, Wu M, Wong C (2014) *Development of bacterial transglycosylase inhibitors as new antibiotics: Moenomycin A treatment for drug-resistant Helicobacter pylori*. Bioorgan Med Chem Lett 24(11):2412-2414.
142. Park W, Matsushashi M (1984) *Staphylococcus aureus and Micrococcus luteus peptidoglycan transglycosylases that are not penicillin-binding proteins*. J Bacteriol 157(2):538-544.

143. Di Berardino M, Dijkstra A, Stüber D, Keck W, Gubler M (1996) *The monofunctional glycosyltransferase of Escherichia coli is a member of a new class of peptidoglycan-synthesising enzymes*. FEBS Lett 392(2):184-188.
144. Baizman ER, Branstrom AA, Longley CB, Allanson N, Sofia MJ, Gange D et al. (2000) *Antibacterial activity of synthetic analogues based on the disaccharide structure of moenomycin, an inhibitor of bacterial transglycosylase*. Microbiology 146(12):3129-3140.
145. Vollmer W, Bertsche U (2008) *Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta 1778(9):1714-1734.
146. Den Blaauwen T, Pedro MA de, Nguyen-Distèche M, Ayala JA (2008) *Morphogenesis of rod-shaped sacculi*. FEMS Microbiol Rev 32(2):321-344.
147. Den Blaauwen T, Andreu JM, Monasterio O (2014) *Bacterial cell division proteins as antibiotic targets*. Bioorg Chem 55:27-38.
148. Rebets Y, Lupoli T, Qiao Y, Schirner K, Villet R, Hooper D et al. (2014) *Moenomycin Resistance Mutations in Staphylococcus aureus Reduce Peptidoglycan Chain Length and Cause Aberrant Cell Division*. ACS Chem Biol 9(2):459-467.
149. Eggert US, Ruiz N, Falcone BV, Branstrom AA, Goldman RC, Silhavy TJ et al. (2001) *Genetic basis for activity differences between vancomycin and glycolipid derivatives of vancomycin*. Science 294(5541):361-364.
150. Ruiz N, Falcone B, Kahne D, Silhavy TJ (2005) *Chemical conditionality: a genetic strategy to probe organelle assembly*. Cell 121(2):307-317.
151. Nishi H, Komatsuzawa H, Fujiwara T, McCallum N, Sugai M (2004) *Reduced Content of Lysyl-Phosphatidylglycerol in the Cytoplasmic Membrane Affects Susceptibility to Moenomycin, as Well as Vancomycin, Gentamicin, and Antimicrobial Peptides, in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Ch 48(12):4800-4807.
152. Leeson S (1984) *Growth and carcass characteristics of chicken and turkey broilers fed diets containing Flavomycin*. Can J Anim Sci 64(4):971-976.
153. He S, Zhou Z, Liu Y, Cao Y, Meng K, Shi P et al. (2010) *Effects of the antibiotic growth promoters flavomycin and florfenicol on the autochthonous intestinal microbiota of hybrid tilapia (Oreochromis niloticus ♀ × O. aureus ♂)*. Arch Microbiol 192(12):985-994.
154. Murray PJ, Winslow SG, Rowe JB (1992) *Conditions under which flavomycin increases wool growth and liveweight gain in sheep*. Aust J Agr Res 43(2):367-377.
155. van der Merwe B. J., Dugmore T. J., Walsh K. P. (2001) *The effect of flavophospholipol on milk production and milk urea nitrogen concentrations of grazing dairy cows*. S Afr J Anim Sci 31(2):101-105.
156. Edwards JE, McEwan NR, McKain N, Walker N, Wallace RJ (2005) *Influence of flavomycin on ruminal fermentation and microbial populations in sheep*. Microbiology+ 151(3):717-725.
157. Lin J (2014) *Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers*. Front Microbiol 5:33.

Literatur

158. Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F (2003) *Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed: Effects of Less Well Known Antibiotics on Gram-Positive Bacteria*. Clin Microbiol Rev 16(2):175-188.
159. Poole TL, McReynolds JL, Edrington TS, Byrd JA, Callaway TR, Nisbet DJ (2006) *Effect of flavophospholipol on conjugation frequency between Escherichia coli donor and recipient pairs in vitro and in the chicken gastrointestinal tract*. J Antimicrob Chemoth 58(2):359-366.
160. Slusarchyk WA (1971) *Chemical and biological aspects of a new family of phosphorus-containing antibiotics*. Biotechnol Bioeng 13(3):399-407.
161. Jeong S, Song Y, Cho J (2009) *Risk assessment of ciprofloxacin, flavomycin, olaquinox and colistin sulfate based on microbiological impact on human gut biota*. Regul Toxicol Pharm 53(3):209-216.
162. Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F (1998) *Effects of Different Test Conditions on MICs of Food Animal Growth-Promoting Antibacterial Agents for Enterococci*. J Clin Microbiol 36(7):1907-1911.
163. Sarmah AK, Meyer MT, Boxall, Alistair B A (2006) *A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment*. Chemosphere 65(5):725-759.
164. Apley MD, Bush EJ, Morrison RB, Singer RS, Snelson H (2012) *Use Estimates of In-Feed Antimicrobials in Swine Production in the United States*. Foodborne Pathog Dis 9(3):272-279.
165. Diarra MS, Malouin F (2014) *Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives*. Frontiers in microbiology 5:282.
166. Krishnasamy V, Otte J, Silbergeld E (2015) *Antimicrobial use in Chinese swine and broiler poultry production*. Antimicrob Resist Infect Control 4:17.
167. *Richtlinie 70/524/EWG des Rates vom 23. November 1970 über Zusatzstoffe in der Tierernährung (RL 70/524/EWG)* Der Rat der Europäischen Union, 23.11.1970; Amtsblatt der Europäischen Union L 270 vom 14.12.1970, S. 1-17.
168. *Futtermittelverordnung* Die Bundesministerin für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, 08.04.1981; BGBl. I, S. 352.
169. *Dreiunddreißigste Richtlinie 80/678/EWG der Kommission vom 4. Juli 1980 zur Änderung der Anhänge der Richtlinie 70/524/EWG des Rates über Zusatzstoffe in der Tierernährung (RL 80/678/EWG)* Die Kommission der Europäischen Gemeinschaften, 04.07.1980; Amtsblatt der Europäischen Union L 185 vom 18.7.1980, S. 48–50.
170. Mounsey SP (2005) *Handbook of Feed Additives 2005*. Simon Mountsey Ltd., Chesterfield (England).
171. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB et al. (2009) *Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America*. Clin Infect Dis 48(1):1-12.

172. *Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments Und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung (VO(EG) Nr. 1831/2003)* Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union, 22.09.2003; Amtsblatt der Europäischen Union L 268 vom 18.10.2003, S. 29–43.
173. *Verordnung (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 29. April 2004 über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz (VO(EG) Nr. 882/2004)* Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union, 29.04.2004; Amtsblatt der Europäischen Union L 165 vom 30.4.2004, S. 1–141.
174. *Internetauftritt des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL); Integrierter mehrjähriger Kontrollplan der Bundesrepublik Deutschland.* Online verfügbar unter: http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/02_MNKP/lm_mnkp_node.html.
175. *Internetauftritt des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL); Kontrollprogramm Futtermittel.* Online verfügbar unter: http://www.bvl.bund.de/DE/02_Futtermittel/01_Aufgaben/02_Amt_Futtermittelueberwachung/03_kontrollprogrammFuttermittel/fm_kontrollprogramm_futtermittelsicherheit_node.html.
176. *Internetauftritt des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL); Kontrollprogramm Futtermittel für die Jahre 2012 bis 2016.* Online verfügbar unter: http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Tier/Futtermittel/KontrollprogrammFuttermittel_2012_2016.html.
177. Sofia MJ, Allanson N, Hatzenbuehler NT, Jain R, Kakarla R, Kogan N et al. (1999) *Discovery of novel disaccharide antibacterial agents using a combinatorial library approach.* J Med Chem 42(17):3193-3198.
178. Garneau S, Qiao L, Chen L, Walker S, Vederas JC (2004) *Synthesis of mono- and disaccharide analogs of moenomycin and lipid II for inhibition of transglycosylase activity of penicillin-binding protein 1b.* Bioorgan Med Chem 12(24):6473-6494.
179. Hsu C, Schelwies M, Enck S, Huang L, Huang S, Chang Y et al. (2014) *Iminosugar C-glycoside analogues of α -D-GlcNAc-1-phosphate: synthesis and bacterial transglycosylase inhibition.* J Org Chem 79(18):8629-8637.
180. Lin C, Chen K, Hu C, Yun W, Cheng W (2015) *Synthesis of 1-C-Glycoside-Linked Lipid II Analogues Toward Bacterial Transglycosylase Inhibition.* Chem Eur J 21(20):7511-7519.
181. Cheng TR, Wu Y, Yang S, Lo K, Chen S, Chen Y et al. (2010) *High-throughput identification of antibacterials against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) and the transglycosylase.* Bioorgan Med Chem 18(24):8512-8529.

Literatur

182. Gampe CM, Tsukamoto H, Doud EH, Walker S, Kahne D (2013) *Tuning the Moenomycin Pharmacophore To Enable Discovery of Bacterial Cell Wall Synthesis Inhibitors*. J Am Chem Soc 135(10):3776-3779.
183. Huang S, Wu W, Huang L, Huang W, Fu W, Chen P et al. (2013) *New Continuous Fluorometric Assay for Bacterial Transglycosylase Using Förster Resonance Energy Transfer*. J Am Chem Soc 135(45):17078-17089.
184. Yang M, Zhou L, Zuo Z, Tang X, Liu J, Ma X (2008) *Structure-based virtual screening for glycosyltransferase 51*. Mol Simulat 34(9):849-856.
185. Derouaux A, Turk S, Olrichs NK, Gobec S, Breukink E, Amoroso A et al. (2011) *Small molecule inhibitors of peptidoglycan synthesis targeting the lipid II precursor*. Biochem Pharmacol 81(9):1098-1105.
186. Wang Y, Chan F, Sun N, Lui H, So P, Yan S et al. (2014) *Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of isatin derivatives as potential glycosyltransferase inhibitors*. Chem Biol Drug Des 84(6):685-696.
187. Pikkemaat MG (2009) *Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals*. Anal Bioanal Chem 395(4):893-905.
188. *Achte Richtlinie der Kommission vom 15. Juni 1978 zur Festlegung gemeinschaftlicher Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln (78/633/EWG) (RL 78/633/EWG)* Die Kommission der Europäischen Gemeinschaften, 15.06.1978; Amtsblatt der Europäischen Union L 206 vom 29.7.1978, S. 43–55.
189. *Verordnung über Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Futtermittelüberwachung (Futtermittel-Probenahme- und -Analyse-Verordnung)* Der Bundesminister für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, 21.03.1978; BGBl. I, S. 414.
190. *Verordnung (EG) Nr. 152/2009 der Kommission vom 27. Januar 2009 zur Festlegung der Probenahmeverfahren und Analysemethoden für die amtliche Untersuchung von Futtermitteln (VO(EG) Nr. 152/2009)* Die Kommission der Europäischen Gemeinschaften, 27.01.2009; Amtsblatt der Europäischen Union L 54 vom 26.2.2009, S. 1–130.
191. Präve P (1967) *Semiautomatic Assay of the Antibiotic Moenomycin*. Appl Environ Microb 15(4):950-951.
192. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (ehemals § 35 LMBG); Methode L 01.00-11; Untersuchung von Lebensmitteln - Suchverfahren auf das Vorhandensein von Antiinfektiva in Milch - Agar-Diffusions-Verfahren mit Bacillus stearothermophilus (Brillantschwarz-Reduktionstest)*, Berlin. Beuth.
193. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) *Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB (ehemals § 35 LMBG); Methode L 01.01-5; Nachweis von Hemmstoffen in Sammelmilch - Agar-Diffusionsverfahren (Brillantschwarz-Reduktionstest)*, Berlin. Beuth.
194. Frank H (1965) *Nachweis von Hemmstoffen in Milch und Milchpulver*. Milchwissenschaft 20(7):361-365.

195. Grynne B (1973) *Identification of small amounts of antibiotics by electrophoresis and bioautography*. APMIS 81B(5):583-588.
196. Langner HJ, Teufel U, Siegert M, Frommhold M (1973) *Chemical and Microbiological Determination of Antibiotics - Microbiological Determination of Various Antibiotics*. Chem Mikrobiol Technol Lebensm 2:71-78.
197. Salvatore MJ, Katz SE (1993) *Unified Procedure for the Determination of Antibiotics in Animal Feeds*. J AOAC Int 76(3):514-525.
198. Ionova I, Petkov R (1985) *[Electrophoretic method of demonstrating antibiotic residues in meat and eggs]*. Vet Med Nauki 22(9):78-84.
199. Rybinska K (1982) *[Flavomycin determination in poultry meat]*. Rocznik Panstw Zakl Hig 33(4):323-325.
200. Rybinska K (1984) *[Flavomycin detection in eggs]*. Rocznik Panstw Zakl Hig 35(2):131-133.
201. Pérez S, McJury BE, Eichhorn P, Aga DS (2007) *Determination of the antimicrobial growth promoter moenomycin-A in chicken litter*. J Chrom A 1175(2):234-241.
202. Nič M, Jirát J, Košata B, Jenkins A, McNaught A (2009) *IUPAC (Compendium of Chemical Terminology [the "Gold Book"])*. 2. Auflage. IUPAC, Research Triangle Park (North Carolina, USA).
203. Thevenot DR, Tóth K, Durst RA, Wilson GS (1999) *Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification*. Pure Appl Chem 71(12):2333-2348.
204. Nakamura H, Karube I (2003) *Current research activity in biosensors*. Anal Bioanal Chem 377(3):446-468.
205. Kretschmann E, Raether H (1968) *Radiative decay of non radiative surface plasmons excited by light*. Z Naturforsch A 23(12):2135-2136.
206. Schasfoort RBM (2008) *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Royal Society of Chemistry, Cambridge (England).
207. Baird CL, Myszka DG (2001) *Current and emerging commercial optical biosensors*. J Mol Recognit 14(5):261-268.
208. Cooper MA (2002) *Optical biosensors in drug discovery*. Nat Rev Drug Discov 1(7):515-528.
209. Guo X (2012) *Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review*. J Biophotonics 5(7):483-501.
210. McGrath TF, Buijs J, Huet AC, Delahaut P, Elliott CT, Mooney MH (2013) *Assessment of a multiplexing high throughput immunochemical SPR biosensor in measuring multiple proteins on a single biosensor chip*. Sensor Actuat B-Chem 186:423-430.
211. Breault-Turcot J, Masson J (2012) *Nanostructured substrates for portable and miniature SPR biosensors*. Anal Bioanal Chem 403(6):1477-1484.
212. Homola J (2006) *Surface Plasmon Resonance Based Sensors*. (Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors; Band 4). Springer, Berlin, Heidelberg.

Literatur

213. Liedberg B, Nylander C, Lundström I (1995) *Biosensing with surface plasmon resonance — how it all started*. *Biosens Bioelectron* 10(8):i.
214. Biacore AB (Hrsg), Markey F (1999) *What is SPR anyway?* *BIA journal* 1:14-17.
215. Otto A (1968) *Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection*. *Z Phys* 216(4):398-410.
216. Liedberg B, Lundström I, Stenberg E (1993) *Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance*. *Sensor Actuat B-Chem* 11:63-72.
217. Biacore AB (Hrsg) (2005) *Biacore® Q Instrument Handbook*.
218. Quinn JG, O'Neill S, Doyle A, McAtamney C, Diamond D, MacCraith BD et al. (2000) *Development and Application of Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors for the Detection of Cell-Ligand Interactions*. *Anal Biochem* 281(2):135-143.
219. Fägerstam LG, Frostell-Karlsson Å, Karlsson R, Persson B, Rönnberg I (1992) *Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis: 9th International Symposium on Affinity Chromatography and Biological Recognition*. *J Chrom A* 597:397-410.
220. Abbas A, Linman MJ, Cheng Q (2011) *New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors*. *Biosens Bioelectron* 26(5):1815-1824.
221. Homola J, Yee SS, Gauglitz G (1999) *Surface plasmon resonance sensors: review*. *Sensor Actuat B-Chem* 54:3-15.
222. Alves ID, Park CK, Hruby VJ (2005) *Plasmon Resonance Methods in GPCR Signaling and Other Membrane Events*. *Curr Protein Pept Sci* 6(4):293-312.
223. Nice EC, Catimel B (1999) *Instrumental biosensors: new perspectives for the analysis of biomolecular interactions*. *Bioessays* 21(4):339-352.
224. Oshannessy DJ, Brighamburke M, Sonesson KK, Hensley P, Brooks I (1993) *Determination of Rate and Equilibrium Binding Constants for Macromolecular Interactions Using Surface Plasmon Resonance: Use of Nonlinear Least Squares Analysis Methods*. *Anal Biochem* 212(2):457-468.
225. Morton TA, Myszka DG, Chaiken IM (1995) *Interpreting Complex Binding Kinetics from Optical Biosensors: A Comparison of Analysis by Linearization, the Integrated Rate Equation, and Numerical Integration*. *Anal Biochem* 227(1):176-185.
226. Biacore AB (Hrsg) (2001) *Biacore® Concentration Analysis Handbook [Edition December 2001 (Version AA)]*.
227. Löfas S, Johnsson B (1990) *A Novel Hydrogel Matrix on Gold Surfaces in Surface Plasmon Resonance Sensors for Fast and Efficient Covalent Immobilization of Ligands*. *J Chem Soc Chem Comm*(21):1526-1528.
228. Cooper M (2003) *Label-free screening of bio-molecular interactions*. *Anal Bioanal Chem* 377(5):834-842.

229. Karlsson R, Roos H, Fägerstam L, Persson B (1994) *Kinetic and Concentration Analysis Using BIA Technology*. *Methods* 6(2):99-110.
230. Day YSN, Baird CL, Rich RL, Myszka DG (2002) *Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods*. *Protein Sci* 11(5):1017-1025.
231. Biacore AB (Hrsg) (2003) *Biacore® Sensor Surface Handbook*.
232. Bain CD, Evall J, Whitesides GM (1989) *Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent*. *J Am Chem Soc* 111(18):7155-7164.
233. Wink T, van Zuilen SJ, Bult A, van Bennekom WP (1997) *Self-assembled Monolayers for Biosensors*. *Analyst* 122(4):43R-50R.
234. Kankate L, Turchanin A, Göhlhäuser A (2009) *On the Release of Hydrogen from the S-H groups in the Formation of Self-Assembled Monolayers of Thiols*. *Langmuir* 25(18):10435-10438.
235. Chen P, Nien P, Wu C, Wu T, Lin C, Ho K (2009) *Fabrication of a molecularly imprinted polymer sensor by self-assembling monolayer/mediator system*. *Anal Chim Acta* 643:38-44.
236. Choi S, Chang H, Lee N, Kim J, Chun HS (2009) *Detection of Mycoestrogen Zearalenone by a Molecularly Imprinted Polypyrrole-Based Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor*. *J Agr Food Chem* 57(4):1113-1118.
237. Frasconi M, Tel-Vered R, Riskin M, Willner I (2010) *Surface Plasmon Resonance Analysis of Antibiotics Using Imprinted Boronic Acid-Functionalized Au Nanoparticle Composites*. *Anal Chem* 82(6):2512-2519.
238. Rich RL, Myszka DG (2007) *Survey of the year 2006 commercial optical biosensor literature*. *J Mol Recognit* 20(5):300-366.
239. Rich RL, Myszka DG (2008) *Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature*. *J Mol Recognit* 21(6):355-400.
240. Löfas S, Johnsson B, Edström Å, Hansson A, Lindquist G, Hillgren RM et al. (1995) *Methods for site controlled coupling to carboxymethyl dextran surfaces in surface plasmon resonance sensors*. *Biosens Bioelectron* 10:813-822.
241. Johnsson B, Löfås S, Lindquist G (1991) *Immobilization of proteins to a carboxymethyl dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors*. *Anal Biochem* 198(2):268-277.
242. Cuatrecasas P, Parikh I (1972) *Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose*. *Biochemistry-US* 11(12):2291-2299.
243. Spinke J, Liley M, Guder, H. J., Angermaier L, Knoll W (1993) *Molecular recognition at self-assembled monolayers: the construction of multicomponent multilayers*. *Langmuir* 9(7):1821-1825.
244. Johnsson B, Löfås S, Lindquist G, Edström Å, Hillgren RM, Hansson A (1995) *Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies*. *J Mol Recognit* 8:125-131.

Literatur

245. Autorenkollektiv *RÖMPP Online*. Online verfügbar unter: <http://www.roempp.com/prod/>. Stichwort: Streptavidin
246. Gershon PD, Khilko S (1995) *Stable chelating linkage for reversible immobilization of oligohistidine tagged proteins in the BIAcore surface plasmon resonance detector*. J Immunol Methods 183(1):65-76.
247. Oshannessy DJ, Odonnell KC, Martin J, Brighamburke M (1995) *Detection and Quantitation of Hexa-Histidine-Tagged Recombinant Proteins on Western Blots and by a Surface Plasmon Resonance Biosensor Technique*. Anal Biochem 229(1):119-124.
248. Nieba L, Nieba-Axmann SE, Persson A, Hämäläinen M, Edebratt F, Hansson A et al. (1997) *BIACORE Analysis of Histidine-Tagged Proteins Using a Chelating NTA Sensor Chip*. Anal Biochem 252(2):217-228.
249. Einhauer A, Jungbauer A (2001) *The FLAG(TM) peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins*. J Biochem Bioph Meth 49:455-465.
250. Andersson K, Hamalainen M, Malmqvist M (1999) *Identification and Optimization of Regeneration Conditions for Affinity-Based Biosensor Assays. A Multivariate Cocktail Approach*. Anal Chem 71(13):2475-2481.
251. Andersson K, Areskoug D, Hardenborg E (1999) *Exploring buffer space for molecular interactions*. J Mol Recognit 12(5):310-315.
252. Myszka DG (1999) *Improving biosensor analysis*. J Mol Recognit 12(5):279-284.
253. McGrath TF, Elliott CT, Fodey TL (2012) *Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food*. Anal Bioanal Chem 403(1):75-92.
254. Rich RL, Myszka DG (2005) *Survey of the year 2004 commercial optical biosensor literature*. J Mol Recognit 18(6):431-478.
255. Rich RL, Myszka DG (2006) *Survey of the year 2005 commercial optical biosensor literature*. J Mol Recognit 19(6):478-534.
256. Aretz J, Rademacher C (2015) *Fragmentbasierte Wirkstoffentwicklung*. Nachr Chem 63(2):116-121.
257. Ricci F, Volpe G, Micheli L, Palleschi G (2007) *A review on novel developments and applications of immunosensors in food analysis*. Anal Chim Acta 605(2):111-129.
258. Petz M (2009) *Recent applications of surface plasmon resonance biosensors for analyzing residues and contaminants in food*. Monatsh Chem 140(8):953-964.
259. Lu Y, Xia Y, Pan M, Wang X, Wang S (2014) *Development of a Surface Plasmon Resonance Immunosensor for Detecting Melamine in Milk Products and Pet Foods*. J Agr Food Chem 62(51):12471-12476.
260. Arugula MA, Zhang Y, Simonian AL (2013) *Biosensors as 21st Century Technology for Detecting Genetically Modified Organisms in Food and Feed*. Anal Chem 86(1):119-129.

261. Dorokhin D, Haasnoot W, Franssen MR, Zuilhof H, Nielen MF (2011) *Imaging surface plasmon resonance for multiplex microassay sensing of mycotoxins*. Anal Bioanal Chem 400(9):3005-3011.
262. Huet A, Delahaut P, Fodey T, Haughey SA, Elliott C, Weigel S (2010) *Advances in biosensor-based analysis for antimicrobial residues in foods*. TrAC-Trend Anal Chem 29(11):1281-1294.
263. Cacciatore G, Petz M, Rachid S, Hakenbeck R, Bergwerff AA (2004) *Development of an optical biosensor assay for detection of β -lactam antibiotics in milk using the penicillin-binding protein 2x**. Anal Chim Acta 520:105-115.
264. Caldwell M, Stead SL, Day J, Sharman M, Situ C, Elliott C (2005) *Development and Validation of an Optical SPR Biosensor Assay for Tylosin Residues in Honey*. J Agr Food Chem 53(19):7367-7370.
265. DiCuollo CJ, Miller JA, Miller CR (1973) *Tissue residue studies in swine treated with virginiamycin*. J Agr Food Chem 21(5):818-821.
266. Ferguson, J. P., Baxter, G. A., McEvoy, J. D. G., Stead S, Rawlings E, Sharman M (2002) *Detection of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk, honey and meat samples using an optical biosensor*. Analyst 127(7):951-956.
267. Haasnoot W, Bienenmann-Ploum M, Kohen F (2003) *Biosensor immunoassay for the detection of eight sulfonamides in chicken serum*. Anal Chim Acta 483:171-180.
268. Moeller N, Mueller-Seitz E, Scholz O, Hillen W, Bergwerff AA, Petz M (2006) *A new strategy for the analysis of tetracycline residues in foodstuffs by a surface plasmon resonance biosensor*. Eur Food Res Technol 224(3):285-292.
269. Andree U (2009) *Beitrag zur Biosensoranalytik von Tetracyclintrückständen in Lebensmitteln mittels Oberflächenplasmonresonanz [Dissertation]*, Bergische Universität Wuppertal; Lebensmittelchemie; Persistenter Identifier (Uniform Resource Name): urn:nbn:de:hbz:468-20090680.
270. Andree U, Mueller-Seitz E, Usai I, Loeber S, Gmeiner P, Wimmer C et al. (2010) *Tetracycline sensing using novel doxycycline derivatives immobilized on different surface plasmon resonance biosensor surfaces*. Bioanalysis 2(2):217-227.
271. Krause SJ (2013) *SPR-Analytik von Tetracyclinen in Matrices tierischer Herkunft [Dissertation]*, Bergische Universität Wuppertal; Lebensmittelchemie; Persistenter Identifier (Uniform Resource Name): urn:nbn:de:hbz:468-20131023-092150-6.
272. Kirchgeßner M (2004) *Tierernährung (Leitfaden für Studium, Beratung und Praxis*. 11. Auflage. DLG-Verlag, Frankfurt am Main.
273. Tüdös AJ, Lucas-van den Bos, Elly R., Stigter, Edwin C. A. (2003) *Rapid Surface Plasmon Resonance-Based Inhibition Assay of Deoxynivalenol*. J Agr Food Chem 51(20):5843-5848.
274. Yuan J, Deng D, Lauren DR, Aguilar M, Wu Y (2009) *Surface plasmon resonance biosensor for the detection of ochratoxin A in cereals and beverages*. Anal Chim Acta 656:63-71.

Literatur

275. Kadota T, Takezawa Y, Hirano S, Tajima O, Maragos CM, Nakajima T et al. (2010) *Rapid detection of nivalenol and deoxynivalenol in wheat using surface plasmon resonance immunoassay*. *Anal Chim Acta* 673(2):173-178.
276. Meneely J, Fodey T, Armstrong L, Sulyok M, Krska R, Elliott C (2010) *Rapid Surface Plasmon Resonance Immunoassay for the Determination of Deoxynivalenol in Wheat, Wheat Products, and Maize-Based Baby Food*. *J Agr Food Chem* 58(16):8936-8941.
277. Meneely JP, Sulyok M, Baumgartner S, Krska R, Elliott CT (2010) *A rapid optical immunoassay for the screening of T-2 and HT-2 toxin in cereals and maize-based baby food*. *Talanta* 81:630-636.
278. Stembera K, Buchynskyy A, Vogel S, Knoll D, Osman AA, Ayala JA et al. (2002) *Moenomycin-mediated affinity purification of penicillin-binding protein 1b*. *ChemBioChem* 3(4):332-340.
279. Buchynskyy A, Stembera K, Knoll D, Vogel S, Kempin U, Biallass A et al. (2002) *Synthesis of tools for raising antibodies against moenomycin epitopes and initial immunological studies*. *Tetrahedron* 58(38):7741-7760.
280. Liu H, Wong C (2006) *Characterization of a transglycosylase domain of Streptococcus pneumoniae PBP1b*. *Bioorgan Med Chem* 14(21):7187-7195.
281. Rühl T, Volke D, Stembera K, Hatanaka Y, Hennig H, Schumer F et al. (2002) *Isoserine-based biotinylated photoaffinity probes that interact with penicillin-binding protein 1b*. *Chem Commun* 2002(15):1630-1631.
282. Schwartz B, Markwalder JA, Wang Y (2001) *Lipid II: Total Synthesis of the Bacterial Cell Wall Precursor and Utilization as a Substrate for Glycosyltransfer and Transpeptidation by Penicillin Binding Protein (PBP) 1b of Escherichia coli*. *J Am Chem Soc* 123(47):11638-11643.
283. Meadow PM, Anderson JS, Strominger JL (1964) *Enzymatic polymerization of UDP-acetylmuramyl-L-ala-L-glu-L-lys-D-ala-D-ala and UDP-acetylglucosamine by a particulate enzyme from Staphylococcus aureus and its inhibition by antibiotics*. *Biochem Biophys Res Co* 14(4):382-387.
284. Galley NF, O'Reilly AM, Roper DI (2014) *Prospects for novel inhibitors of peptidoglycan transglycosylases*. *Bioorg Chem* 55:16-26.
285. Offant J, Terrak M, Derouaux A, Breukink E, Nguyen-Distèche M, Zapun A et al. (2010) *Optimization of conditions for the glycosyltransferase activity of penicillin-binding protein 1a from Thermotoga maritima*. *FEBS J* 277(20):4290-4298.
286. Chandrakala B, Shandil RK, Mehra U, Ravishankar S, Kaur P, Usha V et al. (2004) *High-Throughput Screen for Inhibitors of Transglycosylase and/or Transpeptidase Activities of Escherichia coli Penicillin Binding Protein 1b*. *Antimicrob Agents Ch* 48(1):30-40.
287. Vollmer W, Höltje J (2000) *A Simple Screen for Murein Transglycosylase Inhibitors*. *Antimicrob Agents Ch* 44(5):1181-1185.
288. Shih H, Chen K, Chen S, Huang C, Cheng TR, Ma C et al. (2010) *Combinatorial approach toward synthesis of small molecule libraries as bacterial transglycosylase inhibitors*. *Org Biomol Chem* 8(11):2586-2593.

289. Kempin U, Hennig L, Knoll D, Welzel P, Muller D, Markus A et al. (1997) *Moenomycin A: new chemistry that allows to attach the antibiotic to reporter groups, solid supports, and proteins*. Tetrahedron 53(52):17669-17690.
290. Rühl T, Hennig L, Hatanaka Y, Burger K, Welzel P (2000) *A trifunctional reagent for photoaffinity labeling*. Tetrahedron Lett 41(23):4555-4558.
291. Buchynskyy A, Kempin U, Vogel S, Hennig L, Findeisen M, Muller D et al. (2002) *Synthesis of fluorescent derivatives of the antibiotic moenomycin A*. Eur J Org Chem 2002(7):1149-1162.
292. Volke D, Daghish M, Hennig L, Findeisen M, Giesa S, Oehme R et al. (2003) *On Penicillin-Binding Protein 1b Affinity-Labeling Reagents*. Helv Chim Acta 86(12):4214-4232.
293. Kempin U, Hennig L, Mueller D, Markus A, Welzel P (1996) *A selective reaction that can be used to attach moenomycin to solid supports and proteins*. Tetrahedron Lett 37(29):5087-5090.
294. Phillips RR *The Japp-Klingemann Reaction*. In: Adams R (Hrsg) (1959) *Organic reactions*. Wiley, New York, Chichester.
295. Regitz M, Eistert B (1963) *Über die Bildung von 1.2.4-Triazolderivaten aus α -Acetamino- β -dicarbonylverbindungen durch Japp-Klingemann-Spaltung mit Diazoniumsalzen*. Chem Ber 96(12):3120-3132.
296. Schürer H, Stembera K, Knoll D, Mayer G, Blind M, Förster H et al. (2001) *Aptamers that bind to the antibiotic moenomycin A*. Bioorgan Med Chem 9(10):2557-2563.
297. Betat H, Vogel S, Struhalla M, Foerster H, Famulok M, Welzel P et al. (2003) *Aptamers that recognize the lipid moiety of the antibiotic moenomycin A*. Biol Chem 384:1497-1500.
298. Barrett DS, Chen L, Litterman NK, Walker S (2004) *Expression and Characterization of the Isolated Glycosyltransferase Module of Escherichia coli PBP1b*. Biochemistry-US 43(38):12375-12381.
299. Barrett D, Leimkuhler C, Chen L, Walker D, Kahne D, Walker S (2005) *Kinetic Characterization of the Glycosyltransferase Module of Staphylococcus aureus PBP2*. J Bacteriol 187(6):2215-2217.
300. Müller P, Ewers C, Bertsche U, Anstett M, Kallis T, Breukink E et al. (2007) *The Essential Cell Division Protein FtsN Interacts with the Murein (Peptidoglycan) Synthase PBP1B in Escherichia coli*. J Biol Chem 282(50):36394-36402.
301. Aretz W, Ehlers E, Hedtmann U (Erfinder); Hoechst AG; Patent EP 0503419 (A1) - *Verfahren zur Herstellung von MA*. Anmeldenummer: EP 19920103534; Anmeldedatum: 02.03.1992.
302. Aretz W, Boettger D, Seibert G, Tumulka A, Welzel P, Hobert K (Erfinder); Hoechst AG; Patent EP 0355679 (A2) - *Neuer Mikroorganismus zum Abbau von Moenomycinen, Verfahren zum Abbau sowie die Verwendung der Abbauprodukte*. Anmeldenummer: EP 19890115069; Anmeldedatum: 16.08.1989.

Literatur

303. Aretz W, Boettger D, Seibert G, Tumulka A, Welzel P, Hobert K (Erfinder); Hoechst AG; Patent US 5315038 (A) - *Microorganism for breaking down moenomycins, a process for the breakdown, and the use of the breakdown products*. Anmelde­nummer: US 08048511; Anmelde­datum: 20.04.1993.
304. Aretz W, Ehlers E, Hedtmann U (Erfinder); Hoechst AG; Patent US 5316929 (A) - *Process for the Preparation of MA*. Anmelde­nummer: US 08104598; Anmelde­datum: 11.08.1993.
305. Sen A, Lai TW (1984) *Mechanism of palladium(II)-catalyzed carbon-carbon double bond isomerization in olefins*. Inorg Chem 23(20):3257-3258.
306. Tiller GE, Mueller TJ, Dockter ME, Struve WG (1984) *Hydrogenation of Triton X-100 eliminates its fluorescence and ultraviolet light absorption while preserving its detergent properties*. Anal Biochem 141(1):262-266.
307. McMaster MC (2005) *LC/MS (A practical user's guide)*. John Wiley, Hoboken (New Jersey, USA).
308. Macherey-Nagel (Hrsg) *Produktbroschüre "NUCLEODUR® C18 HTec"*. Online verfügbar unter: ftp://ftp.mn-net.com/english/Flyer_Catalogs/Chromatography/HPLC/Nucleodur-C18Htec-EN.pdf.
309. Hennig L, Findeisen M, Welzel P, Haessner R (1998) *1H NMR spectroscopic studies of the moenomycins*. Magn Reson Chem 36(8):615-620.
310. Annesley TM (2003) *Ion suppression in mass spectrometry*. Clin Chem 49(7):1041-1044.
311. Golborn P, Scheinmann F (1973) *Isomerisation of allyl phenyl ethers and allylphenols with transition metal catalysts*. J Chem Soc Perk T 1:2870-2875.
312. Wang X, Woo LK (1998) *Isomerization of olefin carboxylic esters catalyzed by nickel and palladium compounds*. J Mol Catal A Chem 130:171-176.
313. Offant J, Michoux F, Dermiaux A, Biton J, Bourne Y (2006) *Functional characterization of the glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 1a from Thermotoga maritima*. Biochim Biophys Acta 1764(6):1036-1042.
314. Chattopadhyay A, Harikumar KG (1996) *Dependence of critical micelle concentration of a zwitterionic detergent on ionic strength: implications in receptor solubilization*. FEBS Lett 391:199-202.
315. Nicholas RA, Lamson DR, Schultz DE (1993) *Penicillin-binding protein 1B from Escherichia coli contains a membrane association site in addition to its transmembrane anchor*. J Biol Chem 268(8):5632-5641.
316. Vollmer W, Rechenberg M von, Höltje J (1999) *Demonstration of Molecular Interactions between the Murein Polymerase PBP1B, the Lytic Transglycosylase MltA, and the Scaffolding Protein MipA of Escherichia coli*. J Biol Chem 274(10):6726-6734.
317. Bury D, Dahmane I, Derouaux A, Dumbre S, Herdewijn P, Matagne A et al. (2015) *Positive cooperativity between acceptor and donor sites of the peptidoglycan glycosyltransferase*. Biochem Pharmacol 93(2):141-150.

318. Breukink E, van Heusden, Hester E., Vollmerhaus PJ, Swiezewska E, Brunner L, Walker S et al. (2003) *Lipid II Is an Intrinsic Component of the Pore Induced by Nisin in Bacterial Membranes*. J Biol Chem 278(22):19898-19903.
319. Esterbauer H (1968) *Über die Autoxydation von Linolsäure-methylester in Wasser III: Chromatographische Auftrennung der wasserlöslichen Reaktionsprodukte*. Fett Wiss Technol 70(1):1-4.
320. Ikura M, Hikichi K (1982) *Application of two-dimensional NMR spectroscopy to the complete analysis of the ^1H and ^{13}C NMR spectra of biotin in aqueous solution*. Org Magn Resonance 20(4):266-273.
321. GE Healthcare (Hrsg) *BIAevaluation Software Handbook [BR-1002-29 AH 07/2008]*.
322. *Verordnung (EG) Nr. 767/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 13. Juli 2009 über das Inverkehrbringen und die Verwendung von Futtermitteln, zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates und zur Aufhebung der Richtlinien 79/373/EWG des Rates, 80/511/EWG der Kommission, 82/471/EWG des Rates, 83/228/EWG des Rates, 93/74/EWG des Rates, 93/113/EG des Rates und 96/25/EG des Rates und der Entscheidung 2004/217/EG der Kommission (VO(EG) Nr. 767/2009)* Das Europäische Parlament und der Rat der Europäischen Union, 13.07.2009; Amtsblatt der Europäischen Union L 229 vom 1.9.2009, S. 1-28.

Internetadressen zuletzt geprüft am 06.10.2015

12 Anhang

12.1 Verwendete Futtermittel

Im Folgenden sind die Herstellerangaben bezüglich der Zusammensetzung der verwendeten Flavophospholipol-freien Futtermittel wiedergegeben (Angaben nach Verordnung (EG) Nr. 767/2009 und Futtermittelverordnung [168, 322]):

12.1.1 Ferkelaufzuchtfutter:

Alleinfuttermittel deuka primo pro (3233620), gekörnt.

Inhaltsstoffe: 17,5% Rohprotein, 0,75% Calcium, 0,55% Phosphor, 0,20% Natrium, 13,4 MJ/kg umsetzbare Energie, 1,20% Lysin, 0,36% Methionin (berechnet als Methioninäquivalente), 4,0% Rohfett, 4,0% Rohfaser, 4,8% Rohasche.

Zusatzstoffe je kg:

Ernährungsphysiologische Zusatzstoffe: 15.000 I.E. Vitamin A, 2000 I.E. Vitamin D (als Vitamin D₃), 100 mg Vitamin E (als *all rac*- α -Tocopherylacetat), 30 mg Eisen aus Eisencarbonat und 60 mg Eisen aus Eisen(II)-sulfat, 1,2 mg Iod (aus Calciumiodat, wasserfrei), 0,4 mg Cobalt (aus basischem Cobalt(II)-carbonat-Monohydrat), 2 mg Kupfer aus Aminosäuren-Kupfer-Chelat-Hydrat und 149 mg Kupfer aus Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat, 56 mg Mangan (aus Mangan(II)-oxid), 30 mg Zink aus Zinksulfat-Monohydrat und 20 mg Zink aus Zinkoxid, 0,35 mg Selen (aus Natriumselenit), Hydroxy-Analogon von Methionin: 0,12%.

Zootechnische Zusatzstoffe: 250 OTU 6-Phytase (EC 3.1.3.26), 0,30% Natriumbenzoat, 610 U Endo-1,4- β -Xylanase (EC 3.2.1.8) und 76 U Endo-1,3(4)- β -Glucanase (EC 3.2.1.6).

Technologische Zusatzstoffe: Ameisensäure, Ammoniumformiat, Milchsäure.

Zusammensetzung: Weizen, Gerste, Sojaextraktionsschrot (dampferhitzt), Weizenkleie, Weizen (aufgeschlossen), Gerste (aufgeschlossen), Mais (aufgeschlossen), Pflanzenfettsäuren (aus Soja, Raps, Sonnenblume, Palmöl), Calciumcarbonat, Natriumchlorid, Mono-/Dicalciumphosphat.

Anhang

12.1.2 Alleinfuttermittel für Legehennen:

Alleinfuttermittel I für Legehennen deuka all-mash LH-V (3116500).

Inhaltsstoffe: 17,0% Rohprotein, 0,90% Lysin, 0,45% Methionin (berechnet als Methioninäquivalente), 3,80% Calcium, 0,50% Phosphor, 0,16% Natrium, 11,6 MJ/kg umsetzbare Energie, 6,0% Rohfett, 3,3% Rohfaser, 12,6% Rohasche.

Zusatzstoffe je kg:

Ernährungsphysiologische Zusatzstoffe: 12.000 I.E. Vitamin A, 2500 I.E. Vitamin D (als Vitamin D₃), 20 mg Vitamin E (als *all rac*- α -Tocopherylacetat), 25 mg Eisen aus Eisen(II)-sulfat, 0,6 mg Iod (aus Calciumiodat, wasserfrei), 0,1 mg Cobalt (aus basischem Cobalt(II)-carbonat-Monohydrat), 8 mg Kupfer aus Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat, 80 mg Mangan (aus Mangan(II)-oxid), 60 mg Zink aus Zinksulfat-Monohydrat, 0,2 mg Selen (aus Natriumselenit)

Zootechnische Zusatzstoffe: 300 PPU 6-Phytase (EC 3.1.3.26), 100 U Endo-1,3(4)- β -Glucanase (EC 3.2.1.6) und 70 U Endo-1,4- β -Xylanase (EC 3.2.1.8).

Sensorische Zusatzstoffe: 6,3 mg Canthaxanthin, 4 mg Lutein und Zeaxanthin

Zusammensetzung: Weizen, Mais, Sojaextraktionsschrot (dampferhitzt), Calciumcarbonat, Pflanzenfettsäuren (aus Soja, Raps, Sonnenblume, Palmöl), Sonnenblumenextraktionsschrot, Weizenkleie, Mono-/Dicalciumphosphat, Natriumchlorid.

12.1.3 Rindermastfutter:

Ergänzungsfuttermittel für Mastrinder deuka bullkraft 243 (3311520).

Inhaltsstoffe: 24,0% Rohprotein, 10,8 MJ/kg umsetzbare Energie, 3,8% Rohfett, 8,2% Rohfaser, 8,1% Rohasche, 1,50% Calcium, 0,65% Phosphor, 0,40% Natrium.

Zusatzstoffe je kg:

Ernährungsphysiologische Zusatzstoffe: 30.000 I.E. Vitamin A, 2400 I.E. Vitamin D (als Vitamin D₃), 0,3 mg Iod (aus Calciumiodat, wasserfrei), 0,6 mg Cobalt (aus basischem Cobalt(II)-carbonat-Monohydrat), 60 mg Mangan (aus Mangan(II)-oxid), 90 mg Zink aus Zinksulfat-Monohydrat, 0,9 mg Selen (aus Natriumselenit), 15.000 mg Harnstoff, 4,3% Rohprotein aus NPN.

Zusammensetzung: Rapsextraktionsschrot, Weizenkleberfutter, Palmkernkuchen, Sorghum, Mais, Zuckerrüben-Vinasse, Weizenkleie, Maiskleberfutter, Calciumcarbonat, Natriumchlorid.

12.2 Flavophospholipol-Premix

Für die Dotierung der Futtermittel wurde der Flavophospholipol-Premix Flavomycin 80 von biovet® (Peshtera, Bulgaria) verwendet. Herstellerangaben: Flavomycin®-Gehalt: 81 µg/mg; pH-Wert der Suspension: 8,7; Trocknungsverlust: 3,3%, Partikel <800 µm: 97,0%; Partikel <100 µm: 5,0%.

Zu den sonstigen Bestandteilen macht der Hersteller keine Angaben. Im Verzeichnis der zugelassenen Futtermittelzusatzstoffe nach Art. 9t lit. b der Richtlinie 70/524/EWG [58] war die Zusammensetzung des Futtermittelzusatzstoffs „Flavomycin 80“ geregelt. Hiernach durfte der Zusatzstoff zwischen 50 und 150 g/kg Siliciumdioxid und zwischen 0 und 400 g/kg Calciumcarbonat enthalten. Dies findet bei Mounsey [170] Bestätigung, laut dem die Grundlage von Flavomycin 80 Kalkstein ist. Daher ist davon auszugehen, dass die Matrix des Premix nennenswerte Gehalte an Calciumcarbonat und Siliciumdioxid aufweist. Ferner wird der Premix Reste des Zelllysats enthalten.