

Metabolische Netzwerkanalysen für den Weg von xenobiotischen zu verträglichen antibiotischen Substanzen



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Alexander Cecil, geb. Schmid

aus Augsburg

Würzburg 2012

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Biologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Mitglieder der Promotionskommission:

- Vorsitzender: Prof. Dr. W. Rössler
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dandekar
- 3. Gutachter: PD Dr. Knut Ohlsen

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2007 bis Dezember 2011 am Lehrstuhl für Bioinformatik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter der Anleitung von **Herrn Prof. Dr. Thomas Dandekar** mit finanzieller Unterstützung des Sonderforschungsbereiches 630 angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgender Form veröffentlicht:

Originalarbeiten

Cecil A, Rikanović C, Ohlsen K, Liang C, Oelschlaeger T, Gulder T, Bringmann G, Holzgrabe U, Unger M, Dandekar T: **Modeling antibiotic and cytotoxic effects of the dimeric isoquinoline IQ-143 on metabolism and its regulation in Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis and human cells.** GenomeBiology, 2011, 12:R24.

Cecil A, Ohlsen K, Menzel T, François P, Schrenzel J, Fischer A, Dittrich M, Liang C, Bernhardt J, Oelschlaeger TA, Bringmann G, Bruhn H, Unger M, Lehmann L, Dandekar T: **Metabolic modelling of antibiotic and cytotoxic effects of the isoquinoline IQ-238 in S. aureus, S. epidermidis and human cells.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, in Vorbereitung.

Zirkel J, Cecil A, Schäfer F, Rahlfs S, Ouedraogo A, Xiao K, Sawagogo S, Coulibaly B, Becker K, Dandekar T: **Analyzing thiol-dependent redox networks in the presence of methylene blue and other anti-malarial agents with RT-PCR-supported in silico modeling.** Malaria Journal, eingereicht.

Kongressbeiträge

Rikanović C, Schmid A*, Bringmann G, Ohlsen K, Unger M, Dandekar T, Holzgrabe U: **Combining bioinformatics and metabolomics to investigate the effect of a naphthylisoquinoline alkaloid on staphylococcus aureus.** 2nd International Symposium of the Collaborative Research Center SFB 630, 2009, Würzburg.

Schmid A*, Rikanović C, Ohlsen K, Unger M, Dandekar T: **Experiments towards the biocombinatorial generation of aminocoumarin antibiotics with catechol structures: Investigation of influx and efflux across the bacterial cell envelope.** 4th Joint PhD Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630, 766, 544, 2008, Kloster Bronnbach.

Cecil A, Santosh N, Liang C, Schaefer B, Sottriffer C, Dandekar T: **DrugPoint – a retrieval software and databank to connect proteins, drugs and targets.** German Conference on Bioinformatics, 2011, München.

Zirkel J, Cecil A, Heinz W, Coulibaly B, Schirmer H, Dandekar T: **Thiol-dependent redox networks: analysing the effects of the anti-malarial agent Methylene Blue.** 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 2011, Essen.

*: Diese Kongressbeiträge wurden noch unter meinem Geburtsnamen Alexander Schmid eingereicht.

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Dandekar für die Anleitung und Betreuung der vorliegenden Arbeit. Ich danke für das stetige Interesse am Fortgang der Arbeit, für die zahlreichen Gespräche und das in mich gesetzte Vertrauen, das es mir ermöglichte, eigenverantwortlich wissenschaftlich zu arbeiten.

PD. Dr. Knut Ohlsen danke ich für die vielen wertvollen Hinweise, die zahlreichen fachlichen Diskussionen und die Genexpressionsdaten, die einen so zentralen Teil in dieser Arbeit einnehmen.

Carina Rikanović danke ich für die Aufarbeitung unserer unzähligen Proben, die unkomplizierte, gute Zusammenarbeit und die Aufmunterung in stressigen Zeiten.

Janina Zirkel danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre Freundschaft auch über die Plasmodien hinaus.

Chunguang Liang möchte ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit danken.

Prof. Dr. Roy Gross danke ich für die Ermöglichung der Arbeiten mit meinen Zellkulturen im Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg.

Bei allen Kooperationspartnern innerhalb des SFB 630 möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Allen Mitarbeitern der Bioinformatik möchte ich für die Freundschaft und die wunderbare Arbeitsatmosphäre danken; beides hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Im Besonderen: Frank Förster, Gaby Wangorsch, Chunguang Liang, Desislava Boyanova, Santosh Nilla, Astrid Fieselmann, Daniela Beißer, Christian Koetschan, Dominik Schaak, Karin Lustre, Stefan Obermeier.

Der größte Dank gilt jedoch meiner Frau Barbara Cecil und meiner Familie für ihre immerwährende Unterstützung.

Für Barbara

***"Education's purpose is to replace an empty mind
with an open one."***

- Malcom Forbes -

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	8
I. Einleitung	10
1. Infektionskrankheiten	10
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	12
1.2 <i>Plasmodium falciparum</i>	13
2. Grundlagen der Sequenzanalyse	16
2.1 Alignments	16
2.1.1 Wichtige Begriffe	16
2.1.2 Substitutionsmatrizen	17
2.1.3 Identitätsmatrizen	17
2.1.3.1 PAM-Matrizen	18
2.1.3.2 BLOSUM-Matrizen	19
II. Material und Methoden	20
1. Einführung in die Bioinformatik	20
1.1 Basic Local Alignment Search Tool: BLAST	20
1.1.1 BLAST-Algorithmus	20
1.1.2 BLAST-P	21
1.1.3 PSI-BLAST	22
1.1.4 PHI-BLAST	22
1.1.5 Bit-Score und e-Value	23
1.2 Weitere Methoden	24
2. Metabolische Netzwerke	24
2.1 Metabolische Rekonstruktion	24
2.2 Grundlagen von „extreme pathway“-Berechnungen	26

2.3 Kurzanleitung KEGGbrowser und YANASquare	29
3. Messungen der Metabolitkonzentrationen	42
4. Gewinnung der Genexpressionsdaten	43
4.1 <i>S. epidermidis</i> RP62A	44
4.2 <i>S. aureus</i> HG001	45
4.3 <i>P. falciparum</i> 3D7	47
5. Messung der inhibitorischen Konzentrationen und Cytochromassays	48
5.1 Messung der inhibitorischen Konzentrationen	48
5.2 Cytochromassay	49
6. Voronoi-Diagramme	50
III. Analyse der Effekte des Naphtylisochinolins IQ-143	51
1. Wahl von IQ-143	51
2. Optimale Bedingungen für das Wachstum, die Ernte und die Metabolitkonzentrationsmessungen von Staphylokokken	53
3. Metabolitänderungen nach Gabe von IQ-143	54
3.1 Gradienten der HPLC-Analyse zur Messung der Konzentrationen der Purin und Pyrimidinnukleotide	54
3.2 Gradienten der HPLC-Analyse zur Messung der Konzentrationen der Nikotinamide	55
3.3 Gemessene Veränderung der Zellmetabolite: Anstieg von NADPH, AMP, GMP und TMP, Abfall von NAD und CMP	56
4. Metabolische Netzwerkanalyse zeigt differentiellen antibiotischen Effekt von IQ-143	58
4.1 Metabolische Rekonstruktion	59
4.2 Annotation von neun bisher nicht aufgedeckten Enzymen in <i>S. aureus</i> USA300	61
4.3 Berechnung der Modenaktivitäten mit R: Starke Veränderungen in der oxidativen Phosphorylierung	64
4.4 Pathwayanalyse: Geringe Stressantwort auf IQ-143, jedoch starker Einfluss auf den Energiemetabolismus	66
4.4.1 Stressantwort der Organismen	66
4.4.2 Verringerte Moden- und Enzymaktivitäten im Energiestoffwechsel	68
4.4.3 Vergleich mit Metabolitmessungen: Bestätigung des hypothetischen	

Wirkmechanismus von IQ-143	75
5. Charakterisierung der Effekte von IQ-143	79
IV. Analyse der Effekte des Naphtylisochinolins IQ-238	81
1. Wahl von IQ-238	81
2. Voronoi-Diagramme: Starke Unterschiede zwischen IQ-143 und IQ-238	82
3. PCA: Unterschiedliche chemische und biologische Eigenschaften von IQ-143 und IQ-238	86
4. Metabolische Netzwerkanalyse zeigt Einfluss von IQ-238 auf die Glykolyse	90
4.1 Modenaktivitäten mit R: Starke Veränderungen im Energiemetabolismus	90
4.2 Pathwayanalyse: Starke direkte Effekte auf Flaschenhalsenzyme der Glykolyse	91
5. Charakterisierung der Effekte von IQ-238	94
V. Wirkungen von Methylenblau auf <i>P. falciparum</i> 3D7	95
1. Motivation und untersuchter Organismus	95
2. Stoffwechselmodellierung	97
2.1 Modellierung des chloroquinresistenten Stammes	97
2.2 Modellierung des Stammes mit Resistenz gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin	98
2.3 Modellierung der Multiresistenz gegen Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin	99
2.4 Die verschiedenen Resistenzmechanismen im metabolischen Netzwerkmodell	99
2.5 Implementation der Genexpressionsdaten	100
3. Ergebnisse der metabolischen Netzwerkanalyse	101
3.1 Modellierung des Wildtyps als Referenz für alle anderen Modelle	102
3.2 Modellierung der Resistenz gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin	106
3.3 Modellierung der Resistenz gegen Chloroquin	108
3.4 Modellierung eines Multiresistenten Stammes	110
4. Charakterisierung der Methylenblauwirkungen auf <i>P. falciparum</i> 3D7	111
VI. Diskussion	114

VII. Zusammenfassung	119
VIII. Summary	121
IX. Veröffentlichungen	123
X. Literaturverzeichnis	127
XI. Anhang	(auf CD)
1. Tabellen (enthalten in der Datei „Anhang.pdf“)	
1.1 Daten der Simulationen des Naptyhlochinolinium IQ-143	S 1
1.2 Daten der Simulationen des Naptyhlochinolinium IQ-238	S 139
1.3 Daten der Simulationen von <i>P. falciparum</i>	S 192
2. Programme und Skripte (Im Verzeichnis „Programme und Skripte“)	
2.1 IQ-143	
2.1.1 Modelle:	enthält die YANASquare-Modelle für Kapitel III
2.1.2 PERL-Skripte:	enthält die PERL-Skripte für Kapitel III
2.1.3 R-Skripte:	enthält R-Skripte für Kapitel III
2.1.4 Ergebnisse	enthält die Rohergebnisse für Kapitel III
2.2 IQ-238	
2.2.1 Modelle:	enthält die YANASquare-Modelle für Kapitel IV
2.2.2 PERL-Skripte:	enthält die PERL-Skripte für Kapitel IV
2.2.3 R-Skripte:	enthält R-Skripte für Kapitel IV
2.2.4 Ergebnisse	enthält die Rohergebnisse für Kapitel IV
2.3 Methylenblau	
2.3.1 Modelle:	enthält die YANASquare-Modelle für Kapitel V
2.3.2 PERL-Skripte:	enthält die PERL-Skripte für Kapitel V
2.3.3 R-Skripte:	enthält R-Skripte für Kapitel V
2.3.4 Ergebnisse	enthält die Rohergebnisse für Kapitel V

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
I.1	Infektionen mit <i>S. aureus</i> in europäischen Krankenhäusern im Jahr 2010	10
I.2	Vankomycinresistente Staphylokokkenkolonie im Elektronenrastermikroskop bei 20000x Vergrößerung	12
I.3	Klinische Belastung durch Malaria 2007	13
I.4	Entwicklungszyklus des Malariaerregers	15
II.1	Verknüpfungen der C++-Bibliotheken unter Linux	29
II.2	Dateioperationen	30
II.3	KEGGbrowser	31
II.4	KEGGbrowser: Auswahl der Spezies, von welcher Netzwerkdaten importiert werden sollen	31
II.5	KEGGbrowser: Auswahl des zu importierenden Stoffwechselweges	32
II.6	KEGGbrowser: Download der Reaktionen aus der KEGG-Datenbank	32
II.7	KEGGbrowser: Auswahl der zu übernehmenden Reaktionen	33
II.8	KEGGbrowser: Erstellung der Bibliothek	33
II.9	KEGGbrowser: Erstellung eines für YANAsquare lesbaren Formats	34
II.10	Berechnung der extremen Moden mittels konvexem Basis-Algorithmus	35
II.11	Exportfunktion und Ergebnisfenster YANAsquares	36
II.12	Erstellung der Datei mit Enzymaktivitäten	36
II.13	Berechnung der Modenaktivitäten	38
II.14	Output des R-Skripts	39
II.15	Skript zur Überführung des R-Outputs in eine von YANAsquare lesbare Datei	40
II.16	Import der berechneten Aktivitäten der extremen Moden	41
II.17	Export aller Enzymaktivitäten	42

III.1	Naphtylisochinolin IQ-143	52
III.2	Ernteprotokoll für Zellkulturen von <i>S. aureus</i> USA300	54
III.3	Veränderung der Nikotinamidkonzentrationen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen an IQ-143	56
III.4	Veränderung der Nukleotidkonzentrationen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen an IQ-143	57
III.5	Grundriss des YANAsquare-Modells	60
III.6	Purinstoffwechsel von <i>S. aureus</i> USA300 zum Zeitpunkt des Importes aus KEGG	61
III.7	Ergebnis der Untersuchung der cDNA von <i>S. epidermidis</i> RP62A nach den proteincodierenden Genen, sichtbar gemacht mittels Gelelektrophorese	63
III.8	Purinstoffwechsel von <i>S. aureus</i> USA300 nach Nachannoation der fehlenden Enzyme	64
III.9	Aktivitäten der extremen Moden von <i>S. aureus</i> nach Berechnung mit R	69
III.10	Aktivitäten der extremen Moden von <i>S. epidermidis</i> nach Berechnung mit R	69
III.11	Grafische Darstellung der veränderten Enzymaktivitäten nach Tabelle III.10 für <i>S. aureus</i>	72
III.12	Grafische Darstellung der veränderten Enzymaktivitäten nach Tabelle III.11 für <i>S. epidermidis</i> RP62A	74
III.13	Oxidative Phosphorylierung, abgeändert nach KEGG	74
III.14	Reaktionsschema der Regeneration von Ubichinol unter Verbrauch von NADH	75
III.15	Wachstum und Biofilmproduktion von <i>S. epidermidis</i> RP62A nach Gabe verschiedener Konzentrationen von IQ-143	78
IV.1	Das Naphtylisochinolin IQ-238	81
IV.2	Voronoi-Diagramm für die doppelte inhibitorische Konzentration von IQ-143 (Graphiken nach Jörg Bernhardt, Uni Greifswald)	83
IV.3	Voronoi-Diagramm für 0,25 MIC von IQ-143 (Graphiken nach Jörg Bernhardt, Uni Greifswald)	84
IV.4	Voronoi-Diagramm für IQ-238 (Graphiken nach Jörg Bernhardt, Uni Greifswald)	85

IV.5	Gegenüberstellung verschiedener Xenobiotika des SFB630 nach ihren Aktivitäten gegenüber verschiedenen Organismen nach Dr. Dr. Markus Dittrich	87
IV.6	Gegenüberstellung verschiedener Xenobiotika des SFB630 nach ihren IC ₅₀ -Werten nach Dr. Dr. Markus Dittrich	89
IV.7	Enzymkaskade der durch IQ-238 betroffenen Enzyme der Glykolyse	93
V.1	Implementiertes Stoffwechselnetz von <i>P. falciparum</i>	103
V.2	Stoffwechselnetz von <i>P. falciparum</i> mit implementierten Genexpressionsdaten der RT-PCR	104
V.3	Aktivitätsveränderungen der Schlüsselenzyme des Redoxstoffwechsels eines gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin resistenten Stammes	106
V.4	Aktivitätsveränderungen der Schlüsselenzyme des Redoxstoffwechsels eines gegen Chloroquin resistenten Stammes	108
V.5	Aktivitätsveränderungen der Schlüsselenzyme des Redoxstoffwechsels eines multiresistenten Stammes	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
I.1	Verbreitungsgebiete der verschiedenen Malariaerreger.	14
II.1	Identitätsmatrix	17
II.2	Hersteller der verwendeten Standards zur Kalibrierung der HPLC-Anlage	43
II.3	Veränderung der Genexpression nach Zugabe von Methylenblau	48
II.4	Effekte von IQ-143 auf CYP1A2, 2C8/2C9/2C19, 2D6 und 3A4	49
III.1	Übersicht über die verschiedenen „Omik“-Techniken	52
III.2	Gradient der Acetonitrilphase der HPLC-Säule zur Bestimmung der Purin- und Pyrimidinnukleotidkonzentrationen	55
III.3	Gradient der Acetonitrilphase der HPLC-Säule für die Untersuchung der Nikotinamidkonzentrationen	55
III.4	Messung der NAD-, NADH-, NADP- und NADPH-Konzentrationen in <i>S. aureus</i> USA300	57
III.5	Messung der Purin- und Pyrimidinnukleotidkonzentrationen in <i>S. aureus</i> USA300	58
III.6	Mit BLAST nachannotierte Enzyme für die Stoffwechselwege des YANAsquare-Modells von <i>S. epidermidis</i> RP62A, <i>S. aureus</i> USA300 und menschliche Zellen	62
III.7	Genexpressionsänderungen	65
III.8	Signifikant erhöhte Proteine der generellen Stressantwort	67
III.9	Veränderungen von Enzymaktivitäten in <i>S. aureus</i> nach Gabe verschiedener Konzentrationen an IQ-143	71
III.10	Veränderungen von Enzymaktivitäten in <i>S. epidermidis</i> nach Gabe verschiedener Konzentrationen an IQ-143	73
III.11	Messung der Purin- und Pyrimidinnukleotidkonzentrationen in <i>S. aureus</i> USA300	77
III.12	Messung der NAD-, NADH-, NADP- und NADPH-Konzentrationen in <i>S. aureus</i> USA300	83
IV.1	Chemische Eigenschaften der Xenobiotika	86

IV.2	Ergebnisse der <i>in vitro</i> Versuchsreihen der Ölschlägergruppe	88
IV.3	Veränderte Genexpressionen von <i>S. aureus</i> HG001 nach Gabe des Naphtylisochinolins IQ-238	90
IV.4	Veränderungen der Enzymaktivitäten in <i>S. epidermidis</i> nach Gabe von IQ-238 (orange) im Vergleich zu einer Berechnung ohne zugesetzten Wirkstoff (blaugrau)	91
IV.5	Veränderungen der Enzymaktivitäten in <i>S. aureus</i> nach Gabe von IQ-238 (orange) im Vergleich zu einer Berechnung ohne zugesetzten Wirkstoff (blaugrau)	92
V.1	Aufteilung der Ergebnisse gemäß der verschiedenen berechneten Szenarien	101

I. Einleitung

1. Infektionskrankheiten

Infektionskrankheiten sind laut einer Studie der WHO von 2004^[1] für 20 % der 57 Millionen vorzeitigen Todesfälle pro Jahr verantwortlich. Verschärfend kommt hinzu, dass immer häufiger – insbesondere in den Industrieländern – Resistenzen gegen die gängigen Antibiotika auftreten. Ein unrühmliches Paradebeispiel ist das grampositive Bakterium *Staphylococcus aureus*. Dieses Bakterium tritt in ganz Europa in seiner multiresistenten Form in Krankenhäusern auf.

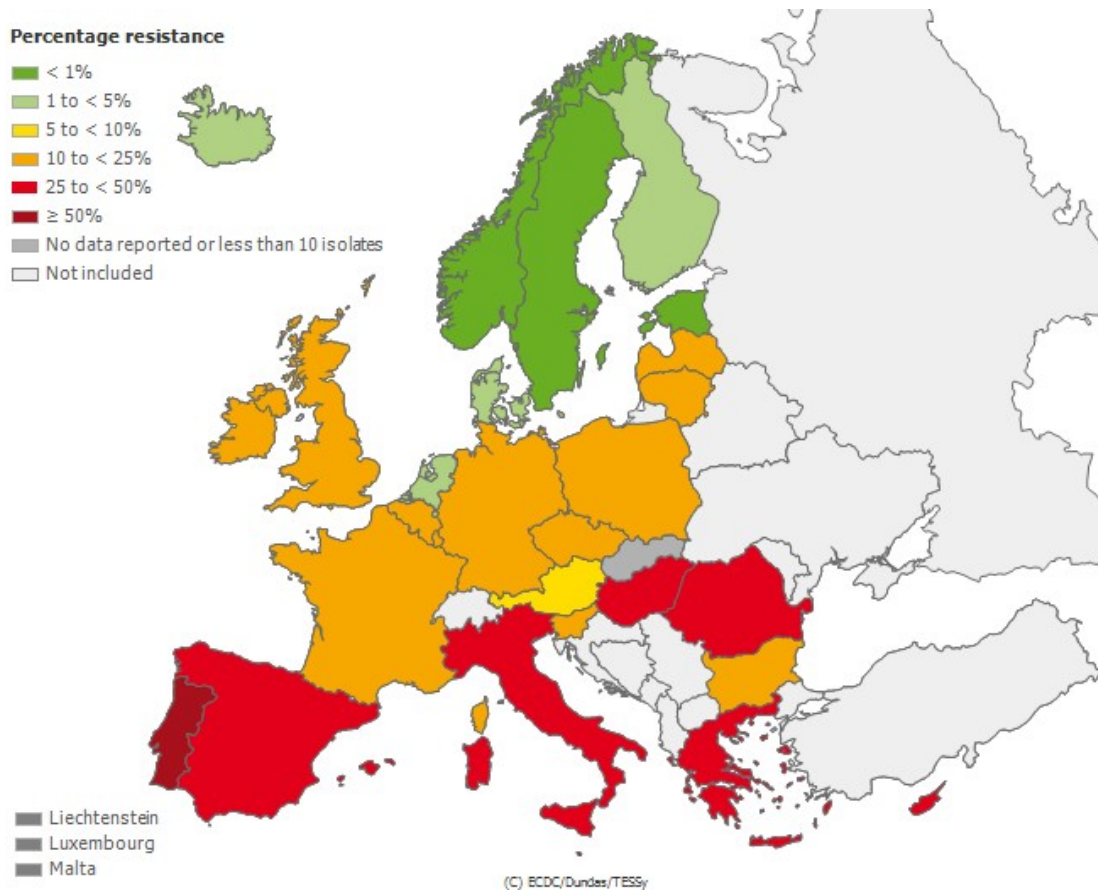


Abbildung I.1 Infektionen mit *S. aureus* in europäischen Krankenhäusern im Jahr 2010 (mit freundlicher Genehmigung des European Centre for Disease Prevention and Control^[2, 3]). Die farbliche Codierung gibt die Prozentzahl der multiresistenten Infektionen mit *S. aureus* an.

Dabei schien es lange Zeit so, als ob der Mensch seinen ewigen Widersacher – Krankheiten – endlich zu besiegen vermochte: Mitte des letzten Jahrhunderts konnten zum ersten Mal in der Geschichte der Menschheit Antibiotika für die meisten Infektionen

und Impfstoffe gegen die größten Bedrohungen wie die Diphtherie, den Keuchhusten, den Wundstarrkrampf, die Tuberkulose oder aber die Kinderlähmung hergestellt werden.

Der Kampf an sich wurde dadurch jedoch nicht gewonnen. Durch unsachgemäßen Gebrauch dieser „Wunderwaffen“ erschuf der Mensch selbst immer resistenter Keime:

- Es werden Antibiotika in falscher Dosierung verschrieben, wodurch nicht alle Bakterien abgetötet werden, sondern lediglich diejenigen, welche keine latente Resistenz innehaben. Diese können ihre Erbinformationen bevorzugt an die nächsten Generationen weitergeben.
- Ungenügende Aufklärung der Patienten über die Wichtigkeit der sogenannten „Compliance“, d.h. über sein kooperatives Verhalten während der Therapie, oder schlicht Desinteresse spielen eine weitere wichtige Rolle: Dadurch, dass die Antibiotika zu kurz eingenommen werden, können auch hier wiederum latent resistente Bakterien bevorzugt ihre Gene an die nächsten Generationen weitergeben.

Welcher der Gründe im Einzelfall für die Resistenzbildung oder Ausbreitung von Infektionskrankheiten verantwortlich war, kann im Nachhinein nicht mehr genau eruiert werden. Die Tatsache, dass sich die Menschheit dem globalen Problem der (multi)resistenten Krankheitserreger gegenüberstellt,^[4] bleibt jedoch bestehen. Auch sogenannte „Impfgegner“ fördern aktiv eine Ausbreitung längst ausgerotteter geglaubter Infektionskrankheiten, indem sie sich und ihre Kinder den gängigen Impfungen verweigern.

In den Entwicklungsländern stellen Infektionen die Haupttodesursache dar. Bedingt durch Armut und schlechte (oder keine) medizinische Versorgung ist der Zugang zu Arzneimitteln dort einer breiten Bevölkerungsschicht schlicht vorenthalten. Krankheiten wie die Malaria sind bei ihrem Auftreten in den Industrieländern effektiv therapierbar – in den Entwicklungsländern ist dies nicht der Fall.

1.1 *Staphylococcus aureus*

Abgeleitet vom griechischen „staphylé“ für Weintraube und „kókkos“ für Kern ergibt sich sofort eine graphische Vorstellung der Staphylokokken: runde bis ovale Kügelchen, welche unbeweglich zusammenhängen. Und in der Tat handelt es sich hierbei um ca. 1 µm kleine, kugelförmige Zellen, die sich dadurch auszeichnen, dass sie auf den besiedelten Oberflächen eine zusammenhängende Kolonie bilden.

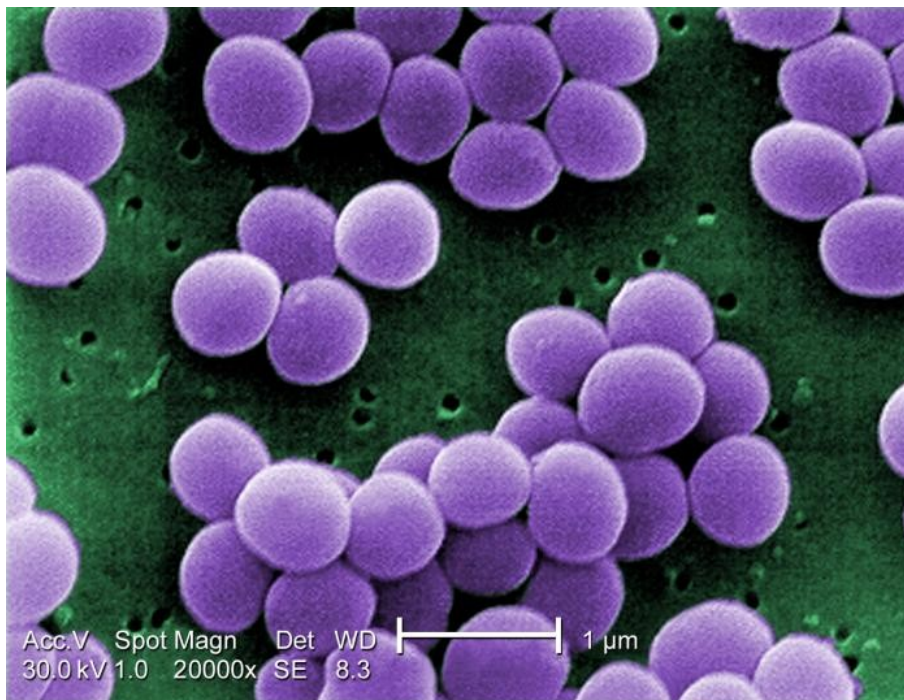


Abbildung 1.2 Vankomycinresistente Staphylokokkenkolonie im Elektronenrastermikroskop bei 20000x Vergrößerung. Mit freundlicher Genehmigung von Matthew J. Arduino und Janice Haney Carr des CDC.^[5]

Von den bisher bekannten Arten der Staphylokokken zählt *Staphylococcus aureus* zu den am besten untersuchten. *S. aureus* siedelt sich beim Menschen häufig – und ohne Infektionen hervorzurufen – an den Schleimhäuten und auf der Haut an. Man geht davon aus, dass 20 bis 30 % der Bevölkerung permanent mit Staphylokokken besiedelt sind. In Krankenhäusern ist von einer Rate von 80 % auszugehen. Eine Übertragung erfolgt durch Haut- oder Oberflächenkontakt. Infektionen sind in der Regel lokal begrenzt, Staphylokokken können jedoch durchaus auch zu systemischen Infektionen führen.

Ungefähr 50 % der bekannten Staphylokokkenarten sind in der Lage, äußerst hitzestabile Toxine (keine Denaturierung nach 30 Minuten bei 100 °C) freizusetzen, welche bei

Konsum damit kontaminierter Lebensmittel zu Vergiftungserscheinungen führen. Innerhalb weniger Stunden treten Übelkeit, Erbrechen und Durchfall auf. Im schlimmsten Fall können diese Toxine ein sogenanntes „Toxic-Shock-Syndrom“ hervorrufen, welches in kürzester Zeit zu Multiorganversagen führt.^[6, 7]

Die Koloniebildung ist für Staphylokokken in zweierlei Hinsicht vorteilhaft: Ab einer bestimmten Dichte der Kolonie, welche durch chemische Kommunikation der Bakterien untereinander (quorum sensing) definiert ist,^[8] wird ein mehrschichtiger Biofilm gebildet, welcher die Bakterien vor dem körpereigenen Immunsystem schützt, zum anderen erhöht diese geschützte Kolonie die Wahrscheinlichkeit, dass Resistenzgene durch horizontalen Gentransfer ausgetauscht werden können.

1.2 *Plasmodium falciparum*

Malaria, bis ins 19. Jahrhundert auch in gemäßigten Breiten wie Europa, Russland und Nordamerika verbreitet, tritt heute nur noch in tropischen und subtropischen Regionen auf. Diese bedeutet jedoch auch, dass etwa die Hälfte der Weltbevölkerung, d.h. ca. 3,3 Milliarden Menschen, in Malariarisikogebieten leben; 1,2 Milliarden davon in sogenannten Hochrisikogebieten. Jährlich ist in etwa von 300 bis 500 Millionen Erkrankungen auszugehen.^[9]

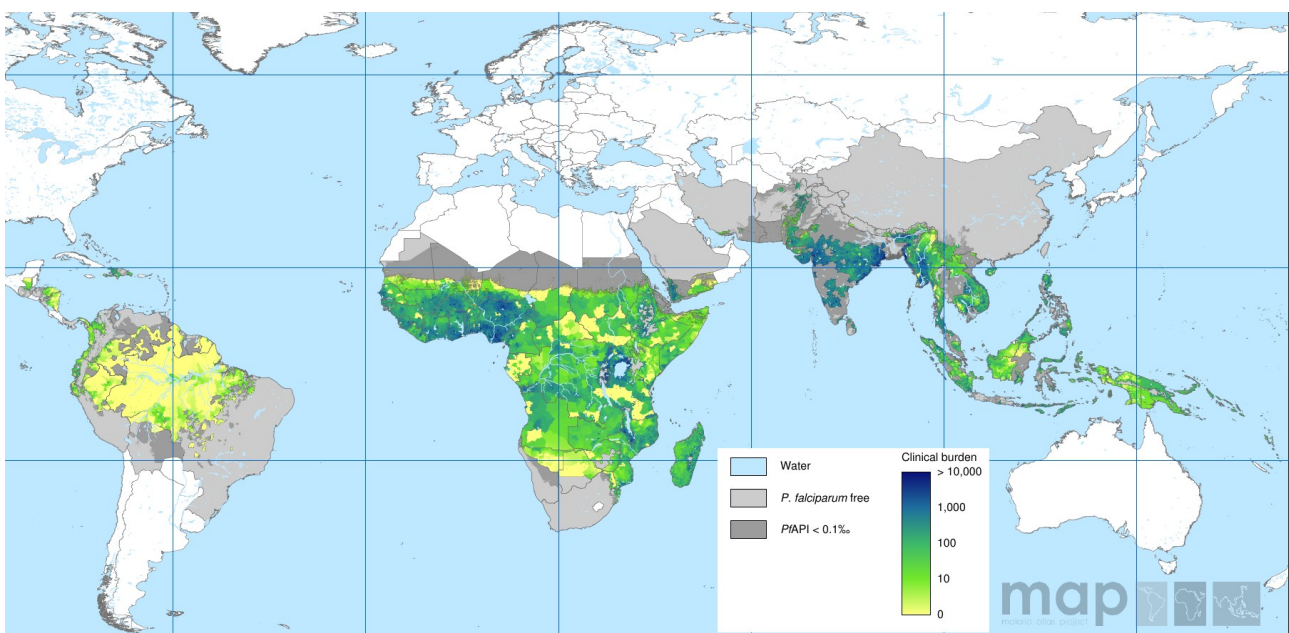


Abbildung 1.3 Klinische Belastung durch Malaria 2007. Mit freundlicher Genehmigung abgeändert nach Hay et al^[10] und dem "Malaria Atlas Project"^[11].

Auf Grund der globalen Erderwärmung könnte sich das Einzugsgebiet der Malaria jedoch wieder vergrößern.^[12] Dies würde auch zu einem Anstieg der Erkrankungen und, damit einhergehend, der jährlichen Todesfälle führen.

Die höchste Sterblichkeitsrate tritt in Afrika südlich der Sahara auf: 60 % der weltweiten Malariaerkrankungen und 90 % der jährlich zu verzeichnenden Todesfälle ereignen sich in dieser Region.^[13] Schwangere Frauen und Kleinkinder sind von dieser Krankheit besonders gefährdet. Bei Kleinkindern kann Malaria – wenn sie die Blut-Hirn-Schranke überwindet und die Infektion überlebt wird – schwere Lerndefizite und andere zerebrale Spätfolgen auslösen. Bei Schwangeren führt eine Malariainfektion unter anderem zu Früh- und Totgeburten sowie spontanen Schwangerschaftsabbrüchen. Auch die überlebenden Säuglinge weisen dementsprechend eine erhöhte Säuglingssterblichkeit auf.^[14] Dies wirkt sich natürlich auch auf die Wirtschaftskraft der betroffenen Länder aus.

Beim Menschen sind vier Arten von Protozoen der Gattung Plasmodium für die Erkrankung mit Malaria verantwortlich:

- *P. falciparum* → Malaria tropica
- *P. vivax* → Malaria tertiana
- *P. ovale* → Malaria tertiana
- *P. malariae* → Malaria quartana

Die Verbreitungsgebiete der einzelnen Plasmodien teilen sich wie folgt auf:

Plasmodienarten	Verbreitungsgebiete
<i>P. falciparum</i>	Afrikanischer Kontinent
<i>P. vivax</i>	Nordafrika, vorderer Orient, Indien, Pakistan, Nepal, Sri Lanka und Mittelamerika
<i>P. ovale</i>	Westafrika
<i>P. malariae</i>	West- und Ostafrika sowie isolierte Teile von Indien

Tabelle I.1 Verbreitungsgebiete der verschiedenen Malariaerreger. 90 % der Malariainfektionen werden durch *P. falciparum* ausgelöst,^[15, 16] *P. vivax* stellt vor allem in Nordafrika und dem vorderen Orient ein Problem dar. *P. ovale* und *P. malariae* sind weitaus seltener.^[17]

Die Malariaerreger werden durch den Stich einer weiblichen Anophelesmücke übertragen, welche in Gebieten von maximal 1500 m über dem Meeresspiegel („üdm“) in vom Äquator weiter entfernten Gebieten und bis in Höhen von 2500 m üdm am Äquator leben. Somit decken sich die Verbreitungsgebiete der Malaria mit den Verbreitungsgebieten der Anophelesmücken. Die Mücken durchlaufen vier Lebenszyklen: Ein Ei, ein Larven-, ein Puppen- und ein Adultstadium. Eine einzelne Mücke kann ein Alter von mehreren Wochen erreichen und in der Zeit ihres Adultstadiums bis zu 1000 Eier in Sümpfen oder anderen, schwach fließenden Gewässern ablegen.

Der Entwicklungszyklus der Malariaerreger läuft zum Teil in den Anophelesmücken, zum Teil aber auch im menschlichen Wirt ab. Das folgende Schema gibt diesen Zyklus wieder:

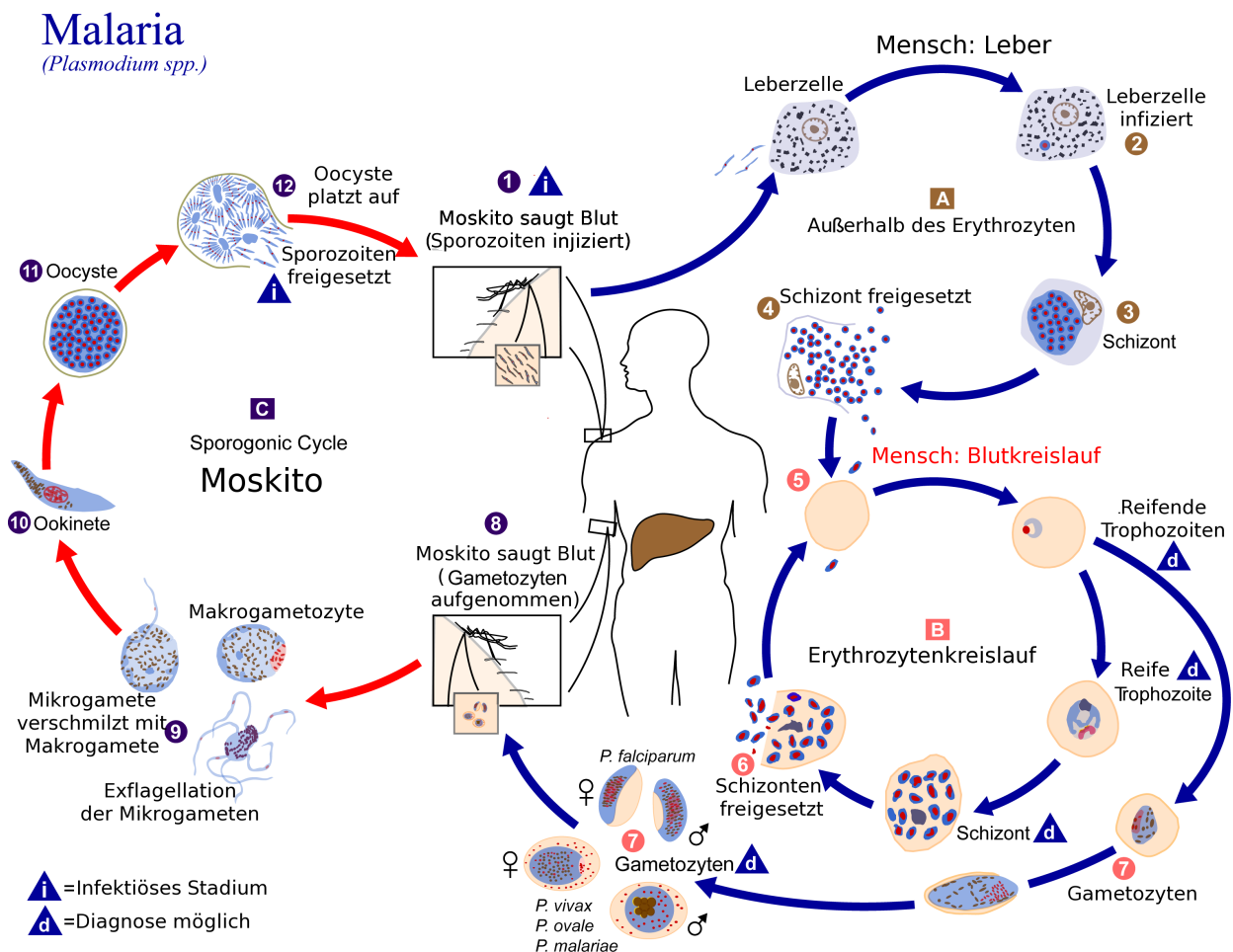


Abbildung I.4 Entwicklungszyklus des Malariaerregers. Dieses Schema wurde nach dem Schema des „Centers of Disease Control and Prevention“^[18] abgeändert und ins Deutsche übersetzt.

2. Grundlagen der Sequenzanalyse

2.1 Alignments

Durch zeilenweises Untereinanderschreiben mehrerer Sequenzen, welche miteinander verglichen werden sollen, wird ein sogenanntes „Alignment“ erstellt.

Hierbei gibt es drei Zustände:

- Match: Die Aminosäuren oder Nukleinsäuren im Alignment stimmen an dieser Position überein.
- Mismatch: Die Aminosäuren oder Nukleinsäuren im Alignment stimmen an dieser Position nicht überein.
- Gap: Diese Position wird mit einer Lücke versehen, um bessere Übereinstimmungen im restlichen Alignment zu erhalten.

2.1.1 Wichtige Begriffe

- Ähnlichkeit:
Beschreibt, basierend auf der verwendeten Ähnlichkeitsmatrix (auch: Substitutionsmatrix), die Anzahl der ähnlich zu bewertenden Positionen in den zu vergleichenden Sequenzen.
- Identität:
Gibt an, wie viele übereinstimmende Positionen im Alignment vorhanden sind – die Identität lässt sich genau berechnen und in Prozent angeben.
- Homologie:
Gehen zwei oder mehrere Sequenzen auf einen gemeinsamen Vorfahren zurück, so bezeichnet man diese als homolog. Man spricht hierbei von Orthologie, wenn homologe Sequenzen aus verschiedenen Spezies hervorgehen, von Paralogie, wenn die homologen Sequenzen aus einer Spezies stammen.

2.1.2 Substitutionsmatrizen

Die Identität im Alignment hängt von den Übereinstimmungen der einzelnen Positionen der Sequenzen ab. Daher kann die Identität berechnet und in Prozent angegeben werden. Die Ähnlichkeit beruht auf der Substitutionsmatrix, welche für das Alignment Verwendung findet. Hierfür gibt es mehrere Möglichkeiten. Im Folgenden wird näher auf die verschiedenen möglichen Matrizen eingegangen.

2.1.3 Identitätsmatrizen

Nur zwei Zustände – identisch und nicht-identisch – werden hierbei für die Bewertung der Ähnlichkeit verwendet.

Die identischen Positionen erhalten „+“, nicht-identische „-“.

Sequenz	a	b	c	d	e
a	+	-	-	-	-
b	-	+	-	-	-
c	-	-	+	-	-
d	-	-	-	+	-
e	-	-	-	-	+

Tabelle II.1 Identitätsmatrix

Zwei Aspekte von Identitätsmatrizen finden hier jedoch keine Beachtung, weshalb nur wenige Programme diese Matrizen verwenden:

- Sind zwei (oder mehr) Aminosäuren in ihrer räumlichen Struktur ähnlich zueinander, so können diese untereinander ausgetauscht werden, ohne dass es zu einer signifikanten Änderung in der räumlichen Struktur des aus der Aminosäuresequenz resultierenden Proteins kommt.
- Durch den degenerierten genetischen Code codieren mehrere Basentriplets ein und dieselbe Aminosäure. So stehen „GUU“, „GUC“, „GUA“ und „GUG“ für Valin, während die Glutaminsäure nur durch zwei Tripletts repräsentiert wird: „GAA“ und „GAG“.

Diese beiden Punkte sind jedoch in den PAM- und BLOSUM-Matrizen abgedeckt.

2.1.3.1 PAM-Matrizen

1978 berechnete Margaret Dayhoff^[19] aus ca. 100 verschiedenen Aminosäuresequenzen, welche zueinander in 85% der Positionen identisch waren, die erste PAM-Matrix. Zur Bestimmung der Identität wurde zunächst ein globales Alignment, d.h. ein Alignment über die volle Länge der Proteinsequenzen, erstellt. Mit einem derartigen Alignment konnte man nun auszählen, bei welchen Aminosäuren wie oft ein Austausch vorlag. Das Ergebnis wurde dann in eine Matrix aus 20 x 20 Feldern eingetragen. 20 x 20 Felder aus dem Grund, um der theoretischen Möglichkeit, dass eine Aminosäure mit jeder anderen ausgetauscht wurde, Rechnung zu tragen. Auch hierfür ist wieder der degenerierte genetische Code verantwortlich: Für manche Aminosäuren ist es wahrscheinlicher, dass ein Austausch auftritt, als für andere. Eine Veränderung des Triplets „GUU“ zu „GUC“ bewirkt keine Änderung in der daraus resultierenden Aminosäure, da beide Triplets (s.o.) für Valin codieren. Eine Mutation von „UGG“ zu „UGC“ jedoch würde zu einer Veränderung der resultierenden Aminosäure von Tryptophan hin zu Cystein führen.

Unterschiede in den Sequenzen, welche zur Erstellung der Matrix verwendet wurden, bezeichnete Dayhoff als „accepted point mutations“. Diese Punktmutationen müssen sich in den verschiedenen Sequenzen voneinander unabhängig entwickelt haben und dürfen einen Funktionsverlust des aus den Aminosäuresequenzen resultierenden Enzyms bewirken. Je weniger die verwendeten Sequenzen miteinander verwandt sind, desto höher ist daher die zu erwartende Anzahl an Punktmutationen und desto niedriger die zu erwartende Ähnlichkeit.

Dayhoff definierte daher über die Anzahl der Punktmutationen pro 100 Aminosäuren („percent accepted mutation“; PAM) den evolutionären Abstand zweier oder mehrerer Sequenzen:

- PAM1 = ein Austausch pro 100 Aminosäuren
- PAM2 = zwei Austausche pro 100 Aminosäuren
- usw.

Die daraus resultierenden PAM-Matrizen finden heute in verschiedenen Varianten Verwendung:

- PAM40 für nah verwandte Sequenzen, für welche global – über die gesamte Länge der Sequenz – ein Vergleich angefertigt werden soll.
- PAM250 für den globalen Vergleich entfernt verwandter Sequenzen; ein Wert von 250 Aminosäureaustauschen kommt dann zustande, wenn für eine Aminosäure ein mehrmaliger Austausch stattfand.

2.1.3.2 BLOSUM-Matrizen

Die „**blocks substitutions matrix**“ der Henikoffs^[20] basiert auf einem ähnlichen Prinzip wie die PAM-Matrix, allerdings werden hier verwandte Sequenzen lokal (und nicht global wie bei den PAM-Matrizen) miteinander verglichen.

Bei der Namensgebung und der Erstellung der BLOSUM-Matrizen orientierte man sich eng an den PAM-Matrizen: Die verwendeten Sequenzen zur Erstellung einer BLOSUM62-Matrix mussten zu 62 % identisch sein. Je höher die Nummer hinter der Matrixbezeichnung, desto höher die Identität bei den für die Berechnung dieser Matrix verwendeten Sequenzen.

Beide Matrizen haben die gleiche Funktion, allerdings für verschiedene Aufgaben: PAM-Matrizen finden Verwendung, um globale Alignments zu berechnen; BLOSUM-Matrizen, um lokale Alignments zu erstellen. Beide haben allerdings die Funktion, eine Grundlage für „BLAST“^[21] bereitzustellen, auf Grund derer dieses Programm entscheiden kann, ob eine Sequenz noch als verwandt erkannt wird oder nicht.

II. Material und Methoden

1. Einführung in die Bioinformatik

Dieses Kapitel befasst sich mit einer kleinen Einführung in die grundlegenden Begriffe und Methoden der Bioinformatik, welche in dieser Doktorarbeit zur Anwendung kommen. Dies umfasst generelle Grundlagen wie auch spezielle Verfahren zur Berechnung von Enzymaktivitäten in metabolischen Netzwerken.

Die Bücher „Bioinformatik – Ein Leitfaden für Naturwissenschaftler“^[22], „Bioinformatik – Eine Einführung“^[23] sowie das Buch „Methoden der Bioinformatik – Eine Einführung“^[24] fanden Verwendung um hier die Grundlagen in möglichst kurzer Form darzustellen.

Des Weiteren sollen auch die Methoden, welche zur Bestimmung der Metabolitkonzentrationen aus Zellextrakten Anwendung fanden beschrieben werden.

1.1 Basic Local Alignment Search Tool: BLAST

Ähnlichkeiten in verschiedenen Sequenzen von Hand zu untersuchen, ist mit einer Sisyphusaufgabe vergleichbar. Eine Protein des Blutgerinnungsfaktors VIII eines Havaneserhundes wird durch ungefähr 8000 Nukleinsäuren codiert. Transkribiert man diese, so erhält man immer noch ~2400 Aminosäuren für dieselbe Sequenz. Dafür in einer effizienten Art und Weise ein Alignment zu erstellen, ist nur mit Hilfe von Computerprogrammen möglich. Das Programm „BLAST“ – mit den Unterprogrammen PSI-BLAST, PHI-BLAST und Protein-BLAST – ist hierfür gedacht.

1.1.1 BLAST-Algorithmus

Im Folgenden wird der grundlegende BLAST-Algorithmus beschrieben. Dieser gliedert sich in drei verschiedene Schritte auf:

1. BLAST erstellt zu Beginn einer jeden Suche aus der Sequenz, mit welcher gesucht wird („Query“), einen Index. Die Einträge in diesem Index besitzen unterschiedliche Längen: Die Indizierung der Nukleotide erfolgt mit einer Länge („L“) von 11 Positionen, bei Proteinen mit 3 Positionen. BLAST verwendet diese Indexe um in der zu durchsuchenden Datenbank nach Übereinstimmungen mit diesen Indexen zu suchen. Dabei gilt: Nukleotide müssen genau übereinstimmen, während bei Proteinen, je nach verwendeter Substitutionsmatrix, auch ähnliche Einträge zulässig sind.
2. Sobald eine erste Übereinstimmung gefunden wird, so definiert die Fensterlänge F (diese kann variabel gewählt sein), wie weit entfernt von diesem Fund noch eine weitere Übereinstimmung gefunden werden muss, um die Suche als erfolgreich zu werten. Sollte keine weitere Übereinstimmung zu finden sein, wird der erste Treffer verworfen – dies wird programmintern gespeichert, so dass dieser Treffer keine weitere Verwendung findet – und es erfolgt eine Rückkehr zu Schritt 1. Tritt nun innerhalb der Fensterlänge ein weiterer Treffer auf, so werden beide Übereinstimmungen weiterverwendet und BLAST fährt mit Schritt 3 fort.
3. BLAST versucht nun, diese Übereinstimmungen in beide Richtungen der Sequenzen (Query und Datenbank) weiter zu verlängern; so lange, bis keine weiteren Treffer mehr auftreten. Hierbei müssen noch folgende Unterscheidungen beachtet werden: Der Schwellenwert „S“ gibt die Qualität der Übereinstimmungen wieder. Übereinstimmung, welche über „S“ liegen, werden als „high scoring pairs“ („HSP“) bezeichnet. Durch die Programmeinstellungen von BLAST können nun Gaps erlaubt werden, um diese HSPs miteinander zu verknüpfen.

1.1.2 BLAST-P

Der Protein-BLAST wird dazu verwendet, um Sequenzen ähnlich zur Query in einer Datenbank zu finden. In diesem speziellen Fall sucht das Programm allerdings nur nach Übereinstimmungen von Aminosäuresequenzen. BLAST-P verwendet den gleichen Algorithmus, wie unter 1.2.1 beschrieben. Überspannen die Übereinstimmungen die gesamte Sequenz, so wird von BLAST-P angezeigt, dass ein globales Alignment vorliegt. Um ein Protein genau zu identifizieren, ist dies das bevorzugteste Ergebnis.

1.1.3 PSI-BLAST

Der **positionsspezifische, iterative** BLAST-Algorithmus (PSI-BLAST) kann nur für Aminosäuresequenzen verwendet werden. Er ist eine Erweiterung des BLAST-P, und besteht aus 2 Schritten:

1. BLAST-P
2. Iteration

Zunächst wird ein normaler Protein-BLAST durchgeführt, dessen Resultat aber nur programmintern gespeichert wird. Daraus resultiert die Berechnung eines multiplen Sequenzalignments (dieses schließt die anfängliche Suchsequenz mit ein) und einer Konsensussequenz, aus welcher PSI-BLAST die positionsspezifische Matrix („**position-specific scoring matrix**“) errechnet. Diese weist gewisse Ähnlichkeiten mit einer Substitutionsmatrix auf, ist aber nicht auf 20 x 20 (z.B.) Felder beschränkt, sondern ist mit $S \times 20$ Feldern definiert, wobei „S“ hier die Länge der Suchsequenz ist.

Das so gewonnene Profil erfährt im nächsten Schritt eine Iteration, d. h. eine weitere Durchsuchung der Datenbank mit diesem Profil. Die jetzt neu gefundenen Sequenzen werden dann wiederum in das Profil aufgenommen. Dies geschieht so lange, bis keine weiteren Sequenzen mehr gefunden werden.

Schwach konservierte Positionen gehen über die Iterationsschritte verloren, stark konservierte bleiben in der Konsensussequenz erhalten.

1.1.4 PHI-BLAST

Im Gegensatz zum PSI-BLAST, welcher eine Konsensussequenz berechnet und damit die weiteren Iterationen der darauffolgenden Suchen durchführt, ist der PHI-BLAST („**pattern-hit initiated**“ BLAST) darauf ausgelegt, Datenbanken mit einem vom Benutzer definierten Motiv zusammen mit der Query zu finden. Query und Motiv kombiniert als Suchkriterien führen dazu, dass weniger Treffer in einer Datenbank gefunden werden. Es besteht allerdings das Problem, dass manche Treffer keine echte Homologie mit der Suchsequenz haben.

1.1.5 Bit-Score und e-Value

- Die Berechnung des Bit-Score geht vom Raw-Score aus, welcher sich aus der Addition der Kosten der Schritte in der Substitutionsmatrix errechnen lässt. Der Bit-Score kann nicht direkt verwendet werden, da dieser vergleichbar ist „mit der Angabe eines Abstandes ohne eine Einheit (z.B. km)“^[25], weshalb eine Normalisierung mit dem Karlin-Altschul-Parameter λ und K ^[26] stattfindet. Die verwendete Substitutionsmatrix und die Definition der Strafpunkte, welche für jedes neu geöffnete Gap wie auch die Verlängerung über Gaps hinaus mit einem bestimmten Wert angerechnet werden, bestimmen also, wie der Bit-Score des BLAST-Ergebnisses ausfallen wird und errechnet sich somit folgendermaßen:

$$S^* = \frac{\lambda S - \ln K}{\ln 2}$$

S = „Raw-Score“, S^* = „Bit-Score“

- Ein Bit-Score enthält keine Information darüber, wie statistisch relevant das Resultat ist, da dieser nur eine Auskunft über die Übereinstimmung zwischen Query und gefundenem Treffer in einer Datenbank gibt. Zur statistischen Absicherung des Ergebnisses wird nun ein Erwartungswert E („e-Value“), basierend auf einer Kombination aus Bit-Score „ S^* “, der Sequenzlänge, sowie der Summe aller Vergleichssequenzen berechnet:

$$E = \ln 2^{-S^*}$$

Je kleiner die e-value ausfällt, desto geringer ist daher die Wahrscheinlichkeit, dass das Resultat ein Zufallsergebnis ist. Ein gutes Ergebnis bewegt sich im Bereich von $< 10^{-14}$, eine e-value von 10^{-6} ist noch annehmbar.

1.2 Weitere Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nicht nur BLAST-Algorithmen angewandt, auch andere Methoden der Bioinformatik fanden Verwendung.

Mit sogenannten Rückwärtssuchen wurden die ersten Treffer der Blastsuchen validiert. Hierzu finden die Hitsequenzen als Querysequenzen Verwendung. Mit diesen werden dann wiederum dieselben Blastsuchen, welche zu den ersten Treffern führten, durchgeführt. Können auf diese Art die ersten Querysequenzen wiedergefunden werden, so erhöht sich dadurch die Signifikanz der Blastsuche.

Domänenanalysen fanden Einsatz, um die nachannotierten Enzyme auf die Konsistenz der enthaltenen Domänen zu überprüfen. Hierbei verglich man die Domänen des nachannotierten Enzyms mit denen des zu erwartenden Enzyms. Nur wenn diese in Übereinstimmung gebracht werden konnten, wurden die nachannotierten Enzyme in die nähere Auswahl aufgenommen.

2. Metabolische Netzwerke

Proteininteraktionsnetzwerke sind sehr komplexe Systeme. Eine große Anzahl von Enzymen interagieren in einem solchen System miteinander. Durch diese Interaktionen wird es einem biologischen Organismus ermöglicht, aus einfachen Molekülen hochkomplexe Verbindungen herzustellen.

2.1 Metabolische Rekonstruktion

Die Darstellung derartiger Netzwerke erfolgt zum einen durch Datenbanken mit einer grafischen Darstellung der Teilnetzwerke, wie etwa die KEGG-Datenbank (Kanehisa et al.^[27], Webadresse:^[28]); zum anderen aber auch durch dedizierte Computerprogramme, welche entweder die Daten aus solchen Datenbanken importieren können oder von Hand mit den Reaktionsdaten bestückt werden. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Software YANAsquare (Schwarz et al, 2007^[29]; Download:^[30]).

Die Möglichkeit, ein solches Proteininteraktionsnetzwerk *in silico* zu modellieren, ist einzig durch die Verfügbarkeit der Daten beschränkt. Die KEGG-Datenbank ist eine sehr vollständige Datenbank, sie weist jedoch leider Lücken in bestimmten Abschnitten der Proteininteraktionen auf; dies kann sich darin äußern, dass in einer Reaktionskaskade ein wichtiger Zwischenschritt als nicht vorhanden angezeigt wird, obwohl die Edukte aus diesem Schritt essentiell für den betroffenen Organismus sind – und dieser diese auch nicht durch Transportproteine aus dem umgebenden Milieu aufnehmen kann.

Da diese Lücken die Berechnungen der Enzymaktivitäten in YANAsquare ad absurdum führen würden, sollten sie auch im finalen Netzwerkmodell vorhanden sein, müssen diese geschlossen werden. Hierzu wendet man verschiedene Methoden an, welche unter dem Begriff der „metabolischen Rekonstruktion“ zusammengefasst sind.

Diese gliedert sich in folgende Schritte:

- Import vorhandener Daten aus (z.B.) KEGG in das verwendete Computerprogramm (YANAsquare).
- Überprüfung der stöchiometrischen Eigenschaften der jetzt vorhandenen Enzymreaktionen. D.h. alle Metaboliten aller Enzymreaktionen müssen in der richtigen Menge miteinander reagieren. Außerdem ist es zwingend notwendig, dass die Richtigkeit der Reaktionsrichtung gegeben ist, welche in der KEGG-Datenbank zu einem großen Teil leider nicht richtig annotiert sind. Als Vorlage für die Überprüfung der Reaktionsrichtungen aller im Netzwerk vorhandener Enzyme diente „Biochemical Pathways“^[31].
- Der nächste Schritt besteht darin, dass nach Metaboliten und Enzymen gesucht wird, welche noch keine Funktionen im Netzwerk ausüben. Diese, so solche im Netzwerk vorhanden, sind ein erster Hinweis darauf, dass ein Enzym einer Reaktionskaskade nicht in der Datenbank annotiert war und noch nachannotiert werden muss.
- Die Datenbank wird nun dahingehend untersucht, welches Enzyme die fehlende Funktion übernehmen könnte und ob dieses Enzym diesem bestimmten

Teilnetzwerk der fehlenden Reaktion zugeordnet werden kann.

- Im letzten Schritt versucht man nun für dieses Enzym eine Annotation zu finden. D.h. mittels BLAST wird zunächst im Zielorganismus nach Enzymen gesucht, welche diese Funktion ausüben könnten. Mit einer PCR-Analyse der cDNA untersucht man danach, ob die cDNA für dieses Enzym überhaupt im Zielorganismus gebildet wird. Sollten beide Versuche positiv ausfallen, so wird dieses – nun neuannotierte – Enzym zum vorhandenen Netzwerk hinzugefügt.

2.2 Grundlagen von „extreme pathway“-Berechnungen.

Eine sogenannte „extreme pathway“-Analyse findet Verwendung, um alle im metabolischen Netzwerk vorhandenen Stoffwechselwege durch Linearkombinationen darzustellen (Schuster et al, 2000^[32] und Paping et al, 2004^[33]). Die Berechnung der „extreme pathways“ erfolgt hierbei durch das Programm „Metatool“ (Pfeiffer et al, 1999^[34]). Jeder einzelne dieser „extreme pathways“ kombiniert alle beteiligten Enzyme in einer Art, dass alle an den Reaktionen beteiligten internen Metabolite in gleichem Maße produziert wie auch konsumiert werden. Alle Berechnungen wurden in dieser Dissertation mittels einer Kombination des YANAsquare-Modells und eines R-Skriptes durchgeführt.

Diese Vorgehensweise benötigt folgende Daten aus dem YANAsquare-Modell:

- i. Stöchiometrische Matrix
- ii. Nullsummenmatrix
- iii. Alle Stoffwechselwege
- iv. Alle Enzyme des Modells

Die Erstellung von i, ii und iii erfolgt durch eine „convex-basis“-Berechnung von Metatool, iv ist durch den Benutzer vorgegeben. Sie alle werden jedoch aus YANAsquare exportiert.

Ad i.)

Die Reihen und Spalten der Matrix (S) korrespondieren mit den Enzymen (e) und den internen (d.h. die Metaboliten werden im Netzwerk gebildet und/oder verbraucht) Metaboliten (m) im modellierten Netzwerk.

Für die Matrix ergibt sich folgende Definition:

$$S = e \cdot m \quad (\text{Gleichung 1})$$

Ad ii.)

Alle internen Metaboliten müssen in gleichem Maße verbraucht werden, wie sie gebildet werden. Durch ein sogenanntes „balancing“ erreicht man, dass kein interner Metabolit akkumuliert oder vollkommen verschwindet. Hierfür wurde mittels Metatool eine Nullsummenmatrize (n) – basierend auf einer „convex-basis“-Berechnung, welche diesen Anforderungen genügt, erstellt:

$$S_n = 0 \quad (\text{Gleichung 2})$$

Ad iii.)

Um die Aktivitäten aller an den Stoffwechselwegen beteiligten Enzyme berechnen zu können, müssen diese für das R-Skript in ihrer vollen Länge vorberechnet werden. Dies wurde durch eine „convex-basis“-Berechnung mittels YANASquare erreicht.

Ad iv.)

Die Liste aller Enzyme im Modell wurde genutzt, um die Genexpressionsdaten mit in die Berechnungen einzubeziehen. Hierfür wurde in einem ersten Schritt angenommen, dass sich die beobachtete Enzymaktivität (E_{obs}) direkt proportional zur Genexpression verhält. Eine vierfach erhöhte Genexpression hätte also eine flux value = 4 für dieses Enzym zur Folge. Dies ist natürlich eine starke Vereinfachung, da die Enzymaktivität unter anderem allosterisch moduliert wird, die Stabilität der mRNA eine wichtige Rolle spielt und natürlich auch die translationale Regulation hierbei noch einen großen Einfluss hat.

Des Weiteren wurde angenommen, dass alle Enzyme der zentralen Stoffwechselwege – also die des Energiemetabolismus wie auch des Nukleotidmetabolismus – in gleichem Maße aktiv sind, wenn nicht durch gemessene Genexpressionsdaten eine andere beobachtete Enzymaktivität (E_{obs}) festgelegt wird. Der Fluss durch diese Enzyme wird für das Modell mit „flux value“ = 1 dargestellt. Zusätzlich wurden, um eine größere Genauigkeit der Berechnungen zu erhalten, alle Flüsse für die Enzyme des Aminosäurestoffwechsels auf eine „flux value“ = -1 gesetzt. Dies hat zur Folge, dass der

Algorithmus des R-Skriptes die Aktivitäten dieser Enzyme – unter Beachtung der Aktivitäten aller anderer Enzyme im Stoffwechselnetz – kalkulieren muss; die Aminosäurestoffwechselwege werden in diesem Modell also dynamisch berechnet.

Der einem solchen System inhärente Fehler der Annahme der Proportionalität einer höheren/niedrigeren Genexpression gleich einer höheren/niedrigeren Enzymaktivität wird dadurch minimiert, dass nicht nur ein Enzym durch die gemessenen Genexpressionen in seiner Aktivität verändert wird, sondern dass viele solcher Änderungen, basierend auf den Genexpressionsdaten, vorgenommen werden.

Die Enzymaktivitäten in den Stoffwechselwegen (E_{pred}) werden dadurch berechnet, dass die Summe über jeder vorhergesagten Aktivität A eines jeden Stoffwechselweges, welcher dieses Enzym enthält, gebildet wird:

$$E_{\text{pred}} = \sum A_i \quad (\text{Gleichung 3})$$

Für das Gesamtsystem wurde ein Minimierungsschritt der Standardabweichung zum Quadrat für die Enzymaktivitäten E_{obs} und E_{pred} eingeführt:

$$\min (\sum (E_{\text{pred}} - E_{\text{obs}})^2) \quad (\text{Gleichung 4})$$

Dieser Algorithmus wird im verwendeten R-Skript angewendet um den inhärenten Fehler zu minimieren.

Zur Validierung der Richtigkeit der *in silico* Vorhersagen, basierend auf diesen Genexpressionsdaten, wurden parallel Messungen der Metabolitkonzentrationen *in vitro* durchgeführt.^[36] Auf die mikrobiologische Vorgehensweise wird unter 1.3 näher eingegangen.

Die Ergebnisse der Berechnungen des R-Skriptes wurden dann per PERL-Skript wieder in eine Form überführt, welche von YANASquare gelesen und importiert werden kann. Dieser Zwischenschritt ist wichtig, da nur in YANASquare aus den Aktivitäten der metabolischen Stoffwechselwege auf die Aktivitäten der einzelnen Enzyme zurückgerechnet werden kann. Ein Vergleich der auf diese Art berechneten Enzymaktivitäten – vor und nach der

Gabe von Wirkstoffen – kann nun dazu genutzt werden, um Vorhersagen über den Angriffspunkt neuartiger antiinfektiver Substanzen zu treffen.

2.3 Kurzanleitung KEGGbrowser und YANAsquare

Für diese Dissertation wurde YANAsquare auf einem Linuxsystem installiert, weil die Umgebungsvariablen einfacher zu konfigurieren sind. YANAsquare kann auch auf einem PC mit Windows XP (Microsoft^[36]) eingesetzt werden. Windows Vista und Windows 7 eignen sich leider nicht, um YANAsquare zu installieren, da beide die Verzeichnisstruktur der noch zu installierenden Pakete (s.u.) anders deklarieren und handhaben, so dass YANAsquare diese später nicht aufrufen kann. Wie bereits erwähnt, setzen YANAsquare und KEGGbrowser verschiedene Softwarepakete voraus:

- JAVA (Oracle^[37], Webadresse:^[38]) in einer Version von 1.6.0_16 oder höher muss installiert werden. Unter Linux kann in der Konsole mit dem Befehl „java -version“ überprüft werden, ob eine solche Version installiert ist; unter Windows in der Systemsteuerung → Software.
- In einer Linuxumgebung müssen zusätzlich C++-Bibliotheken im /usr/bin-Verzeichnis folgendermaßen verknüpft sein:

```
lrwxrwxrwx 1 root root 18 8. Jul 2009 libstdc++.so.5 -> libstdc++.so.5.0.7
-rwxr-xr-x 1 root root 765072 3. Dez 2008 libstdc++.so.5.0.7
lrwxrwxrwx 1 root root 19 28. Jan 2009 libstdc++.so.6 -> libstdc++.so.6.0.10
-rwxr-xr-x 1 root root 971048 8. Jul 2009 libstdc++.so.6.0.10
```

Abbildung II.1 Verknüpfungen der C++-Bibliotheken unter Linux. Dieser Screenshot, wie auch alle anderen in dieser Dissertation, wurde mit der freien Software GIMP^[39] erstellt.

- Das Programm „R“ (R Development Core Team^[40]) zur statistischen Berechnung der extremen Moden muss installiert sein.
- Ein PERL-Programm (z.B.: die freie Software „Strawberry PERL“^[41]) wird benötigt, um die PERL-Skripte ablaufen zu lassen.

YANAsquare wird unter Windows durch Ausführung der Datei „runYANA.bat“ gestartet. Sind alle Voraussetzungen erfüllt (JAVA ist installiert und XP ist die verwendete Windows-

Variante) so startet YANASquare. Unter Linux kann YANASquare direkt aus der Konsole gestartet werden. Hierfür einfach in den Ordner der YANASquare-Installation wechseln und „./runYANA.sh“ aufrufen.

Das Öffnen/Speichern oder Neuanlegen erfolgt im Reiter „File“:

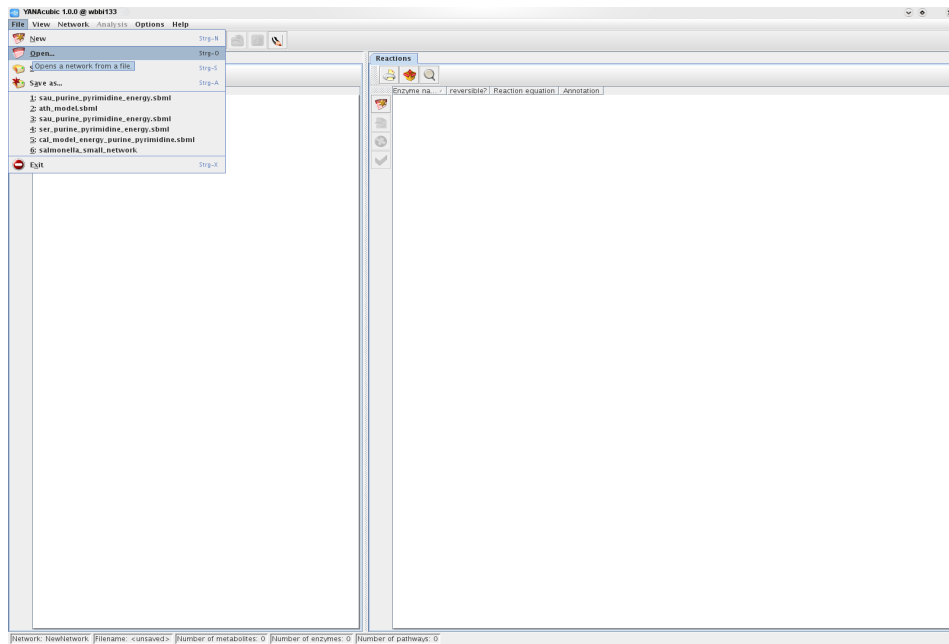


Abbildung II.2 Dateioperationen. Wenn eine Datei geöffnet wird, kann es je nach Größe des darin enthaltenen Netzwerkes einige Sekunden dauern, bis diese vollständig geladen ist.

Der Reiter „Network“ erlaubt den Zugriff auf die KEGG-Datenbank über den im YANASquare-Paket enthaltenen KEGGbrowser. Mittels dieses Werkzeugs können die in der KEGG-Datenbank hinterlegten Stoffwechselnetze direkt nach YANASquare importiert werden.

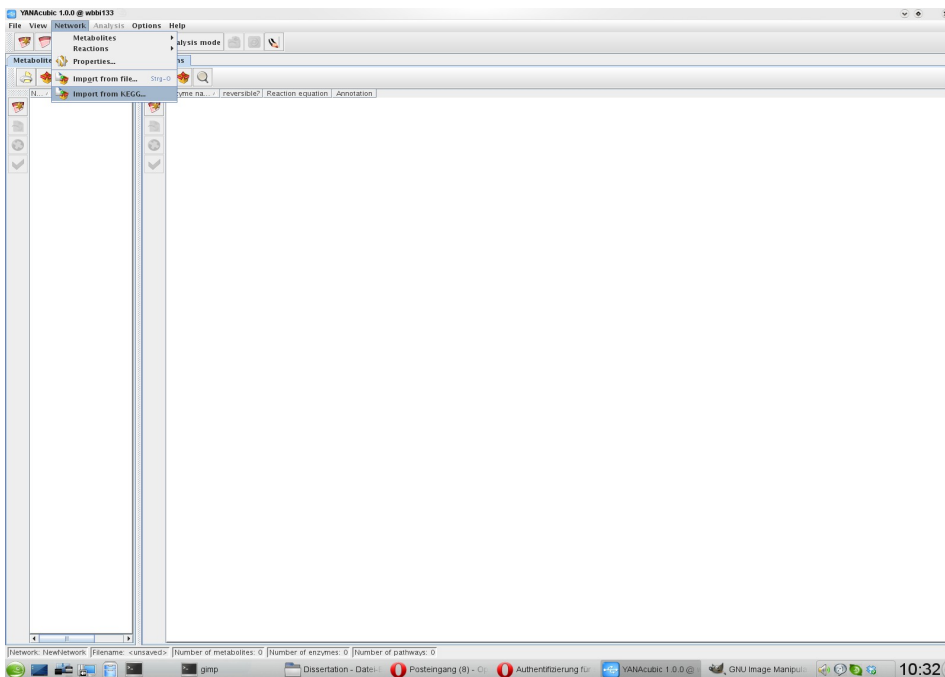


Abbildung II.3 KEGGbrowser. Mit dem KEGGbrowser können vorhandene Stoffwechselnetze aus KEGG nach YANAsquare importiert werden.

Der Import ist in verschiedene Schritte unterteilt. Zunächst wird die Spezies, von welcher die Stoffwechseldaten importiert werden sollen, ausgewählt (siehe Abbildung II.4).

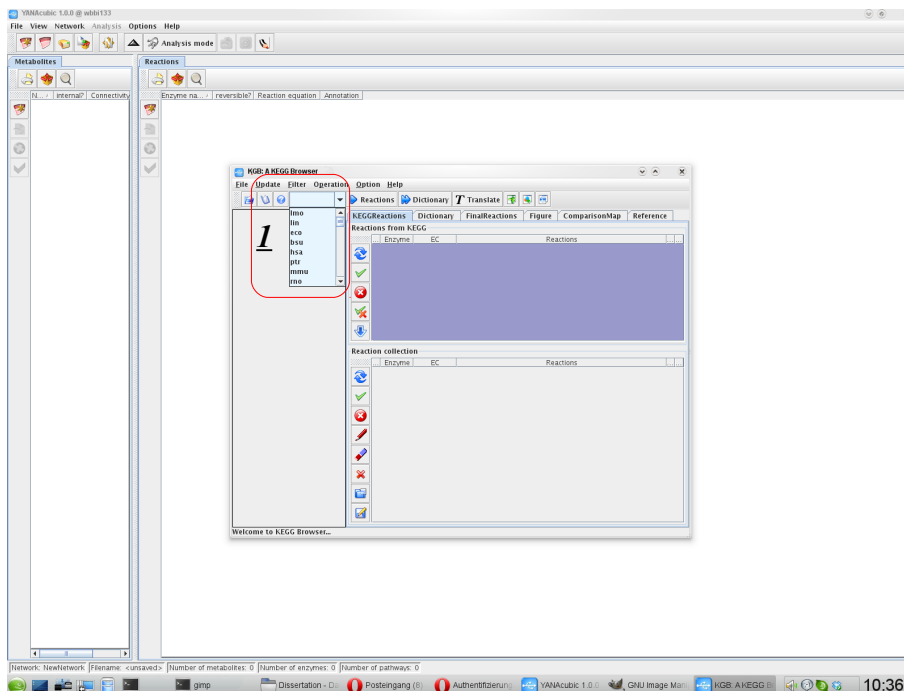


Abbildung II.4 KEGGbrowser: Auswahl der Spezies, von welcher die Netzwerkdaten importiert werden sollen.

Im Anschluss daran wird der betreffende Stoffwechselweg angewählt (siehe Abbildung II.5).

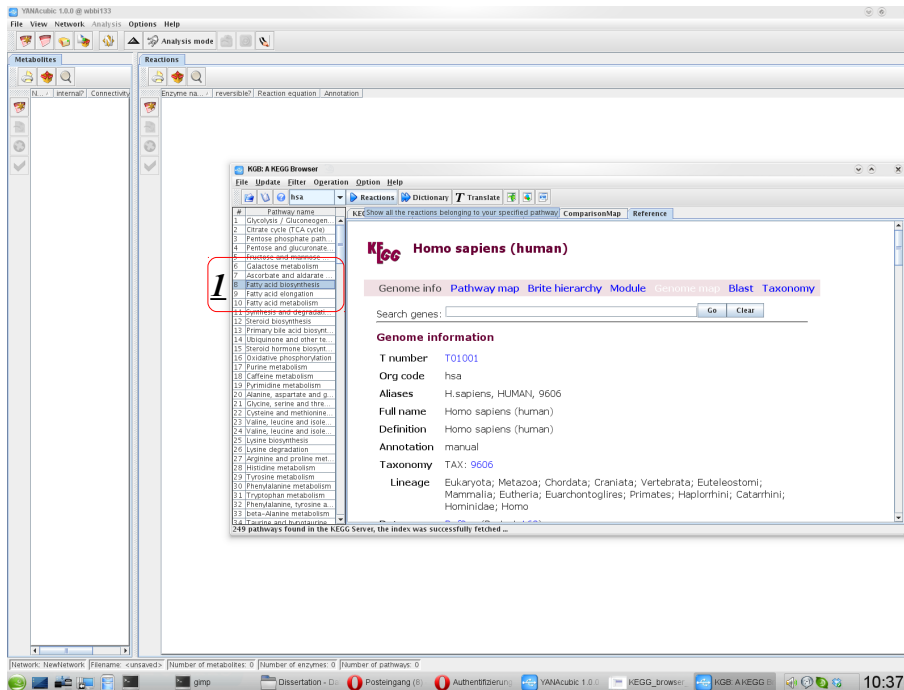


Abbildung II.5 KEGGbrowser: Auswahl des zu importierenden Stoffwechselweges.

Die Reaktionen des ausgewählten Stoffwechselweges werden wie folgt aus der Datenbank heruntergeladen:

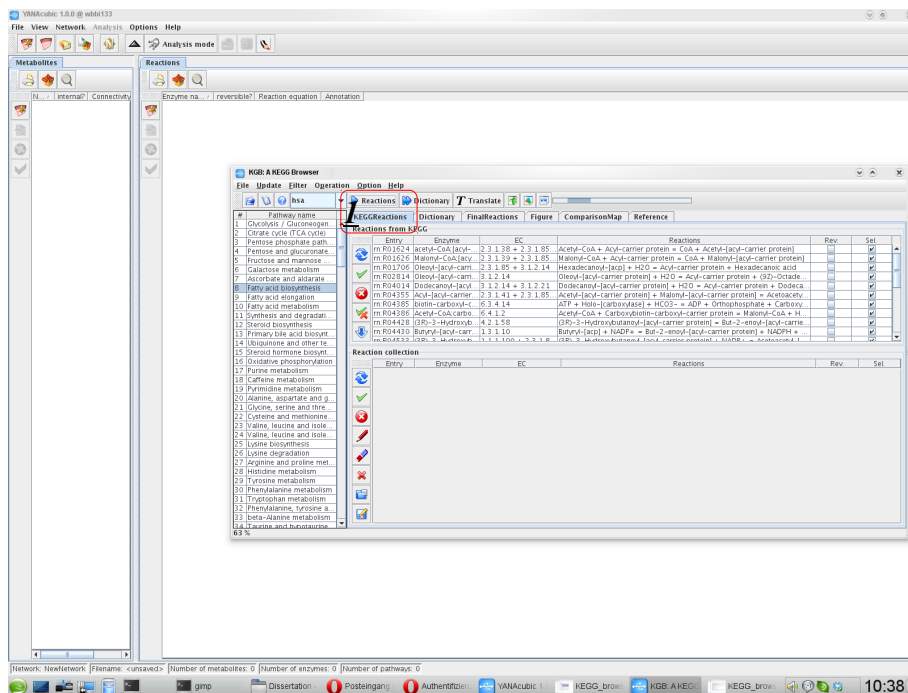


Abbildung II.6 KEGGbrowser: Download der Reaktionen aus der KEGG-Datenbank.

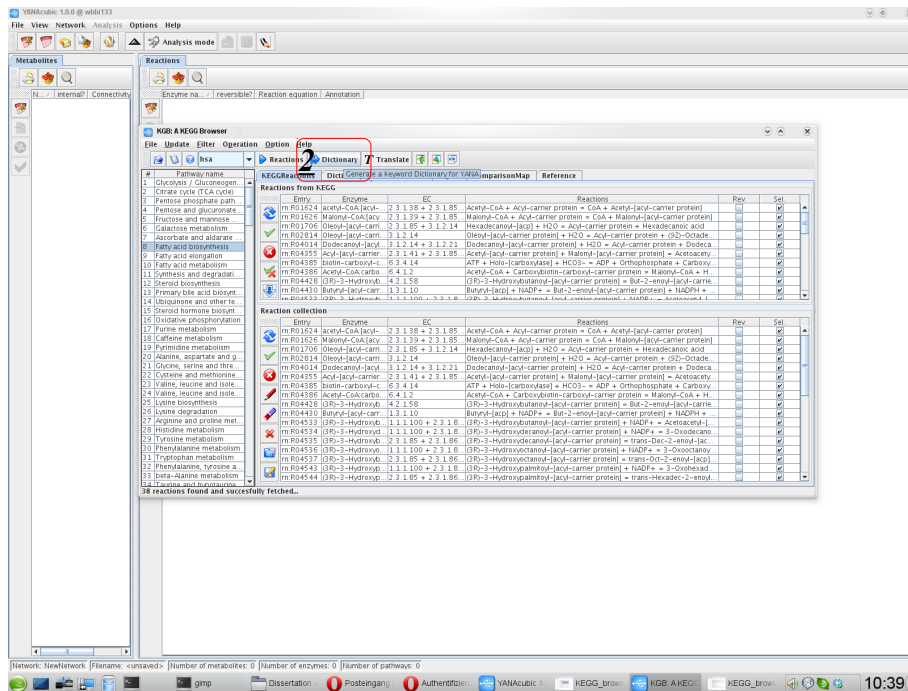


Abbildung II.7 KEGGbrowser: Auswahl der zu übernehmenden Reaktionen.

Nach dem Herunterladen müssen die erwünschten Reaktionen noch übernommen werden. In diesem Schritt können diese auch mit eigenen Namen statt den von KEGG vergebenen Reaktionsnummern versehen werden. Anschließend kann die sogenannte Bibliothek erstellt werden (siehe Abbildung II.8).

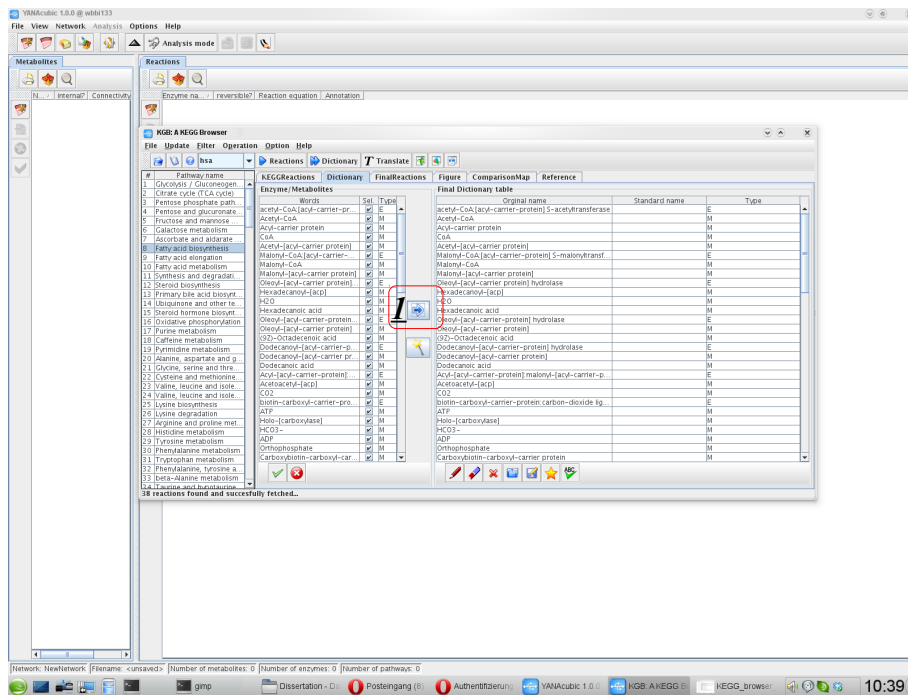


Abbildung II.8 KEGGbrowser: Erstellung der Bibliothek.

Hierbei werden alle Enzyme und Metabolite aus den übernommenen Reaktionen ausgelesen und aufgelistet. Diese können auch wiederum in Gänze oder nur zum Teil übernommen werden. Eine Änderung der jeweiligen Benennungen ist möglich.

Im letzten Schritt werden die Enzyme und Metaboliten der Bibliothek und die übernommenen Reaktionen in ein für YANAsquare lesbares Format übersetzt (siehe Abbildung II.9).

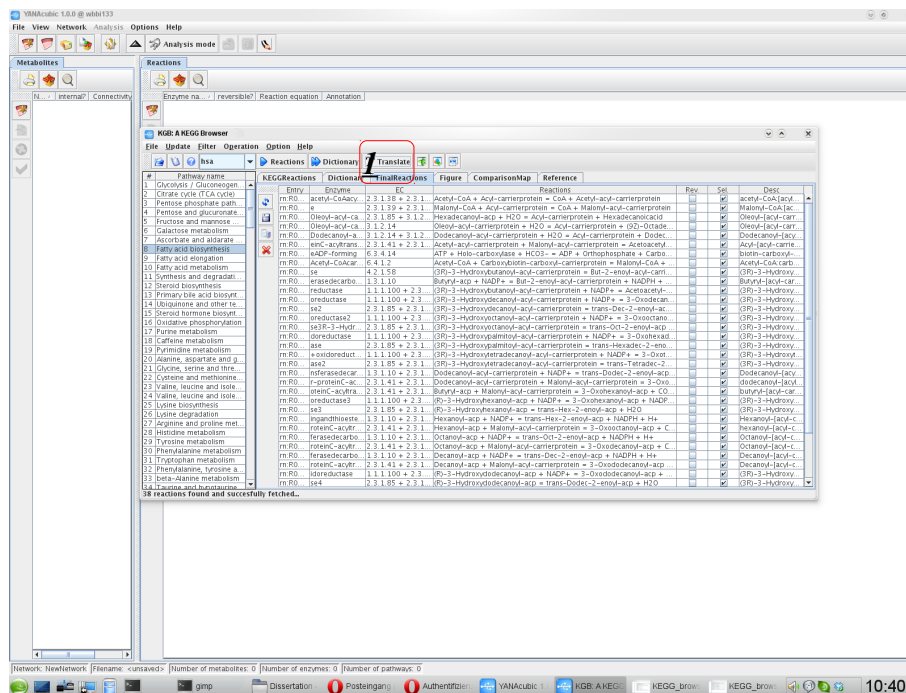


Abbildung II.9 KEGGbrowser: Erstellung eines für YANAsquare lesbaren Formats.

Sobald dieser Schritt abgeschlossen ist, kann man zum YANAsquare-Fenster zurückkehren. Durch ein erneutes Aufrufen des Reiters „Network“ → „Import from KEGG“ werden die soeben erstellten Reaktionen in YANAsquare importiert und stehen sofort als Stoffwechselnetz zur Verfügung. Allerdings ist, wie auch unter II.2.1 erwähnt, zu beachten, dass alle Metaboliten aller Enzymreaktionen in der stöchiometrisch richtigen Quantität vorhanden sind. Gleichzeitig müssen alle Reaktionsrichtungen aller Enzyme in die korrekten Richtungen ablaufen. Da die Reaktionsrichtungen in der KEGG-Datenbank zu einem großen Teil leider nicht richtig annotiert sind, hat auch hier die Überprüfung manuell zu erfolgen.

Die Berechnungen mittels des konvexen Basis-Algorithmus mit Metatool zur Reproduktion der Ergebnisse dieser Dissertation werden folgendermaßen ausgeführt:

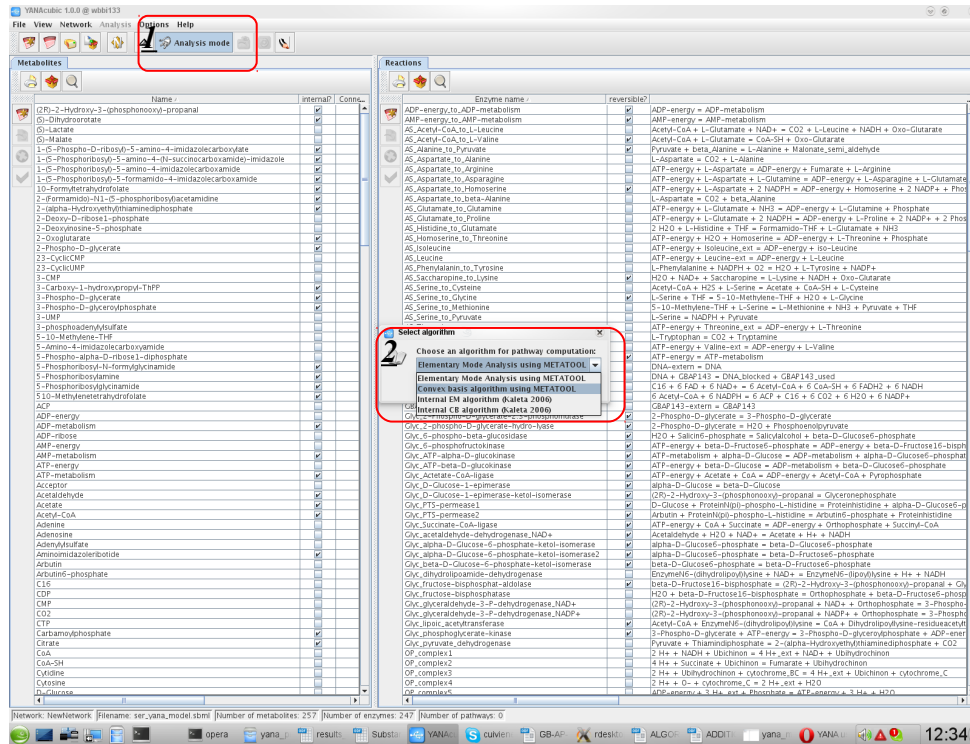


Abbildung II.10 Berechnung der extremen Moden mittels konvexem Basis-Algorithmus. Diese kann, je nach Größe des Netzwerkes und der Leistungsfähigkeit des verwendeten Computers, in der Dauer variieren.

Diese Berechnungen müssen vollständig durchgeführt werden, um die extremen Moden zu liefern. Sind diese berechnet, so können die Nullsummenmatrix, die stöchiometrische Matrix und die extremen Moden einzeln als Datei exportiert werden, um in R Verwendung zu finden. Hierfür ruft man die Reiter für „Pathways“, „Stoichiometry“ und „Nullspace Matrix“ im Ausgabefenster (rechter Bereich in Abbildungen II.11 und II.12) auf und exportiert deren Inhalte. Diese vorläufigen Ergebnisse werden als „csv“-Datei abgespeichert:

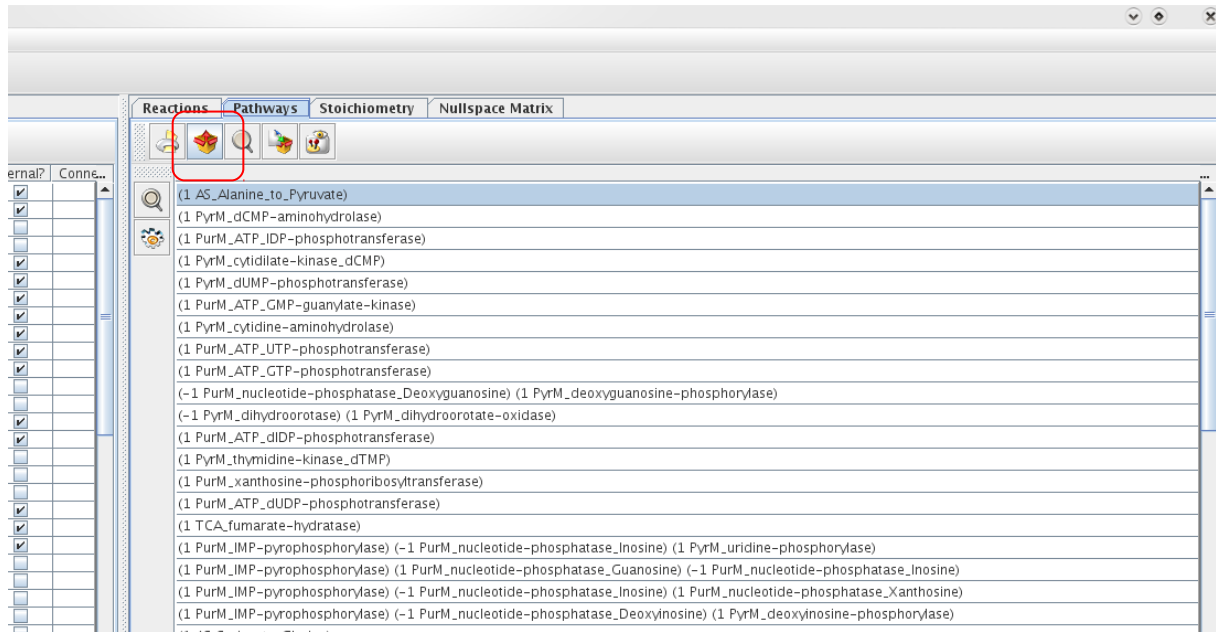


Abbildung II.11 Exportfunktion der Ergebnisfenster YANAsquares.

Im Anschluss daran erstellt und exportiert man die Datei, welche später die an die Genexpression angepassten Enzymaktivitäten enthalten soll:

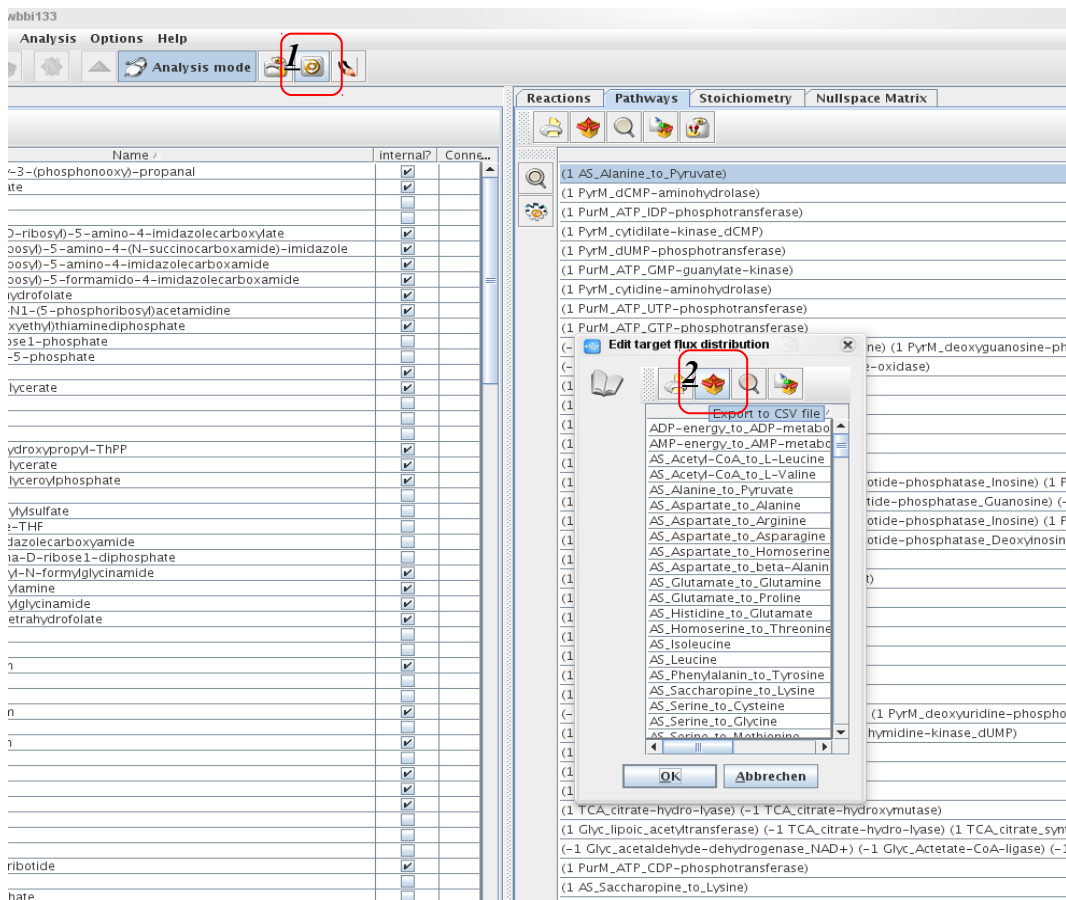


Abbildung II.12 Erstellung der Datei mit Enzymaktivitäten.

Der Standardwert für alle Enzyme in dieser Datei beträgt Null. Zur Eintragung der experimentellen Daten wird diese Datei mit einem Texteditor (z.B. mit dem freien Editor Notepad++^[42]) geöffnet. Für Enzyme, bei denen keine Veränderungen in ihrem Genexpressionsmuster zu erkennen war, trägt man einen Wert von „1“ ein, für Enzyme, bei denen Veränderungen auftraten, wird direkt die quantitative Änderung eingetragen.

Mittels eines R-Skriptes werden nun diese Daten in das YANASquare-Modell einbezogen. Hierfür wird unter Windows R entweder durch die Verknüpfung im Startmenu, auf dem Desktop oder direkt aus dem Installationsverzeichnis heraus gestartet; unter Linux über die Konsole → „R“.

Die Ansteuerung der Nullsummenmatrix, der stöchiometrischen Matrix, der Liste mit extremen Moden und der Datei mit den gemappten Enzymaktivitäten geschieht im Skript durch die Pfadangabe für diese Dateien in der Funktion „#go_enzy“:

```
„<-function()  
  {  
  pathfile=\"/Verzeichnis_der_Moden_Datei/Moden.csv\";  
  nullfile=\"/Verzeichnis_der_Nullsumme_Datei/Nullsumme.csv\";  
  stoifile=\"/Verzeichnis_der_Stöchiometrie/Stoichiometrie.csv\"  
  enzyfile=\"/Verzeichnis_des_Szenarios_Datei/Szenario.csv\"  
  ...  
  }“
```

Für die verschiedenen Genexpressionsdaten der untersuchten IQ-143-Konzentrationen muss jeweils eine eigene Datei angelegt und im Skript separat angesteuert werden. Zudem ist es notwendig unter Windows die hier verwendeten „/“ durch „\“ zu ersetzen, da andernfalls der korrekte Dateipfad nicht aufgerufen werden kann.


```

# enzyme correlation code written by liang, Oct. 2008,
#
# methods: L-BFGS-B
# variables:
# S: stoich
# E: nullspace
# w: weight factors
# z: enzyme expect. target

estimate_enzyme_rates<-function(w,S,E,z) {
  distance=abs(E%*%w)-abs(z);
  distance[z==-1]=0;
  return (sqrt(t(distance)%*%distance));
}

library(car); library(MASS);

#go_enzy<-function() {
  pathfile="* Pfad zur Datei mit berechneten extreme modes *";
  nullfile="* Pfad zur Datei mit der Nullsummenmatrix *";
  stoifile="* Pfad zur Datei mit der stöchiometrischen Matrix *";
  enzyfile="* Pfad zur Datei mit den Enzymaktivitäten *";

  pathways=as.matrix(read.table(pathfile,sep=" ",header=T,row.names=1));
  nullspace=as.matrix(read.table(nullfile,sep=" ",header=T,row.names=1));
  stoichiometry=as.matrix(read.table(stoifile,sep=" ",header=T,row.names=1));
  enzyme.expect=as.matrix(read.table(enzyfile,sep=" ",header=T,row.names=1));
  print(enzyme.expect);

  pathways.revc=pathways[,3];
  pathways.revc[which(pathways.revc=="true")]=-100;
  pathways.revc[which(pathways.revc=="false")]=0;
  pathways.lower=as.numeric(pathways.revc);

  nullnorm=nullspace ; #wrong: apply(nullspace,2,function(x){x/sqrt(x %*% x)});
  rownames(nullnorm)=rownames(nullspace);

  # cut the stoichiometry matrix
  #stoi.cut=stoichiometry[rownames(metabolite.expect),];
  stoi.cut=stoichiometry;
  nullnorm.cut=nullnorm;

  # Optimize the Constraint Linear Regression model of (Ew-y)'(Ew-y)
  optimum=optim(
    rep(50,ncol(nullnorm)), function(X)
return(estimate_enzyme_rates(X,stoi.cut,nullnorm.cut,enzyme.expect[,1]));,
    method="L-BFGS-B", lower=pathways.lower, upper=rep(100,ncol(nullnorm)),
control=list(trace=1,maxit=10000)
  );
  act.estimate=optimum$par;
  print(act.estimate); # models' activity

  result=nullnorm%*%act.estimate; fd=as.numeric(result); names(fd)=rownames(result); #print(fd);

  print(round(cbind(nullnorm%*%act.estimate,enzyme.expect[,1]),3) );

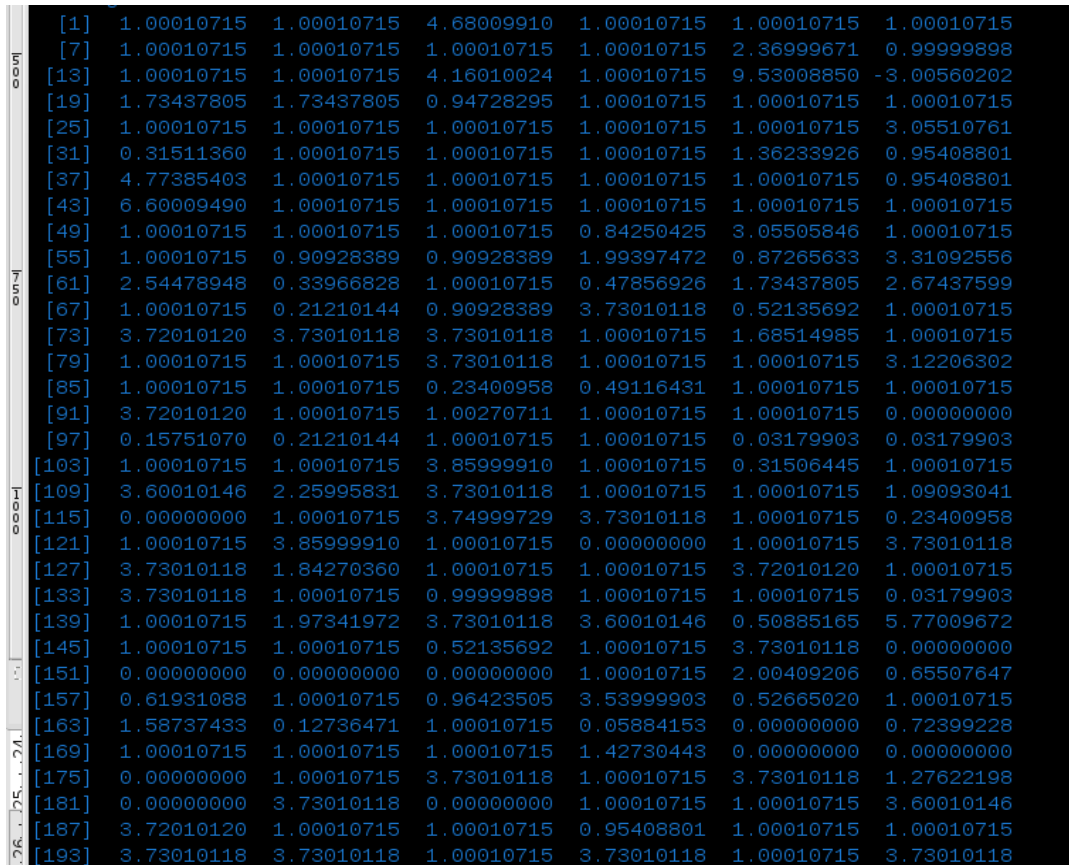
  uc=enzyme.expect[,1];
  fd[u==-1]=NA;
  u[u==-1]=NA;

  layout(c(1,2));
  plot(abs(fd),abs(u),xlab="calculation",ylab="experiment",main="absolute value", pch=9);
  fd_abso=abs(fd);
  u_abso=abs(u);
  #abline(lm(fd_abso~u_abso),lty=8,lwd=1,col="red");
  plot(fd,u,pch=3,,xlab="calculation",ylab="experiment",main="raw value");
  tc=cbind(abs(fd),abs(u));
}

```

Abbildung II.13 Berechnung der Modenaktivitäten. Das hier abgebildete Skript wurde für alle Berechnungen der resultierenden Modenaktivitäten nach Gabe verschiedener Konzentrationen von IQ-143 verwendet. Die vom Benutzer einzutragenden Pfadangaben für die stöchiometrischen Matrizen, der Nullsummenmatrizen, der Listen mit den extremen Moden und der Listen mit Enzymaktivitäten sind in fetter, kursiver Schrift dargestellt.

Der resultierende Output dieses Skriptes enthält die aus den gemappten Enzymaktivitäten berechneten Aktivitäten der einzelnen Moden.



[1]	1.00010715	1.00010715	4.68009910	1.00010715	1.00010715	1.00010715
[7]	1.00010715	1.00010715	1.00010715	1.00010715	2.36999671	0.99999898
[13]	1.00010715	1.00010715	4.16010024	1.00010715	9.53008850	-3.00560202
[19]	1.73437805	1.73437805	0.94728295	1.00010715	1.00010715	1.00010715
[25]	1.00010715	1.00010715	1.00010715	1.00010715	1.00010715	3.05510761
[31]	0.31511360	1.00010715	1.00010715	1.00010715	1.36233926	0.95408801
[37]	4.77385403	1.00010715	1.00010715	1.00010715	1.00010715	0.95408801
[43]	6.60009490	1.00010715	1.00010715	1.00010715	1.00010715	1.00010715
[49]	1.00010715	1.00010715	1.00010715	0.84250425	3.05505846	1.00010715
[55]	1.00010715	0.90928389	0.90928389	1.99397472	0.87265633	3.31092556
[61]	2.54478948	0.33966828	1.00010715	0.47856926	1.73437805	2.67437599
[67]	1.00010715	0.21210144	0.90928389	3.73010118	0.52135692	1.00010715
[73]	3.72010120	3.73010118	3.73010118	1.00010715	1.68514985	1.00010715
[79]	1.00010715	1.00010715	3.73010118	1.00010715	1.00010715	3.12206302
[85]	1.00010715	1.00010715	0.23400958	0.49116431	1.00010715	1.00010715
[91]	3.72010120	1.00010715	1.00270711	1.00010715	1.00010715	0.00000000
[97]	0.15751070	0.21210144	1.00010715	1.00010715	0.03179903	0.03179903
[103]	1.00010715	1.00010715	3.85999910	1.00010715	0.31506445	1.00010715
[109]	3.60010146	2.25995831	3.73010118	1.00010715	1.00010715	1.09093041
[115]	0.00000000	1.00010715	3.74999729	3.73010118	1.00010715	0.23400958
[121]	1.00010715	3.85999910	1.00010715	0.00000000	1.00010715	3.73010118
[127]	3.73010118	1.84270360	1.00010715	1.00010715	3.72010120	1.00010715
[133]	3.73010118	1.00010715	0.99999898	1.00010715	1.00010715	0.03179903
[139]	1.00010715	1.97341972	3.73010118	3.60010146	0.50885165	5.77009672
[145]	1.00010715	1.00010715	0.52135692	1.00010715	3.73010118	0.00000000
[151]	0.00000000	0.00000000	0.00000000	1.00010715	2.00409206	0.65507647
[157]	0.61931088	1.00010715	0.96423505	3.53999903	0.52665020	1.00010715
[163]	1.58737433	0.12736471	1.00010715	0.05884153	0.00000000	0.72399228
[169]	1.00010715	1.00010715	1.00010715	1.42730443	0.00000000	0.00000000
[175]	0.00000000	1.00010715	3.73010118	1.00010715	3.73010118	1.27622198
[181]	0.00000000	3.73010118	0.00000000	1.00010715	1.00010715	3.60010146
[187]	3.72010120	1.00010715	1.00010715	0.95408801	1.00010715	1.00010715
[193]	3.73010118	3.73010118	1.00010715	3.73010118	1.00010715	3.73010118

Abbildung II.14 Output des R-Skriptes. Dieses enthält die Aktivitäten aller Moden, welche nun auf das Transkriptom bezogen berechnet sind.

Dieser Output muss nun für jedes Szenario einzeln gespeichert werden, um dann wieder in YANAsquare Verwendung zu finden. Mittels eines PERL-Skriptes (nach PhD Chunguang Liang vom Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg), wird dieser Output wieder in eine von YANAsquare lesbare Form überführt:

```

#!/usr/bin/perl -w

#README
#All files mentioned in this code should be in the same directory. This makes it much easier to work with
this code.

#results_R.txt must be the output from R, but only the activity of the extreme modes (right after
"iteration") and before the calculated enzyme activity.

open (RES, "results_R.txt") or die "Couldn't find file containing mode activity";
$i=1;

foreach $line (<RES>)
{
    if ($line =~ /\[/)
    {
        $line =~ s/\[.+\\//;

        while ($line =~ /^[^s]+/)
        {
            $line =~ s/([^\s]+)/;
            $HASH{$i} = $1;$i++;
        }
    }
    else
    {print NEW $line;}
}
close RES;

# while( my($k, $v) = each %HASH)
# {
# print "$k => $v\n";
# }

#infile.txt has to be the pathway-file exported from YANASquare, which was used for the R-calculations.
#outfile.txt should be named in the same way as infile.txt, but with a tag to represent it being a R-output.

open (IN, "infile.txt") or die "Yana2 pathways file not found";
open (NEW, ">OUTFILE.csv") or die "wtf?";

foreach $line (<IN>)
{
    if ($line =~ /^"(\d*)"$/)
    {
        $nummer = $1;
        $line =~ s/"1.0"/"$HASH{$nummer}"/;
        print $line . "\n";

        print NEW $line;
    }

    else
    {print NEW $line;}
}

close IN;close NEW;ww

```

Abbildung II.15 Skript zur Überführung des R-Outputs in eine von YANASquare lesbare Datei.

Im ersten Schritt dieses Skriptes erfolgt das Einlesen der Output-Datei von R mit dem Befehl „open (RES, “R_results.txt“). „RES“ trennt jede Modenaktivität mit einem Zeilenumbruch von den anderen. Im Anschluss daran wird die Datei mit den Modenaktivitäten aus YANAsquare, welche außer einem Platzhalterwert von „1.0“ noch keinerlei Berechnungen für deren Aktivitäten enthalten, über „open (IN, “infile.txt““ geöffnet. „In“ schreibt nun die von R berechneten Modenaktivitäten in die dafür vorgesehenen Zeilen und Spalten und speichert dies unter einem neuen Dateinamen, welcher im Befehl „open (NEW, “>OUTFILE.csv““ definiert ist.

In Windows muss dieses Skript im installierten PERL-Paket ausgeführt werden, unter Linux reicht es aus, die Konsole aufzurufen und „perl /*Verzeichnis des Skriptes*/Name des Skriptes*“ auszuführen.

Der Import der so erstellten Aktivitäten der extremen Moden erfolgt über die Importfunktion von YANAsquare:

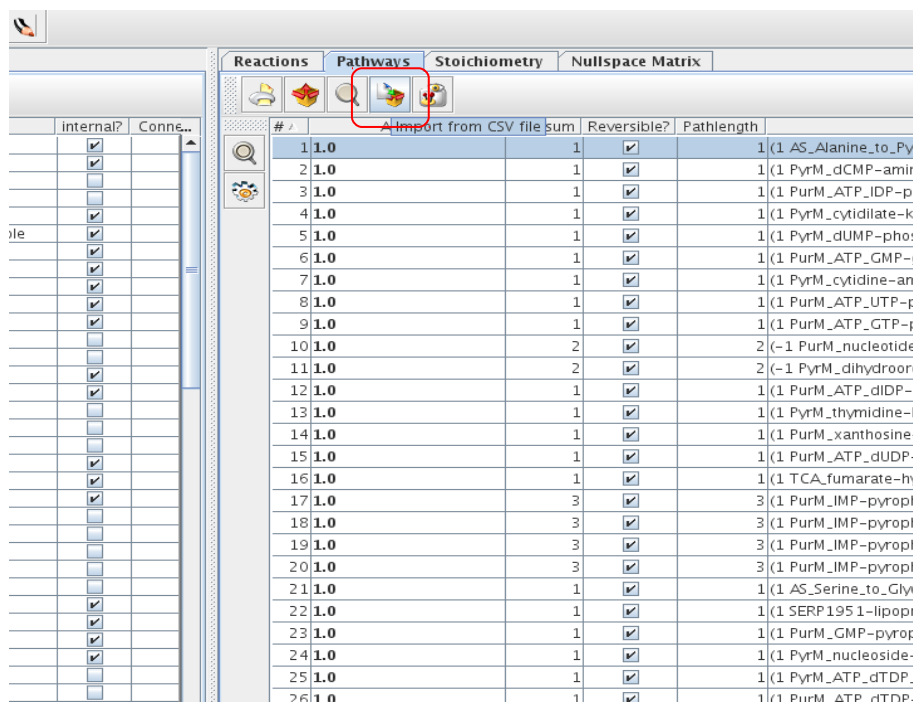


Abbildung II.16 Import der berechneten Aktivitäten der extremen Moden.

Im Anschluss daran können nun die Aktivitäten aller Enzyme – auch derer, die nicht durch Genexpressionsdaten definiert wurden – ausgelesen werden:

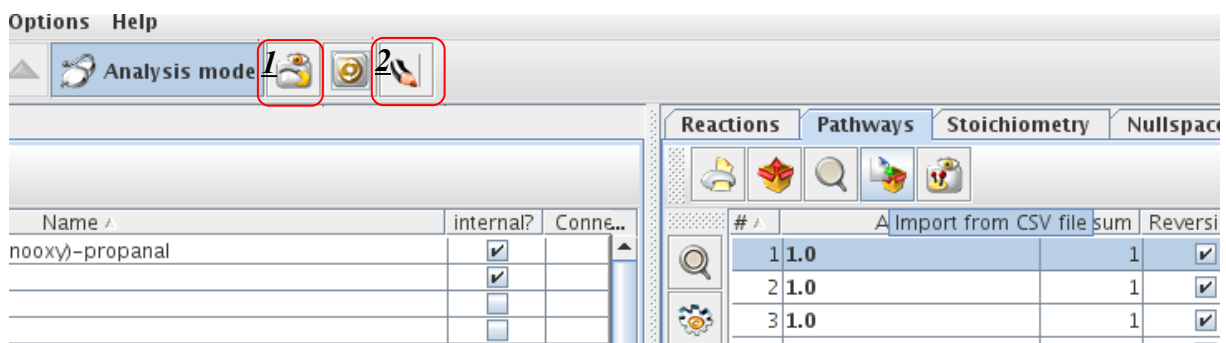


Abbildung II.17 Export aller Enzymaktivitäten.

Diese Enzymaktivitäten werden, basierend auf den Modenaktivitäten, berechnet und geben somit die tatsächliche Enzymaktivitäten, welche im Organismus vorliegen.

3. Messungen der Metabolitkonzentrationen

Für die Messung der Metabolitkonzentrationen wurde eine Methodik für eine Hochdurchsatzflüssigchromatografie („high performance liquid chromatography“; HPLC), mit Detektion durch ultraviolettes Licht, nach Schmitz^[43] durch Dr. Carina Rikanović^[44] adaptiert und folgendermaßen angewandt:

Eine Probe von 10 µl wurde in eine 4 µm „Synergi Fusion“ Chromatografiesäule mit reverser Phase (Phenomex, Aschaffenburg, Deutschland) mit einem internen Durchmesser von 150 x 4,6 mm injiziert. Die mobile Phase für die Chromatografie bestand aus Wasser (A) und Acetonitril (B). Beide Phasen enthielten 5 mM Tributylamin und 0,1 % Ameisensäure. Die Durchflussrate betrug 1ml/min und die Temperatur der Säule wurde auf 25 °C eingestellt.

Für die Detektion wurde eine Wellenlänge von 260 nm ausgewählt, da alle Nukleotide bei dieser die höchste Absorption von ultraviolettem Licht aufweisen. Alle Messungen wurden dreifach durchgeführt. Verschiedene vordefinierte Lösungen dienten zur Kalibrierung der Quantifikation der zu detektierenden Nukleotide (Konzentrationen zwischen 0,5 µg/ml und 100 µg/ml).

Hersteller	Produkt
AppliChem (Darmstadt, Deutschland)	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) und die reduzierte Form NADH wie auch Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP) und dessen reduzierte Form NADPH
Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)	Methanol und Acetonitril
Fluka (Buchs, Schweiz)	Tributylamin und Ameisensäure (hochrein)
Sigma (Taufkirchen, Deutschland)	Adenosin-5'-Monophosphat (AMP), Cytosine-5'-Monophosphat (CMP), Dextromethorphan, Imipramin, Inosin-5'-Monophosphat (IMP), Guanosin-5'-Monophosphat (GMP), NaCl, Midazolam, Paclitaxel, Reserpin, Takrin, Tolbutamid, Thymidin-5'-Monophosphat (TMP), Xanthosin-5'-Monophosphat (XMP)

Tabelle II.2 Hersteller der verwendeten Standards zur Kalibrierung der HPLC-Anlage.

4. Gewinnung der Genexpressionsdaten

Die Anzucht der Zellkulturen für die Genexpressionsanalyse für *S. epidermidis* RP62A und *S. aureus* HG001 wurden von der Arbeitsgruppe Ohlsen am Institut für molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

Die Versuche zur Gewinnung von Genexpressionsdaten von *P. falciparum* 3D7 nach Zugabe von Metylenblau mittels Echtzeit-PCR („real time polymerase chain reaction“; RT-PCR), fanden a interdisziplinären Forschungszentrum der Justus von Liebig Universität Gießen statt.

Die dafür genutzten Protokolle werden, auch wenn diese Daten nicht vom Verfasser erstellt worden sind, hier aufgeführt, um die Verlässlichkeit der damit gewonnenen Daten darzustellen. Dies ist besonders im Hinblick auf die metabolische Netzwerkanalyse mit YANAsquare von großer Wichtigkeit, da diese Daten direkt in die Modelle eingeflossen sind, um die Effekte der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Wirkstoffe zu simulieren und zu analysieren.

4.1 *S. epidermidis* RP62A

Eine Übernachtskultur *S. epidermidis* RP62A, angezogen in LB-Medium nach Luria (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton und 0,5 g/l NaCl), ist so weit verdünnt worden, dass eine optische Dichte (OD, bei einer Wellenlänge von 600 nm; OD₆₀₀) von 0,05 in einer 50ml Flasche erreicht wurde. Diese Kultur wurde dann in Gegenwart einer nichtinhibitorischen Konzentration von 0,16 µM IQ-143 (1/4 minimale inhibitorische Konzentration) unter Agitation bei 200 Umdrehungen pro Minute bei 30 °C kultiviert, bis OD₆₀₀ von 1,0 erreicht war. Bei der Kontrollgruppe ohne IQ-143 erfolgte die Kultivierung nach dem gleichen Schema. Für eine Konzentration von 1,25 µM (2 x minimale inhibitorische Konzentration) IQ-143 wurde die gleiche Vorgehensweise gewählt, die Zellkultur nach Erreichen einer OD₆₀₀ jedoch noch 10 Minuten länger kultiviert.

Die Ernte der Zellen erfolgte mittels Zusatz von „RNA Protect“ (Quiagen, Hilden, Deutschland) gemäß Herstellerangaben. Vor Isolation der RNA wurden die Bakterienzellen mittels Glaskügelchen in einem „Fast prep Shaker“ (Qbiogene, Heidelberg, Deutschland) für 45 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 6,5 Einheiten lysiert. Die Isolation der RNA erfolgte mittels eines „RNeasy kit“ (Quiagen, Hilden, Deutschland) gemäß dem Standardprotokoll des Herstellers.

Die Microarrays des Gesamtgenoms von *S. epidermidis* RP62A bestanden aus 2282 Genen/ORFs und wurden für die DNA- Microarrayanalyse herangezogen. Die RNA aus 12 (für 0,16 µM IQ-143) und 6 (1,25 µM IQ-143) Versuchsreihen ist folgendermaßen gewonnen worden:

10µg der aus der exponentiellen Wachstumsphase der Kulturen (vgl. III.2.1) gewonnenen „total RNA“ (d.h., die extrahierte RNA wurde nicht aufgereinigt und beinhaltet daher die gesamte RNA der Zellen) wurden mittels reverser Transkription und Fluoreszenzmarkierung isoliert. Hierfür wurden Zufallsprimer verwendet; für die reverse Transkription die Superscript III reverse Transkriptase von Invitrogen. Die daraus resultierende cDNA markierte man mit den Farben Cy3 und Cy5 nach dem Standardprotokoll des Herstellers Scienion markiert.

Um einer Verfälschung der Ergebnisse während der reversen Transkription durch unterschiedliche Entfärbung oder verschiedene Aufnahmezeiten von Cy3 und Cy5 auszuschließen, wurde ein weiteres Experiment mit reverser Markierung, d.h. ein Tausch der Farbmarkierung von Cy3 zu Cy5 und Cy5 zu Cy3, durchgeführt.

Die Hybridisierung des Microarrays (16 h bei 50 °C) und das Waschen der Platten erfolgte nach Herstellerangaben. Hybridisierte Platten wurden mit einem Genepix 4000B Laser-Scanner (Axon Instruments Inc., Union City, CA, USA) eingelesen. Die bioinformatische Analyse der Hybridisierungen erstellte man mit Genepix Pro 3.0 (Axon Instruments Inc., Union City, CA, USA). Die Daten jedes einzelnen Bildes wurden normalisiert. Die Ergebnisse sind in der öffentlichen Datenbank PROTECS^[45, 46] hinterlegt und können mit der Zugangsnummer „PROTECS:IQ-143“ abgerufen werden.

4.2 *S. aureus* HG001

Der Bakterienstamm *S. aureus* HG001 wurde bis zur einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 in der exponentiellen Phase angezogen. Bei Erreichen diesen Wertes ist der Testgruppe die zehnfache minimal inhibitorische Konzentration an IQ-238 zugegeben worden. Es folgte eine Inkubation der Kontrollen und Testgruppen für eine weitere Stunde. 7 ml Zellkultur wurden mit 7 ml RNAprotect™ Bacteria Reagent von Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany) auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 6000 x G bei 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 1 ml RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Germany) versetzt mit 1 % (vol/vol) β-Mercaptoethanol. Die Zellen wurden anschließend mit einer FastPrep®-24 und einer Lysematrix E von MP Biomedicals (MP Biomedicals, Solon, OH, USA) lysiert und für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Die Aufreinigung des Überstandes mittels eines RNeasy®Mini Kit von Qiagen erfolgte nach einer kurzen Zentrifugation.

Zur Aufreinigung wurde im Anschluss das Eluat mit DNase von Roche (Roche, Grenzach-Wyhlen, Germany) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und danach nochmals mit dem RNeasy®Mini Kit aufgereinigt.

Zur Ausfällung der RNA wurden die aufgereinigten Proben mit Natriumacetatlösung (3 molar, pH 4,8, Verhältnis Probe:Natriumacetat = 10:1) mit eisgekühltem Ethanol (100 %

vol/vol, Verhältnis Probe:Ethanol = 1:2,5) versetzt, und bei -80 °C für 2 Stunden inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 11000 x G, 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit eisgekühltem Ethanol (70 % vol/vol) gewaschen und im Anschluss bei Raumtemperatur getrocknet.

Der Microarray wurde durch die *in situ* Synthese, d.h. also direkt an der RNA, von 10.807 Oligonukleotiden durch ausgewählte 60mer Sonden nach Charbonnier^[47] von Agilent (Agilent, Palo Alto, CA, USA) von der Ohlsengruppe des Zentrums für Infektionsforschung der Universität Würzburg erstellt. Es deckt 98 % der offenen Leserahmen („open reading frames“ = ORFs) der Genome – inklusive ihrer Plasmide –, welche für die Stämme N315 und mu50 (beide Kuroda^[48]), MW2 (Baba^[49]), COL (Gill^[50]), NCTC8325 und USA300 (beide Diep^[51]), MRSA252 und MSSA476 (beide Holden^[52]) annotiert sind.

Um die Markierung der DNA vorzubereiten, wurden Stämme von *S. aureus* kultiviert und deren RNA wie unter 2.1 beschrieben extrahiert. Nach einer zusätzlichen Anwendung der DNase wurde die Abwesenheit von DNA-Resten mit quantitativer PCR (SDS 7700, Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) getestet. Chargen von 5 µg totaler *S. aureus* HG001 RNA wurden mit Cy-3 dCTP (ohne MT02) oder Cy-5 dCTP (mit MT02) mittels SuperScript II (Invitrogen, Basel, Schweiz) unter Beachtung der Herstellerangaben markiert. Darauf folgte die Aufreinigung der derart markierten DNA mittels QiaQuick-Säulen (Qiagen) und deren Lösung in 50 µl Agilent Hybridisierungspuffer. Die Hybridisierung ging bei 60 °C für 17 Stunden von statten. Die einzelnen Platten wurden mit proprietären Agilentpuffern gewaschen, unter Stickstoff getrocknet und mit einem Photomultiplikator bei beiden Wellenlängen abgescannt.

Die Extraktion der Fluoreszenzintensitäten erfolgte mit der „feature extraction software“ (Agilent, Version 8). Der LOWESS-Algorithmus („locally weighted linear regression“) fand Verwendung zur Filterung des Hintergrundrauschens. Die Daten von zwei biologisch unterschiedlichen Experimenten wurden als log₁₀-Werte mit GeneSpring 8.0 (Silicon Genetics, Redwood City, CA, USA) analysiert; die statistische Signifikanz der differentiellen Genexpression bestätigte sich auch nach Anwendung der GeneSpring. Der vollständige Datensatz ist in der GEO-Datenbank („gene expression omnibus“) unter den Zugriffsnummern GPL11137XXXX (Plattform) und GSE33832 (Originaldatenset) hinterlegt.

4.3 *P. falciparum* 3D7

Zur Bestimmung des mRNA-Gehaltes im Parasiten nach einer Methylenblaubehandlung wurden Trophozoiten von *P. falciparum* 3D7 einer Konzentration von 15 nM Methylenblau ausgesetzt. Dies entspricht dem Fünffachen IC_{50} nach 72 Stunden.

Nach 9, 12 und 18 Stunden erfolgte die Entnahme von Proben der Kontroll- und der Testgruppe. Die infizierten roten Blutkörperchen wurden für 10 Minuten bei 37 °C in einem zwanzigfach höherem Volumen eines Lysepuffers für rote Blutkörperchen (7 mM K_2HPO_4 , 1 mM NaH_2PO_4 , 11 mM $NaHCO_3$, 58 mM KCl, 56 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 14 mM Glukose und 0,02 % Saponin bei einem pH von 7,4) inkubiert.

Diese Suspension wurde bei 1500 x G für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen, die Parasiten im Anschluss nochmals im oben beschriebenen Puffer sowie danach nochmals in PBS gewaschen. Für diese Schritte wurde das selbe Zentrifugationsprotokoll verwendet und das resultierende Pellet bei -80 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Lyse der Parasiten wurde das Pellet mit den Parasiten dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut und im Anschluss die Gesamt-RNA mit dem „NucleoSpin RNA/Protein Kit“ (Macherey-Nagel, Düren) extrahiert. Zur Entfernung der DNA wurde der Extrakt im Anschluss mit RNase freier DNase I (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) nach Herstellerangaben behandelt. Die Überprüfung auf vollständige Zersetzung der DNA erfolgte mittels PCR.

Aliquots von 450 ng RNA wurden, für jede Probe, zu cDNA reverse transkribiert. Hierfür wurden Oligo-dT Primer von Abgene („Reverse-iT MAX 1st Strand Synthesis Kit“, Abgene, Hamburg, Germany) verwendet.

Die quantitative RT-PCR wurde mit einem „Rotor-Gene 3000 real-time PCR cycler“ (Corbett Research, Sydney, Australia) und dem „SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix“ (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) erstellt. Die Arbeitsgruppe der Universität Giessen erstellte und überprüfte die dazu benötigten Primer auf ihre Funktionalität. Dadurch konnten folgende Veränderungen der Genexpression nach Zugabe von Methylenblau gemessen werden:

Protein	Relative mRNA-Expression nach 9 h	Relative mRNA-Expression nach 12h	Relative mRNA-Expression nach 18h
Thioredoxin-Reduktase	0,55	0,74	0,61
Glutathion-Reduktase	0,73	1,49	1,2
Glyoxalase I	keine Daten	0,51	0,48
Glyoxalase II	0,9	0,36	0,38
Lactate-Dehydrogenase	0,7	0,93	1,93
1-Cys-Peroxiredoxin	0,59	0,79	1,27
Glutaredoxin	0,88	0,63	0,7
Glutamat-Cystein-Ligase	0,61	0,55	0,54
thioredoxinabhängige Peroxidase 1	0,45	0,49	0,39
glutaredoxinähnliches Protein 1	0,51	0,76	0,66

Tabelle II.3 Veränderungen der Genexpression nach Zugabe von Methylenblau.

5. Messung der inhibitorischen Konzentrationen und Cytochromassays

Zur Bestimmung der inhibitorischen Konzentration („inhibitory concentration“; IC) des Wirkstoffes IQ-143 für menschliche Zellen führte die Arbeitsgruppe Ölschläger des Instituts für molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg Versuchsreihen mit J774.1 Makrophagen und 293T Nierenzellen durch. Die Cytochromassays erstellte die Arbeitsgruppe Unger des Lehrstuhls für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg.

5.1 Messung der inhibitorischen Konzentrationen

Die Kultivierung der J774.1 Makrophagen fand in Kompletmedium (RPMI mit NaHCO_3 , 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES (pH 7,2), 100 U/ml Penicillin, 50 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin, 50 μM 2-Mercaptoethanol und ohne Phenolrot) statt. Um zu bestimmen wann eine inhibitorische Konzentration erreicht wurde, bei der nur noch 50 % der Zellen lebensfähig waren (IC_{50}), gab man steigende Konzentrationen von IQ-143 bzw. IQ-238

einer Zellsuspension von 200 μl mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml zu. Diese kultivierte man im Anschluss bei 37 °C, 5 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit. Nach Zugabe von 20 μl Alamarblau, unter Beachtung des Protokolls nach Pimentel-Elardo^[53], wurde die optische Dichte nach 24, 38 und 72 Stunden gemessen.

Zellkulturen von 293T Nierenepithelzellen mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/ml wurden nach dem gleichen Protokoll, jedoch mit einem anderem Medium getestet. Für diese Zelllinie wurde eine Suspension aus DMEM-Medium („Dulbecco's Modified Eagle Medium“) und hochreinem fötalem Kälberserum („FBS superior“) verwendet: 4,5 g/l DMEM ohne Glutamin, mit Pyruvate und hohem Glukoseanteil („DMEM, high glucose, pyruvate, no glutamine“, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) gemischt mit 20 % FBS superior und 200 mM L-Glutamin. Beide Zelllinien erreichten den IC_{50} bei 40 μM Wirkstoff.

5.2 Cytochromassay

Die für den Wirkstoffabbau hauptverantwortlichen Cytochromenzyme wurden nach Unger^[54] untersucht. Die Gewinnung der Cytochromenzyme CYP1A2, 2C8/2C9/2C19, 2D6 und 3A4 erfolgte aus baculovirusinfizierten Insektenzellen. Bezogen wurden diese Enzyme von Natutec (Frankfurt, Deutschland). Diese inkubierte man mit verschiedenen Konzentration von IQ-143 (1 μM , 10 μM und 100 μM). Die Ergebnisse sind in Tabelle II.4 zusammengefasst:

Cytochromisoenzyme	Prozentzahl der Aktivität gegenüber der Kontrollgruppe		
	1 μM IQ-143	10 μM IQ-143	100 μM IQ-143
1A2	106,9	127,3	126,2
2C8	142,8	144,0	146,0
2C9	122,7	130,0	142,0
2C19	102,2	101,8	90,1
2D6	99,1	100,9	58,7
3A4	98,6	95,3	6,6

Tabelle II.4 Effekte von IQ-143 auf CYP1A2, 2C8/2C9/2C19, 2D6 und 3A4. Nur sehr hohe Konzentrationen (100 μM) von IQ-143 haben einen sichtbaren Effekt auf die Cytochromisoenzyme 2C19, 2D6, und 3A4. Alle Enzyme weisen unter 1 μM und 10 μM sogar höhere Aktivitäten als in der Kontrollgruppe ohne IQ-143 auf.

6. Voronoi-Diagramme

In der Biologie eignen sich solche Diagramme besonders gut um z.B. das Genom eines Organismus den jeweiligen Stoffwechselwegen zuzuordnen und dies grafisch darzustellen.

Mit einem Voronoi-Diagramm können Gene gemäß ihren spezifischen Funktionen im Organismus grafisch dargestellt werden. Dazu trägt man die Gene in einem zweidimensionalen Raum auf. Dieser Raum wird dann in verschiedene Regionen, welche den verschiedenen Stoffwechselwegen entsprechen, aufgeteilt. Die Regionen im Raum werden durch eine gegebene Menge an Genen, welche diesen Stoffwechselwegen angehören, durch genau einen Punkt, das sogenannte Zentrum, repräsentiert. Es umfasst alle Gene des Raumes, welche gemäß der euklidischen Metrik näher am Zentrum der Region liegen als an jedem anderen Zentrum anderer Regionen. Dadurch wird die Zerlegung des Raumes und somit die Zugehörigkeiten der Gene zu bestimmten Stoffwechselwegen definiert.

Die in dieser Dissertation durchgeführten Voronoi-Diagramme für die Effekte der Naphtylisochinoline IQ-143 und IQ-238 wurden von Jörg Bernhardt der mathematisch naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald erstellt.

Die globale Expressionsanalyse wurde nach Bernhardt et al.^[55] und Otto et al.^[56] durchgeführt. Die einzelnen Regionen des Raumes entsprachen dabei den funktionellen Gruppen der TIGR-Familien – also Sammlungen von Proteinfamilien, annotierten multiplen Sequenzalignments und hidden Markov Modellen – der betreffenden Staphylokokkenstämme.

Die Genexpressionen nach Zugabe der verschiedenen Naphtylisochinoline werden nach ihren logarithmischen Veränderungen farbig in den Voronoi-Diagramme abgebildet: orange für hochregulierte Gene, blau für herunterregulierte Gene.

III. Analyse der Effekte des Naphtylisochinolins IQ-143

1. Wahl von IQ-143

Die Behandlung von Infektionskrankheiten wird durch die stetig steigende Resistenzbildung gegen gebräuchliche Antibiotika immer schwieriger. Im Besonderen müssen hier die Staphylokokken hervorgehoben werden, da viele Stämme dieser Bakterienart gegen die standardmäßig verwendeten Antibiotika und auch gegen Reserveantibiotika, resistent sind. Diese multiresistenten Stämme verbreiten sich weltweit, ^[57] und sind im schlimmsten Fall nicht mehr zu behandeln. Sie weisen zudem eine äußerst hohe Persistenz im Patienten auf. ^[58, 59, 60] Die Suche nach neuen Antibiotika ist also von äußerster Dringlichkeit.

Die aus tropischen Lianen der Familie der Ancistrocladaceae isolierten, *N,C*-gekoppelten Naphtylisochinoline stellen eine neue Unterklasse von bioaktiven Stoffen dar. So weisen Ancistrocladinium A und B exzellente antiinfektive Aktivitäten gegen *Leishmania major* auf. ^[61, 62, 63, 64, 65] Diese extrahierten Substanzen, wie auch deren synthetische Analoga, ^[66, 67, 68] bieten ein reiches Repertoire mit großem Potential gegen Infektionskrankheiten und dienen in erster Linie als Leitsubstanzen zur Synthese neuartiger Wirkstoffe durch den SFB630 der Universität Würzburg.

Das Naphtylisochinolin IQ-143 (siehe Abbildung III.1) wurde als Ausgangsstoff für die bioinformatische Wirkstoffanalyse ausgewählt, da für diesen schon diverse Vorarbeiten wie Genexpressionsanalyse und Zytotoxizitätsmessungen durchgeführt wurden.

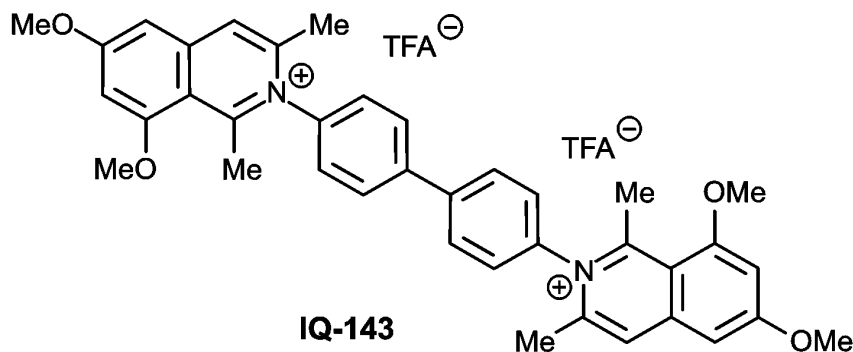


Abbildung III.1 Naphtylisochinolin IQ-143. Das Naphtylisochinolin IQ-143 ist ein synthetisches Analogon des N,C-gekoppelten Naphtylisochinolinalkaloids Ancisheynin, welches in früheren Studien^[69] eine wachstumshemmende Wirkung auf *S. aureus* wie auch *S. epidermidis* zeigte.

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus des ausgewählten Vertreters dieser neuen Substanzklasse wurden Techniken aus der Metabolomik, der Metabonomik und Proteomik, wie auch der Genomik eingesetzt.

Technik	Definition
Metabolomik	Die Untersuchung von chemischen Prozessen, welche Metabolite aus Stoffwechselprozessen als Edukte verwenden oder selbst Metabolite als Teil einer Stoffwechselreaktion herstellen.
Metabonomik	Umschreibt die quantitative Messung von Reaktionen eines Organismus auf verschiedene Umwelteinflüsse auf der Ebene der Metabolite.
Proteomik	Die Untersuchung der Proteine eines Organismus – besonders in ihrer Struktur und Funktion.
Genomik	Beschreibt die Untersuchung des Genoms eines Organismus, wie z.B. die Änderung der Genexpression unter verschiedenen Umwelteinflüssen.

Tabelle III.1 Übersicht über die verschiedenen „Omik“-Techniken. Die hier aufgeführten Techniken wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt.

Die durch jede dieser Methoden gewonnenen Daten sind – einzeln und nicht methodenübergreifend betrachtet – von relativ geringem direktem Nutzen.^[70] Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung der Effekte des Naphtylisochinolins IQ-143 auf Zellen von *S. aureus* USA300, *S. epidermidis* RP62A und menschliche Zellen, eine neue Vorgehensweise gewählt: Daten aus der Genomik, Metabolomik, Metabonomik und Proteomik werden kombiniert. Dies erfordert natürlich einen hohen Aufwand an Versuchen – sowohl in der Bioinformatik als auch im Labor – wie auch eine hohe

Kooperationsbereitschaft der beteiligten Wissenschaftler. Im Gegenzug erhalten die so gewonnenen Daten jedoch eine viel höhere Aussagekraft.

Für diesen Kombinationsansatz werden Daten aus Microarrayuntersuchungen der Genexpression von *S. epidermidis* RP62A – im Zustand mit und ohne IQ-143 – als Grundlage für die Aktivitäten der verschiedenen Proteine eines metabolischen Netzwerkes verwendet. Die Validierung der metabolischen Netzwerkanalyse erfolgt über metabonomische Untersuchungen.

Anstatt den Organismus als eine Art „black box“ zu betrachten, wird hier der Versuch gewagt, die genauen Stoffwechselforgänge zu identifizieren, d.h., statt einen neuen Wirkstoff zu einer Zellkultur hinzuzugeben und nur zu beobachten ob toxische oder antibiotische Effekte auftreten, ohne sich genau damit zu beschäftigen warum diese Effekte auftreten, wird hier genau das Gegenteil untersucht: Warum treten die beobachteten Effekte in dieser Art auf und welche zellulären Ursachen haben diese? Die Kombination der verschiedenen Techniken bietet die einzigartige Chance, die metabolischen Effekte verschiedener Wirkstoffe im Detail zu verstehen.

2. Optimale Bedingungen für das Wachstum, die Ernte und die Metabolitkonzentrationsmessungen von Staphylokokken

Die Messungen der Metabolitkonzentrationen erfolgten durch Dr. Carina Rikanović am Lehrstuhl für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg. Die Kultivierung und Ernte der hierfür benötigten Zellkulturen wurden vom Verfasser im Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

Übernachtskulturen von *S. aureus* USA300, angezogen in LB-Medium nach Luria (5g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton und 0,5 g/l NaCl) wurden im Verhältnis 1:100 zu 500 ml frischem LB-Medium nach Luria in einen 1000 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Auch hierbei wurden wieder die Konzentrationen 0,0 µM, 0,16 µM und 1,25 µM IQ-143 eingestellt. Die Kulturen wuchsen unter Agitation (175 Umdrehungen pro Minute) bei 30 °C, bis eine OD₆₀₀ von 1,0 erreicht wurde. Die Ernte erfolgte nach folgendem Schema:

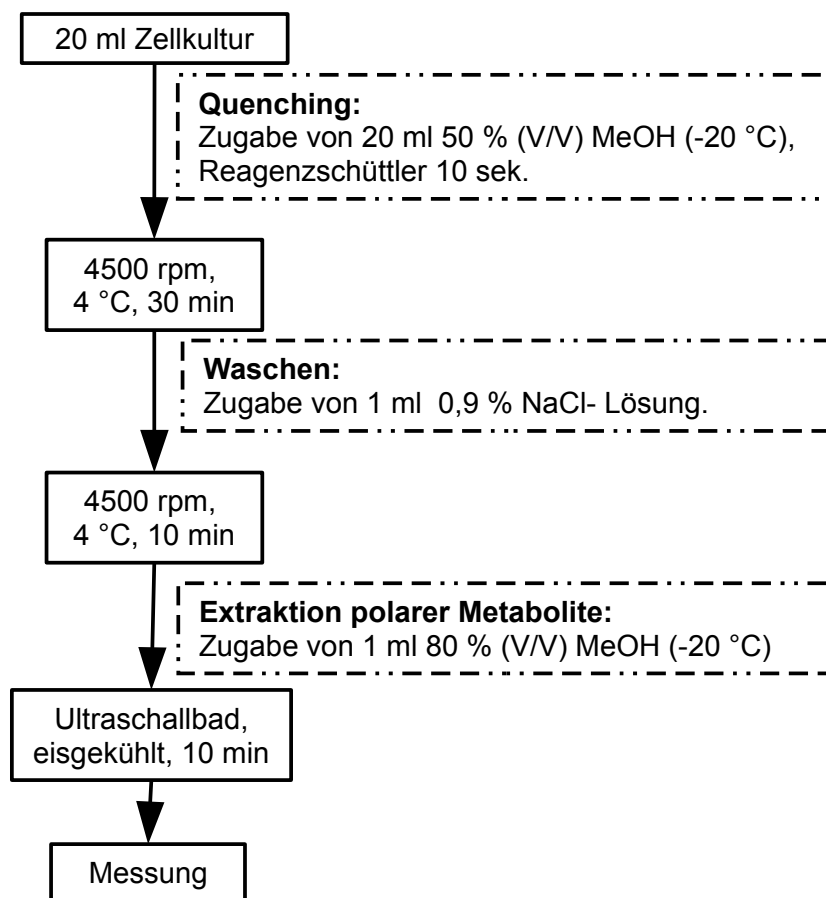


Abbildung III.2 Ernteprotokoll für Zellkulturen von *S. aureus* USA300. Die Methodik und Messprotokolle für die Metabolitkonzentrationsmessungen werden im Detail in der Dissertation von Dr. Carina Rikanović^[71] aufgeführt; eine allgemeine Kurzbeschreibung ist unter II.3 zu finden, speziell für IQ-143 und *S. aureus* USA300 unter III.5.

3. Metabolitänderungen nach Gabe von IQ-143

Zur Validierung der theoretischen Ergebnisse der metabolischen Netzwerkrechnungen wurden die Konzentrationen der Purin- und Pyrimidinnukleotide wie auch die Nikotinamidkonzentrationen gemessen.

3.1 Gradienten der HPLC-Analyse zur Messung der Konzentrationen der Purin- und Pyrimidinnukleotide

Um die Wirkung von IQ-143 auf *S. aureus* direkt zu messen, wurden die Konzentrationen von Purin- und Pyrimidinnukleotiden (AMP, CMP, GMP, IMP, TMP und XMP) der verschiedenen Proben (Gewinnung beschrieben unter III.2.2) ermittelt.

Folgender Gradient wurde für die Acetonitrilphase angelegt:

Zeit (Minuten)	% Acetonitril	% Ameisensäure
0 – 5	95	5
5 – 15	80	20
15 – 18	80	20
18 – 21	0	100
21 – 24	95	5

Tabelle III.2 Gradient der Acetonitrilphase der HPLC-Säule zur Bestimmung der Purin- und Pyrimidinnukleotidkonzentrationen. Bis 5 Minuten nach Start eines HPLC-Laufes besteht eine konstante Konzentration von 5 % Ameisensäure im Lösungsmittel. Ab 5 Minuten erhöht sich der Gradient über 10 Minuten auf 20 % Ameisensäure und 80% Acetonitril. Diese Konzentration bleibt für weitere 3 Minuten konstant. Nach 18 Minuten wird die Säule mit 100 % Ameisensäure für 3 Minuten gewaschen und anschließend wieder mit einer Lösung von 5 % Ameisensäure und 95 % Acetonitril in ein Äquilibrium gebracht.

3.2 Gradienten der HPLC-Analyse zur Messung der Konzentrationen der Nikotinamide

Zur Untersuchung und Quantifizierung der Nikotinamidderivate (NAD, NADH, NADP und NADPH) die gleiche Methode, jedoch mit einem anderen Fließmittelgradienten, fand Anwendung:

Zeit (Minuten)	% Acetonitril	% Ameisensäure
0 – 5	95	5
5 – 15	50	50
15 – 18	50	50
18 – 21	0	100
21 – 24	95	5

Tabelle III.3 Gradient der Acetonitrilphase der HPLC-Säule für die Untersuchung der Nikotinamidkonzentrationen. Bis 5 Minuten nach Start eines HPLC-Laufes besteht eine konstante Konzentration von 5 % Ameisensäure und 95 % Acetonitril. Ab 5 Minuten erhöht sich der Gradient über 10 Minuten auf 50 % Ameisensäure und 50 % Acetonitril. Diese Konzentration bleibt für weitere 3 Minuten konstant. Nach 18 Minuten wird die Säule mit 100 % Ameisensäure für 3 Minuten gewaschen und anschließend wieder mit einer Lösung von 5 % Ameisensäure und 95 % Acetonitril in ein Äquilibrium gebracht.

3.3 Gemessene Veränderung der Zellmetabolite: Anstieg von NADPH, AMP, GMP und TMP, Abfall von NAD und CMP

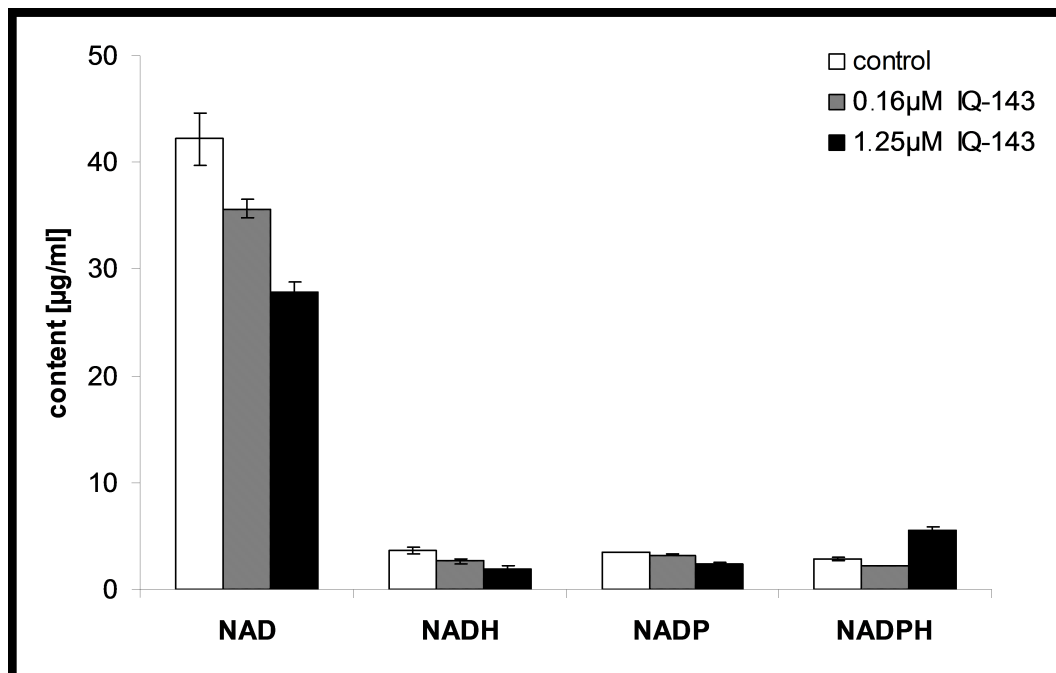


Abbildung III.3 Veränderung der Nikotinamidkonzentrationen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen an IQ-143.

Nach Gabe von IQ-143 konnten komplexe Veränderungen in den Metabolitkonzentrationen von *S. aureus* USA300 gemessen. Die Nikotinamide NAD, NADH und NADP weisen bei einer Gabe von 0,16 µM IQ-143 eine Verringerung ihrer Konzentration zwischen 10 % bis 30 % auf; bei einer Gabe von 1,25 µM IQ-143 einen Abfall von 30 % bis 50 % (siehe Abbildung III.3 und Tabelle III.4). Die Konzentration von NADPH verdoppelt sich bei einer Gabe von 1,25 µM IQ-143.

Die folgende Tabelle vermittelt eine detaillierte Übersicht des Einflusses von IQ-143 auf die gemessenen Metabolite.

	Kontrolle		0,16 μM IQ-143			1,25 μM IQ-143		
	mean [$\mu\text{g/ml}$]	sdv	mean [$\mu\text{g/ml}$]	sdv	% of control	mean [$\mu\text{g/ml}$]	sdv	% of control
NAD	42,19	2,44	35,68 **	0,92	84,57	27,89 **	0,95	66,11
NADH	3,71	0,31	2,63 **	0,28	70,89	1,95 **	0,21	52,56
NADP	3,47	0,06	3,24 **	0,05	93,37	2,42 **	0,05	69,74
NADPH	2,87	0,12	2,25 **	0,02	78,40	5,56 **	0,22	193,73

Tabelle III.4 Messung der NAD-, NADH-, NADP- und NADPH-Konzentrationen in *S. aureus* USA300: Alle Werte sind in $\mu\text{g/ml}$ an gemessener Konzentration (Mittelwert von drei Versuchsreihen; „mean“) und Prozentzahl der Kontrollgruppe („% of control“), bezogen auf die zugegebene Konzentration an IQ-143, aufgelistet. Statistisch signifikante Abweichungen werden durch „**“ (= $p < 0,05$) und „***“ (= $p < 0,01$) gekennzeichnet. „sdv.“ gibt die Standardabweichung nach Mann-Whitney-U-Test mit Statistica 8.0 wieder.

Nicht nur die Nikotinamide wiesen stark veränderte Konzentrationen nach Gabe von IQ-143 auf, auch das Metabolitprofil von Purin- und Pyrimidinnukleotiden veränderte sich:

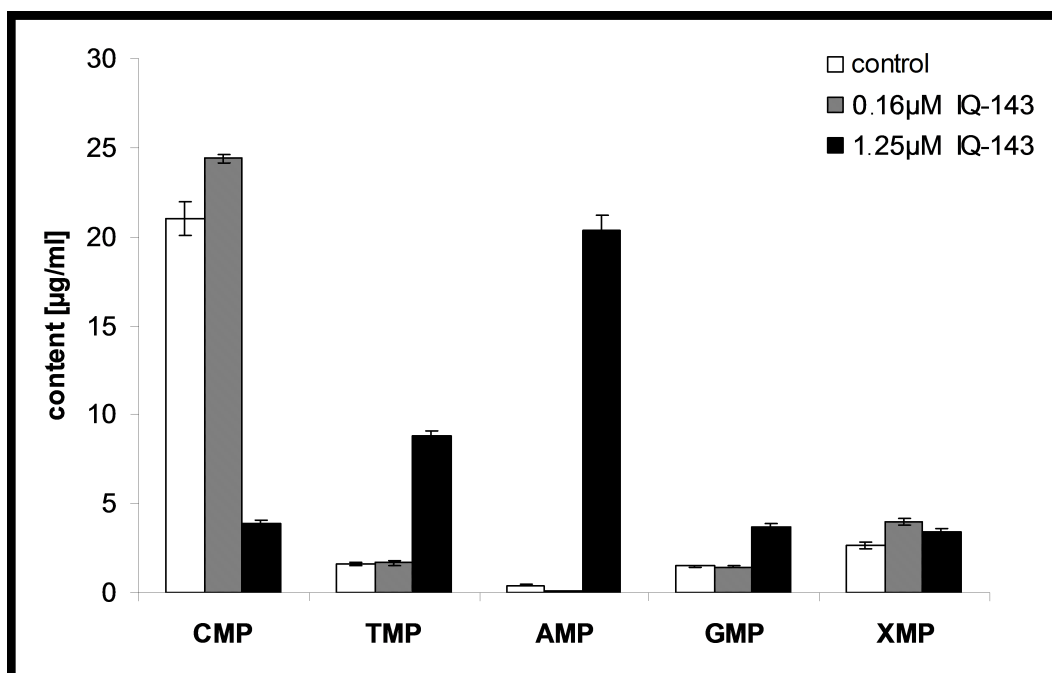


Abbildung III.4 Veränderung der Nukleotidkonzentrationen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen an IQ-143.

Die Konzentration von TMP erhöhte sich um das Fünffache, die Konzentration von AMP um das Zwanzigfache bei einer Gabe von 1,25 μM IQ-143. Im Gegensatz verringerte sich die Konzentration von CMP um 80 % im Vergleich zur Kontrolle. Alle übrigen gemessenen

Nukleotide wiesen ebenfalls eine Steigerung in ihren Konzentrationen auf. Bei Gabe von 0,16 μM IQ-143 ergab sich nur eine leichte Steigerung der CMP-Konzentration. Die Konzentrationsänderungen der übrigen Nukleotide war in diesem Fall demnach heterogener als bei Gabe von 1,25 μM IQ-143.

Die folgende Tabelle zeigt eine detaillierte Übersicht des Einflusses von IQ-143 auf die gemessenen Nukleotide.

	Kontrolle		0,16 μM IQ-143			1,25 μM IQ-143		
	mean [$\mu\text{g/ml}$]	sdv	mean [$\mu\text{g/ml}$]	sdv	% of control	mean [$\mu\text{g/ml}$]	sdv	% of control
CMP	21,03	0,96	24,41 *	0,24	116,07	3,86 **	0,19	18,35
TMP	1,61	0,12	1,67	0,11	103,76	8,81 *	0,24	547,20
AMP	0,42	0,06	0,12 *	0,02	28,57	20,37 **	0,80	4850,00
GMP	1,51	0,05	1,44 **	0,05	95,36	3,66 *	0,21	242,38
XMP	2,62	0,20	3,96 **	0,16	151,15	3,44 **	0,11	131,30

Tabelle III.5 Messung der Purin- und Pyrimidinnukleotidkonzentrationen in S. aureus USA300: Alle Werte sind in $\mu\text{g/ml}$ an gemessener Konzentration (Mittelwert von drei Versuchsreihen; „mean“) und Prozentzahl der Kontrollgruppe („% of control“), bezogen auf die zugegebene Konzentration an IQ-143, aufgelistet. Statistisch signifikante Abweichungen werden durch „*“ (= $p < 0,05$) und „**“ (= $p < 0,01$) gekennzeichnet. „sdv.“ gibt die Standardabweichung nach Mann-Whitney-U-Test mit Statistica 8.0 wieder.

4 Metabolische Netzwerkanalyse zeigt differentiellen antibiotischen Effekt von IQ-143

Im Folgenden wird der Aufbau der metabolischen Netzwerke für *S. epidermidis*, *S. aureus* und menschliche Zellen, die Berechnung der Enzymaktivitäten unter verschiedenen Umweltvariablen (Wildtyp und unter Einfluss von IQ-143) wie auch die Ergebnisse dieser *in silico* Methoden diskutiert. Zur Validierung und Aufklärung des Wirkmechanismus von IQ-143 werden die gemessenen Metabolitkonzentrationen auf die *in silico* Ergebnisse gemappt.

Die Grundlage eines jeden metabolischen Netzwerkes stellen die verschiedenen Metabolite, welche von den Enzymen im Stoffwechsel als Edukte verwendet oder als Produkte hergestellt werden, dar. Diese Enzymreaktionen sind in der Lage, durch Weitermetabolisierung von Produkten aus vorangehenden Reaktionen Enzymreaktionskaskaden zu formen. Diese Reaktionskaskaden müssen in ihrer Gesamtheit betrachtet werden, um den Fluss der Metabolite vom ersten Edukt bis zum letzten Produkt berechnen zu können. Es muss sichergestellt sein, dass die Enzymreaktionen eines metabolischen Netzwerkes – um korrekte Ergebnisse zu liefern – in ihrer Stöchiometrie und in ihrer Reaktionsrichtung richtig in die Computermodelle einprogrammiert sind.

Um dies zu gewährleisten werden verschiedene Schritte der Programmierung durchlaufen (vgl. auch: II.2.1).

- Import vorhandener Daten aus (z.B.) KEGG in das verwendete Computerprogramm (YANAsquare).
- Überprüfung der stöchiometrischen Eigenschaften der jetzt vorhandenen Enzymreaktionen.
- Überprüfung des Modells auf Proteine ohne Verknüpfung oder Lücken in den Reaktionskaskaden.
- Schließen dieser Lücken mittels BLAST- und PCR-Analyse der cDNA des betroffenen Organismus.
- Überprüfung der jetzt neu hinzugekommenen Proteine auf ihre stöchiometrischen Eigenschaften wie auch auf die Richtigkeit der Reaktionsrichtung.

4.1 Metabolische Rekonstruktion

Im ersten Schritt – noch vor dem Import der ersten Netzwerkdaten aus KEGG – wurde festgelegt, welche Teilnetzwerke des gesamten Metaboloms von *S. epidermidis*, *S. aureus* und des Menschen in die Modelle einprogrammiert werden sollen. Dies muss jedoch

immer auch unter den Gesichtspunkten der Machbarkeit und der Berechenbarkeit erfolgen. Die Machbarkeit ist nicht gegeben, wenn ein Großteil des Genoms des Organismus, welcher modelliert werden soll, nicht bekannt ist. Bei *S. epidermidis* und *S. aureus* ist dies nicht der Fall, da die Genomssequenzen schon aufgeklärt sind.^[50,51]

Die Berechenbarkeit stellt wiederum ein anderes Problem dar: Je mehr Enzyme im metabolischen Netzwerk vorhanden sind, desto komplexer werden die Berechnungen, welche von Metatool geleistet werden müssen. Je nach verwendeter Computerhardware können, vor allem bedingt durch die hohe Auslastung des Prozessors, die Berechnungen von hochkomplexen Netzwerken sehr lange dauern, oder, sollte nicht genug Arbeitsspeicher zur Verfügung stehen, während den Berechnungen abgebrochen werden.

Aus diesen beiden Gründen wurde das Modell daher auf die Glykolyse mit Pentosephosphatstoffwechsel, den Zitronensäurezyklus mit oxidativer Phosphorylierung und die Purin- und Pyrimidinnukleotidstoffwechsel wie auch die Amino- und Fettsäurestoffwechsel als Hauptkomponenten des metabolischen Netzwerkes beschränkt. Zusätzlich wurden Stoffwechselwege zur Wiedergewinnung von Metaboliten („salvage pathways“), Intermediärstoffwechselwege zur Verknüpfung der einzelnen Hauptkomponenten wie auch Stoffwechselwege zum Redoxschutz einprogrammiert.

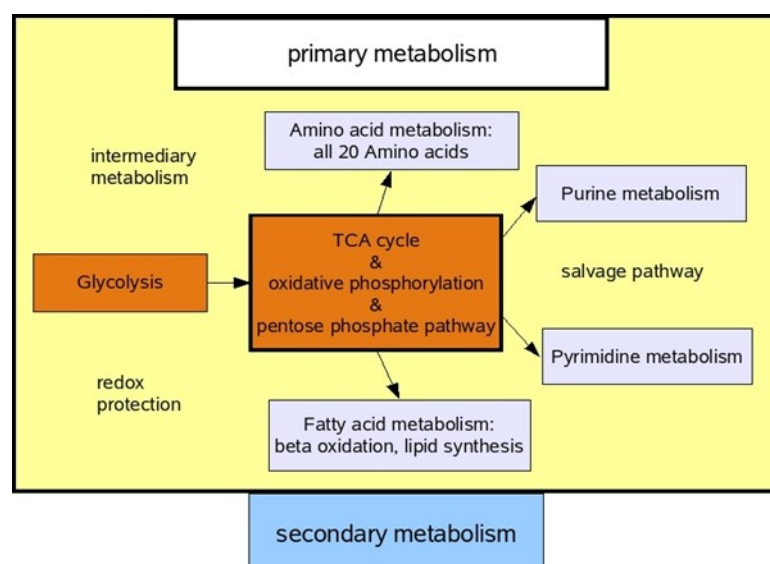


Abbildung III.5 Grundriss des YANAsquare-Modells. Als Hauptkomponenten dienen die energieproduzierenden Stoffwechsel der Glykolyse, des Pentosephosphatstoffwechsels, des Zitronensäurezyklus und der oxidativen Phosphorylierung (orange). Die energieverbrauchenden Stoffwechselwege werden durch Amino- und Fettsäurestoffwechsel und die Nucleotidstoffwechsel (Purin- und Pyrimidin-stoffwechsel) gebildet. Als Nebenstoffwechselwege wurden diverse salvage pathways, der Redoxschutz und intermediäre Stoffwechselwege eingeführt.

Diese Stoffwechselwege wurden mittels YANAsquare direkt aus der KEGG-Datenbank importiert und auf die Richtigkeit der Reaktionsrichtung wie auch der Stöchiometrie überprüft und ggf. korrigiert.

4.2. Annotation von neun bisher nicht aufgedeckten Enzymen in *S. aureus* USA300

Zum Zeitpunkt, als die Modelle erstellt wurden (Winter 2007 bis Fröhsommer 2008), wies die KEGG-Datenbank noch große Lücken in der Enzymausstattung der in der Datenbank vorhandenen Netzwerke auf. Ein Beispiel hierfür ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

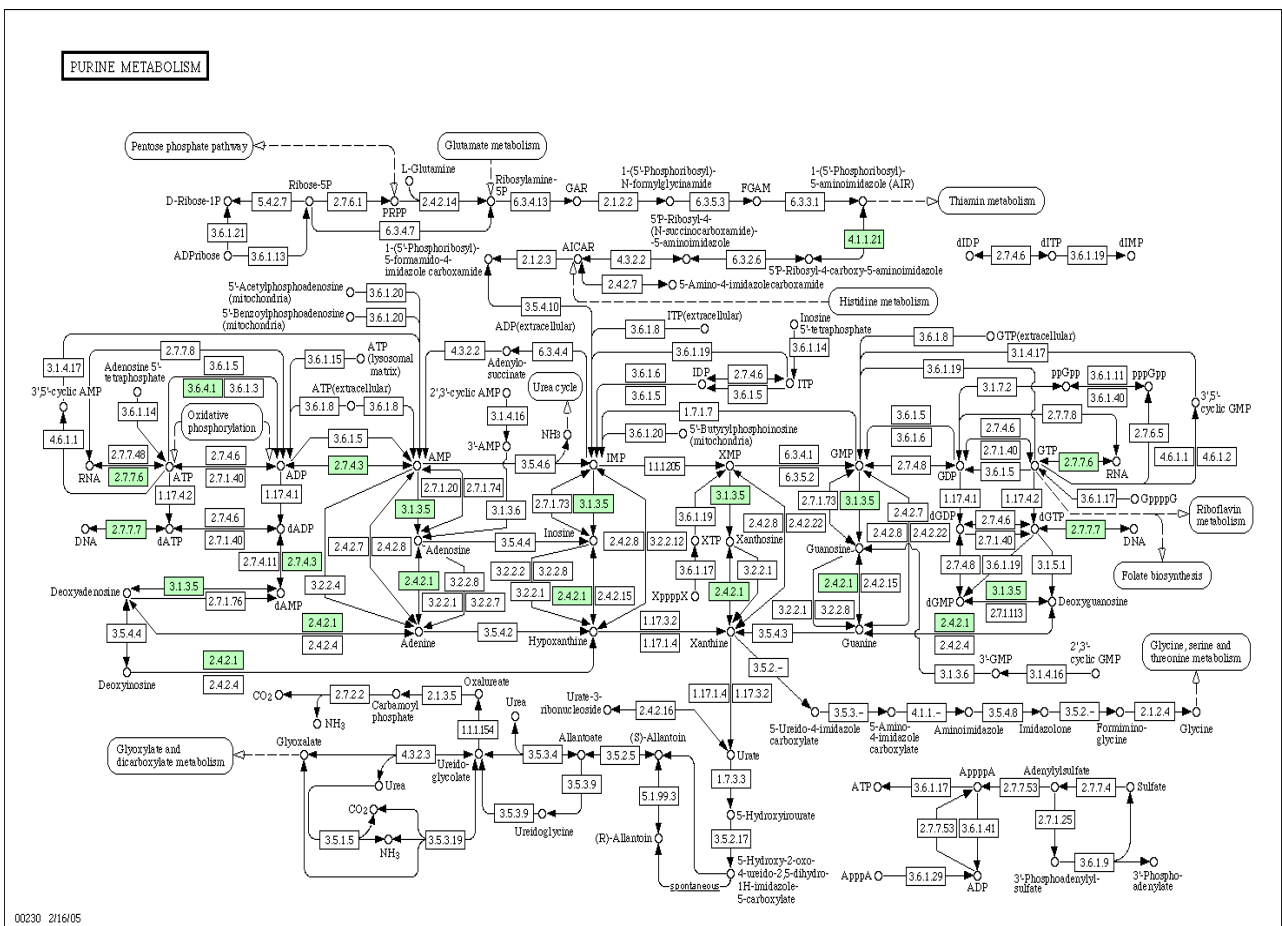


Abbildung III.6 Purinstoffwechsel von *S.aureus* USA300 zum Zeitpunkt des Importes aus KEGG^[27]. Weiß hinterlegte Boxen stellen Enzymreaktionen des Purinstoffwechsels dar, welche für *S. aureus* als „nicht vorhanden“ angezeigt werden. Grün hinterlegte Enzyme waren in der KEGG-Datenbank als „vorhanden“ gekennzeichnet und hinterlegt. Beim Import in YANAsquare wurden von der Importfunktion „KEGG-Browser“ nur die als „vorhanden“ gekennzeichneten Enzymreaktionen in das Modell übernommen.

Ein derartig lückenhafter Stoffwechselweg ist natürlich dem Überleben des betroffenen Organismus nur in sehr wenigen Ausnahmefällen förderlich. Dementsprechend

umfangreich gestalteten sich die Versuche die fehlenden Enzyme nachzuannotieren. Dies gelang in vielen Fällen durch Literaturrecherchen, in manchen Fällen musste allerdings mittels BLAST das Genom der beiden Staphylokokkenstämme – und auch des Menschen für das Vergleichsmodell für den humanen Stoffwechsel – durchsucht werden.

<i>H. sapiens</i>					
EC-Nummer	Enzymname	Query Sequence:	Hit:	E-Value	Bit-Score
		Brenda/NCBI	exPASY/NCBI		
3.6.1.5	Apyrase	P49961	ENTP1_HUMAN	0,00E+000	1013
3.6.1.19	nucleoside-triphosphate diphosphatase	Q9BY32	ITPA_HUMAN	1,00E-110	400
3.6.1.14	adenosine-tetraphosphatase	Q4UK18	ATPB_HUMAN	0,00E+000	649
4.6.1.2	guanylate cyclase	P33402	GCYA2_HUMAN	0,00E+000	1308
2.4.2.8	inosinate pyrophosphorylase	P00492	HPRT_HUMAN	1,00E-123	442
2.4.2.4	thymidine phosphorylase	P19971	TYPH_HUMAN	0,00E+000	868
2.7.1.74	deoxycytidine kinase	P27707	DCK_HUMAN	e-152	539
3.5.2.5	Allantoinase	P77671	ref NP_001376.1	2,00E-032	136
3.6.1.41	bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase	P05637	ref NP_006230.2	8,00E-005	44,3
2.7.4.4	nucleoside-phosphate kinase	NP_036606	NP_036606	2,00E-147	518
4.2.1.70	pseudouridylate synthase	Q96K56	Q96K56_HUMAN	0,00E+000	730

<i>S. epidermidis</i> RP62A					
EC-Nummer	Enzymname	Query Sequence:	Hit:	E-Value	Bit-Score
		Brenda/NCBI	exPASY/NCBI		
3.6.1.19	nucleoside-triphosphate diphosphatase	Q9BY32	Q5HQ23	8.7e-16	177
3.6.1.3	Adenosinetriphosphatase	A2QUY7	Q5HME0	7.3e-51	508
2.7.1.74	deoxycytidine kinase	P27707	Q5HRJ1	1.2e-10	136
3.1.3.5	5'-nucleotidase	Q2YUP8	Q5HKQ5	1.5e-19	244
2.4.2.22	xanthine phosphoribosyltransferase	Q04IV9	Q5HRX4	4.2e-48	486
2.4.2.4	thymidine phosphorylase	Q301G5	Q5HM85	2.4e-116	1126
2.7.1.76	epoxyadenosine kinase	Q48VP1	Q5HRJ0	2.5e-27	286

<i>S. aureus</i> USA300					
EC-Nummer	Enzymname	Query Sequence:	Hit:	E-Value	Bit-Score
		Brenda/NCBI	exPASY/NCBI		
2.4.2.3	uridine phosphorylase	P12758	ref NC_007793.1	2,00E-022	100
3.2.2.3	uridine nucleosidase	Q88S31	ref NC_007793.1	3,00E-048	186
2.7.4.4	uridine-cytidine kinase	ref NP_036606.2	ref NC_007793.1	9,00E-042	163
2.7.4.10	nucleoside-triphosphate-adenylate kinase	Q9UIJ7	ref NC_007793.1	2,00E-043	169
3.6.1.19	nucleoside-triphosphate diphosphatase	Q9BY32	ref NC_007793.1	3,00E-012	65
2.7.7.6	DNA-directed RNA polymerase	Q2FER5	ref NC_007793.1	1,00E-159	553
3.2.2.8	riboislypyrimidine nucleosidase	A7ZNY5	ref NC_007793.1	3,00E-060	225
2.7.1.74	deoxycytidine kinase	P27707	ref NC_007793.1	3,00E-008	52
3.5.4.14	deoxycytidine deaminase	O74047	ref NC_007793.1	5,00E-021	94
3.5.2.2	dihydropyrimidinase kinase	A2UD01	ref NC_007793.1	4,00E-024	106
4.2.1.70	pseudouridylate synthase	A5ISF5	ref NC_007793.1	1,00E-168	583
2.4.2.4	thymidine phosphorylase	A5IUT1	ref NC_007793.1	0	716

Tabelle III.6 Mit BLAST nachannotierte Enzyme für die Stoffwechselwege des YANAsquare-Modells von *S. epidermidis* RP62A, *S. aureus* USA300 und menschliche Zellen.

Die Validierung des Konzeptes mittels BLAST die fehlenden Enzyme nachzuannotieren, erfolgte wie folgt: Die cDNA von *S. epidermidis* RP62A wurde hierfür nach den Genen für die mit BLAST gefundenen Enzymsequenzen durchsucht. Dazu wurden spezifisch für

jedes Protein die zu dessen Gen passenden Primer erstellt, diese Gene in der cDNA anschließend mit einer PCR vervielfacht und durch Gelelektrophorese sichtbar gemacht.

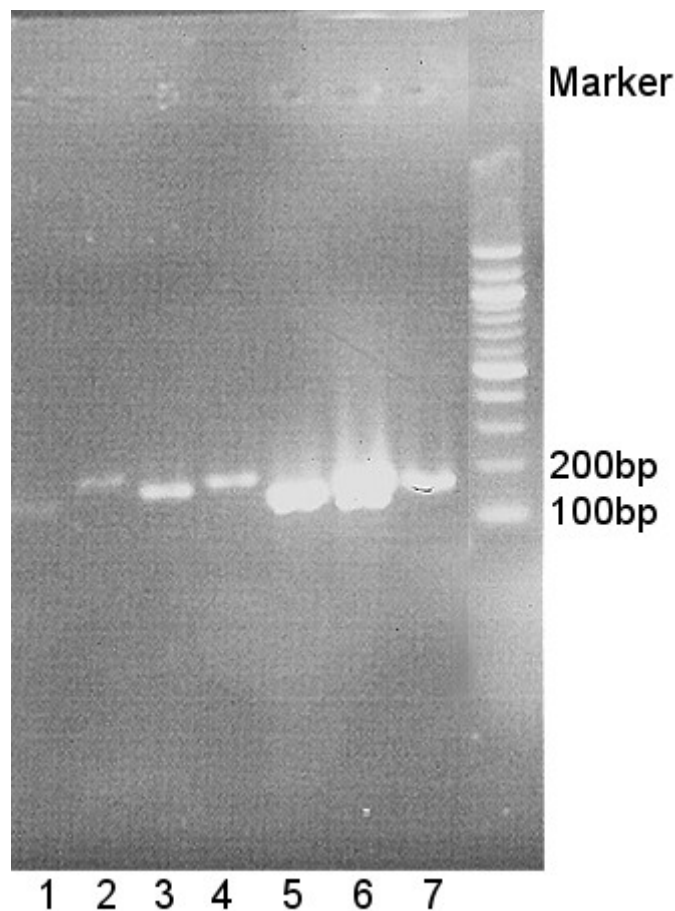


Abbildung III.7 Ergebnis der Untersuchung der cDNA von *S. epidermidis* RP62A nach den proteincodierenden Genen, sichtbar gemacht mittels Gelelektrophorese. Die Längen der Genfragmente (Bahn: 1 = nucleoside-triphosphate diphosphatase, 2 = adenosinetriphosphatase, 3 = deoxycytidine kinase, 4 = 5'-nucleotidase, 5 = xanthine phosphoribosyltransferase, 6 = thymidine phosphorylase, 7 = epoxyadenosine kinase) entsprachen jeweils den Erwartungswerten entsprechend des Primerdesigns.

Da die Länge der Genfragmente, welche durch die PCR synthetisiert wurden, dem Erwartungswert der Genlänge, welche durch die Wahl der Primer vorgegeben war, entsprachen, wurden die Resultate des BLASTs als validiert gewertet. Die BLAST-Ergebnisse der anderen Organismen fanden nach diesem erfolgreichen Beweis des Konzeptes auch zur Annotation der anderen Organismen Verwendung.

Nach erfolgter Annotation der fehlenden Enzyme bietet sich nun ein anderes Bild des Purinstoffwechselweges.

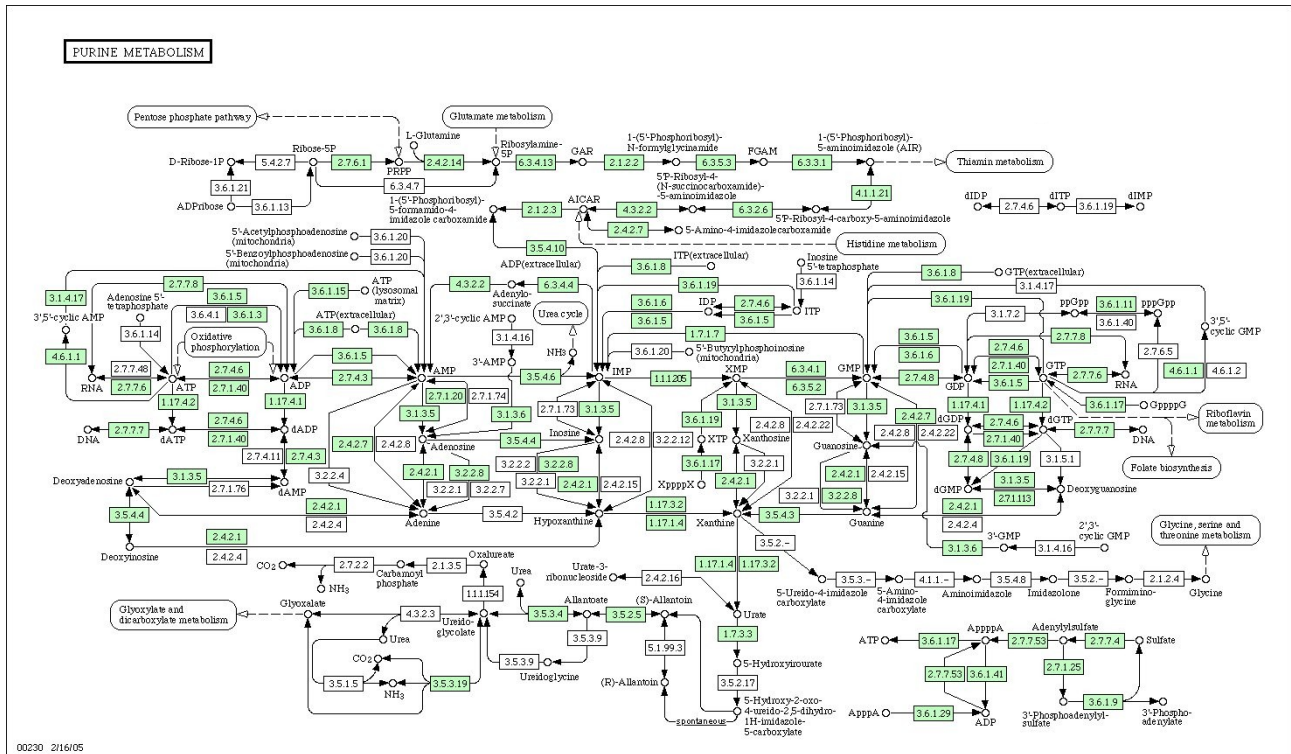


Abbildung III.8 Purinstoffwechsel von *S. aureus* USA300 nach Nachannotierung der fehlenden Enzyme (Stoffwechselnetz abgeändert nach KEGG^[27]). Weiß hinterlegte Boxen stellen Enzymreaktionen des Purinstoffwechsels dar, welche nicht vorhanden sind, grün hinterlegte Boxen stellen Enzyme dar, welche nun auch in diesen Stoffwechselweg integriert wurden.

4.3 Berechnung der Modenaktivitäten mit R: Starke Veränderungen in der oxidativen Phosphorylierung

Zur Berechnung der Aktivitäten der Moden wurde ein R-Skript eingesetzt. Dafür benötigt werden die Nullsummenmatrix, die stöchiometrische Matrix, eine vorläufige Liste aller errechneten (mittels YANAsquare) extremen Moden und eine Datei, welche die Enzymaktivitäten für das zu berechnende Szenario enthält. Diese Enzymaktivitäten werden aus den Genexpressionsdaten gewonnen und dann für die einzelnen Enzyme übernommen. Ein Wert von 1,000 in der Spalte mit 0,00 µM zugesetztem IQ-143 stellt die Grundaktivität für Enzyme ohne Aktivitätsänderung dar. Dieser Wert ist Bedingung für die Normalisierungsroutine im R-Skript (siehe unten), da Werte mit einer Aktivität von 0,000 für die Berechnungen nicht beachtet werden, während Einträge mit -1,000 als unbekannt definiert sind. Eine Genexpression von 0,5 für eines der hier eingetragenen Enzyme steht somit für eine Halbierung der Aktivität dieses Enzyms, während eine Genexpression von 2,0 dementsprechend eine Verdopplung darstellt.

Enzyme	Genexpression nach Gabe von IQ-143		
	0,00 μ M	0,16 μ M	1,25 μ M
OP_complex1	1,000	1,000	1,000
OP_complex2	1,000	1,000	1,000
OP_complex3	1,000	1,000	8,390
OP_complex4	1,000	1,000	1,000
OP_complex5a	1,000	1,000	1,000
SERP0290-zinc-transport_efflux	1,000	0,399	0,449
SERP0291-zinc-transporter_import	1,000	0,544	0,450
SERP0292-iron-dicitrate-transporter_import	1,000	0,544	0,430
SERP0389-EC:1.1.1.1-rn:R00754	1,000	1,000	3,070
SERP0653-EC:6.3.5.3-rn:R04463	1,000	1,000	0,491
SERP0655-EC:2.4.2.14-rn:R01072	1,000	1,000	0,436
SERP0656-EC:6.3.3.1-rn:R04208	1,000	1,000	0,424
SERP0657-EC:2.1.2.2-rn:R04325	1,000	1,000	0,426
SERP0658-EC:2.1.2.3-rn:R04560	1,000	1,000	0,439
SERP0659-EC:6.3.4.13-rn:R04144	1,000	1,000	0,392
SERP0686-spermidine/putrescine-transport_import	1,000	1,000	2,361
SERP0687-spermidine/putrescine-transport_import	1,000	1,000	2,208
SERP0688-spermidine/putrescine-transport_import	1,000	1,000	2,075
SERP0765-Uracil-permease-transport_import	1,000	1,000	2,765
SERP0831-EC:2.7.7.7-rn:R00375	1,000	1,000	2,202
SERP0831-EC:2.7.7.7-rn:R00376	1,000	1,000	2,202
SERP0831-EC:2.7.7.7-rn:R00378	1,000	1,000	2,202
SERP0831-EC:2.7.7.7-rn:R00379	1,000	1,000	2,202
SERP0841-EC:2.7.7.8-rn:R00437	1,000	1,000	2,867
SERP0841-EC:2.7.7.8-rn:R00439	1,000	1,000	2,867
SERP1403-MultiDrug-transport_efflux	1,000	1,000	2,063
SERP1802-cobalt/nickel-transport_efflux	1,000	1,000	2,401
SERP1803-cobalt/nickel-transport_efflux	1,000	1,000	2,301
SERP1944-MultiDrug-transport_efflux	1,000	1,000	2,075
SERP1951-lipoprotein-transport_efflux/import	1,000	1,000	0,457
SERP1952-macrolide-transport_efflux	1,000	1,000	0,386
SERP1997-formate/nitrite-transport_efflux/import	1,000	1,000	2,619
SERP2060-glycerol-transport_import	1,000	1,000	2,823
SERP2156-EC:1.1.1.27-rn:R00703	1,000	1,000	0,486
SERP2179-choline/betaine/carnitine-transp_efflux	1,000	7,071	2,389
SERP2186-EC:2.7.7.4-rn:R00529	1,000	1,000	0,349
SERP2283-phosphonate-transport_import	1,000	1,000	2,680
SERP2289-MultiDrug-transport_efflux	1,000	1,000	1,971

Tabelle III.7 Genexpressionsänderungen. Diese Tabelle listet die Änderungen in der Genexpression für die in den Modellen verwendeten Enzyme nach Gabe verschiedener Konzentrationen von IQ-143 auf.

Diese vereinfachenden Abschätzungen erlauben jedoch erstaunlich gut die metabolische Netzwerkmodellierung, obwohl die Genexpressionsdaten weder Enzymaktivitäten noch Protein- bzw. RNA-Stabilitäten berücksichtigen.

Für das R-Skript werden die stöchiometrische Matrix, die Nullsummenmatrix wie auch die Liste der extremen Moden mittels YANAsquare berechnet. Diese sind für alle Berechnungen innerhalb eines Organismus konstant, da nur jeweils die Aktivitäten der Enzyme an die verschiedenen Genexpressionsdaten der verschiedenen Konzentrationen von zugesetztem Wirkstoff angepasst werden müssen, und diese keinen Einfluss auf die Stöchiometrie und Nullsummenmatrix haben. Den extremen Moden wird von YANAsquare standardmäßig ein Wert von 1,0 (d.h. 100 % aktiv) zugeordnet. Deren tatsächlichen Werte werden durch das R-Skript auf das Transkriptom (Tabelle III.7) bezogen berechnet. Dieses Transkriptom gibt dem R-Skript die Rahmenbedingungen vor (sogenannte „constraints“) und wird für jedes Einzelszenario separat gemappt und angesteuert.

Sobald diese Datei mit den berechneten Modenaktivitäten in YANAsquare eingelesen wird, können auch die Enzymaktivitäten der nicht im Transkriptom enthaltenen Enzyme ausgelesen werden, da diese von YANAsquare aus den extremen Moden berechnet werden können. Die vollständigen Listen der Enzyme zum Aufbau der Modelle wie auch deren Aktivitäten zur Berechnung der extremen Moden sind im Anhang in den Tabellen S VI.1.1 bis S VI.1.21 aufgeführt.

4.4 Pathwayanalyse: Geringe Stressantwort auf IQ-143, jedoch starker Einfluss auf den Energiemetabolismus

Durch die Kombination von experimentellen Genexpressionsdaten und metabolischer Modellierung war es möglich, speziesspezifische Unterschiede auf verschiedene Konzentrationen von IQ-143 zu beobachten.

4.4.1 Stressantwort der Organismen

Nach Zugabe eines antibiotischen Wirkstoffes ist immer mit einer generellen Stressantwort des betroffenen Organismus zu rechnen. Bei *S. epidermidis* RP62A traten mehrere Mechanismen zur Stressbewältigung auf, jedoch wurde nur bei zweien eine signifikante

Hochregulierung mittels Genexpressionsanalyse nachgewiesen.

Suche	Hit: Familie	Treffer: Beschreibung	Treffer Typ	Treffer Clan	Treffer Bit-Score	Treffer e-Value
SERP2244	PGA-cap	Verkapselungssyntheseprotein PGA_cap	Domäne	CL0163	233,2	2,3e-69
SERP1998	AHSA1	Aktivator des Hsp90 ATPase Homolog 1	Familie	CL0209	67,8	6,9e-19

Tabelle III.8 Signifikant erhöhte Proteine der generellen Stressantwort. Diese Ergebnisse wurden mittels iterativen BLAST-Suchen gewonnen. Das Gen für „PGA-cap“ codiert für ein Enzym zur Synthese einer Kapsel aus Poly-gamma-Glutamat. Diese Verkapselung des Bakteriums erhöht dessen Überlebenschance unter Salzstress. AHSA1 codiert für einen Aktivator des Hsp90 ATPase Homologs 1. Eine Erhöhung der Expression dieses Gens führt zu einer erhöhten Effizienz des Hsp90 Proteins, und dadurch zu erhöhtem Stresswiderstand.

Das Gen SERP2244 codiert für ein Syntheseprotein, welches die Verkapselung des Bakteriums mit einer Poly-gamma-Glutamat-Hülle initiiert („PGA-cap“). Diese Hülle ermöglicht es dem Bakterium, eine erhöhte Salzkonzentration im Medium zu überdauern. Zudem existieren Hinweise darauf, dass eine derartige Hülle auch für die Virulenz von Bedeutung ist.^[72, 73] Das Gen SERP1998 codiert, so wird angenommen, für ein Homolog des Hsp90 ATPase Proteins. Eine Hochregulierung führt zu erhöhter Widerstandsfähigkeit gegen externen Stress.^[74, 75] Es konnten allerdings keine Hinweise auf eine Änderung der Genexpression des sigmaB-Stressregulons gefunden werden.

Die Transkriptomdaten weisen zudem mehrere Transporter für Bindestellen der ATP-Kassetten („ATP-binding cassette; ABC“) auf, welche durch Gabe von IQ-143 in ihrer Expression verändert sind. Derartige ABC-Transporter werden oftmals mit Multiresistenzen („multi-drug resistance“; MDR) in Verbindung gebracht, da sie wie Transmembran-effluxpumpen agieren. Diese befördern über einen aktiven Transportmechanismus unspezifisch antiinfektive Substanzen aus der Zelle in das umgebende Milieu.^[76] ABC-Transporter sind in Staphylokokken unter anderem für Resistenzbildung gegen Macrolide, Linkosamide, Tetracycline, Fluorochinolone, Streptogramine und Fusidinsäure (MrsA, TetK, NorA, VgaAB und FusB) verantwortlich.^[77] Allerdings weisen ABC-Transporter keine Eigenschaften auf, welche sie befähigen würden, gegen Naphtylisochinolone Resistenzen zu verursachen.

4.4.2 Verringerte Moden- und Enzymaktivitäten im Energiestoffwechsel

Die speziesspezifischen Unterschiede der Stoffwechselnetze äußern sich in verschiedener Regulierung von Moden mit der gleichen Aufgabe. So weisen zum Beispiel die Moden für die UMP-Pyrophosphorylase und die dUDP-Thymidylat-Kinase (in *S. aureus* 49 und 54, in *S. epidermidis* 52 und 58) des Pyrimidinstoffwechsels nur in *S. aureus* eine erhöhte Aktivität auf, in *S. epidermidis* hingegen nicht. Die Moden für die CTP-Cytidilat-Kinase und die dUTP-Uridin-Kinase (in *S. aureus* 45 und 193, in *S. epidermidis* 44 und 193) – wiederum Pyrimidinstoffwechsel – sind hingegen nur in *S. epidermidis* in ihrer Aktivität gesteigert. Auch treten gegensätzlich regulierte Moden auf, wie zum Beispiel Mode 122, welche in beiden Spezies verschiedene Transporterenzyme für Cholin, Betain und Carnithin enthält: Diese Mode ist in *S. aureus* hochreguliert, während sie in *S. epidermidis* herunterreguliert ist.

Die folgenden Abbildungen III.9 und III.10 geben eine Übersicht über die verschiedenen berechneten Aktivitäten aller Moden wieder. Diese sind in drei Spalten für die verschiedenen Konzentrationen an zugesetztem IQ-143 unterteilt. Jede Zeile enthält 6 extreme Moden. Eine rote Hintergrundfarbe indiziert eine niedrigere Aktivitäten, eine grüne Hintergrundfarbe steht für eine erhöhte Aktivität nach Gabe von IQ-143. Die in den einzelnen Feldern aufgeführten Werte geben die aus dem R-Output in YANASquare überführten, berechneten Aktivitäten wieder.

seu_0.00µM							seu_0.16µM							seu_1.25µM						
# Mode	activity						# Mode	activity						# Mode	activity					
[1-6]	A: 1.00	N: 1.00	N: -0.65	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[1-6]	A: 1.00	N: 1.00	N: -0.65	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[1-6]	A: 1.00	N: 1.00	N: -0.66	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00
[7-12]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[7-12]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[7-12]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00
[13-18]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	E: 0.96	N: 1.00	[13-18]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	E: 0.96	N: 1.00	[13-18]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	E: 0.97	N: 1.00
[19-24]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	T: 1.00	N: 1.00	[19-24]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	T: 1.00	N: 1.00	[19-24]	N: 0.45	N: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	T: 1.00	N: 1.00
[25-30]	N: -0.45	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: -1.33	[25-30]	N: -0.57	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: -1.33	[25-30]	N: -0.59	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: -1.33	N: 1.00
[31-36]	N: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	E: 0.96	E: 1.00	[31-36]	N: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	E: 0.96	E: 1.00	[31-36]	N: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	E: 0.96	E: 1.00
[37-42]	E: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	E: 1.00	AE: 1.00	[37-42]	E: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	E: 1.00	AE: 1.00	[37-42]	E: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	E: 1.00	AE: 1.00
[43-48]	N: 1.00	N: 1.00	NE: 0.50	E: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[43-48]	N: 1.00	N: 1.00	NE: 0.50	E: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[43-48]	N: 1.00	N: 1.00	NE: 0.50	E: 1.00	N: 1.00	N: 1.00
[49-54]	N: -0.87	N: -0.33	N: -0.33	N: -0.33	N: -0.33	N: -0.33	[49-54]	N: -0.36	N: 0.40	N: 0.40	N: 0.40	N: 0.40	N: 0.40	[49-54]	N: -0.36	N: 0.40	N: 0.40	N: 0.40	N: 0.40	N: 0.40
[55-60]	N: 0.73	N: 0.72	N: 1.23	E: -0.50	N: 0.37	N: 0.38	[55-60]	N: 0.73	N: 0.72	N: 1.21	E: -0.50	N: 0.37	N: 0.38	[55-60]	N: 0.95	N: 0.92	N: 1.06	E: -0.50	N: -0.64	N: 0.38
[61-66]	E: 0.72	E: 0.51	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[61-66]	E: 0.88	E: 0.69	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[61-66]	E: 0.92	E: 0.45	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00
[67-72]	E: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[67-72]	E: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[67-72]	E: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00
[73-78]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	T: 1.00	N: 0.53	N: 0.53	[73-78]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	T: 1.00	N: 0.53	N: 0.53	[73-78]	N: 0.39	N: 1.00	N: 1.00	T: 2.30	N: 1.00	N: 0.27
[79-84]	A: 1.00	T: 1.00	N: 1.28	N: 1.00	T: 1.00	E: 0.25	[79-84]	A: 1.00	T: 1.00	N: 1.12	N: 1.00	T: 0.54	E: 0.25	[79-84]	A: 1.00	T: 1.00	N: 1.08	N: 1.00	T: 0.43	E: 0.24
[85-90]	N: 1.00	A: 1.00	EN: 1.00	EN: 1.00	N: 1.00	N: 0.13	[85-90]	N: 1.00	A: 1.00	EN: 1.00	EN: 1.00	N: 1.00	N: 1.03	[85-90]	N: 1.00	A: 1.00	EN: 1.00	EN: 1.00	N: 1.00	N: 1.02
[91-96]	N: 1.00	N: 0.67	N: 0.38	N: 0.16	N: 1.00	NT: 0.31	[91-96]	N: 1.00	N: 0.67	N: 0.00	N: 0.23	N: 1.00	NT: 0.33	[91-96]	N: 1.00	N: 0.67	N: 0.02	N: 0.39	N: 1.00	NT: 0.49
[97-102]	N: 0.58	NT: 1.00	N: 1.00	N: 0.38	EN: 1.00	EN: 0.58	[97-102]	N: 0.61	NT: 1.00	N: 1.00	N: 0.22	EN: 1.00	EN: 0.61	[97-102]	N: 1.52	NT: 1.00	N: 2.68	N: 0.47	EN: 1.00	EN: 0.16
[103-108]	N: 1.00	T: 1.00	NT: 1.00	A: 1.00	N: 0.49	T: 1.00	[103-108]	N: 1.00	T: 1.00	NT: 1.00	A: 1.00	N: 0.40	T: 1.00	[103-108]	N: 2.40	T: 1.00	NT: 1.00	A: 1.00	N: 1.41	T: 1.00
[109-114]	N: 0.72	E: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	[109-114]	N: 0.88	E: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	[109-114]	N: 0.92	E: 1.00	N: 1.00	N: 2.87	A: 1.00	N: 1.00
[115-120]	N: 1.00	N: 0.12	T: 0.12	N: 1.00	A: 0.38	EN: 0.36	[115-120]	N: 1.00	N: 0.00	T: 2.02	N: 1.00	A: 0.00	EN: 2.02	[115-120]	N: 1.00	N: 0.36	T: 0.63	N: 1.00	A: 0.54	EN: 1.01
[121-126]	N: 0.25	T: 0.22	N: 1.00	T: 1.2000092	A: 1.00	N: 0.75	[121-126]	N: 0.25	T: 1.00	N: 1.00	T: 0.80	A: 1.00	N: 0.75	[121-126]	N: 0.25	T: 1.97	N: 1.00	T: 0.80	A: 1.00	N: 0.72
[127-132]	N: 1.50	N: 1.00	A: 1.00	N: 0.80	N: 1.00	N: 1.00	[127-132]	N: 1.50	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.40	N: 1.00	N: 1.00	[127-132]	N: 1.50	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.40	N: 1.00	N: 1.00
[133-138]	N: 1.00	A: 1.00	T: 1.00	A: 1.00	N: 0.55	EN: 1.00	[133-138]	N: 0.47	A: 1.00	T: 1.00	A: 1.00	N: 0.57	EN: 1.00	[133-138]	N: 0.45	A: 1.00	T: 1.00	A: 1.00	N: 0.85	EN: 1.00
[139-144]	N: 0.38	N: 0.12	N: 0.38	N: 1.00	E: 1.00	N: 1.00	[139-144]	N: 0.00	N: 0.00	N: 0.00	N: 1.00	E: 1.00	N: 1.00	[139-144]	N: 0.59	N: 0.96	N: 1.14	N: 1.00	E: 2.20	N: 1.00
[145-150]	A: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	A: 0.80	N: 0.41	NT: 0.81	[145-150]	A: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	A: 0.57	N: 0.27	NT: 0.70	[145-150]	A: 2.20	N: 2.20	N: 2.20	A: 2.68	N: 1.27	NT: 0.00
[151-156]	T: 0.84	T: 1.00	E: 1.00	N: 0.57	EN: 0.45	EO: 1.00	[151-156]	T: 0.72	T: 1.00	E: 1.00	N: 0.54	EN: 0.43	EO: 1.00	[151-156]	T: 1.55	T: 1.00	E: 1.00	N: 0.00	EN: 0.15	EO: 1.00
[157-162]	EO: 1.00	N: 0.22	EO: 1.00	E: 1.00	EO: 0.27	A: 1.00	[157-162]	EO: 1.00	N: 1.00	EO: 1.00	E: 1.00	EO: 0.21	A: 1.00	[157-162]	EO: 1.00	N: 2.06	EO: 1.00	E: 1.00	EO: 0.65	A: 1.00
[163-168]	AE: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 0.25	T: 1.25	EF: 1.00	[163-168]	AE: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 0.25	T: 1.25	EF: 1.00	[163-168]	AE: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 0.25	T: 1.25	EF: 1.00
[169-174]	N: 0.25	A: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 0.50	NT: 0.49	[169-174]	N: 0.25	A: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 0.50	NT: 0.49	[169-174]	N: 0.25	A: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 0.50	NT: 0.49
[175-180]	NT: 0.25	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	EF: 0.75	[175-180]	NT: 0.25	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	EF: 0.90	[175-180]	NT: 0.25	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	EF: 0.80
[181-186]	EN: 1.00	N: 1.00	NT: 0.15	A: 0.27	N: 1.00	N: 1.00	[181-186]	EN: 1.00	N: 1.00	NT: 0.23	A: 0.21	N: 1.00	N: 1.00	[181-186]	EN: 1.00	N: 1.00	NT: 0.53	N: 0.95	N: 1.00	N: 1.00
[187-192]	N: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	AE: 1.04	A: 1.00	N: 1.00	[187-192]	N: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	AE: 1.04	A: 1.00	N: 1.00	[187-192]	N: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	AE: 1.04	A: 1.00	N: 1.00
[193-198]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.08	T: 1.00	N: 1.00	[193-198]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 0.55	T: 1.00	N: 1.00	[193-198]	N: 0.35	N: 1.00	N: 1.00	N: 0.52	T: 1.00	N: 2.62

Abbildung III.9 Aktivitäten der extremen Moden von *S. aureus* nach Berechnung mit R. Stoffwechselwege der Moden: A = Aminosäurestoffwechsel, E = Energiemetabolismus, F = Fettsäurestoffwechsel, N = Nukleotidstoffwechsel, T = Transporter, O = oxidative Phosphorylierung.

ser_0.00µM							ser_0.16µM							ser_1.25µM						
# Mode	activity						# Mode	activity						# Mode	activity					
[1-6]	A: 1.00	N: 1.00	N: -0.70	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[1-6]	A: 1.00	N: 1.00	N: -0.70	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[1-6]	A: 1.00	N: 1.00	N: -0.67	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00
[7-12]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[7-12]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[7-12]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00
[13-18]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	E: 1.00	N: 0.91	N: 1.00	[13-18]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	E: 1.00	N: 0.91	N: 1.00	[13-18]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	E: 1.00	N: 1.00	N: 1.00
[19-24]	N: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	T: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[19-24]	N: 1.00	N: 1.00	A: 1.00	T: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[19-24]	N: 0.39	N: 0.39	A: 1.00	T: 1.00	N: 1.00	N: 1.00
[25-30]	N: -0.52	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: -1.33	[25-30]	N: -0.52	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: -1.33	[25-30]	N: -0.52	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: -1.33	N: 1.00
[31-36]	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	E: 1.00	E: 0.91	E: -0.99	[31-36]	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	E: 1.00	E: 0.91	E: -0.99	[31-36]	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	E: 1.00	E: 1.00	E: 1.00
[37-42]	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	E: 0.50	AE: 0.50	N: 1.00	[37-42]	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	E: 0.50	AE: 0.50	N: 1.00	[37-42]	N: 1.00	A: 1.00	N: 1.00	E: 0.75	AE: 0.75	N: 1.00
[43-48]	N: 1.00	N: 1.05	N: 0.73	E: 1.00	E: 1.00	E: 0.75	[43-48]	N: 1.00	N: 1.05	N: 0.73	E: 1.00	E: 1.00	E: 0.75	[43-48]	N: 1.00	N: 1.11	N: 0.67	E: 1.00	E: 1.00	E: 1.12
[49-54]	E: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: -1.34	N: 0.79	N: 0.53	[49-54]	E: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: -1.34	N: 0.79	N: 0.53	[49-54]	E: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: -1.74	N: 0.79	N: 0.53
[55-60]	E: 0.53	N: 0.53	N: 0.53	N: 0.53	N: 0.92	N: 1.08	[55-60]	E: 0.53	N: 0.53	N: 0.53	N: 0.53	N: 0.92	N: 1.08	[55-60]	E: 0.53	N: 0.53	N: 0.53	N: 0.53	N: 0.92	N: 1.08
[61-66]	N: -0.65	N: 0.92	EN: -0.48	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[61-66]	N: -0.65	N: 0.92	EN: -0.48	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[61-66]	N: -0.92	N: 0.92	EN: -0.48	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00
[67-72]	N: 1.00	E: 1.00	EN: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[67-72]	N: 1.00	E: 1.00	EN: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	[67-72]	N: 1.00	E: 1.00	EN: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00
[73-78]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	T: 1.00	N: 1.00	[73-78]	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00	N: 1.00									

Deutlich zu erkennen sind für die beiden hier dargestellten Organismen verschiedene Aktivitätsmuster für die extremen Moden. Die verschiedenen Aktivitäten der extremen Moden basieren auf Änderungen in den Enzymaktivitäten nach Gabe von unterschiedlichen Konzentrationen von IQ-143, und können mittels YANASquare auch dargestellt werden.

Die Schlüsseffekte von IQ-143 beschränken sich nicht auf ein spezielles Subnetzwerk, sondern verteilen sich auf den gesamten Organismus – wie schon an den Unterschieden in der gemessenen Genexpression (Tabelle III.7) zu sehen ist. So sind, zum Beispiel, die Genexpressionen der DNA- und RNA-Polymerasen doppelt so hoch im Vergleich zu einer Kontrolle ohne zugesetztes IQ-143, die Enzyme des Komplexes 3 der oxidativen Phosphorylierung weisen sogar eine achtfache Erhöhung auf. Demgegenüber steht eine Halbierung der Genexpression von verschiedenen Enzymen der Glykolyse und der Lactatdehydrogenase.

Untersucht man nun die Enzymaktivitäten nach Berechnung der Modenaktivitäten (vgl. Kapitel II.2.3), so weisen vor allem Enzyme der oxidativen Phosphorylierung und des Purinstoffwechsels eine erhöhte Rate an Aktivitätsveränderungen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe auf.

Die folgende Tabelle III.9 und Abbildung III.11 fassen die signifikanten Änderungen in den Enzymaktivitäten für *S. aureus* zusammen. Hier werden nur Enzyme abgebildet, welche einen Hinweis auf den Wirkmechanismus von IQ-143 geben.

<i>S. aureus</i>	0,00 μM	0,16 μM	1,25 μM
OP_complex1	0,0396	0,0260	0,0310
OP_complex2	0,0396	0,0260	0,0310
[OP_complex3]	0,0791	0,0520	0,0619
OP_complex4	0,0396	0,0260	0,0310
OP_complex5	0,0214	0,0109	0,0031
PurM_DNA-directed-RNA-polyermase_ATP	0,0791	0,0000	0,0000
PurM_DNA-directed-RNA-polyermase_CTP	0,0396	0,0260	0,0310
PurM_DNA-directed-RNA-polyermase_GTP	0,0396	0,0260	0,0310
PurM_DNA-directed-RNA-polyermase_UTP	0,0285	0,0229	0,0285
[PurM_DNA-directed-DNA-polymerase_dATP]	0,0396	0,0260	0,0121
[PurM_DNA-directed-DNA-polymerase_dCTP]	0,0396	0,0260	0,0310
[PurM_DNA-directed-DNA-polymerase_dGTP]	0,0396	0,0260	0,0310
[PurM_DNA-directed-DNA-polymerase_dTTP]	0,0396	0,0260	0,0310
[PurM_PNPase_ADp]	0,0791	0,0520	0,0619
[PurM_PNPase_GDP]	0,0265	0,0174	0,0207
Glyc_glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase_NAD+	0,1582	0,1040	0,1238
Glyc_glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase_NADP+	0,0601	0,2102	0,1251
TCA_pyruvate_dehydrogenase	0,0396	0,0260	0,0310

Tabelle III.9 Veränderungen von Enzymaktivitäten in S. aureus nach Gabe verschiedener Konzentrationen an IQ-143. Diese wurden aus den Aktivitäten der extremen Moden berechnet. Enzymaktivitäten, deren Genexpression durch den Wirkstoff verändert wurde: in Klammern. Abkürzungen: OP = oxidative Phosphorylierung, PurM = Purinmetabolismus, Glyc = Glykolyse, TCA = Zitronensäurezyklus.

Die Aktivitäten der Enzyme zeigen generelle eine signifikant erniedrigte Aktivität nach Gabe von IQ-143 auf – mit Ausnahme der Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase, welche in Staphylokokken auch als Aldehyddehydrogenase B annotiert ist, der Glykolyse. Diese weist im Falle einer Metabolisierung von NAD⁺ eine niedrigere Aktivität als nach Gabe von IQ-143 auf, bei Verstoffwechslung von NADP⁺ jedoch eine verdoppelte (1,25 μM IQ-143) bis verdreifachte (0,16 μM) Aktivität.

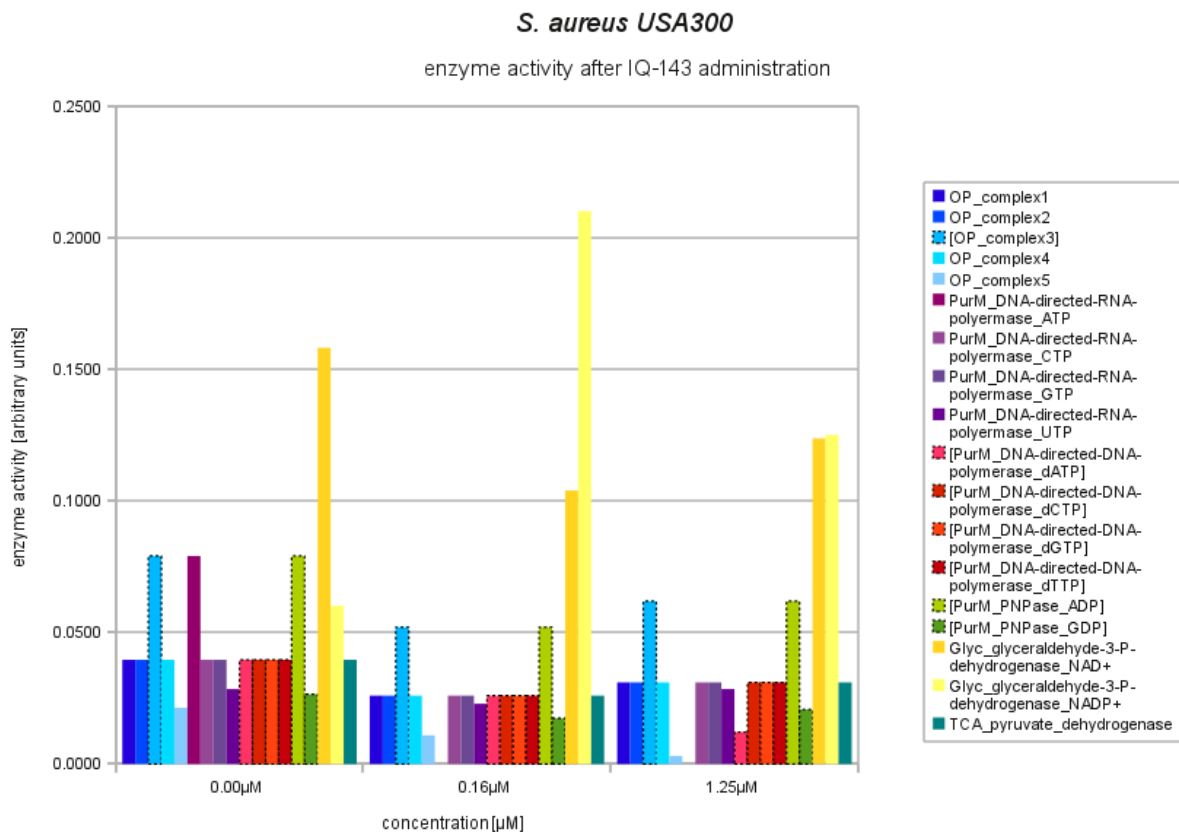


Abbildung III.11 Grafische Darstellung der veränderten Enzymaktivitäten nach Tabelle III.9 für *S. aureus*. Die durch den Wirkstoff in ihrer Genexpression veränderten Enzyme sind hier mit einer gestrichelten Umrandung markiert, die Abkürzungen schlüsseln sich wie folgt auf: OP = oxidative Phosphorylierung, PurM = Purinmetabolismus, Glyc = Glykolyse, TCA = Zitronensäurezyklus.

In dieser Abbildung sind die Veränderungen der Enzymaktivitäten nach Gabe des Wirkstoffs deutlich erkennbar. Alle Enzyme weisen – mit Ausnahme der Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase, welche NADP⁺ verstoffwechselt – geringere Aktivitäten nach Gabe von IQ-143 auf.

Betrachtet man nun die gleichen Enzyme in *S. epidermidis* (Tabelle III.10 und Abbildung III.12), so ergeben sich für diese sehr ähnliche Muster in ihren Aktivitäten nach Wirkstoffgabe. Dies ist dadurch zu erklären, dass sich beide Organismen in ihrer Enzymausstattung sehr ähnlich sind und die Modelle zur Berechnung der Modenaktivitäten sich nur in wenigen, jedoch für die Aufklärung des Wirkortes von IQ-143 sehr wichtigen, Punkten voneinander unterscheiden.

<i>S. epidermidis</i>	0,00 μ M	0,16 μ M	1,25 μ M
OP_complex1	0,0201	0,0201	0,0126
OP_complex2	0,0161	0,0161	0,0050
[OP_complex3]	0,0361	0,0361	0,0175
OP_complex4	0,0334	0,0334	0,0292
OP_complex5	0,0669	0,0669	0,0585
PurM_DNA-directed-RNA-polymerase_ATP	0,0334	0,0334	0,0292
PurM_DNA-directed-RNA-polymerase_CTP	0,0120	0,0120	0,0436
PurM_DNA-directed-RNA-polymerase_GTP	0,0334	0,0334	0,0292
PurM_DNA-directed-RNA-polymerase_UTP	0,0334	0,0334	0,0292
[PurM_DNA-directed-DNA-polymerase_dATP]	0,0334	0,0334	0,0766
[PurM_DNA-directed-DNA-polymerase_dCTP]	0,0224	0,0224	0,0196
[PurM_DNA-directed-DNA-polymerase_dGTP]	0,0334	0,0334	0,0292
[PurM_DNA-directed-DNA-polymerase_dTTP]	0,0468	0,0468	0,0409
[PurM_PNPase_ADP]	0,0669	0,0669	0,0585
[PurM_PNPase_GDP]	0,0120	0,0120	0,0050
Glyc_glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase_NAD+	0,0669	0,0669	0,0585
Glyc_glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase_NADP+	0,0241	0,0241	0,0228
TCA_pyruvate_dehydrogenase	0,0161	0,0161	0,0468

Tabelle III.10 Veränderungen von Enzymaktivitäten in *S. epidermidis* nach Gabe verschiedener Konzentrationen an IQ-143. Diese wurden wiederum aus den Aktivitäten der extremen Moden berechnet. In dieser Tabelle sind nur Enzyme, welche einen Hinweis auf den Wirkmechanismus von IQ-143 geben können, dargestellt. Enzymaktivitäten, deren Genexpression durch IQ-143 verändert wurde: in Klammern. Abkürzungen: OP = oxidative Phosphorylierung, PurM = Purinmetabolismus, Glyc = Glykolyse, TCA = Zitronensäurezyklus.

Auch für *S. epidermidis* treten hier Veränderungen in den Aktivitäten der Enzyme auf. Die Wirkung von IQ-143 ist in diesem Organismus allerdings stärker ausgeprägt wenn mehr IQ-143 zugegeben wurde. Die Komplexe 1 bis 5 der oxidativen Phosphorylierung weisen hier keine Erholung bei einer Gabe von 1,25 μ M IQ-143 im Vergleich zu 0,16 μ M, wie in *S. aureus*, auf: Die Aktivitäten verringern sich stetig. Auch die Reaktion der Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase ist nicht ähnlich zu ihrem Pendant in *S. aureus*: Die Aktivität verringert sich für beide Metaboliten (NAD⁺ und NADP⁺).

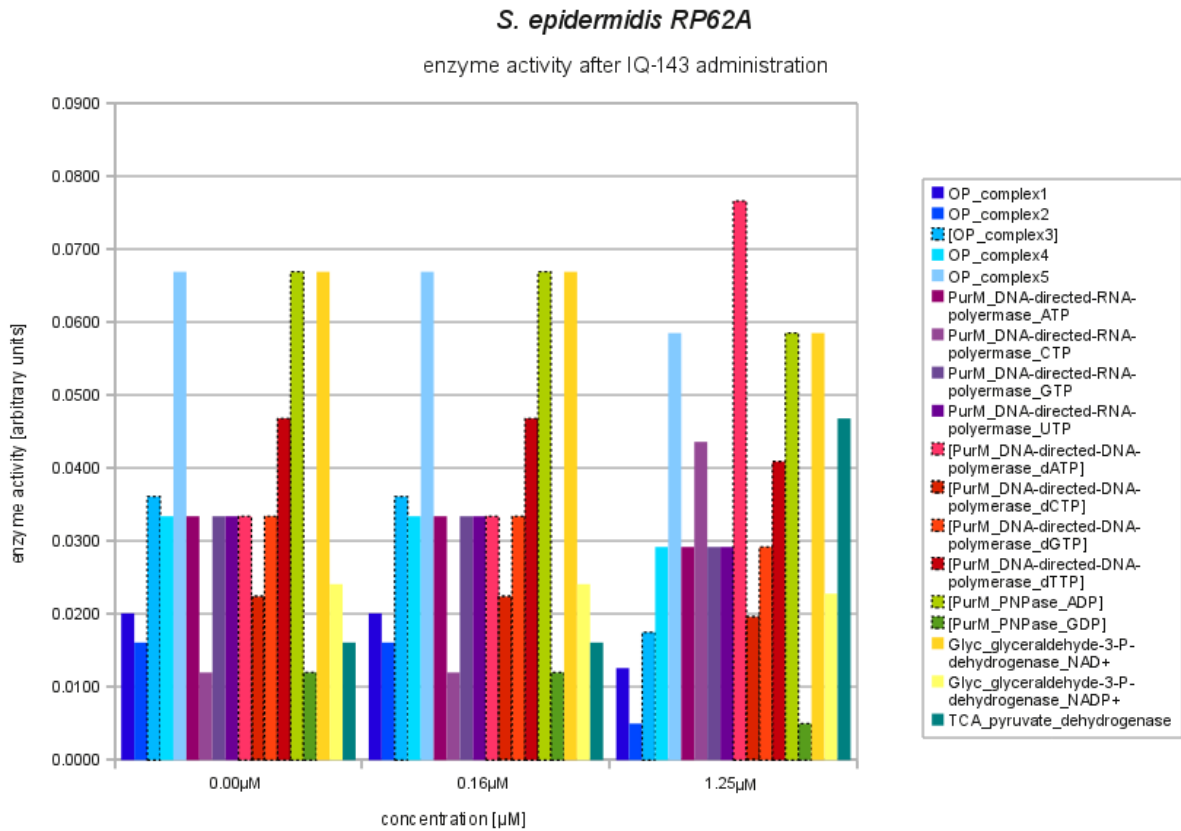


Abbildung III.12 Grafische Darstellung der veränderten Enzymaktivitäten nach Tabelle III.10 für *S. epidermidis*. In ihrer Genexpression veränderte Enzyme sind mit einer gestrichelten Umrandung markiert, die Abkürzungen schlüsseln sich dementsprechend wie folgt auf: OP = oxidative Phosphorylierung, PurM = Purinmetabolismus, Glyc = Glykolyse, TCA = Zitronensäurezyklus.

Die Veränderungen in den Komplexen 1 und 3 sind von besonderem Interesse. Komplex 3 deshalb, da hier eine Erhöhung der Genexpression (siehe Tabelle III.7) festzustellen ist. Abbildung III.13 stellt die oxidative Phosphorylierung schematisch dar.

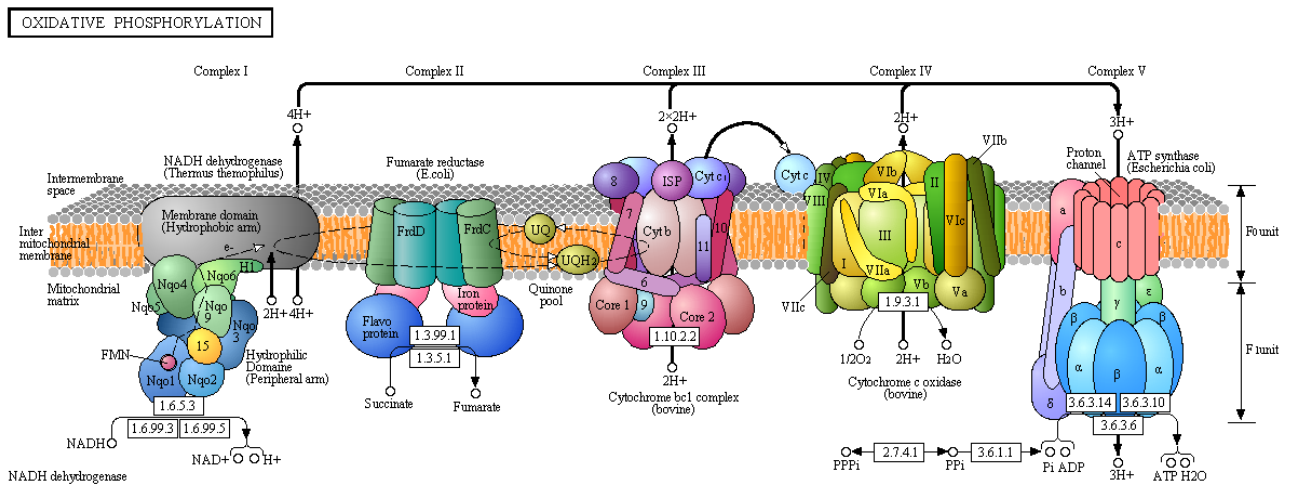


Abbildung III.13 Oxidative Phosphorylierung, abgeändert nach KEGG^[27, 78].

Der Organismus versucht durch die Erhöhung der Genexpression der Enzyme des Komplexes 3 einen schädlichen Umwelteinfluss zu kompensieren, um weiterhin in der Lage zu sein, mittels oxidativer Phosphorylierung genügend Energie für den Stoffwechsel zur Verfügung zu stellen. Eine Verringerung der Enzymaktivität trotz der Hochregulierung der Genexpression lässt darauf schließen, dass nicht genügend Substrat für die Enzymreaktion zur Verfügung steht – hier Ubichinon und Ubichinol.

Ubichinol wird im Komplex 3 reduziert und über die Kombination der Enzymreaktionen in den Komplexen 1 und 2 unter Verbrauch von NADH/NADPH wieder regeneriert.

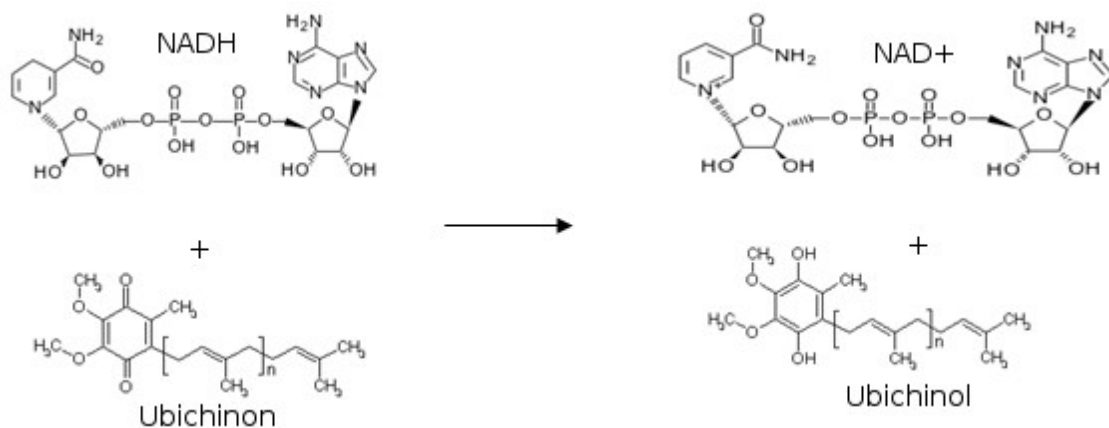


Abbildung III.14 Reaktionsschema der Regeneration von Ubichinol unter Verbrauch von NADH (abgeändert nach KEGG^[27]). Auch NADPH wird in dieser Form zur Regeneration eingesetzt, ist hier aber nicht dargestellt.

Der Wirkstoff IQ-143 muss demnach einen Einfluss auf Komplex 1 oder Komplex 2 besitzen. Dies kann über zwei Arten geschehen: Entweder NADH/NADPH wird nicht in ausreichender Menge hergestellt oder IQ-143 besitzt kompetitive (mit NADH/NADPH) Hemmeigenschaften an einem der beteiligten Enzyme.

Zur Validierung eines oder beider möglicher Wirkmechanismen, müssen die Ergebnisse aus den Metabolitmessungen miteinbezogen werden.

4.4.3 Vergleich mit Metabolitmessungen: Bestätigung des hypothetischen Wirkmechanismus von IQ-143

Betrachtet man zunächst den ersten hypothetischen Wirkmechanismus, in welchem NADH/NADPH nicht in ausreichender Menge synthetisiert werden kann, so muss man vor allem Enzyme der Glykolyse und des Pentosephosphatstoffwechsels genauer

untersuchen.

S. aureus und *S. epidermidis* sind auf Enzyme aus diesen beiden Stoffwechselwegen angewiesen um IMP, ein zur GMP- und AMP-Synthese benötigtes, und daher sehr wichtiges Substrat, im Purinmetabolismus herzustellen. Ribosylamin-5-Phosphat, das Endprodukt des Pentosephosphatstoffwechsels, wird über eine lange Reaktionskaskade im Intermediärmetabolismus zwischen Pentosephosphatstoffwechsel und Purinstoffwechsel zu IMP umgewandelt. Diese Reaktionen hin zu IMP laufen zum Teil unter Verbrauch von NAD⁺ unter Bildung von NADH ab. Eine der Reaktionen in der Glykolyse wird durch die Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase katalysiert.

Enzyme, welche unter NAD⁺-Verbrauch arbeiten, weisen unter Einfluss von IQ-143 (siehe Anhang, Tabellen S VI.1.20 und S VI.1.21) eine, je nach Dosis und Organismus, um 10 bis 30 % verringerte Aktivität auf. Ist die IMP-Synthese auf diese Weise gestört, so hat der Organismus weniger NADH zur Verfügung. Dies führt zu einer verringerten Aktivität im Komplex 1 der oxidativen Phosphorylierung, da hier NADH zwingend als Substrat benötigt wird. Ist Komplex 1 in seiner Aktivität eingeschränkt, hat dies auch direkten Einfluss auf Komplex 3, da dadurch die Regeneration von Ubichinol behindert wird. Betrachtet man nun die Metabolitmessungen (Tabelle III.4 und Tabelle III.5), so sieht man diese Hypothese bestätigt. Diese beiden Tabellen werden auf der nächsten Seite noch einmal aufgeführt.

	Kontrolle		0,16 µM IQ-143			1,25 µM IQ-143		
	mean [µg/ml]	sdv	mean [µg/ml]	sdv	% of control	mean [µg/ml]	sdv	% of control
CMP	21,03	0,96	24,41 *	0,24	116,07	3,86 **	0,19	18,35
TMP	1,61	0,12	1,67	0,11	103,76	8,81 *	0,24	547,20
AMP	0,42	0,06	0,12 *	0,02	28,57	20,37 **	0,80	4850,00
GMP	1,51	0,05	1,44 **	0,05	95,36	3,66 *	0,21	242,38
XMP	2,62	0,20	3,96 **	0,16	151,15	3,44 **	0,11	131,30

Tabelle III.11 Messung der Purin- und Pyrimidinnukleotidkonzentrationen in *S. aureus* USA300: Alle Werte sind in µg/ml an gemessener Konzentration (Mittelwert von drei Versuchsreihen; „mean“) und Prozentzahl der Kontrollgruppe („% of control“), bezogen auf die zugegebene Konzentration an IQ-143, aufgelistet. Statistisch signifikante Abweichungen werden durch „*“ (= $p < 0,05$) und „**“ (= $p < 0,01$) gekennzeichnet. „sdv.“ gibt die Standardabweichung nach Mann-Whitney-U-Test mit Statistica 8.0 wieder.

	Kontrolle		0,16µM IQ-143			1,25µM IQ-143		
	mean [µg/ml]	sdv	mean [µg/ml]	sdv	% of control	mean [µg/ml]	sdv	% of control
NAD	42,19	2,44	35,68 **	0,92	84,57	27,89 **	0,95	66,11
NADH	3,71	0,31	2,63 **	0,28	70,89	1,95 **	0,21	52,56
NADP	3,47	0,06	3,24 **	0,05	93,37	2,42 **	0,05	69,74
NADPH	2,87	0,12	2,25 **	0,02	78,40	5,56 **	0,22	193,73

Tabelle III.12 Messung der NAD-, NADH-, NADP- und NADPH-Konzentrationen in *S. aureus* USA300: Alle Werte sind in µg/ml an gemessener Konzentration (Mittelwert von drei Versuchsreihen; „mean“) und Prozentzahl der Kontrollgruppe („% of control“), bezogen auf die zugegebene Konzentration an IQ-143, aufgelistet. Statistisch signifikante Abweichungen werden durch „*“ (= $p < 0,5$) und „**“ (= $p < 0,01$) gekennzeichnet. „sdv.“ gibt die Standardabweichung nach Mann-Whitney-U-Test mit Statistica 8.0 wieder.

Die Hypothese wird direkt aus den Daten der vermessenen AMP-Konzentration bestätigt (Tabelle III.13). Diese ist unter Einfluss von 0,16µM (0,12 µg/ml) um 70 % geringer als in der Kontrolle (0,42 µg/ml), während gleichzeitig die Genexpression des Komplexes 3 um das Achtfache erhöht ist. Dies dient dem Organismus als Resistenzmechanismus, welcher ihm ermöglicht, trotz des Einflusses von IQ-143 mittels oxidativer Phosphorylierung noch

genügend Energie in Form von ATP aus AMP zu produzieren. Die gemessene Konzentration von 2,63 $\mu\text{g/ml}$ NADH reicht demnach aus, um in Kombination mit der erhöhten Genexpression der Enzyme des Komplexes 3, dennoch genügend Energie bereitzustellen, was normales Wachstum ermöglicht.

Nach einer Gabe von 1,25 μM IQ-143 ändert sich dies jedoch grundlegend. AMP liegt nun in einer fast 50 Mal höheren Konzentration (20,37 $\mu\text{g/ml}$) als in der Kontrollgruppe (0,42 $\mu\text{g/ml}$) vor. Die oxidative Phosphorylierung ist also nicht mehr in der Lage in normalem Maße AMP in ATP umzusetzen. Das zum großen Teil zum Erliegen gekommene Wachstum der Zellkulturen unter diesen Bedingungen (Abbildung III.15) bestätigt diese Wirkung von IQ-143 in hohen Konzentrationen.

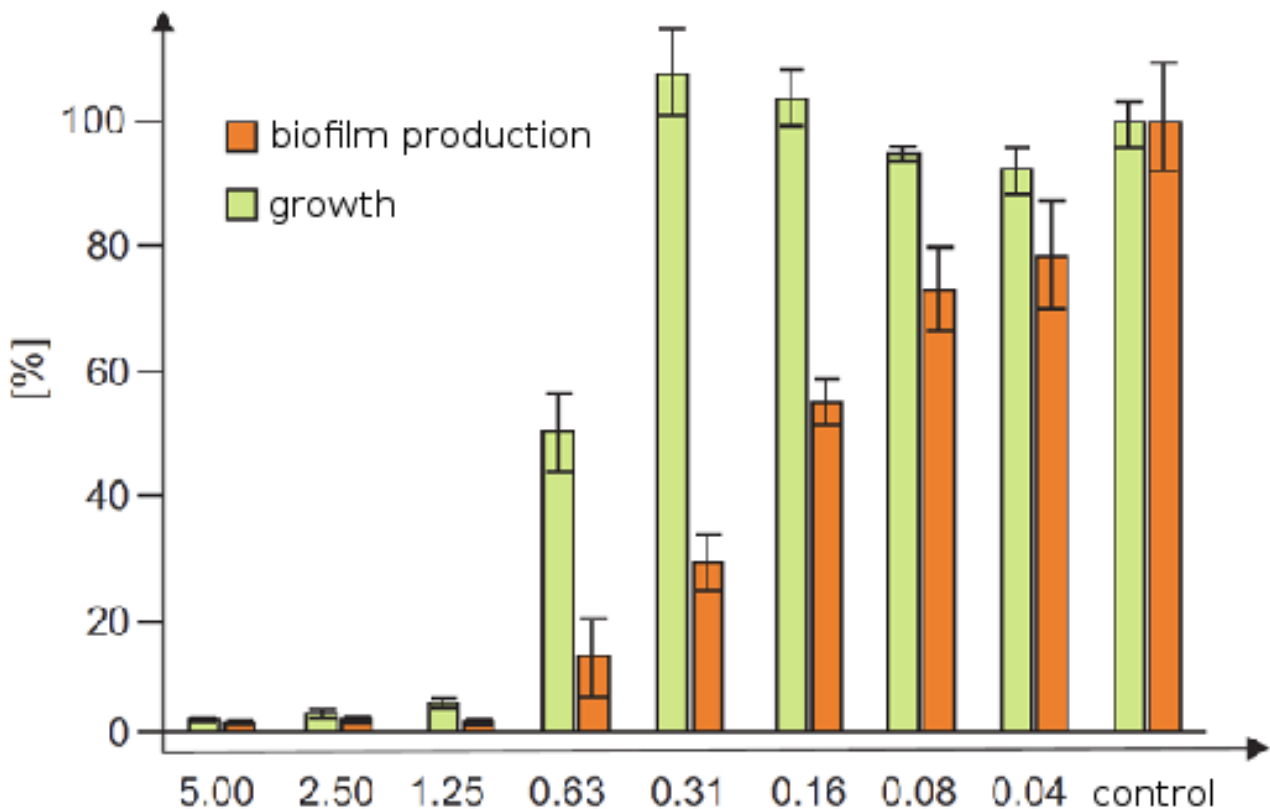


Abbildung III.15 Wachstum und Biofilmproduktion von *S. epidermidis* RP62A nach Gabe verschiedener Konzentrationen (X-Achse, in [μM]) von IQ-143 (abgewandelt nach Gulder^[69]). Die Biofilmproduktion ist unter diesen Bedingungen beeinträchtigt, das Wachstum der Zellen ist aber gleich dem der Kontrollgruppe.

Betrachtet man nun die gemessenen Konzentrationen von NADH/NADPH (Tabelle III.13), so kann die zweite Hypothese – eine kompetitive Hemmung des Komplexes 1 durch IQ-143 – nicht ausgeschlossen werden. Die Konzentration von NADH wird halbiert (vgl. 3,71 $\mu\text{g/ml}$ in der Kontrolle, 1,95 $\mu\text{g/ml}$ unter 1,25 μM IQ-143), während sich

gleichzeitig die Konzentration von NADPH annähernd verdoppelt (vgl. 2,87 µg/ml in der Kontrolle, 5,56 µg/ml unter 1,25 µM IQ-143). Die NADH/NADPH produzierenden Enzyme sind demnach auch bei einer hohen Konzentration von IQ-143 intakt. Der Organismus ist also nicht in der Lage, genügend NADH am Komplex 1 umzusetzen, um genügend NAD⁺ für die NADH-produzierenden Enzyme bereitzustellen.

5. Charakterisierung der Effekte von IQ-143

Die beiden untersuchten Staphylokokkenspezies verwenden NADH als Substrat für die oxidative Phosphorylierung. Die Ergebnisse der Metabolitmessungen zeigen unter verschiedenen Konzentrationen von IQ-143 stark unterschiedliche Konzentrationen dieses wichtigen Substrates. Bei einer hohen 1,25 µM IQ-143 ist die Konzentration von NADPH doppelt so hoch wie in einer Kontrollgruppe, während die Konzentration von NADH gleichzeitig um die Hälfte geringer ist als in der Kontrolle. Daher muss angenommen werden, dass die NADH- und NADPH- produzierenden Enzyme, wie die Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase im Pentosephosphatstoffwechsel, nicht die Hauptangriffspunkte für das Naphtylisochinolium IQ-143 darstellen. Stattdessen beeinflusst IQ-143 direkt den Verbrauch von NADH.

Durch die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung, welche selbst bei geringeren Konzentrationen von IQ-143 auftritt, ist der Verbrauch von NADH im Organismus stark beeinträchtigt: Es wird in einem sehr viel geringeren Maße verbraucht, wodurch eine kleinere Konzentration NAD⁺ im System zur Verfügung steht. Die Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase, wie auch die Enzyme, welche NADPH verwenden, sind davon allerdings nicht betroffen. Die Konzentration von NADPH steigt nach einer Gabe von 1,25 µM IQ-143 stark an, da sich nun das Gleichgewicht zwischen den Reaktionen von NAD⁺ → NADH und NADP⁺ → NADPH an der Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase zu Gunsten von NADP⁺ → NADPH verschoben hat. Diese Hypothese wird durch die Metabolitmessungen, die bioinformatischen Modelle und die Literatur gestützt.

Aromatische Substanzen mit einem quarternären Stickstoff, wie das Chinolonderivat Dequaliniumchlorid, tendieren zur Akkumulation in den Mitochondrien.^[79, 80] Auch ist die Wechselwirkung zwischen quarternären Isochinolinderivaten, wie z.B. den Ionen des

N-Methylisochinolin oder des *N*-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolins, mit der Atmungskette der Mitochondrien, besonders dem Komplex 1, seit Langem bekannt.^[81, 82]

Da IQ-143 strukturell mit dem Dequaliniumchlorid verwandt ist, ist hier eine Wechselwirkung dieses neuen Wirkstoffes mit der mitochondrialen Atmungskette durchaus im Rahmen des Möglichen. Dies wird unter anderem durch die Resultate, welche in den Tabellen III.5, III.6 wie auch III.12 und III.13 dargestellt sind, bestätigt. Unter Einfluss von 0,16 μM IQ-143 ist die AMP-Konzentration um 70 % geringer als in der Kontrolle, während unter Einfluss von 1,25 μM IQ-143 die Konzentration im Vergleich zur Kontrolle um das Fünfzigfache erhöht ist. Eine Erhöhung des AMP-Spiegels durch Degeneration der instabilen ATP-Moleküle kann ausgeschlossen werden: Die Kontrollen wie auch die Testgruppen wurden gleich behandelt.

Die Akkumulation von AMP deutet darauf hin, dass die Oxidation von NADH am Komplex 1 der oxidativen Phosphorylierung gehemmt wird. Dadurch wird der Transport von Elektronen über die Membran der Mitochondrien unterbunden, das chemoosmotische Potential bricht zusammen und die Atmungskette kommt zum Erliegen.

Einflüsse von Sekundärmetaboliten des Wirkstoffes sowie Interaktionen von Wirt und Pathogen wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Die ersten, vorläufigen Mausexperimente der Ohlsengruppe legen jedoch eine gewisse Toxizität von IQ-143 nahe. Deshalb sollte dieser Wirkstoff, auch wenn sein Wirkmechanismus geklärt wurde, nur als eine Art Leitsubstanz zum Design spezifischerer Analoga Verwendung finden.

IV. Analyse der Effekte des Naphtylisochinolins IQ-238

1. Wahl von IQ-238

Das Naphtylisochinolinium IQ-143 wurde im Rahmen dieser Dissertation bereits untersucht und sein wahrscheinlicher Wirkmechanismus aufgezeigt. Allerdings ist auch festgestellt worden, dass dieser Wirkstoff mit großer Wahrscheinlichkeit nicht direkt als Antibiotikum in Betracht kommt, da neurotoxische Nebenwirkungen, die nur im Tierversuch und nicht in der Zellkultur auftreten und deshalb so nicht vorhersehbar waren, und somit diesem Verwendungszweck Wege stehen. Im Rahmen des SFB630 wurden allerdings eine große Anzahl von Naphtylisochinoliniumsalzen synthetisiert. Aus diesem Pool an möglichen Xenobiotika wurde ein in seiner chemischen Struktur nur geringfügig veränderter Wirkstoff, das Naphtylisochinolinium IQ-238, ausgewählt, um dessen metabolisches Wirkspektrum zu identifizieren.

Die Auswahl von IQ-238 erfolgte aus verschiedenen Gründen. Zum einen weist dieses Xenobiotikum ein breites Wirkspektrum gegen gram-positive Bakterien wie Staphylokokken und Streptokokken auf. Zum anderen sind für diesen Wirkstoff die wichtigen Vorarbeiten für die metabolische Netzwerkanalyse – wie Genexpressionsanalysen und Zytotoxizitätsmessungen – bereits abgeschlossen und können für die Berechnung der Modelle verwendet werden.

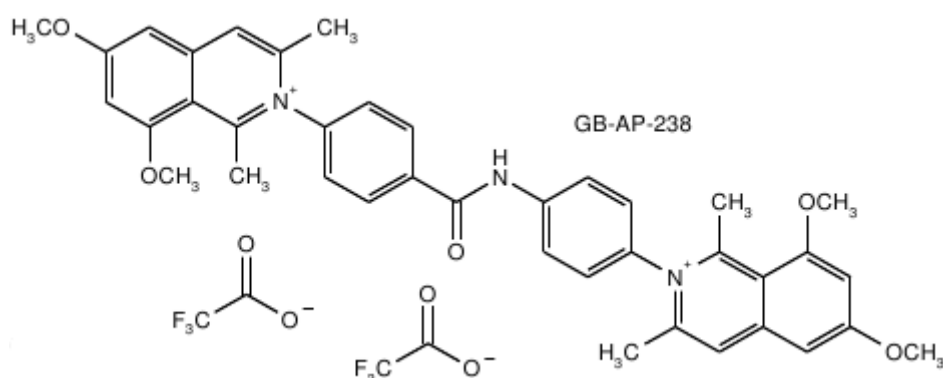


Abbildung IV.1 Das Naphtylisochinolin IQ-238.

Die Analyse des Naphtylisochinoliniumsalzes IQ-238 wurde in drei Teile gegliedert. Im Ersten wird der Wirkmechanismus von IQ-238 mittels metabolischer Netzwerkanalyse,

welche durch Genexpressionsdaten und Zytotoxizitätsmessungen gestützt wird, aufgeklärt. Im zweiten Teil wird das Wirkspektrum von IQ-143 mit dem von IQ-238 mit Voronoi-Diagrammen in Korrelation gebracht, um die Unterschiede in ihren Effekten auf den Organismus direkt darzustellen. Im Anschluss daran werden im dritten Teil die beiden bereits untersuchten Naphtylisochinoline mit weiteren potentiellen Wirkstoffen dieser Gruppe durch eine Hauptkomponentenanalyse („principal component analysis; PCA“) miteinander verglichen, um die bestmögliche Leitsubstanz zur Antibiotikaentwicklung zu ermitteln.

2. Voronoi-Diagramme: Starke Unterschiede zwischen IQ-143 und IQ-238

Die Voronoi-Diagramme wurden für die Wirkungen der Naphtylisochinoline IQ-143 und IQ-238 berechnet. Für IQ-143 erfolgte dies in den Konzentrationen 2,0 MIC und 0,25 MIC für IQ-238 für die einfache MIC. Sie wurden für den Organismus *S. epidermidis* berechnet. Diese Konzentrationen für IQ-143 sind nicht identisch mit den in Kapitel 3 modellierten Konzentrationen von 1,25 μM und 0,16 μM .

Im Folgenden sollen zunächst die Voronoi-Diagramme für das Naphtylisochinolinium IQ-143 analysiert werden, im Anschluss daran für IQ-238. Diese basieren auf den Genexpressionsdaten, welche auch zur Erstellung der metabolischen Netzwerke Verwendung fanden. Hierfür wurden, im Gegensatz zum Modelling, für IQ-143 allerdings alle Expressionswerte für alle Gene herangezogen, zur Erstellung der Diagramme für

IQ-238 ein eingeschränkter Satz an Genen. Dadurch werden in den Voronoi-Diagrammen für IQ-143 alle betroffenen Stoffwechselwege dargestellt, für IQ-238 nur diejenigen, welche auch für die Berechnung der metabolischen Netzwerkmodelle betreffend dieses Naphtylisochinoliniums verwendet wurden.

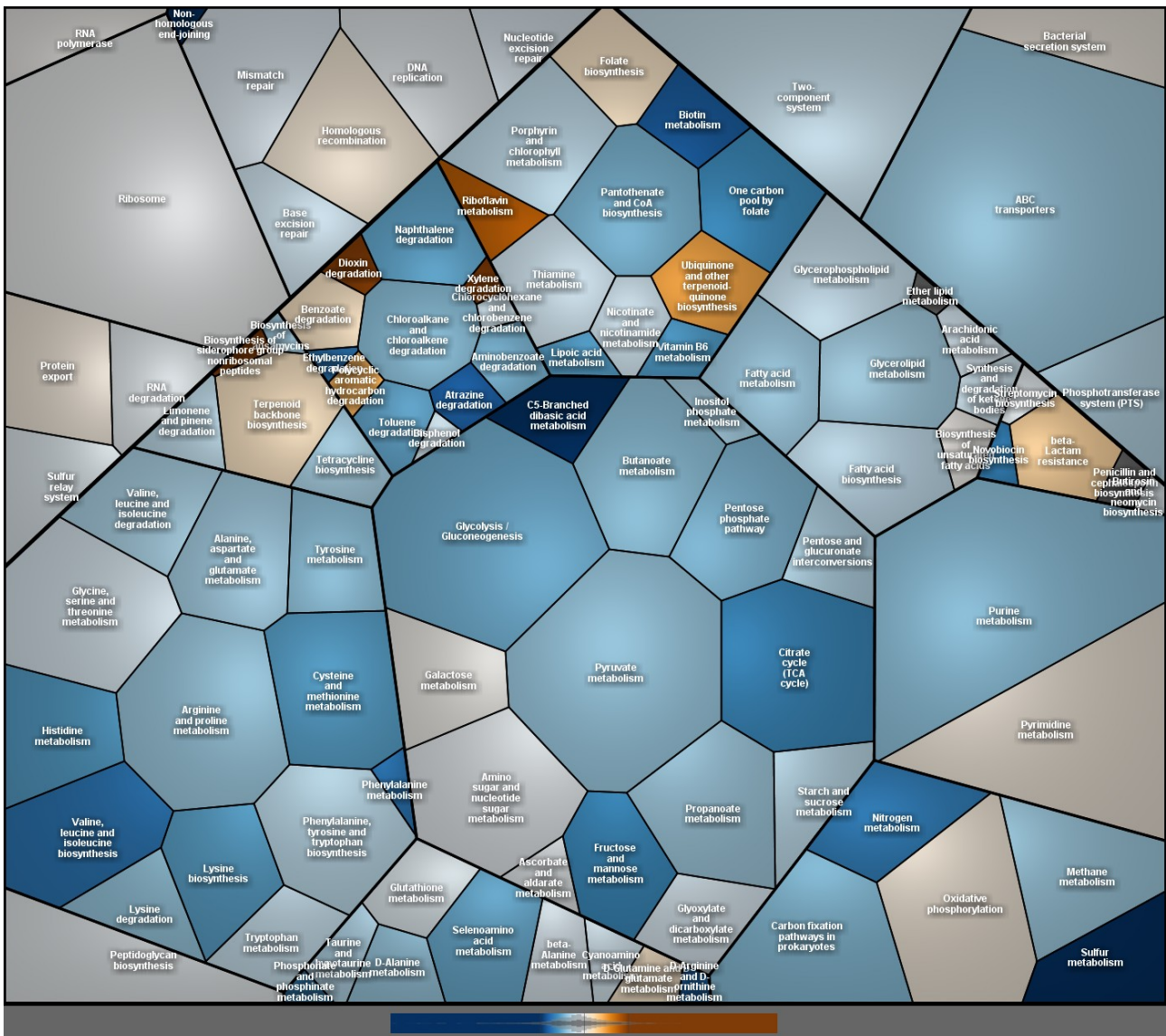


Abbildung IV.2 Voronoi-Diagramm für die doppelte inhibitorische Konzentration von IQ-143 (Graphiken nach Jörg Bernhardt, Uni Greifswald). Blau dargestellt sind herunterregulierte Stoffwechselwege, in orangebraun hochregulierte Stoffwechselwege.

Dieses Voronoi-Diagramm sagt für den Wirkstoff IQ-143 unter anderem starke Wirkungen auf den Zitronensäurezyklus aus. Auch die Glykolyse wird hier herunterreguliert dargestellt. Beides stimmt mit den Ergebnissen aus den metabolischen Netzwerkmodellen überein, auch wenn hier eine andere Konzentration an IQ-143 für die Simulation Verwendung fand als in den Modellen.

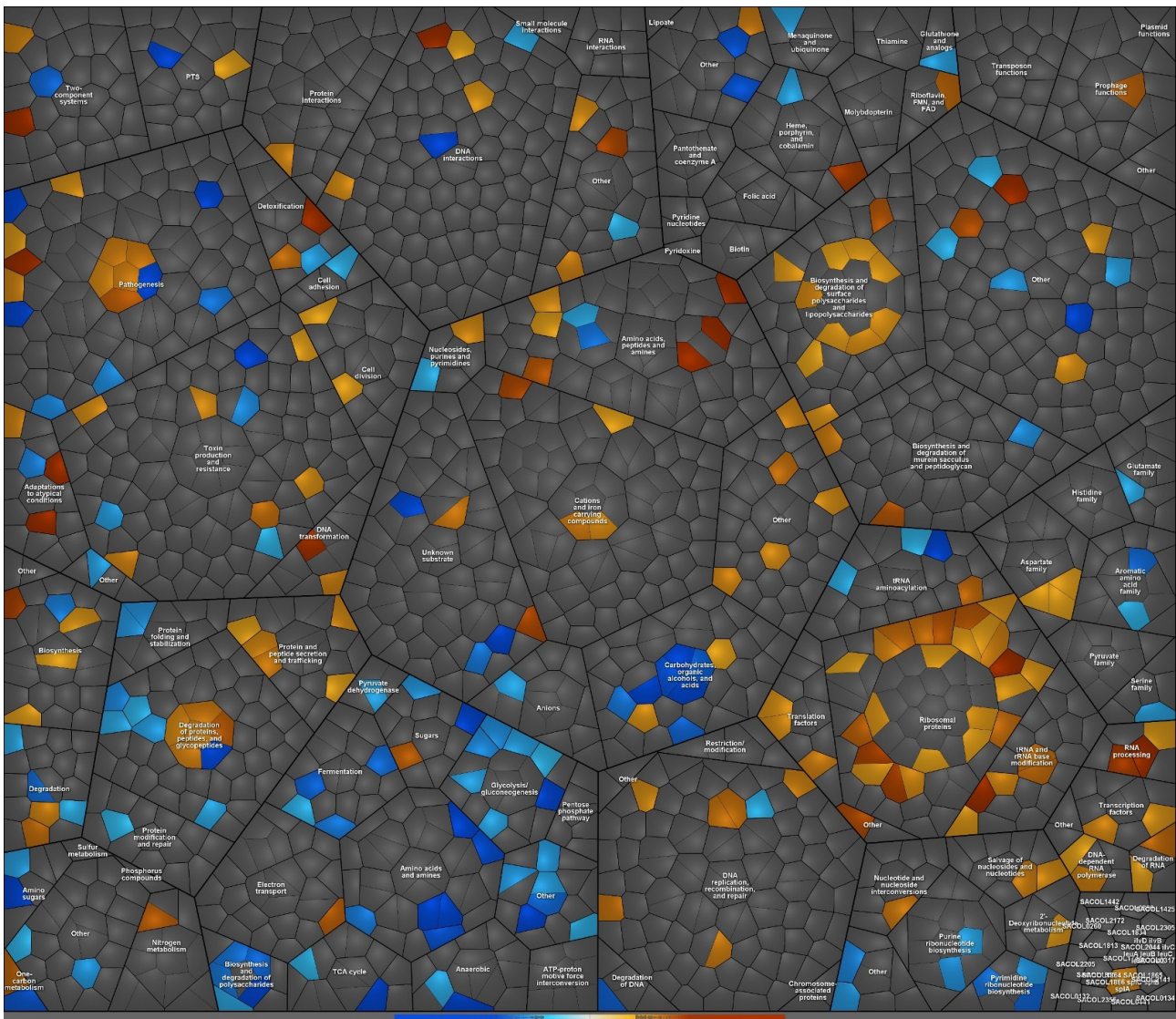


Abbildung IV.4 Voronoi-Diagramm für IQ-238 (Graphiken nach Jörg Bernhardt, Uni Greifswald). Blau dargestellt sind herunterregulierte Stoffwechselwege, in orangebraun hochregulierte Stoffwechselwege. Zur Erstellung dieses Diagramms wurden nur ausgewählte Gene – und nicht wie für IQ-143 alle – verwendet, da hier ein direkterer Vergleich mit den metabolischen Modellen gezogen werden soll.

Die Analyse der Voronoi-Diagramme zeigt starke Effekte des Naphtylisochinolins IQ-238 auf den Energiestoffwechsel von *S. aureus*, insbesondere auf den Metabolismus von NADP/NADPH, den Kohlehydratstoffwechsel und die abbauenden Stoffwechselwege.

3. PCA: unterschiedliche chemische und biologische Eigenschaften von IQ-143 und IQ-238

Eine PCA erlaubt einen weiteren generellen Einblick in die Unterschiede der Naphtylisochinolone IQ-143 und IQ-238. Das hier verwendete R-Skript (mit dem abgewandelten R-Paket „vegan“ nach Oksanen et al^[83]) von Dr. Dr. Marcus Dittrich vom Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg berechnet diese Hauptkomponentenanalyse. Die generellen chemischen Eigenschaften der untersuchten Stoffe, wie z.B. die Anzahl der Wasserstoffdonatoren und -akzeptoren wurden vom Verfasser mit dem Programm MarvinSketch^[84] berechnet. In der PCA werden die berechneten chemischen Eigenschaften den gemessenen biologischen Eigenschaften wie IC₅₀-Werten und den Aktivitäten gegen verschiedene Organismen gegenübergestellt.

SFB ID	Atom Count:	Ring Count:	Polar surface Area:	Molecular Weight:	logP:	H bond donor Count:	H bond acceptor Count:	Lipinski rule of 5 Acceptable?	IC50 J774.1 Cells
251	61	4	65,07	435,51	3,90	0	6	1	100
265	62	4	36,92	430,54	6,52	0	4	0	35,9
268	52	4	13,11	428,42	1,00	0	1	1	100
269	20	1	40,46	138,16	2,39	2	2	1	100
274	41	1	57,53	262,34	4,27	2	3	1	32,8
275	36	1	46,53	246,30	4,42	1	3	1	27
276	40	1	55,76	276,33	4,48	1	4	1	29,2
277	46	2	46,53	322,40	5,14	1	3	0	32
278	47	1	52,60	314,44	2,39	0	4	1	3,5
279	26	1	63,60	196,20	0,55	1	4	1	4,1
281	29	1	52,60	210,23	0,97	0	3	1	100
283	39	1	49,69	238,32	3,53	2	3	1	100
285	40	1	46,53	250,33	2,65	1	3	1	7,5
299	37	3	3,88	248,34	0,69	0	0	1	100
300	35	2	13,11	228,31	-0,46	0	1	1	100
303	45	3	22,34	308,39	0,37	0	2	1	20
304	51	3	22,34	336,45	1,10	0	2	1	5,9
309	43	2	3,88	254,39	1,24	0	0	1	100
310	49	2	3,88	282,44	2,19	0	0	1	100
312	48	3	22,34	322,42	1,07	0	2	1	17,6
314	63	4	51,80	517,49	0,90	1	4	0	1
324	56	6	39,18	420,50	6,38	1	2	0	100
334	31	2	3,88	277,18	0,47	0	0	1	100
335	57	4	22,34	390,49	2,09	0	2	1	2,9
336	51	4	22,34	358,45	1,55	0	2	1	3,77
339	69	7	62,46	539,56	8,41	0	4	0	100
353	55	5	22,34	406,50	2,75	0	2	1	2,47
356	44	4	13,11	314,40	1,00	0	1	1	26
361	20	1	40,46	138,16	2,39	2	2	1	35,1
370	18	1	60,60	140,14	0,60	3	3	1	78,5
238	86	6	73,78	629,74	-1,17	1	5	0	100
143	82	6	44,68	586,72	-0,61	0	4	0	40,15

Tabelle IV.1 Chemische Eigenschaften der Xenobiotika. Die PCA stellt diese Wirkstoffe einander gegenüber – die chemischen Eigenschaften wurden mit MarvinSketch berechnet. Anmerkungen für die Spalte „Lipinski rule of 5 acceptable“: „1“ = Kriterien erfüllt, „0“ = Kriterien nicht erfüllt.

Die beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Xenobiotika befinden sich in einem ähnlichen Bereich betreffend ihrer chemischen Eigenschaften. Beide weisen wenige Ringe in ihrer Struktur auf, die Anzahl an Atomen und das Molekulargewicht sind gering.

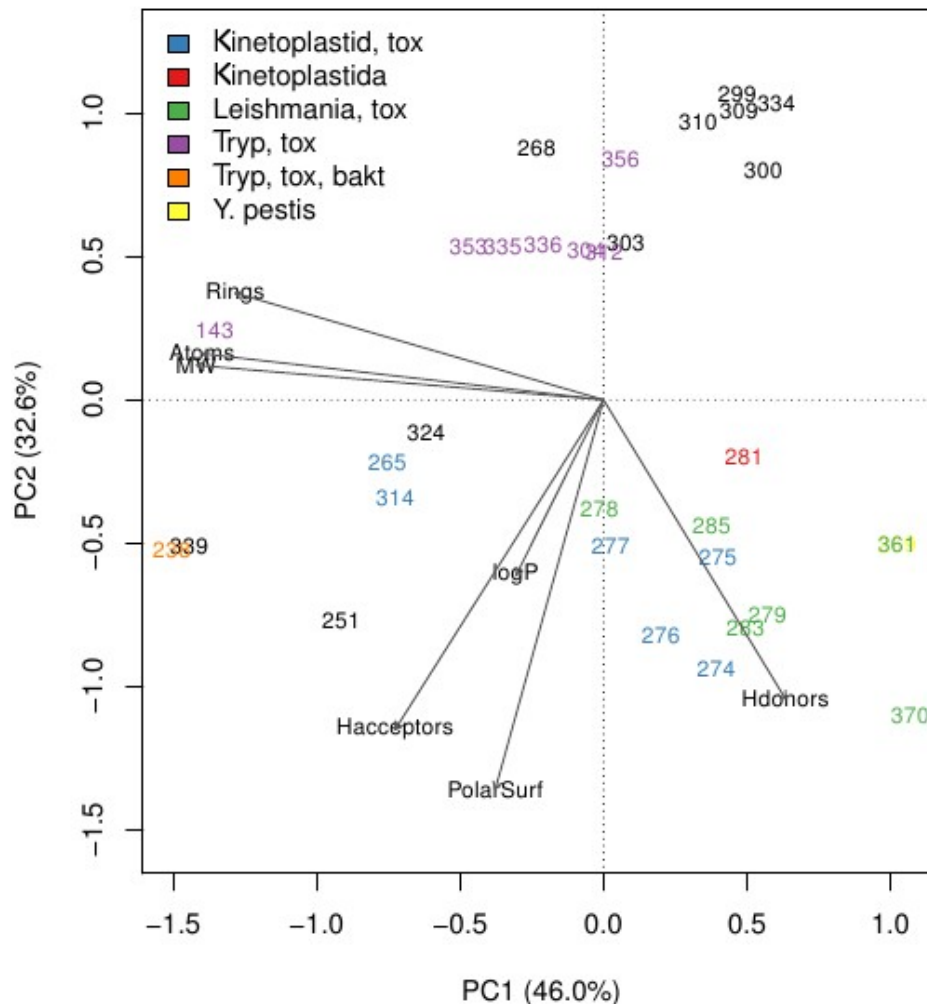


Abbildung IV.5 Gegenüberstellung verschiedener Xenobiotika des SFB630 nach ihren Aktivitäten gegenüber verschiedenen Organismen nach Dr. Dr. Markus Dittrich. IQ-143 und IQ-238 befinden sich im linken Teil der PCA. Die Wirkungen sind nach Farben aufgetrennt; schwarz = Stoff zeigte keine besondere Wirkung, siehe auch Legende der Abbildung.

Das Naphtylisochinolin IQ-238 weist gegenüber IQ-143 einen noch geringeren Oktanol-Wasser-Koeffizienten und eine erhöhte polare Oberflächenladung auf. Beides führt zu einem hydrophileren Wirkstoff. Die Folge ist, dass die Blut-Hirn-Schranke von dieser Substanz nicht mehr so leicht überwunden werden kann. Auch der Transport in die Zellen durch Diffusion über die Membran hinweg ist erschwert. Die toxischen Nebenwirkungen fallen, wie aus Tabelle IV.2 hervorgeht, damit eindeutig geringer aus als bei IQ-143.

Betrachtet man das Wirkspektrum von IQ-143, so ist dieser Stoff nach Labortests sehr effektiv gegen Trypanosomen – die bakteriziden Effekte gegen *S. aureus* und *S. epidermidis* treten erst bei einer hohen Konzentration von minimal 0,63 μM auf (vgl. Abb. III.18). Dagegen reichen bei *T. brucei* bereits 0,06 μM aus, um 50 % der Zellen abzutöten.

Die Wirkung von IQ-238 weitet sich hingegen auf verschiedene Bakterien aus. Für *S. aureus* liegt die MIC bei 2,50 μM (5,00 μM für IQ-143) und für *S. epidermidis* bei 0,16 μM . Die Toxizität gegen J774.1-Zellen sinkt gleichzeitig stark ab: IC_{50} ist bei IQ-143 bei 40 μM erreicht, während bei IQ-238 dieser Wert erst bei mehr als 100 μM erreicht wird (siehe Tabelle IV.2; gelbe Markierung).

IQ-238	MIC [μM]	IC50 [μM]	[%]	IQ-143	MIC [μM]	IC50 [μM]	[%]
<i>S. aureus</i>	2,50			<i>S. aureus</i>	5,00		
<i>S. epidermidis</i>	0,16			<i>S. epidermidis</i>	0,63		
<i>E. coli</i>	40,00			<i>E. coli</i>	20,00		
<i>P. aeruginosa</i>	>160			<i>P. aeruginosa</i>	>160		
<i>C. albicans</i>	5,00			<i>C. albicans</i>	1,25		
293T		58,10		293T		- / -	
<i>T. brucei</i>		0,27		<i>T. brucei</i>		0,06	
<i>L. major</i>		19,60		<i>L. major</i>		23,57	
J774.1		>100		J774.1		40,15	
Hemmung der Biofilmproduktion			95	Hemmung der Biofilmproduktion			100
Wachstumshemmung			95	Wachstumshemmung			95

Tabelle IV.2 Ergebnisse der *in vitro* Versuchsreihen der Ölschlägergruppe.

In der folgenden Abbildung sind die gleichen ausgewählten Xenobiotika des SFB630 wie in Abbildung IV.5 aufgetragen. In dieser PCA jedoch nach ihren IC_{50} -Werten gegen J774.1 Zellen. Je höher der IC_{50} -Wert ist, desto besser die Verträglichkeit, da eine höhere Konzentration an Wirkstoff benötigt wird, um 50 % der J774.1 Zellen abzutöten. Viele der hier in hellgrüner Schrift aufgetragenen Substanzen (siehe besonders im oberen rechten Quadranten) weisen eine sehr gute Verträglichkeit auf, jedoch leider keine herausragende spezielle Wirkung in den biologischen Tests.

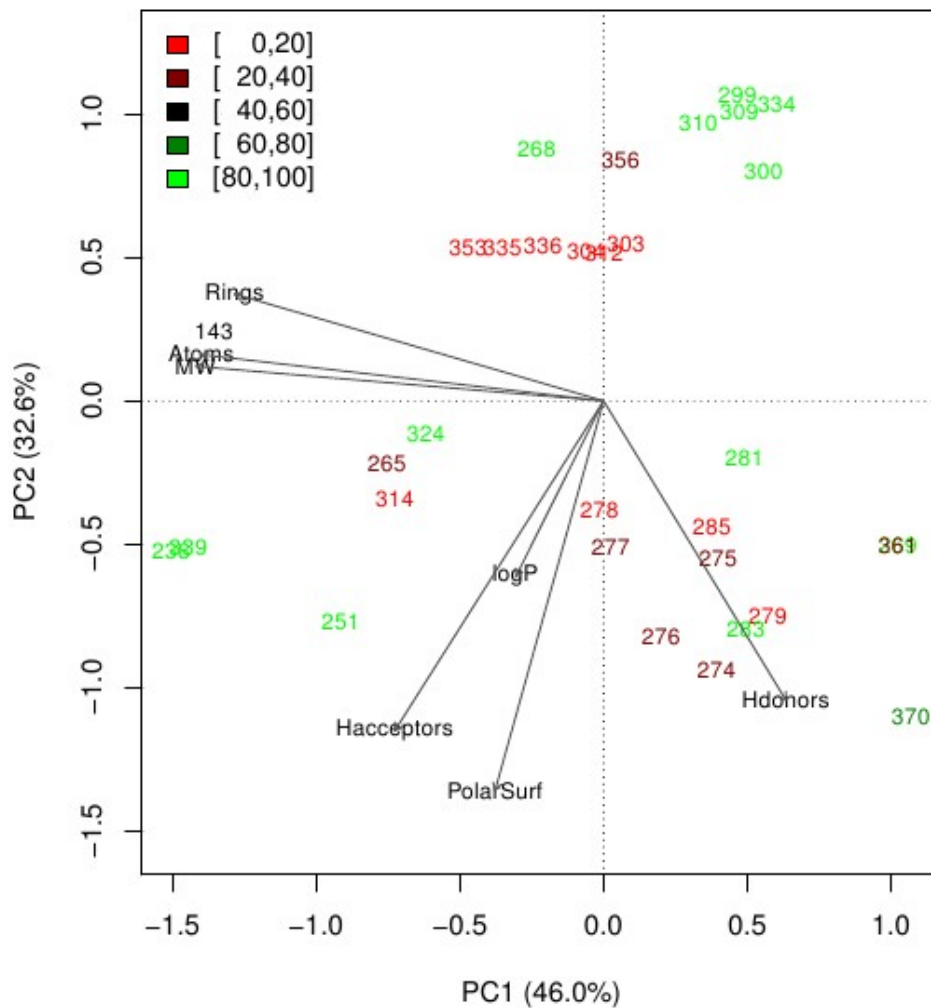


Abbildung IV.6 Gegenüberstellung verschiedener Xenobiotika des SFB630 nach ihren IC₅₀-Werten nach Dr. Dr. Markus Dittrich. Die Wirkstoffe IQ-143 und IQ-238 befinden sich wiederum im linken Teil der PCA.

Die Substanzen, welche besonders gut gegen Trypanosomen und generell gegen den Bewegungsapparat (Kinetoplastiden) wirken, erweisen sich leider als sehr toxisch. In dieser Kategorie bildet IQ-143 die erste Ausnahme: Der IC₅₀-Wert liegt bei 40 µM. IQ-238, das sich nur geringfügig von IQ-143 unterscheidet, weist eine noch bessere Verträglichkeit auf.

Zusammen mit der besseren Wirksamkeit gegen Staphylokokken ist dieses Xenobiotikum noch effektiver gegen diese Bakterien einzusetzen. Aus diesem Grund wurde versucht, auch für IQ-238 die Wirkeffekte durch metabolische Netzwerkanalysen besser zu verstehen.

4. Metabolische Netzwerkanalyse zeigt Einfluss von IQ-238 auf die Glykolyse

Die Annotation und der Aufbau der metabolischen Netzwerke für *S. aureus* und *S. epidermidis* können unter III.6.1 und III.6.2 nachgelesen werden, da für die Naphtylisochinolone IQ-238 und IQ-143 dieselben Modelle Verwendung fanden. Unter II.2.1 sind die theoretischen Hintergrundinformationen zur Berechnung extremer Moden hinterlegt, die Listen aller Enzyme zum Aufbau der Netzwerke und auch deren Aktivitäten gemäß Genexpressionsdaten sind im Anhang in den Tabellen S VI.2.1 bis S VI.2.6 aufgeführt.

4.1 Modenaktivitäten mit R: Starke Veränderungen im Energiemetabolismus

Folgende Veränderungen der Genexpressionen (vgl. IV.2) konnten für die in den Modellen verwendeten Enzyme festgestellt werden.

EC-Nummer und Enzymname im Modell	Gen	X-fache Veränderung	Beschreibung der Enzymfunktion
2.3.3.1 – TCA-citrate-synthase	<i>citZ</i>	-3,04	citrate synthase
2.A.15 – SERP 2179	<i> cudT</i>	14,33	choline transporter
2.4.2.1 – PurM nucleotide phosphatase, SERP0655-PurM amidophosphoribosyltransferase	<i> deoD</i>	-3,74	purine nucleoside phosphorylase
4.1.2.13 – Glyc-fructose-bisphosphate-aldolase	<i> fbaA</i>	-4,33	fructose-bisphosphate aldolase
3.1.3.11 – Glyc-fructose-bisphosphatase	<i> fbp</i>	-3,64	fructose-bisphosphatase
1.2.7.3 – TCA-oxoglutarate-synthase	<i> fer</i>	6,04	ferredoxin
4.2.1.2 – TCA-fumarate-hydratase	<i> fumC</i>	-9,53	fumarate hydratase
1.2.1.12, 1.2.1.13 – Glyc-glyceraldehyde-3-phospho-dehydrogenase(NAD+/NADP+)	<i> gapB</i>	-3,00	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 2
1.2.4.1 – Glyc/TCA-pyruvate-dehydrogenase	<i> pdhA</i>	-3,54	pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit
2.4.2.2 – PurM_GMP-pyrophosphorylase, PyrM_pyrimidine-nucleoside-phosphorylase	<i> pdp</i>	-4,68	pyrimidine-nucleoside phosphorylase
2.7.1.11 – Glyc-6-phosphofruktokinase	<i> pfkA</i>	-3,54	6-phosphofruktokinase
5.3.1.9 – Glyc_alpha/beta-D-Glucose-6-phosphate-ketol-isomerase	<i> pgi</i>	-4,41	glucose-6-phosphate isomerase
2.7.7.7 – SERP0831	<i> polC</i>	3,72	DNA polymerase III PolC
4.3.2.2 PurM_adenylosuccinate-lyase	<i> purB</i>	-3,22	adenylosuccinate lyase
6.3.5.3 – SERP0653-PurM_FGAM-synthetase	<i> purL</i>	-3,52	phosphoribosylformylglycinamide synthase II
6.4.1.1 – TCA_Pyruvate_CO2-ligase	<i> pycA</i>	-3,01	pyruvate carboxylase
2.4.2.10 – PyrM_orotate-phosphoribosyltransferase	<i> pyrE</i>	-6,60	orotate phosphoribosyltransferase
4.1.1.23 – PyrM_OMP-decarboxylase	<i> pyrF</i>	-5,77	orotidine 5'-phosphate decarboxylase
2.7.7.6 – PurM_DNA-directed-RNA-polymerase	<i> rpoB</i>	4,19	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
2.7.7.6 – PurM_DNA-directed-RNA-polymerase	<i> rpoE</i>	3,02	DNA-directed RNA polymerase subunit delta
1.1.1.27 – SERP2156-Glyc_L-lactate-dehydrogenase	SA2395	-9,53	L-lactate dehydrogenase
1.1.1.1 – SERP0389-Glyc_Ethanol_NAD+-oxidoreductase	SACOL0237	-6,02	alcohol dehydrogenase, zinc-containing
SERP1944	SACOL2413	3,64	EmrB/QacA family drug resistance transporter
2.7.1.48 – PyrM_uridine-kinase, PyrM_cytidine-kinase	<i> udk</i>	3,73	uridine kinase
2.4.2.22 – PurM_xanthosine-phosphoribosyltransferase	<i> xprT</i>	4,16	xanthine phosphoribosyltransferase

Tabelle IV.3 Veränderte Genexpressionen von *S. aureus* HG001 nach Gabe des Naphtylisochinolins IQ-238.

4.2 Pathwayanalyse: Starke direkte Effekte auf Flaschenhalsenzyme der Glykolyse

Nach Import der Ergebnisse der R-Skripte in YANASquare ist für beide modellierten Organismen, *S. aureus* USA300 und *S. epidermidis* RP62A, eines sehr ähnliche Wirkungen des Naphtylisochinolinsalzes IQ-238 feststellbar. Im Detail wurden die folgenden, signifikanten Veränderungen der Enzymaktivitäten berechnet.

Tabelle IV.4 gibt die Ergebnisse für *S. epidermidis* wieder, Tabelle IV.5 für *S. aureus*.

	IQ-238	IQ-238	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
	-	+	absolute	fraktionelle
Enzymname	normalisierter Flux	normalisierter Flux	Unterschiede	Veränderungen
"Glyc_Fructose-Bisphosphatase"	0,0479	0,0029	-0,045	0,061
"Glyc_6-Phosphofruktokinase"	0,1275	0,0464	-0,081	0,364
"Glyc_Fructose-Bisphosphat-Aldolase"	0,0796	0,0435	-0,036	0,546
"Glyc_Glyceraldehyde-3-P-Dehydrogenase_NAD+"	0,0317	0,0144	-0,017	0,454
"Glyc_Glyceraldehyde-3-P-Dehydrogenase_NADP+"	0,1275	0,0726	-0,055	0,569
"Glyc_Phosphoglycerate-Kinase"	-0,1592	-0,0870	-0,072	0,546
"Glyc_2-Phospho-D-glycerate-2.3-Phosphomutase"	-0,1592	-0,0870	-0,072	0,546
"Glyc_2-Phospho-D-Glycerate-Hydro-Lyase"	0,1592	0,0870	-0,072	0,546
"PurM_Pyruvate-Phosphotransferase_dATP"	0,0160	0,0110	-0,005	0,688
"PurM_Pyruvate-Phosphotransferase_dGTP"	0,0160	0,0110	-0,005	0,688
"TCA_PEP-Carboxylase"	-0,2073	-0,1199	-0,087	0,578

Tabelle IV.4 Veränderungen der Enzymaktivitäten in *S. epidermidis* nach Gabe von IQ-238 (orange) im Vergleich zu einer Berechnung ohne zugesetzten Wirkstoff (blaugrau). Enzyme mit blauem Hintergrund weisen Veränderungen in ihrer Genexpression auf. Die absoluten Unterschiede in den Aktivitäten berechnen sich aus den Aktivitäten („normalisierter Flux“) der Kontrolle abzüglich der Aktivitäten der Testgruppe. Die fraktionellen Veränderungen gibt an, wie viel Aktivität in Prozent nach Zugabe von IQ-238 noch vorhanden ist.

Die Veränderungen in den Enzymaktivitäten bei *S. epidermidis* betreffen vor allem Enzyme der Glykolyse. Die Aktivitäten der einzelnen Proteine, welche nicht durch Genexpressionsdaten mit R gefittet wurden, verringern sich teilweise auf nur 54 % ihrer normalen Aktivität ohne Einfluss von IQ-238.

	IQ-238	IQ-238	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	-	+	absolute	fraktionelle
Enzymname	normalisierter Flux	normalisierter Flux	Unterschiede	Veränderungen
"Glyc_Fructose-Bisphosphatase"	0,0356	0,0029	-0,033	0,081
"Glyc_6-Phosphofruktokinase"	0,1526	0,0763	-0,076	0,500
"Glyc_Fructose-Bisphosphat-Aldolase"	0,1169	0,0734	-0,044	0,628
"Glyc_Glyceraldehyde-3-P-Dehydrogenase_NAD+"	0,0304	0,0129	-0,018	0,424
"Glyc_Glyceraldehyde-3-P-Dehydrogenase_NADP+"	0,2034	0,1339	-0,070	0,658
"Glyc_Phosphoglycerate-Kinase"	-0,2339	-0,1468	-0,087	0,628
"Glyc_2-Phospho-D-glycerate-2.3-Phosphomutase"	-0,2339	-0,1468	-0,087	0,628
"Glyc_2-Phospho-D-Glycerate-Hydro-Lyase"	0,2339	0,1468	-0,087	0,628
"PurM_Pyruvate-Phosphotransferase_dATP"	0,0102	0,0103	0,000	1,010
"PurM_Pyruvate-Phosphotransferase_dGTP"	0,0102	0,0103	0,087	1,010
"TCA_PEP-Carboxylase"	-0,2645	-0,1777	-0,087	0,672

Tabelle IV.5 Veränderungen der Enzymaktivitäten in S. aureus nach Gabe von IQ-238 (orange) im Vergleich zu einer Berechnung ohne zugesetzten Wirkstoff (blaugrau). Enzyme mit blauem Hintergrund weisen Veränderungen in ihrer Genexpression auf. Die absoluten Unterschiede in den Aktivitäten berechnen sich aus den Aktivitäten („normalisierter Flux“) der Kontrolle abzüglich der Aktivitäten der Testgruppe. Die fraktionellen Veränderungen gibt an, wie viel Aktivität in Prozent nach Zugabe von IQ-238 noch vorhanden ist.

Auch in *S. aureus* sind Enzyme der Glykolyse stark von den Aktivitätsveränderungen betroffen, jedoch nicht so stark wie die Enzyme von *S. epidermidis*. Abgesehen von den gefitteten Proteinen, welche sich in einem Fall auf nur noch 6 % Restaktivität verringert, weisen die Enzyme von *S. epidermidis* nur eine Reduktion auf 63 % ihrer ursprünglichen Aktivitäten auf.

Diese teilweise massiven Veränderungen in den Enzymaktivitäten kann erklärt werden, wenn man betrachtet, in welchem Stoffwechselweg IQ-238 im Organismus angreift. Die Enzymaktivitäten der blau hinterlegten Enzyme bilden in der Glykolyse eine Enzymkaskade. Diese Kaskade übernimmt in der Glykolyse die wichtige Aufgabe, aus β -D-Fructose-6-Phosphat über Glyceraldehyd-3-Phosphate das Glycerate-3-Phosphat zu bilden. Dieses verstoffwechselt wiederum zu Phosphoenolpyruvat, welches daraufhin zu einem wichtigen Metaboliten des Zitronensäurezyklus wird. Abbildung IV.7 zeigt diese Kaskade in der für YANASquare typischen Enzymansicht.

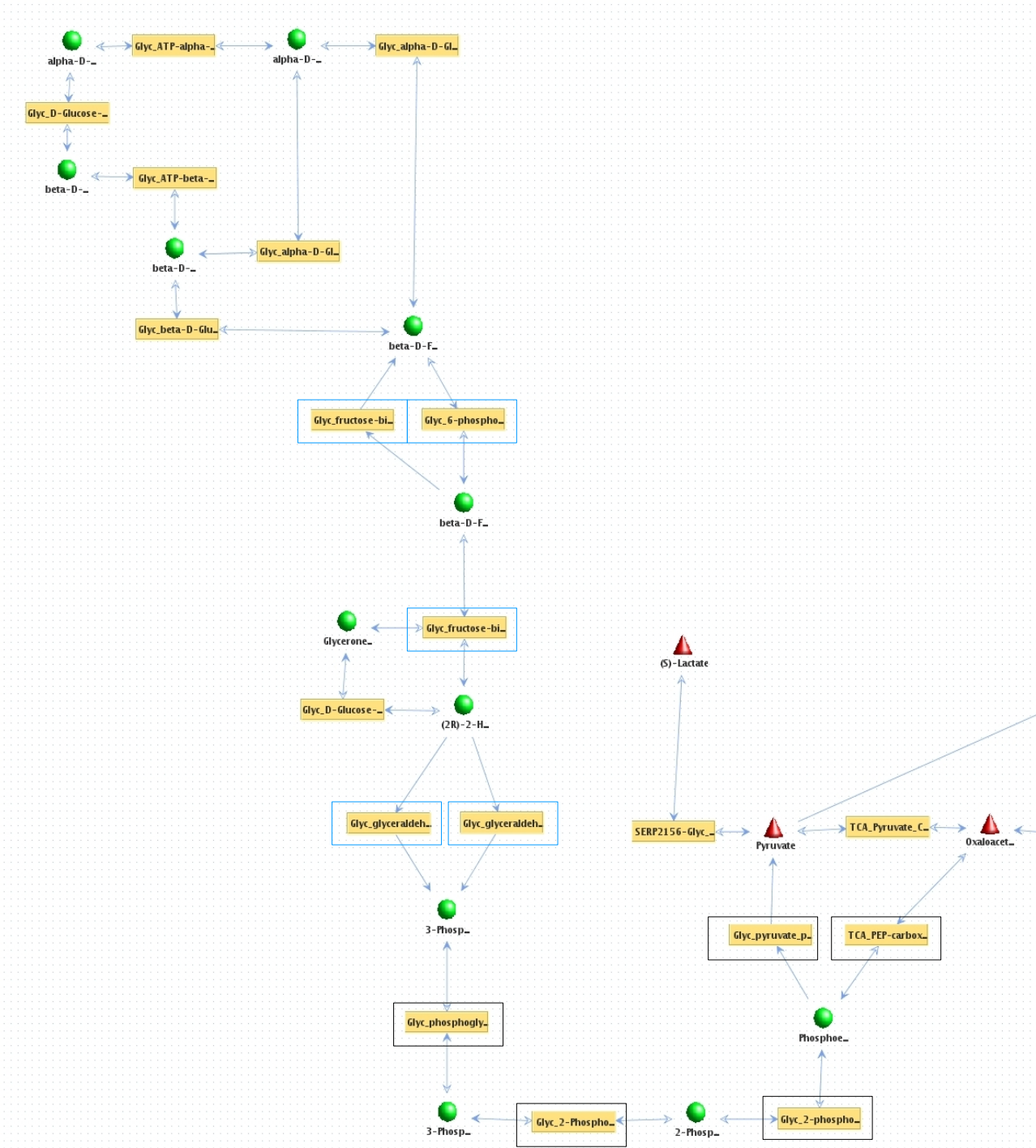


Abbildung IV.7 Enzymkaskade der durch IQ-238 betroffenen Enzyme der Glykolyse. In blauer Umrandung sind die Enzyme gegeben, deren Genexpression durch IQ-238 verändert wurde. Mit einem schwarzen Rand sind die dadurch in ihrer Aktivität beeinträchtigten Enzyme (vgl. Tabellen IV.4 und IV.5) dargestellt. Diese Abbildung ist nur ein Teilausschnitt aus dem Gesamtnetzwerk. Aus diesem Grund sind weiterführende Reaktionspfeile rechts in der Grafik sichtbar.

5. Charakterisierung der Effekte von IQ-238

Durch die metabolische Netzwerkanalyse konnte der bakteriostatische Effekt, welcher für IQ-238 an *S. aureus* HG001 gemessen wurde, auf *S. aureus* USA300 und *S. epidermidis* RP62A übertragen werden. Dadurch war es möglich, diesen im Detail zu beschreiben und zu analysieren.

Dieses Xenobiotikum beeinflusst die Kohlehydratstoffwechsel der beiden modellierten Stämme. Die Genexpressionen der Fruktose-Biphosphatase, der 6-Phosphofruktokinase, der Fruktose-Biphosphat-Aldolase und der Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase sind drei- bis vierfach geringer als in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle IV.3). Das Überleben derart beeinflusster Organismen ist dadurch an sich schon in Frage gestellt, da diese Enzyme alle Teil der Glykolyse sind. Durch die metabolische Netzwerkanalyse konnte jedoch das volle Spektrum der Auswirkungen dieser Veränderungen in den Genexpressionen aufgezeigt werden. Nicht nur Enzyme der Glykolyse, welche direkt in ihrer Genexpression verändert sind, sind davon beeinträchtigt, sondern auch Enzyme, für welche keine Veränderung der Genexpression festgestellt wurde.

Besonders Abbildung IV.7 verdeutlicht dies. Sie bildet die in der Glykolyse lokalisierte Reaktionskaskade von Fruktose-6-Phosphat hin zu Oxalacetat ab. Während die Genexpressionen für die ersten vier Enzyme dieser Kaskade jeweils nach unten reguliert sind, sind die Gene für die Phosphoglycerat-Kinase, die 2-Phospho-D-Glycerat-2,3-Phosphomutase, die 2-Phospho-D-Glycerat-Hydrolyase, die Pyruvat-Phospho-Transferase und die PEP-Carboxylase nicht von Änderungen in Ihrer Expression beeinträchtigt. Dennoch sind die Aktivitäten dieser Enzyme in beiden Stämmen um ca. 50 % geringer als in Modellen ohne zugesetztes Xenobiotikum (siehe Tabellen IV.4 und IV.5).

Die Effekte des Wirkstoffes auf die Sekundärmetaboliten der Organismen wie auch die Interaktionen von Wirt und Pathogen wurden mit diesen Modellen nicht erfasst. Dennoch zeigt sich auch für IQ-238, dass die Methode der metabolischen Netzwerkanalyse ein geeignetes Mittel ist, um die Wirkeffekte von Xenobiotika unter Nutzung der limitierten Information der Genexpressiondaten für das ganze metabolische Netzwerk aufzuspüren

V. Wirkungen von Methylenblau auf *P. falciparum*

1. Motivation und untersuchter Organismus

Nicht nur der Kampf gegen resistenzbildende Bakterien erschwert sich durch multiresistente Stämme immer mehr, auch andere Krankheitserreger treten vermehrt in einer gegen einen oder mehrere Wirkstoffe resistenten Form auf. Ende der 80er Jahre des 19. Jahrhunderts wurden vermehrt gegen Chloroquin resistente Stämme von *P. falciparum* entdeckt.^[85, 86] Chloroquin galt bis dahin als das sicherste, effektivste und vor allem das erschwinglichste Medikament für die am meisten von der Malaria betroffenen Länder Afrikas.^[87] Malaria verursachte 600 Millionen bestätigte Infektionen allein im Jahr 2010. Durch wirtschaftliche Instabilität in den betroffenen Ländern, und dadurch bedingt schlechter medizinischer Versorgung, verursachte Malaria zudem 1 Million Tote – die meisten davon waren Kinder. Diese kritische Situation zeigt auf, dass dringend neue Wege benötigt werden, um Malaria in den davon betroffenen Ländern zu bekämpfen.^[88, 89]

Die Ausbreitung von Chloroquinresistenzen in Malaria führte dazu, dass viele Länder von der Verwendung dieses Wirkstoffs absahen und stattdessen Sulfadoxin-Pyrimethamin einsetzten. Als Antwort auf die sich schnell ausbreitenden Resistenzen – auch gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin – schlägt die WHO vor Kombinationstherapien zur Bekämpfung der Malaria einzusetzen.^[90] Hierbei sollen nicht nur Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin als Kombinate verwendet werden, sondern auch Kombinationen dieser beiden Wirkstoffe mit teuren Artemisininderivaten.

Derartige Kombinationstherapien stellen heute den Standard in der Behandlung von Malariainfektionen dar,^[91, 92, 93] auch wenn diese Behandlung weitaus teurer ist als eine Chloroquinmonotherapie und auch hier bereits erste Fälle von Resistenzen aufgetreten sind.^[94, 95, 96] Zusätzlich sind Artemisininderivate für die ärmere Landbevölkerung, welche am häufigsten von Malaria betroffen ist, mit Kosten von 5 USD pro Fall verbunden. Diese für Europäer geringfügigen Kosten sind dort nicht bezahlbar.^[88, 89, 97, 98, 99]

Effektive und vor allem billige Therapien werden dringend benötigt. Ein vielversprechender Kandidat, der diese Kriterien erfüllt, ist Methylenblau.

Methylenblau ist eine sehr vielfältige Substanz. In der Geologie wird es zur Bestimmung des Smektitgehalts von Tonmineralien eingesetzt, ^[100] in der Chemie z.B. zur Bestimmung der anionischen Tenside im Leitungswasser nach Longwell-Manience.^[101] In Vergessenheit geraten ist jedoch, dass Methylenblau als erster synthetischer Wirkstoff auch gegen Malaria Verwendung fand:^[102] als Scheinsubstrat bindet es an die Glutathionreduktase von *P. falciparum*. Dadurch wird in der Nahrungsvakuole des Malariaparasiten die Polymerisierung von Hämoglobin – welches in Patienten zur Methämoglobinämie führt – effektiv verhindert.^[103, 104] In verschiedenen Studien, welchem zum großen Teil lokal in Burkina Faso durchgeführt wurden, konnte bereits gezeigt werden, dass sich Methylenblau zum Einsatz in Kombinationstherapien eignet.^[105, 106, 107, 108] Zudem ist es billig, temperaturstabil und dadurch für den Einsatz in Afrika geeignet – wenn sich die Kombinationstherapie mit diesem Stoff als wirksam erweist.

Zur Untersuchung der Wirkmechanismen von Methylenblau in Kombination mit Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin erfolgte zunächst die Erstellung des Energie- und Redoxstoffwechsels mit YANA-Modellen. Diese wurden danach wiederum mit Genexpressionsdaten kombiniert, um daraus die Wirkungen der Kombinationstherapien auf verschiedene Resistenzvarianten von Malaria zu untersuchen.

2. Stoffwechselmodellierung

Die Stoffwechselmodellierung für *P. falciparum* 3D7 wurde in enger Zusammenarbeit mit Janina Zirkel erstellt. Eine Besonderheit hierbei stellten die Glutaredoxinreduktase und die Thioredoxinreduktase dar, welche in der Lage sind, mehrere Reaktionen zu katalysieren. Dementsprechend wurden diese jeweils einzeln für sich modelliert und nummeriert; Abkürzungen „Glutaredoxin 1 bis 6“ und „Thioredoxin 1“ sowie „Thioredoxin 2“. Die katalysierten Reaktionen können im Detail in den Tabellen S VI.3.1 bis S VI.3.12 im Anhang eingesehen werden.

Für *P. falciparum* 3D7 wurden die Stoffwechselwege des Energiemetabolismus, des Redoxstoffwechsels und des Hämoglobinabbaus in YANASquare implementiert. Dies ermöglicht eine detaillierte Analyse der Wirkungen von verschiedenen Malariamedikamenten wie auch die Analyse der Resistenzmechanismen von *P. falciparum* gegen diese. Folgende Resistenzmechanismen können mit diesem YANASquare-Modell dargestellt werden:

- Resistenz gegen Chloroquin
- Resistenz gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin
- Multiresistenz gegen Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin

2.1 Modellierung des chloroquinresistenten Stammes

Chloroquin wirkt störend auf die Entgiftung des Hämozins, einem toxischen Nebenprodukt des Hämoglobinabbaus, in der Nahrungsvakuole des Parasiten ein. Hierbei geht Chloroquin eine Bindung mit Hämozoin ein, dieses kann durch die Hämsynthese nicht weiter in Protoporphyrin IX eingebaut werden und führt zur Vergiftung des Parasiten. Gegen Chloroquin haben sich zwei verschiedene Resistenzmechanismen gebildet. Zum einen über den Transporter PfCRT und zum anderen über ein säugetierorthologes P-Glykoprotein, das PfMDR1.

- Der Transporter PfCRT, codiert durch das korrespondierende Gen *pfcr*t und ermöglicht dem Parasiten eine Resistenz gegen Chloroquin.^[109, 110] Im Gen selbst treten *in vivo* und *in vitro* multiple Polymorphismen auf, die essentielle Mutation ist jedoch der Austausch eines Lysins mit einem Threonin an Position 76 der Gensequenz.^[111, 112, 113, 114] Eine weitere Studie konnte auch nachweisen, dass PfCRT *in vitro* die Anfälligkeit des Malariaerregers gegen Chinin, Amodiaquin, Halofantrin und Artemisinin negativ beeinflusst.^[115]
- Der zweite Resistenzmechanismus wird über ein Ortholog zum P-Glykoprotein von Säugetieren, welches dort in Krebszellen eine Resistenz gegen Verapamil auslöst, gebildet. Dieses *pfmdr1*-Gen codiert im Plasmodium für einen Transporter der ATP-Bindekasette und ist als solcher in der Verdauungsvakuole lokalisiert.^[116] Punktmutationen auf dem Gen für PfMDR1 können dabei auch das Spektrum der Resistenzen, welche durch dieses Protein gewährt werden, erweitern. So wurde unter anderem nachgewiesen, dass dieses Protein zusätzlich Resistenzen gegen Mefloquin, Halofantrin, Chinin und Artemisinin vermittelt.^[117] Eine Studie von Rohrbach et al.^[118] lieferte erste Hinweise darauf, wie dieses Protein diese Resistenzen hervorruft: Gelöste Stoffe werden aus der Nahrungsvakuole in die Verdauungsvakuole transportiert. Betrifft dieser Transport Malariamedikamente, so greifen deren Wirkmechanismen nicht mehr gegen *P. falciparum*. Eine Erhöhung der Anzahl der Genkopien in der DNA des Parasiten verstärkt diesen Effekt.

2.2 Modellierung des Stammes mit Resistenz gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin

Der Kombinationswirkstoff Sulfadoxin-Pyrimethamin repräsentiert eine sogenannte Antifolatmedikation. Dieses Kombinationspräparat unterbricht die Folatsynthese, indem es zwei Proteine des – für den Parasiten wichtigen – Folatstoffwechsels in ihren Aktivitäten negativ beeinflusst: Pyrimethamin inhibiert die Dihydrofolatreduktase (DHFR), während Sulfadoxin die Dihydropteroatsynthase (DHPS) hemmt.^[119]

Resistenzen gegen diese Wirkstoffe werden durch Punktmutationen auf den Genen für DHFR und DHPS, welche zu einer Veränderung der Affinitäten von Protein und Wirkstoff führen, erworben.^[120]

2.3 Modellierung der Multiresistenz gegen Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin

Malaria erlangt eine Multiresistenz durch eine Kombination aus Resistenzen, welche durch PfCRT/PfMDR1, respektive DHPS/DHFS, vermittelt werden. Dieser Erreger ist somit gegenüber Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin unempfindlich.

2.4 Die verschiedenen Resistenzmechanismen im metabolischen Netzwerkmodell

Bedingt durch die unterschiedlichen Resistenzen ergeben sich verschiedene Implementierungen für die Enzymaktivitäten zur Berechnung der extremen Moden mit R. Diese können auf drei Szenarien aufgeteilt werden.

- i. Über PfCRT und PfMDR1 vermittelten Resistenzen gegen Chloroquin wurden im YANAsquare-Modell derart implementiert, dass die Hämsynthese auch Komplexe von Hämozoin/Chloroquin verarbeiten kann. Dies hat zur Folge, dass Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert und anschließend in Protoporphyrin eingebaut wird.

Dadurch wird bei den Berechnungen der extremen Moden mit R in einem resistenten Stamm die Aktivität der Hämsynthese bei simulierter Anwesenheit von Chloroquin nicht reduziert. In einem sensitiven Stamm reduziert Chloroquin die Aktivität der entsprechenden Enzyme.

- ii. Die Implementierung der Resistenzen, welche durch Mutationen der Gene für DHPS und DHFS auftreten, wurden in den YANAsquare-Modellen analog durchgeführt:

Unter Anwesenheit von Sulfadoxin-Pyrimethamin sind die Aktivitäten der DHPS und DHFS in einem resistenten Stamm nicht reduziert, während sie in einem sensitiven Stamm dementsprechend reduziert werden, um die extremen Moden mit R zu berechnen.

- iii. Ein multiresistenter Stamm erhält demzufolge folgende Charakteristika bei der Berechnung der extremen Moden mit R:

Unter Anwesenheit von Sulfadoxin-Pyrimethamin und Chloroquin arbeiten die eigentlich von den Wirkstoffen betroffenen Enzyme ohne Aktivitätsverlust.

2.5 Implementation der Genexpressionsdaten

Nach erfolgter Modellierung der Stoffwechselwege von *P. falciparum* mittels YANASquare, erfolgte zunächst die Exportierung der Enzymaktivitätsliste direkt aus dem Modell (vgl. II.2.3). Diese Liste wurde im Anschluss daran auf die Berechnung der extremen Moden mit R vorbereitet, indem die Expression der Gene für die dort enthaltenen Enzyme nach Vorgaben von Bozdech et al.^[121] aus PlasmoDB^[122] übernommen wurden.

Die Implementation der Resistenzen erfolgte, wie unter V.2.4. Beschrieben, dadurch, dass die Aktivitäten der von den Wirkstoffen betroffenen Enzyme bei Resistenz direkt aus den Genexpressionsdaten übernommen wurden. Bei sensitiven Stämmen reduzieren sich die Aktivitäten der betroffenen Enzyme – je nach Szenario (vgl. Kapitel V.2.4) – auf Null.

Zur Modellierung der Effekte von Methylenblau auf resistente und sensitive Malariastämme wurden die im vorhergehenden Schritt erstellten Enzymaktivitäten nochmals angepasst. Die RT-PCR ergab für die Thioredoxinreduktase, die Glutathionreduktase, die Glyoxalasen I&II, die Laktatdehydrogenase, das 1-Cys-Peroxiredoxin, das Glutaredoxin, die Glutamate-Cystein-Ligase, die vom Thioredoxin abhängige Peroxidase 1, sowie für das dem Glutaredoxin ähnlichen Protein 1 veränderte Genexpressionen nach Zugabe von Methylenblau. Dementsprechend erfolgte die Umstellung der Aktivitäten dieser Enzyme: von den Daten von PlasmoDB auf die gemessenen Werte. Dadurch konnte ein akkurates Abbild der durch Methylenblau verursachten Veränderungen im Stoffwechsel *in silico* erstellt werden.

Die vollständigen Listen der Enzyme zum Aufbau der Modelle wie auch deren Aktivitäten zur Berechnung der extremen Moden sind, für alle vorgestellten Szenarien im Anhang in der Tabelle S VI.3.1 aufgeführt.

3. Ergebnisse der metabolischen Netzwerkanalyse

Bedingt durch die unterschiedlichen Resistenzen, modellierte Effekte der verschiedenen Malariamedikamente, und durch die Unterscheidung, ob zusätzlich noch die Effekte von Methylenblau (MB) in die Modelle mit eingehen sollen, muss die Auswertung der *in silico* Berechnungen gemäß den angefertigten Szenarien aufgeteilt werden.

1: ohne MB 2: mit MB	Szenarien der Resistenzen			
	#1	#2	#3	#4
1: Resistenzen:	Keine, Wildtyp	Sulfadoxinresistent	Chloroquinresistent	Multiresistent
1: Zugabe von:	-	Chloroquin	Sulfadoxin- Pyrimethamin	Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin
2: Resistenzen:	Keine, Wildtyp	Sulfadoxinresistent	Chloroquinresistent	Multiresistent
2: Zugabe von:	MB	Chloroquin und MB	Sulfadoxin- Pyrimethamin und MB	Chloroquin, Sulfadoxin- Pyrimethamin und MB

Tabelle V.1 Aufteilung der Ergebnisse gemäß der verschiedenen berechneten Szenarien.

Die Auswertung der metabolischen Netzwerkanalyse erfolgte durch direkten Vergleich der Enzymaktivitäten der verschiedenen Szenarien. Hierfür wurden die extremen Moden und die Enzymaktivitäten der metabolischen Netzwerkmodelle für den Wildtyp ohne simulierte Zugabe von Wirkstoffen berechnet und als Referenz für die Veränderungen, welche durch die verschiedenen Substanzen im Parasiten hervorgerufen werden, herangezogen.

Die Auswertung der einzelnen Szenarien erfolgte folgendermaßen:

1. Vergleich zwischen einem Wildtypstamm ohne Resistenzen, welchem *in silico* zunächst kein und in einer weiteren Simulation dann Methylenblau verabreicht wird.
2. Stamm resistent gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin: *in silico* Analyse der Effekte der Monotherapien mit Chloroquin und Methylenblau sowie einer Kombinationstherapie von Chloroquin mit Methylenblau.
3. Chloroquinresistenter Stamm: *in silico* Analyse der Effekte der Monotherapien mit Sulfadoxin-Pyrimethamin und Methylenblau sowie einer Kombinationstherapie mit Sulfadoxin-Pyrimethamin und Methylenblau.
4. Ein multiresistenter Stamm: *in silico* Analyse der Effekte beider Medikamente, einer Monotherapie mit Methylenblau sowie einer Kombinationstherapie aus Chloroquin, Sulfadoxin-Pyrimethamin mit Methylenblau.

Zunächst sollen nun die Ergebnisse der Modellierung mit Methylenblau als einzigem Wirkstoff gegen einen Wildtypparasiten zusammengefasst werden, im Anschluss daran die Ergebnisse der verschiedenen Mono- und Kombinationstherapien gegen die resistenten Stämme von *P. falciparum*.

3.1 Modellierung des Wildtyps als Referenz für alle anderen Modelle

Nach Implementierung des Stoffwechselnetzes wurde der Normalzustand des Netzwerkes anhand der Genexpressionsdaten von PlasmoDB modelliert. Die folgende Abbildung zeigt das implementierte Stoffwechselnetzwerk. Dieses Netzwerk zeigt jedoch nur, welche Stoffwechselreaktionen möglich sind, und nicht welche Reaktionen in welchem Maße sie ablaufen. Die Daten sind im Anhang (Tabelle S VI.3.2) aufgelistet und dienen als Fixpunkt zum Vergleich der Szenarien mit simulierter Zugabe der oben aufgeführten Substanzen gegen *P. falciparum*.

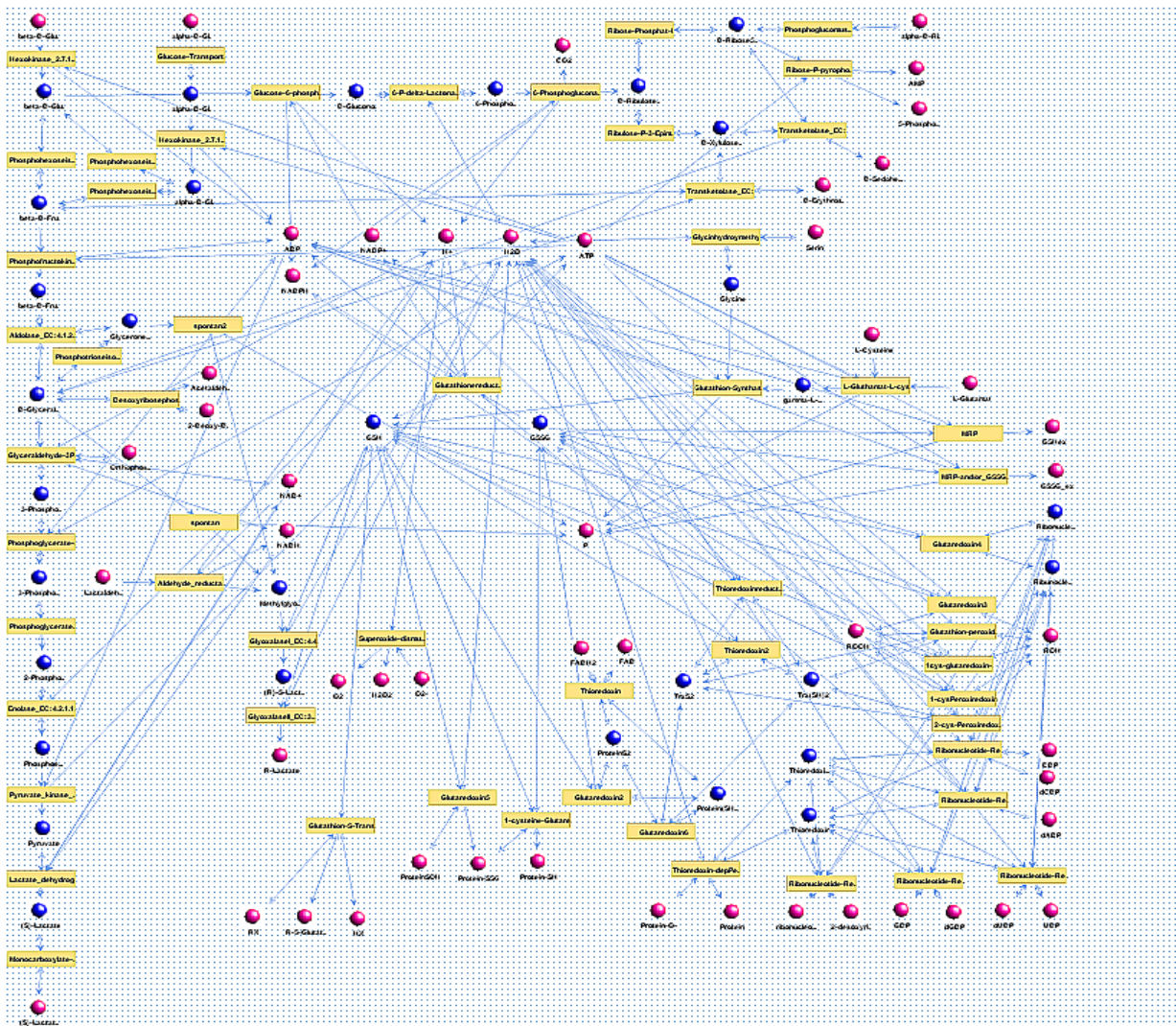


Abbildung V.1 Implementiertes Stoffwechselnetz von *P. falciparum*. Die Enzymnamen sind in den gelben Boxen abgekürzt dargestellt. Der Name der Metabolite (ein Produkt oder ein Substrat einer Enzymreaktion) ist in schwarz unter den Kugelsymbolen annotiert. Externe Metaboliten sind mit den pinken Kugelsymbolen angezeigt. Ein externer Metabolit wird entweder als Substrat aus der Umwelt aufgenommen oder stellt ein Endprodukt eines Stoffwechsels dar. Die internen Metabolite sind mit den blauen Kugelsymbolen gekennzeichnet: Diese müssen der „steady-state“-Beschränkung genügen. D.h., es muss genau so viel interner Metabolit hergestellt werden, wie in der nachfolgenden Reaktion verbraucht wird. Die Stoffwechselreaktionen (blaue Pfeile zwischen den Metaboliten und den Enzymen) sind als gleich aktiv dargestellt und zeigen somit nur, welche Stoffwechselwege theoretisch möglich sind. Zu diesem Zeitpunkt sind noch keine Transkriptionsdaten oder experimentelle mRNA-Expressionsdaten enthalten.

Die Modelle für den Wildtypstamm ohne zugesetzten Wirkstoff wurden für die Simulation der Effekte von Methyleneblau nach den Daten der PCR-Analyse (siehe Kapitel V.2.2) abgeändert. Hierbei fanden die Genexpressionsdaten, welche 12 Stunden nach Zugabe von Methyleneblau gemessen wurden und sich vom Wildtyp ohne zugesetztes Methyleneblau deutlich unterschieden, wieder als sogenannte „constraints“ für die Berechnung der Enzymaktivitäten mit R Verwendung.

Nach Aufnahme dieser constraints in die Modellierung, ergaben sich für die extremen Moden – und damit auch für die Enzymaktivitäten – zum Teil starke Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Diese können auf zweierlei Arten dargestellt werden. Zum einen direkt über die Netzwerkansicht in YANASquare, zum anderen über den Export der einzelnen Enzymaktivitäten und deren genaue Analyse in Tabellenkalkulationsprogrammen.

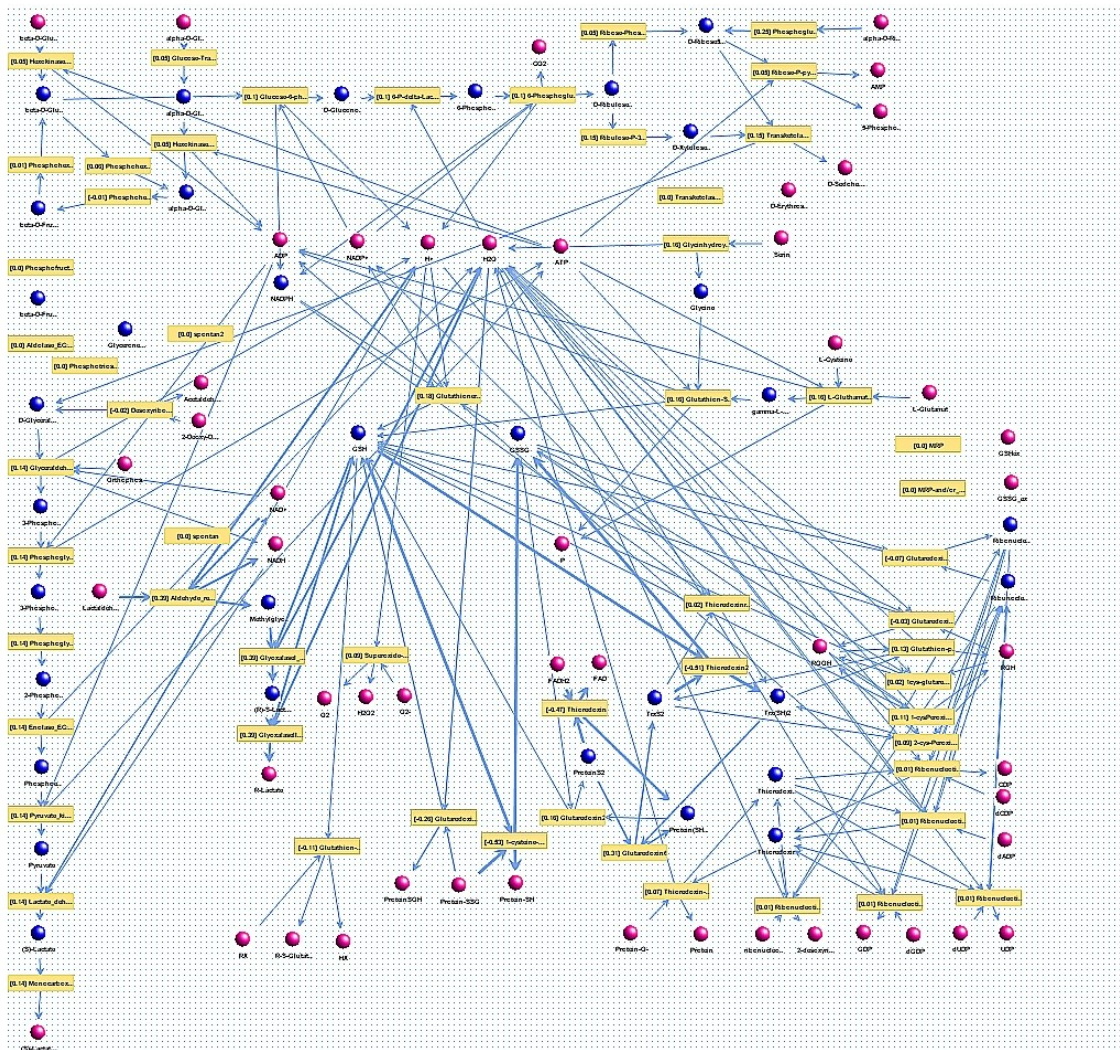


Abbildung V.2 Stoffwechselnetz von *P. falciparum* mit implementierten Genexpressionsdaten der RT-PCR. Externe Metaboliten sind wieder mit pinken, interne Metaboliten mit blauen Kugelsymbolen dargestellt, Enzyme werden mit gelben Boxen symbolisiert. Die Stoffwechselreaktionen sind in ihrer relativen Stärke zueinander mit den hier sichtbaren, unterschiedlich dicken, Pfeilen abgebildet.

25 Stunden nach Eindringen in den menschlichen Erythrozyten – das Entwicklungsstadium des Parasiten ist zu diesem Zeitpunkt der rasant wachsende Trophozoit – sind ohne Methylenblau starke (> 0,15 Einheiten) Stoffwechselflüsse in folgenden Moden zu beobachten: Proteinschutz (Moden 2, 3, 6, 7, 11 und 35), Herstellung

von Ketozuckern (Moden 18 und 23) wie auch in der Laktatproduktion (Mode 26). Daraus kann gefolgert werden, dass diese Stoffwechselwege eine große Rolle für das Wachstum des Parasiten in der Wirtszelle spielen.

In den *in silico* Versuchen mit Methylenblau zeigte sich, dass alle Enzyme, welche an den oben genannten Stoffwechselwegen beteiligt sind, in ihren Aktivitäten eingeschränkt wurden. 12 Stunden nach Gabe von Methylenblau sind die Proteinschutzmode 22 und die Laktatproduktion um mehr als 4 % weniger aktiv. Die stärksten Reduktionen – um mehr als 10 % – treten in den Proteinschutzmoden 3, 6, 7 und 11 (nutzen Thioredoxin und/oder Glutaredoxin) auf. Die Ribose-Phosphat-Produktion für den Nukleotidmetabolismus ist in den am stärksten betroffenen Moden um 17 % weniger aktiv, die Produktion von Ketozuckern ist dagegen nicht beeinflusst.

Diese breitgefächerten Effekte decken sich mit klinischen Befunden aus Afrika, in denen bei 95 % der unter Malaria leidenden Kindern nach einer Behandlung mit Methylenblau eine Verbesserung des parasitologischen Befundes eintrat.^[123]

Für die Erstellung der Genexpressionsdaten wurde eine Dosis von 15 nM verwendet, welche nach einer Inkubationszeit von 12 Stunden nicht lethal ist. Zur Behandlung der Malaria sollte jedoch eine höhere Konzentration (20 nM) Methylenblau in Betracht gezogen werden, da hier die vollständige Remission das Therapieziel sein muss.

3.2 Modellierung der Resistenz gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin

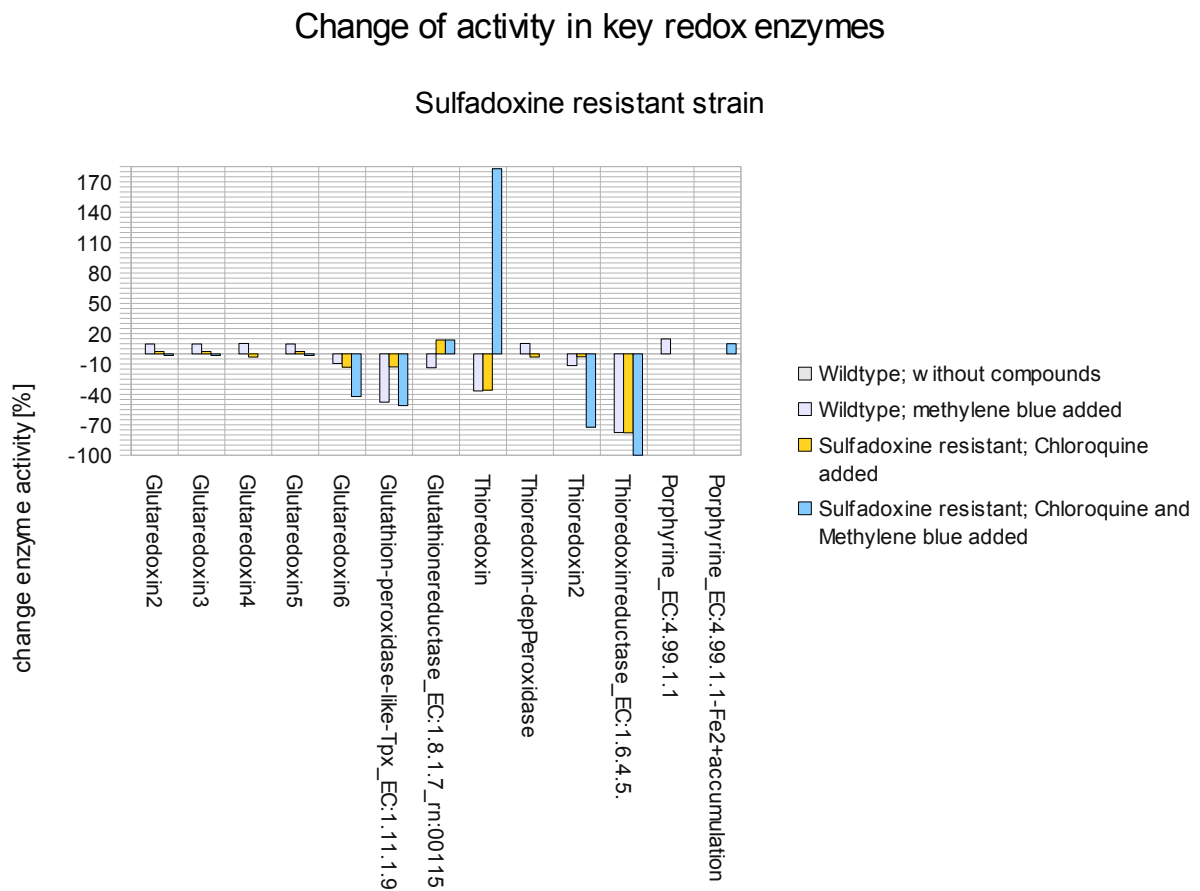


Abbildung V.3 Aktivitätsveränderungen der Schlüsselenzyme des Redoxstoffwechsels eines gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin resistenten Stammes. Hier dargestellt sind: Nulllinie (weiß, nicht sichtbar) – Wildtyp ohne MB; grauer Balken: Wildtyp mit zugesetztem MB; gelber Balken: resistent gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin → Chloroquin zugesetzt; blauer Balken: resistent gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin → Chloroquin und MB zugesetzt. Durch eine detailgetreue Modellierung *in silico* kann auch die Akkumulation von Fe^{2+} durch Chloroquin berechnet werden: dargestellt durch die beiden rechten Balken in der Abbildung.

Eine Chloroquinmonotherapie bewirkt in einem gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin resistenten Stamm eine Aktivitätserhöhung der Glutathionreduktase um 15 %, was durch einen den Versuch des Erregers die Wirkungen von Chloroquin zu kompensieren zu erklären ist. Gleichzeitig verringerten sich die Enzymaktivitäten des Glutaredoxin 6 und der glutathionähnlichen Thiolperoxidase (TPX) um mindestens 10 %. Die stärksten Veränderungen sind jedoch bei Thioredoxin (Verringerung um 30 %) und bei der Thioredoxinreduktase (Verringerung um 70%) zu beobachten.

Für die beiden zuletzt genannten Enzyme ist der Effekt sehr ähnlich, wenn nur Methylenblau und kein Chloroquin zugesetzt wird. Werden jedoch die Wirkstoffe Chloroquin und Methylenblau kombiniert, so tritt eine Wirkverstärkung ein: Die Thioredoxinreduktase wird vollständig inhibiert. Das Thioredoxin ist ebenfalls beeinflusst: Die Reaktionsrichtung ändert sich während sich die Aktivität gleichzeitig verdoppelt.

Auch die Aktivität des Glutaredoxin 6 verringert sich signifikant: Aus einer Verringerung von ~30 % während der Monotherapien, ergibt sich für die Kombinationstherapie eine um ~50 % geringere Aktivität. Diese Effekte könnten auf den kompletten Funktionsverlust der Thioredoxinreduktase zurückzuführen sein. Auch Thioredoxin 2 weist einen ähnlich starken Einbruch in der Aktivität auf: Nach Gabe der Kombinationstherapie ist sie um 70 % reduziert. TPX verringert die Aktivität jedoch nur geringfügig: ~10 % geringer als im Vergleich zu einer Kontrolle.

Zusammengefasst zeigt die metabolische Netzwerkanalyse, dass die Proteine des Redoxstoffwechsels – hier besonders die Proteine zum Schutz vor oxidativem Stress – sehr aktiv sind. Die Hämsynthese entgiftet bei zugesetztem Methylenblau Hämозoin in verstärktem Maße, bei zugesetztem Chloroquin in gleichem Maße wie unter Kontrollbedingungen ohne Wirkstoff. Gleichzeitig erweist sich *in silico* die Kombinationstherapie von Methylenblau und Chloroquin hier als die effektivste: Unter diesen Bedingungen akkumuliert das für den Parasiten toxische Hämозoin, während selbst bei Chloroquin noch keine signifikant erhöhte Akkumulation zu berechnen war.

3.3 Modellierung der Resistenz gegen Chloroquin

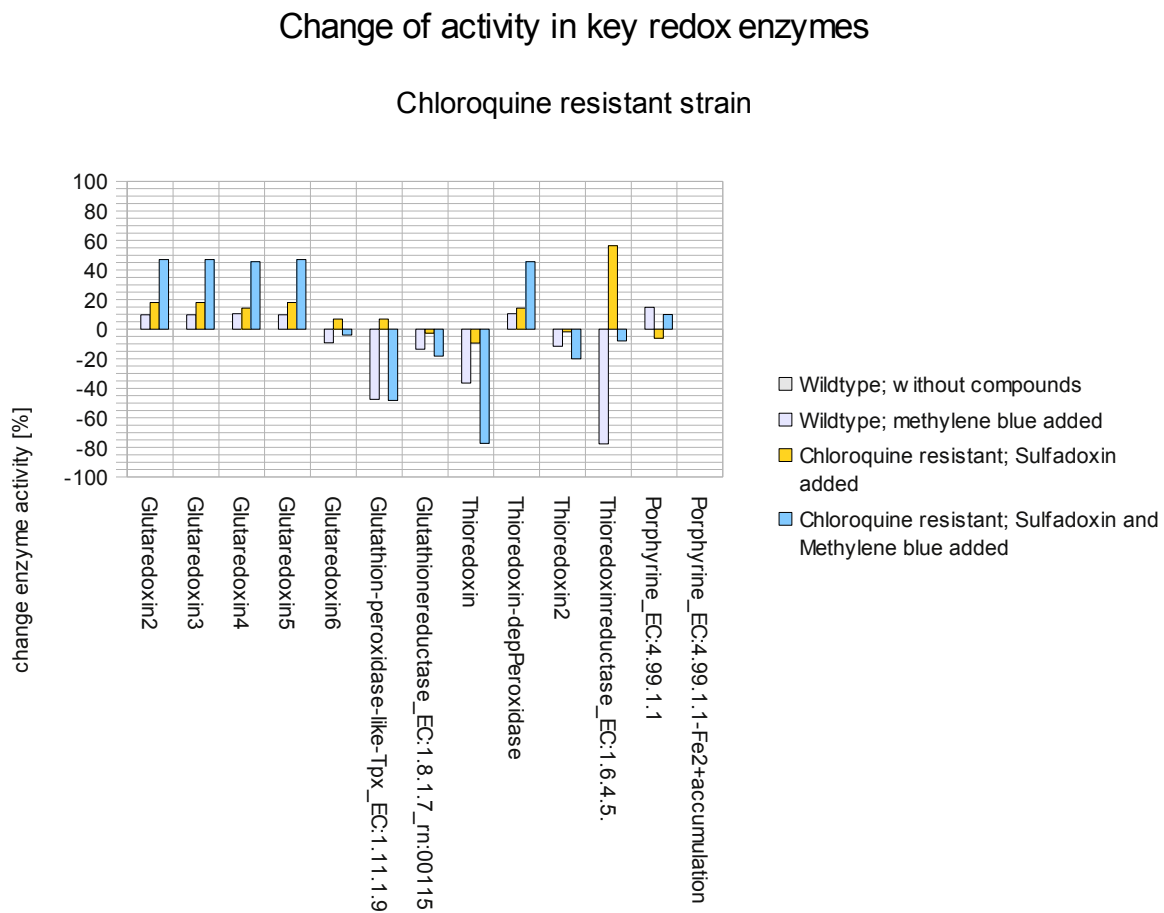


Abbildung V.4 Aktivitätsveränderungen der Schlüsselenzyme des Redoxstoffwechsels eines gegen Chloroquin resistenten Stammes. Hier dargestellt sind: Nulllinie (weiß, nicht sichtbar) – Wildtyp ohne MB; grauer Balken: Wildtyp mit zugesetztem MB; gelber Balken: chloroquinresistent → Effekte von Sulfadoxin-Pyrimethamin modelliert; blauer Balken: chloroquinresistent → Effekte von Sulfadoxin-Pyrimethamin und MB modelliert. Durch eine detailgetreue Modellierung *in silico* können auch in diesem Modell die Aktivitäten der Hämозoinentgiftung und Hämозoinakkumulation berechnet werden, welche wiederum durch die beiden rechten Balken in der Grafik dargestellt werden.

Durch Mapping der Effekte von Sulfadoxin-Pyrimethamin auf einen chloroquinresistenten Stamm steigern sich die Aktivitäten in den Glutaredoxinreaktionen 2, 3, 4 und 5 sowie der thioredoxinabhängigen Peroxidase um 15 bis 18 %. Die Aktivitäten der Glutaredoxinreaktion 6 und der TPX steigern sich dagegen nur marginal (um ~7 %), während die Thioredoxinreduktase eine Aktivitätssteigerung von 55 % aufweist.

Dagegen sind nach der *in silico* Gabe von Sulfadoxin-Pyrimethamin für Thioredoxin 1 und 2, die Glutathionreduktase und die Hämsynthese Aktivitätsverringierungen von ~10 % zu beobachten.

Wird zusätzlich Methylenblau verabreicht, so verstärken sich die Effekte auf Glutaredoxin 2 bis 5, die thiolabhängige Peroxidase, die Glutathionreduktase sowie auf Thioredoxin 1 und 2 signifikant: Die Aktivitäten von Glutaredoxin 2 bis 5 wie auch der thiolabhängigen Reduktase erhöhen sich um weitere 30 %, während die Aktivitäten des Thioredoxin 2 und der Glutathionreduktase auf ~20 % weniger als im Vergleich zur Kontrolle verringern. Beide weisen zudem unter Monotherapie mit Sulfadoxin-Pyrimethamin eine weniger starke Aktivitätsverringierung auf als bei einer Monotherapie mit Methylenblau oder einer Kombinationstherapie mit Sulfadoxin-Pyrimethamin und Methylenblau. Der gleiche Effekt kann, wenn auch in viel stärkerer Ausprägung, für Thioredoxin 1 berechnet werden: Dessen Aktivität verringert sich bei einer Kombinationstherapie um ~80 %. Die Aktivitäten von TPX und Thioredoxinreduktase verringern sich um 8 % im Vergleich zu Kontrolle.

3.4 Modellierung eines multiresistenten Stammes

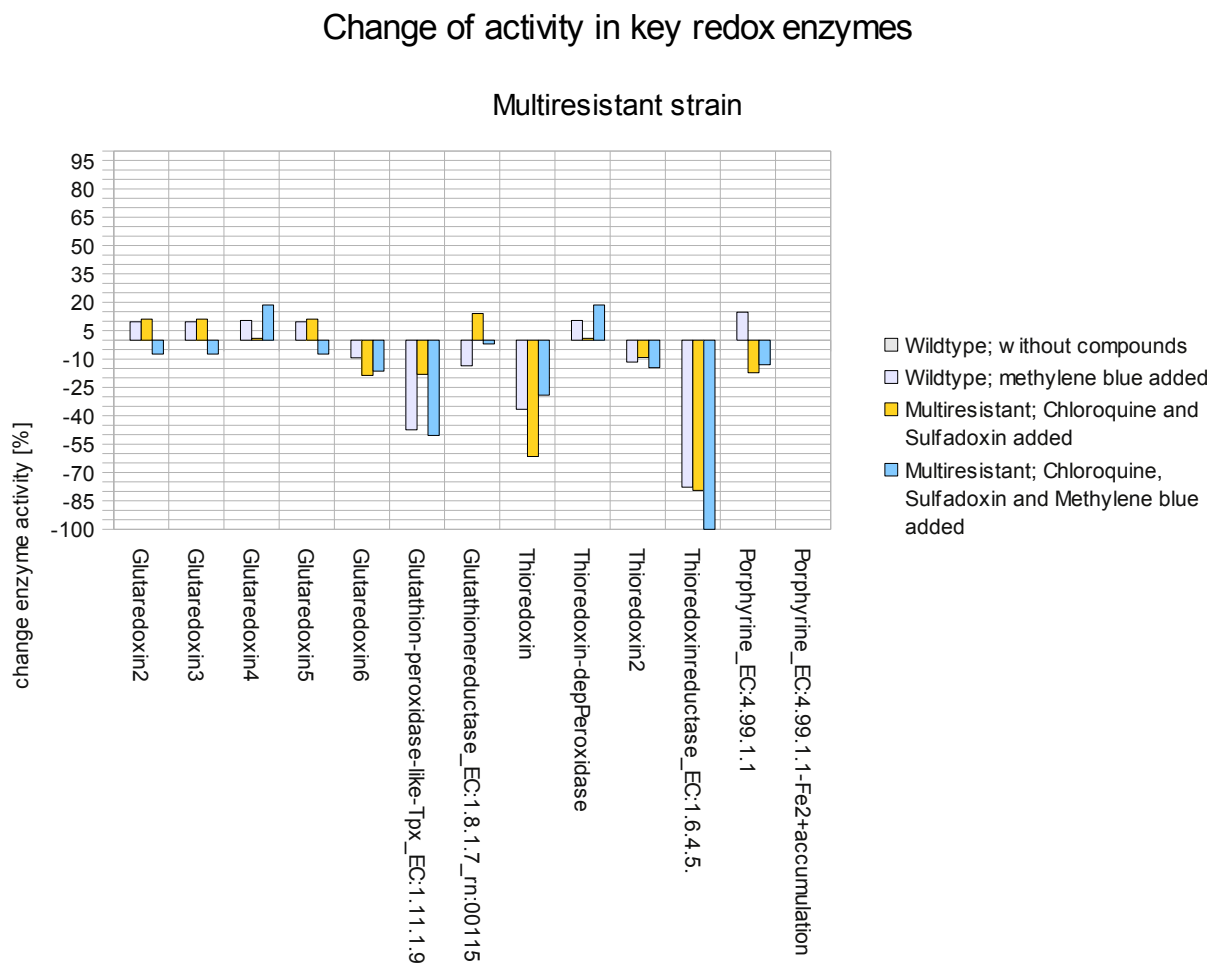


Abbildung V.5 Aktivitätsveränderungen der Schlüsselenzyme des Redoxstoffwechsels eines multiresistenten Stammes. Hier dargestellt sind: Nulllinie (weiß, nicht sichtbar): Wildtyp ohne MB; grauer Balken: Wildtyp mit zugesetztem MB; gelber Balken: multiresistent → Sulfadoxin-Pyrimethamin und Chloroquin zugesetzt; blauer Balken: multiresistent → Sulfadoxin-Pyrimethamin, Chloroquin und MB in einer Dreifachkombination zugesetzt. Durch eine detailgetreue Modellierung *in silico* können auch in diesem Modell die Aktivitäten der Hämzoinentgiftung und Hämzoinakkumulation berechnet werden, welche wiederum durch die beiden rechten Balken in der Grafik dargestellt werden.

Im Fall eines multiresistenten Stammes erfolgt zunächst das Mapping der Effekte von Sulfadoxin-Pyrimethamin und Chloroquin auf das Modell. Dadurch ergeben sich folgende Veränderungen in den Enzymaktivitäten.

Die Glutaredoxinreaktionen 2, 3 und 5 sind um 10 % und die Glutathionreduktase ist um 15 % weniger aktiv als im Stamm ohne aufmodellerte Medikamenteneffekte. Die Hämsynthese, TPX und Glutaredoxin 6 sind um 17 % weniger aktiv, während für

Thioredoxin 2 nur eine Reduktion von 9 % errechnet wurde. Die Aktivität von Thioredoxin 1 ist jedoch um 61 % verringert, die der Thioredoxinreduktase um 80 %.

Fließen nun zusätzlich die Effekte von Methylenblau in die Berechnungen mit ein, so verändern sich *in silico* die Enzymaktivitäten stark: Die Thioredoxinreduktase weist keine Aktivität mehr auf, die Hämsynthese nur noch eine um 14 % geringere Aktivität. Die Enzymaktivitäten der thioxinabhängigen Peroxidase wie auch der Glutaredoxin Reaktion 4 erhöhen ihre Aktivitäten um 18 %. Eine Änderung der Richtungen treten bei den Glutaredoxinreaktionen 2, 3, 5 und 6, bei TPX wie auch bei Thioredoxin 1 und 2 auf. Dies weist auf einen sehr starken Effekt dieser Kombination auf den Parasitenstoffwechsel hin.

4. Charakterisierung der modellierten Effekte auf *P. falciparum* 3D7

Trotz mehrfachen Malariainfektionen kann der menschliche Körper keine vollständige Immunität gegen diesen Parasiten aufbauen, da dieser vielfältige Wege entwickelt hat das Immunsystem des Körpers zu unterwandern.^[124] Für Kinder ist diese Krankheit lebensbedrohlich und der Hauptgrund für eine Sterblichkeitsrate von 0,35 % pro Jahr in den betroffenen Regionen.^[125, 126] Da noch kein Impfstoff gegen Malaria zur Verfügung steht^[127] ist eine lokale Ausrottungsstrategie, um die Gametozyten aus dem Malariaentwicklungszyklus zu entfernen,^[128] wahrscheinlich der beste Weg um diese Krankheit unter Kontrolle zu bringen.

Als eines der ältesten Medikamente gegen Malaria, wurde Methylenblau schon vor über 100 Jahren sogar bei Kindern erfolgreich eingesetzt.^[129] Nachdem neuere und zunächst wirksamere Medikamente entwickelt wurden – wie das Chloroquin –, verschwand Methylenblau aus der Malariatherapie. Da Methylenblau lange benötigt um einen parasitiziden Effekt zu erreichen, sollte es mit einem schneller wirkenden Medikament kombiniert werden um den maximalen Effekt zu erzielen. In einer erst kürzlich erstellten Studie zeigte Methylenblau zudem einen sehr starken gametoziden Effekt in *P. falciparum*.

[130]

Im Rahmen dieser Dissertation konnte durch die Kombination von metabolischer Modellierung und Daten aus RT-PCR gezeigt werden, dass Methylenblau – ähnlich wie die 4-Amino-Chinolone^[131, 132] – die Polymerisierung von Häm zu Hämozoin verhindern kann und darüber hinaus das Potential hat, Chloroquinresistenzen zu durchbrechen.

Die Ergebnisse dieser *in silico* Modellierung lassen darauf schließen, dass Methylenblau eine mannigfaltige Wirkung auf *P. falciparum* ausübt: Methylenblau behindert die Generierung von Ketozuckern, schränkt die Glykolyse in ihrer Funktionalität ein und verringert die Synthese von Glutathion. Dies führt wiederum dazu, dass der Redoxschutz durch die Glutathionreduktase sinkt, der Proteinschutz durch diverse andere Stoffwechselwege verringert wird und die Entgiftung von Oxoaldehyden einer starken Einschränkung unterliegt.

Die Kombination der Effekte von Methylenblau mit anderen Malariamedikamenten in verschiedenen Resistenzmodellen erwies sich als sehr vorteilhaft: Die breitgestreuten Effekte von Methylenblau auf den Redoxstoffwechsel von *P. falciparum* verringern die Resistenzen der Plasmodien gegen Sulfadoxin-Pyrimethamin und Chloroquin. Selbst multiresistente Stämme zeigen sich nach einer Kombination von Methylenblau, Chloroquin und Sulfadoxin-Pyrimethamin wieder anfällig und könnten so effektiv und ohne großen Aufwand bekämpft werden.

Methylenblau – kombiniert mit anderen Wirkstoffen – sollte auf Grund seiner Eigenschaften als so genanntes „Bonaria“ (leicht zu beschaffen, temperaturstabil, zugelassen und kostengünstig) für die „Second-Line“ Therapie, d.h. wenn Resistenzen gegen das Medikament der ersten Wahl auftreten, eingesetzt werden.

Erste Untersuchungen in Burkina Faso lassen darauf schließen, dass diese *in silico* Ergebnisse den Wirkmechanismen *in vivo* in den Blutstadien des Parasiten entsprechen: Der Redoxstoffwechsel ist negativ beeinflusst und es konnte ein starker Effekt auf die Gametozyten nachgewiesen werden. Zur Absicherung dieser Ergebnisse sollten weitere Untersuchungen in die Effektivität von Methylenblau zur Kombination mit anderen

Wirkstoffen unternommen werden.

Falls sich Methylenblau entgegen aller Erwartungen als nicht effektiv genug erweist, so sollte der Ansatz einen Breitbandwirkstoff gegen den Redoxschutz der Plasmodien mit anderen, gezielter wirkenden Substanzen, zu kombinieren, jedoch auf jeden Fall weiter verfolgt werden, da zur Zeit kein zu 100 % wirksames Einzelmedikament gegen diese Krankheit existiert.^[133]

VI. Diskussion

Die Suche nach neuen Antibiotika gegen resistente Stämme von Staphylokokken erweist sich, bedingt durch ihre alarmierend rasche Ausbreitung, immer dringlicher. Wirkstoffe aus bisher nicht antibiotisch eingesetzten chemischen Substanzklassen sind von besonderem Interesse, da man davon ausgehen kann, dass hier noch keine Resistenzen vorliegen. Gleichzeitig könnte die Identifizierung von diesen neuartigen Wirkstoffen die Entdeckung von Leitsubstanzen gegen multiresistente Pathogene beschleunigen.^[134]

In der hier vorgelegten Arbeit wurden verschiedene Arbeitsmethoden der Bioinformatik, der Mikrobiologie und der Pharmazie miteinander kombiniert um die Wirkmechanismen, d.h. die Wirkungen auf die metabolischen Stoffwechselnetze und nicht die Wirkung auf die Targetstruktur im Zielprotein, der Naphtylisochinoline IQ-143 und IQ-238 auf *S. epidermidis* RP62A, *S. aureus* USA300 und menschlichen Zellen aufzuklären. Diese verschiedenen Ansätze komplettieren sich gegenseitig: Toxizitätsdaten der Xenobiotika sind nur teilweise verfügbar und die Metabolitmessungen decken nur einen Teil der Nukleotide im Organismus ab.

Ging man zu Beginn der Arbeiten mit diesen Stoffen noch davon aus, dass alle Naphtylisochinoline auf Grund der Phenole in ihrem chemischen Aufbau als unspezifisch toxisch einzustufen sind, so stellte sich im Verlauf der hier durchgeführten Analysen heraus, dass beide Wirkstoffe auf sehr unterschiedliche Art sehr spezifisch auf die Stoffwechselnetze der hier untersuchten Organismen einwirken. Durch die intensiven Untersuchungen der chemischen Eigenschaften der Naphtylisochinoline ist es nun möglich, auch allgemeine Aussagen über die Wirksamkeit und Toxizität von diversen Xenobiotika des SFB630 zu treffen.

Die selben Methoden, welche für Naphtylisochinoline und Staphylokokken Verwendung fanden, wurden auf Methylenblau und *P. falciparum* 3D7 übertragen, um die Wirkung von Kombinationspräparaten auf resistente Malariastämme vorherzusagen.

Die Limitierungen der metabolischen Netzwerkanalyse scheinen auf den ersten Blick genaue Aussagen über die verschiedenen Wirkungseffekte unmöglich zu machen:

Tierversuche, welche in der Arbeitsgruppe Ohlsen mit IQ-143 an Mäusen durchgeführt wurden, lassen auf Grund der Reaktionen der Versuchstiere – 5 Minuten nach Injektion unkontrolliertes Zucken und nachfolgender Exitus – auf eine dem Wirkstoff inhärente Neurotoxizität schließen. Diese Effekte auch in den Modellen der metabolischen Netzwerke nachzustellen übersteigt jedoch die Möglichkeiten des Algorithmus: Systemeffekte höherer Ordnung – wie das Nervensystem – können nur sehr schwer oder nicht modelliert werden. Diese, wie auch der Stoffwechsel der Sekundärmetabolite, fanden deshalb keine Beachtung in den Modellen. Daher können in dieser Dissertation weder solche Effekte – vor allem in komplexen Eukaryoten – noch die Auswirkungen auf den Sekundärmetabolitstoffwechsel berechnet werden. Die Aussagefähigkeit der Modelle wird dadurch jedoch nur geringfügig beeinflusst, da die Aufklärung der Wirkung der verschiedenen Wirkstoffe auf den zentralen Stoffwechsel bei Pro- und Eukaryoten davon unabhängig ist.

Die Modelle wurden direkt an die Genexpressionsdaten angepasst. Diese Vorgehensweise beinhaltet, wie in Kapitel II.2.2 beschrieben, inhärente Fehler: Die Veränderungen in der Genexpression geben z.B. keinen Aufschluss darüber, in welchem Umfang die Transkription stattfindet noch welche posttranslationalen Modifikationen auftreten oder in welchem Maße Enzyme allosterisch reguliert werden. Durch die angewandten Methoden und das Einführen möglichst vieler „constraints“ bleibt die Aussagefähigkeit der Modelle gewahrt.

Die direkten Vorteile der Modelle überwiegen jedoch bei weitem die Nachteile. So können die *in vitro* gemessenen Effekte von Naphtylisochinolin (vgl. Kapitel II.5.2) auf die untersuchten Stoffwechselwege *in silico* modelliert und in ihren Netzwerkeffekten detailliert berechnet werden. Durch diese Vorgehensweise können auch die Nebenwirkungen dieser Stoffe auf die Netzwerke berechnet werden.

Die Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation konnten so unter anderem aufzeigen, dass die Naphtylisochinoline IQ-143 und IQ-238 trotz ihrer sehr ähnlichen Struktur zwei deutlich verschiedene Netzwerkeffekte aufweisen.

Wird IQ-143 einer Zellkultur zugesetzt, so wird ein Anstieg in der Konzentration von NADPH bei gleichzeitiger Verringerung der Konzentration von NADH gemessen. Da die beiden hier untersuchten Staphylokokkenspezies NADH als Substrat für die oxidative Phosphorylierung verwenden, ergibt sich ein sehr spezifischer Wirkmechanismus für IQ-143: Der Anstieg der NADPH-Konzentration kann nicht auf direkte Effekte auf die Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase zurückgeführt werden, sondern vielmehr auf indirekte Effekte auf dieses Enzym durch eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts an diesem. Dieses Enzyme katalysiert zwei unterschiedliche Reaktionen: $\text{NAD}^+ \rightarrow \text{NADH}$ und $\text{NADP}^+ \rightarrow \text{NADPH}$. Das Reaktionsgleichgewicht kann sich nur dann zu Gunsten der NADPH-Produktion verschieben, wenn zwei Voraussetzungen erfüllt sind: Das Enzym wird nicht direkt gehemmt und gleichzeitig steht weniger NAD^+ für die Reaktion an diesem Enzym zur Verfügung.

Diese beiden Voraussetzungen sind nur dann erfüllt, wenn NAD^+ an Komplex 1 der oxidativen Phosphorylierung nicht mehr gebildet werden kann. Die gemessene Erhöhung der Konzentration von AMP nach Gabe von IQ-143 bestärkt diese Hypothese: sie lässt darauf schließen, dass der Transport von Elektronen über die Membran der Mitochondrien unterbunden wird. D.h., IQ-143 führt zum Zusammenbruch des chemiosmotischen Potentials und damit zum Erliegen der Atmungskette.

In der Literatur ist seit längerem bekannt, dass aromatische Substanzen mit einem quarternären Stickstoff wie z.B. das Chinolonderivat Dequaliniumchlorid zur Akkumulation in den Mitochondrien tendieren.^[79, 80] Auch quarternäre Isochinolinderivate, wie z.B. das *N*-Methylisochinolin oder das *N*-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisochinolins, gehen Wechselwirkungen mit der Atmungskette der Mitochondrien, besonders dem Komplex 1, ein.^[81, 82]

Da IQ-143 strukturell mit diesen beiden Stoffklassen verwandt ist, ist hier eine Wechselwirkung dieses neuen Wirkstoffes mit der mitochondrialen Atmungskette naheliegend und wird auch durch die *in vitro* und *in silico* Ergebnisse gestützt.

IQ-238 beeinflusst hingegen direkt den Kohlenhydratstoffwechsel der beiden untersuchten Staphylokokkenstämme. Die Genexpressionen der Fruktose-Biphosphatase, der 6-Phosphofruktokinase, der Fruktose-Biphosphat-Aldolase und der Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase sind drei- bis vierfach geringer als in der Kontrollgruppe. Die

metabolische Netzwerkanalyse konnte für diesen Wirkstoff das volle Spektrum der Auswirkungen dieser Veränderungen in den Genexpressionen aufzeigen. Nicht nur Enzyme der Glykolyse, welche direkt in ihrer Genexpression verändert sind, sind davon beeinträchtigt, sondern auch Enzyme, für welche keine Veränderung der Genexpression festgestellt wurde: Die Gene für die Phosphoglycerat-Kinase, die 2-Phospho-D-Glycerate-2,3-Phosphomutase, die 2-Phospho-D-Glycerat-Hydrolyase, die Pyruvat-Phospho-Transferase und die PEP-Carboxylase nicht von Änderungen in ihrer Expression beeinträchtigt, ihre Aktivitäten sind in beiden Stämmen jedoch um ca. 50 % geringer als in Modellen ohne zugesetztes IQ-238.

Das Naphtylisochinolin IQ-238 ist strukturell mit Dequaliniumchlorid verwandt, so dass auch für diesen Wirkstoff eine direkte Wirkung auf die Atmungskette möglich ist, jedoch lassen weder die Genexpressionsdaten noch die metabolische Netzwerkanalyse diesen Schluss zu.

Durch die beiden vollkommen verschiedenen Wirkmechanismen kann auch eine unspezifische Hemmung von Enzymen auf Grund der phenolischen Gruppen der Naphtylisochinoline ausgeschlossen werden – Naphtylisochinoline wirken spezifisch auf verschiedene Enzyme in verschiedenen Teilen des Stoffwechsels. Auch sind die Nebenwirkungen dieser Wirkstoffe – wie zum Beispiel die Auswirkungen von IQ-238 auf nicht direkt gehemmte Enzyme der Glykolyse – nur durch die metabolische Netzwerkanalyse sichtbar.

Die hier gewählte Methode Genexpressionsdaten direkt zum Fitting der Enzymaktivitäten heranzuziehen um dadurch die Stoffwechselaktivitäten zu berechnen hat – abgesehen von ihrem Nachteil der geringfügig geringeren Genauigkeit der Ergebnisse – sehr viele Vorteile gegenüber anderen Datensätzen, welche Verwendung finden könnten. So geben gemessene Metabolomdaten, wie sie auch im Rahmen dieser Dissertation verwendet wurden, nur Auskunft über die Quantität der gemessenen Metabolite, jedoch nicht darüber durch welche Stoffwechselwege diese zustande kommen. Gemessene Proteomdaten sind genauer als die verwendeten Genexpressionsdaten, jedoch sind die hierfür benötigten Proteinaktivitätsassays sehr viel schwerer und unter großem Zeitaufwand zu erstellen. Dadurch können nur wenige, einzeln gemessene Enzymaktivitäten zum Fitting herangezogen werden.

Genexpressionsdaten haben den Vorteil, dass ein einmal entwickelter Assay nicht nur ein Gen in seiner Expressionsänderung misst – sondern je nach Größe des Assays hunderte oder tausende Gene mit einem Durchlauf. Dadurch können die Wirkungen neuartiger Wirkstoffe schnell und auch in großen Stoffwechselwegen zuverlässig vorhergesagt werden.

Ein weiterer wichtiger Teil dieser Dissertation beschäftigte sich mit den Wirkungen von Methylenblau in Kombination mit anderen Malariapräparaten. Methylenblau wurde in früheren Zeiten bereits erfolgreich gegen Malariaerkrankungen eingesetzt, ist aber von wirksameren Medikamenten abgelöst worden. In *P. falciparum* 3D7 treten in den letzten Jahren verstärkt Resistenzen gegen die gängigsten Präparate zur Behandlung dieser Tropenkrankheit auf.

Durch die metabolische Netzwerkanalyse konnte im Rahmen dieser Dissertation aufgezeigt werden, dass Methylenblau die Eigenschaft besitzt in einer Kombination mit anderen Präparaten die Wirkung dieser gegen den Malariaparasiten zu verstärken. In resistenten Stämmen ist Methylenblau – wahrscheinlich durch den Aufbau eines oxidativen Stresses auf das Redoxnetzwerk der Parasiten – in der Lage, die Resistenz zu brechen und den vormalig ineffektiven Präparaten ihre Wirkung gegen den Parasiten zum Teil zurückzugeben.

Die Bioinformatik erweist sich damit als ein wirksamer Ansatz, um die Netzwerkeffekte dieser neuartigen Wirkstoffe aufzuklären, und so beispielhaft Wirkungen auf Redoxnetzwerke bei Kombinationstherapien gegen Malaria vorherzusagen, oder neue antibiotische Wirkstoffe gegen bakterielle Infektionen in ihren Netzwerkeffekten zu beschreiben und besser zu unterscheiden.

VII. Zusammenfassung

Durch das Auftreten neuer Stämme resistenter Krankheitserreger ist die Suche nach neuartigen Wirkstoffen gegen diese, sich ständig weiter ausbreitende Bedrohung, dringend notwendig. Der interdisziplinäre Sonderforschungsbereich 630 der Universität Würzburg stellt sich dieser Aufgabe, indem hier neuartige Xenobiotika synthetisiert und auf ihre Wirksamkeit getestet werden. Die hier vorgelegte Dissertation fügt sich hierbei nahtlos in die verschiedenen Fachbereiche des SFB630 ein: Sie stellt eine Schnittstelle zwischen Synthese und Analyse der Effekte der im Rahmen des SFB630 synthetisierten Isochinolinalkaloid-Derivaten.

Mit den hier angewandten bioinformatischen Methoden wurden zunächst die wichtigsten Stoffwechselwege von *S. epidermidis* R62A, *S. aureus* USA300 und menschlicher Zellen in sogenannten metabolischen Netzwerkmodellen nachgestellt. Basierend auf diesen Modellen konnten Enzymaktivitäten für verschiedene Szenarien an zugesetzten Xenobiotika berechnet werden. Die hierfür benötigten Daten wurden direkt aus Genexpressionsanalysen gewonnen.

Die Validierung dieser Methode erfolgte durch Metabolommessungen. Hierfür wurde *S. aureus* USA300 mit verschiedenen Konzentrationen von IQ-143 behandelt und gemäß dem in dieser Dissertation vorgelegten Ernteprotokoll aufgearbeitet. Die Ergebnisse hieraus lassen darauf schließen, dass IQ-143 starke Effekte auf den Komplex 1 der Atmungskette ausübt – diese Resultate decken sich mit denen der metabolischen Netzwerkanalyse.

Für den Wirkstoff IQ-238 ergaben sich trotz der strukturellen Ähnlichkeiten zu IQ-143 deutlich verschiedene Wirkeffekte: Dieser Stoff verursacht einen direkten Abfall der Enzymaktivitäten in der Glykolyse. Dadurch konnte eine unspezifische Toxizität dieser Stoffe basierend auf ihrer chemischen Struktur ausgeschlossen werden.

Weiterhin konnten die bereits für IQ-143 und IQ-238 auf Bakterien angewandten Methoden erfolgreich zur Modellierung der Effekte von Methylenblau auf verschiedene resistente Stämme von *P. falciparum* 3D7 angewandt werden. Dadurch konnte gezeigt

werden, dass Methylenblau in einer Kombination mit anderen Präparaten gegen diesen Parasiten zum einen die Wirkung des Primärpräparates verstärkt, zum anderen aber auch in gewissem Maße vorhandene Resistenzen gegen das Primärpräparat zu verringern vermag.

Somit konnte durch die vorgelegte Arbeit eine Pipeline zur Identifizierung der metabolischen Effekte verschiedener Wirkstoffe auf unterschiedliche Krankheitserreger erstellt werden. Diese Pipeline kann jederzeit auf andere Organismen ausgeweitet werden und stellt somit einen wichtigen Ansatz um Netzwerkeffekte verschiedener, potentieller Medikamente aufzuklären.

VIII. Summary

With the emergence of new strains of resistant pathogens, the search for new compounds against this spreading threat is of utmost importance. The interdisciplinary special research field SFB630 of the University of Würzburg is ready to tackle this task by synthesizing and analysing the effects of xenobiotics. The presented dissertation is seamlessly integrated into the diverse range of special fields of the SFB630: it provides a gateway between synthesis and analysis of the effects of the newly synthesized isoquinoline alkaloid derivatives.

The presented bioinformatic methods were used to build a so called metabolic network model of the most important pathways of *S. epidermidis* RP62A, *S. aureus* USA300 and human cells. Based on these models it was possible to calculate the enzyme activities for different scenarios of added xenobiotics. The data needed for these calculations were derived directly from gene expression analysis.

Validation of this method was done by metabolomic measurements. In order to accomplish this, a strain of *S. aureus* USA300 was subjected to different concentrations of IQ-143 and processed according to the workflow also published in this dissertation. The results suggest that IQ-143 has very strong effects on the complex 1 of the oxidative phosphorylation – these results are consistent with the results obtained by the metabolic network analysis.

Although IQ-238 is structurally a close relative to IQ-143, the effects of this compound are very different: it leads to a drop of the enzyme activities in the glycolysis. Therefore an unspecific toxicity of those compounds based on their chemical structure could be ruled out.

The methods used to model the effects of IQ-143 and IQ-238 on bacteria were furthermore successfully transferred to model the effects of methylene blue on several resistant strains of *P. falciparum* 3D7. It was shown that a combination of methylene blue and other malaria medications either enhances the effects of the primary medication, or – in the case of a resistant strain – methylene blue was able to mitigate the resistances against the primary

medication.

The presented dissertation was thus successfully able to build a pipeline to identify the metabolic effects of different compounds on various germs. This pipeline can be expanded to other organisms at any time and therefore yields an important approach to identify network effects of various potential drugs.

IX. Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

Liang C, Schmid A, López-Sánchez MJ, Moya A, Gross R, Bernhardt J, Dandekar T: **JANE: efficient mapping of prokaryotic ESTs and variable length sequence reads on related template genomes**. BMC bioinformatics, 2009, 10:391.

Cecil A, Rikanović C, Ohlsen K, Liang C, Oelschlaeger T, Gulder T, Bringmann G, Holzgrabe U, Unger M, Dandekar T: **Modeling antibiotic and cytotoxic effects of the dimeric isoquinoline IQ-143 on metabolism and its regulation in Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis and human cells**. GenomeBiology, 2011, 12:R24.

Mischke R, Kühnlein P, Kehl A, Langbein-Detsch I, Steudle F, Schmid A, Dandekar T, Czwalińska A, Müller E: **G244E in the canine factor IX gene leads to severe haemophilia B in Rhodesian Ridgebacks**. Veterinary journal, 2011, 187(1):113-118.

Zirke J, Cecil A, Schäfer F, Rahlfs S, Ouedraogo A, Xiao K, Sawagogo S, Coulibaly B, Becker K, Dandekar T: **Analyzing thiol-dependent redox networks in the presence of methylene blue and other anti-malarial agents with RT-PCR-supported in silico modeling**. Malaria Journal, eingereicht.

Cecil A, Ohlsen K, Menzel T, François P, Schrenzel J, Fischer A, Dittrich M, Liang C, Bernhardt J, Oelschlaeger TA, Bringmann G, Bruhn H, Unger M, Lehmann L, Dandekar T: **Metabolic modelling of antibiotic and cytotoxic effects of the isoquinoline IQ-238 in S. aureus, S. epidermidis and human cells**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, in Vorbereitung.

Kongressbeiträge

Schmid A*, Rikanović C, Ohlsen K, Unger M, Dandekar T: **Experiments towards the biocombinatorial generation of aminocoumarin antibiotics with catechol structures: Investigation of influx and efflux across the bacterial cell envelope**. 4th Joint PhD Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630, 766, 544, 2008, Kloster Bronnbach.

Rikanović C, Schmid A*, Bringmann G, Ohlsen K, Unger M, Dandekar T, Holzgrabe U: **Combining bioinformatics and metabolomics to investigate the effect of a naphthylisoquinoline alkaloid on staphylococcus aureus**. 2nd International Symposium of the Collaborative Research Center SFB 630, 2009, Würzburg.

Cecil A, Santosh N, Liang C, Schaefer B, Sotriffer C, Dandekar T: **DrugPoint – a retrieval software and databank to connect proteins, drugs and targets**. German Conference on Bioinformatics, 2011, München.

Zirke J, Cecil A, Heinz W, Coulibaly B, Schirmer H, Dandekar T: **Thiol-dependent redox networks: analysing the effects of the anti-malarial agent Methylene Blue**. 63.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 2011, Essen.

*: Diese Kongressbeiträge und Veröffentlichungen wurden noch unter meinem Geburtsnamen Alexander Schmid eingereicht.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Des Weiteren erkläre ich, dass ich noch keinen weiteren akademischen Grad zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 10. April 2012

Alexander Cecil

- 1 World Health Organization: **The World Health Report - Statistical Annex**. 2004.
URL: <http://www.who.int/whr/2004/annex/en/>
Stand 21.03.2012
- 2 Heuer O, Magiorakos A-P, Gunell M, Economopoulou A, Blomquist PB, Brown D, Walton C, Patel N, Gagliotti C, Suetens C, Griskeviciene J, Monnet D: **Proportion of Methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolates in participating countries in 2010**. European Centre for Disease Prevention and Control 2012. URL:
http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/map_reports.aspx
Stand 21.03.2012
- 3 European Centre for Disease Prevention and Control: **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010**. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2011.
- 4 World Health Organization: **Antimicrobial resistance: a global threat**. 2000.
URL: http://www.who.int/drugresistance/DC_Antimicrobial_Resistance/en/index.html
Stand 21.03.2012
- 5 Centers for Disease Control and Prevention: Public Health Image Library. Picture ID: #11157
URL: <http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>
Stand 21.03.2012
- 6 Hacker J, Heesemann J: **Molekulare Infektionsbiologie**. 1. Auflage, 2000, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. S. 207-247.
- 7 Kayser HF, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM: **Medizinische Mikrobiologie**. 12. Auflage, 2010, Thieme Verlag, Stuttgart. S. 245-250, 374-384.
- 8 Yarwood JM, Bartels DJ, Volper EM, Greenberg PE: **Quorum Sensing in Staphylococcus aureus Biofilms**. J. Bacteriol. 2004. **186**(6):1838-1850.
- 9 World Health Organization: **World Malaria Report 2008**.
URL: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241563697/en/index.html>
Stand 21.03.2012
- 10 Hay SI, Okiro EA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, Guerra CA, Snow RW: **Estimating the Global Clinical Burden of Plasmodium falciparum Malaria in 2007**. PLoS Medicine, 2010. **7**(6):e100029.
- 11 Malaria Atlas Project: **Clinical burden of Plasmodium falciparum map in 2007 globally**. 2010.
URL: http://www.map.ox.ac.uk/browse-resources/clinical-burden/Pf_burden/world/
Stand 21.03.2012
- 12 Platz JA, Olson SH: **Malaria Risk and temperature: influence from global climate change and local land use practice**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006; **103**:5635-5636.
- 13 World Health Organisation: **Africa Malaria Report 2006**.
URL: <http://www.afro.who.int/>
Stand 21.03.2012
- 14 World Health Organisation: **World Malaria Report 2005**.
URL: <http://www.rollbackmalaria.org/wmr2005/html/toc.htm>
Stand 03.04.2012
- 15 Rowe AK, Rowe SY, Snow RW, Korenromp EL, Schellenberg JR, Stein C, Nahlen BL, Bryce J, Black RE, Steketee RW: **The burden of malaria mortality among African children in the year 2000**. Int J Epidemiol. 2006; **35**:691-704.
- 16 Robert-Koch-Institut: **Malaria, RKI-Ratgeber für Ärzte 2006**.
URL: http://www.rki.de/cln_153/nn_494530/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Malaria.html
Stand 03.04.2012
- 17 Warell D, Gilles H: **Essential Malariology**. Arnold Verlag. 2002. S. 107-190, 191-205, 252-267, 268-312 und 313-325.
- 18 Centers for Disease Control and Prevention: **The Malaria parasite life cycle**. 2010.
URL: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>
Stand 21.03.2012
- 19 Dayhoff MO, Schwartz RM, Orcutt BC: **A model of evolutionary change in proteins**. S. 345-352. Aus Dayhoff MO: **Atlas of Protein Sequence and Structure**. 5. Auflage, (3. Ergänzungsband), Washington, D.C., National Biomedical Research Foundation 1979.
- 20 Henikoff S, Henikoff J.: **Amino acid substitution matrices from protein blocks**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**(biochemistry): 10915 - 10919 (1992).
- 21 Altschul SF, Thomas L, Madden A, Schaffer A, Jinghui Z, Zheng Z, Miller W, Lipman DJ:

- Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**, Nucleic Acids Res 1997, **25**:3389-3402.
- 22 Hansen A: **Bioinformatik – Ein Leitfadens für Naturwissenschaftler**, 2. Auflage, Basel, Schweiz, Birkhäuser Verlag 2004, Seiten 54-65.
- 23 Lesk AM: **Bioinformatik – Eine Einführung**. 1. Auflage, Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH 2003, S. 249-251.
- 24 Hütt MT, Dehnert M: **Methoden der Bioinformatik – Eine Einführung**. 1. Auflage, Heidelberg, Berlin, Springer-Verlag 2006, S. 283-293.
- 25 Hansen A: **Bioinformatik - Ein Leitfadens für Naturwissenschaftler**. 2. Auflage, Basel, Schweiz, Birkhäuser Verlag 2004, S. 56, Kapitel 5.2.2 Bit Score und E-Wert.
- 26 Karlin S, Altschul SF: **Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes**. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990, USA 87:2264-2268(PubMed).
- 27 Kanehisa M, Araki M, Goto S, Hattori M, Hirakawa M, Itoh M, Katayama T, Kawashima S, Okuda S, Tokimatsu T, and Yamanishi Y: **KEGG for linking genomes to life and the environment**. Nucleic Acids Res. 2008, **36**:D480-D484.
- 28 **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes 2012**.
URL: <http://www.genome.jp/kegg/>
Stand 21.03.2012
- 29 Schwarz R, Liang C, Kaleta C, Kühnel M, Hoffmann E, Kuznetsov S, Hecker M, Griffiths G, Schuster S, Dandekar T: **Integrated network reconstruction, visualization and analysis using YANAsquare**. BMC Bioinformatics 2007, **8**:313
- 30 **Julius-Maximilians-Universität Würzburg: YANAsquare**.
URL: <http://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/yana.html>
Stand 21.03.2012
- 31 Michal G: **Biochemical Pathways**, 1. Auflage, Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH 1999.
- 32 Schuster S, Fell DA, Dandekar T: **A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks**. Nature Biotech 2000, **18**:326-332.
- 33 Papin JA, Stelling J, Price ND, Klamt S, Schuster S, Palsson BO: **Comparison of network based pathway analysis methods**. Trends Biotechnol 2004, **22**:400-405.
- 34 Pfeiffer T, Sánchez-Valdenebro I, Nuvo JC, Montero F, Schuster S: **METATOOL: for studying metabolic networks**. Oxford Journals: Bioinformatics 1999, **15**: 251-257.
- 35 Rikanović C: **Metabolomanalytik antiinfektiv wirkender Isochinolinalkaloide**. Dissertation 2011, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Würzburg.
- 36 Microsoft Deutschland GmbH, Konrad-Zuse-Straße 1, 85716 Unterschleißheim.
- 37 Oracle Corporation, 500 Oracle Parkway, Redwood Shores, CA 94065.
- 38 **Java**.
URL: <http://www.sun.java.com>
Stand 21.03.2012
- 39 **Gimp**.
URL: <http://www.gimp.org/>
Stand 21.03.2012
- 40 R Development Core Team: **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2006, ISBN: 3-900051-07-0.
URL: <http://www.r-project.org/>
Stand 21.03.2012
- 41 **Strawberry Perl**.
URL: <http://strawberryperl.com/>
Stand 21.03.2012
- 42 **Notepad++**.
URL: <http://notepad-plus-plus.org/>
Stand 21.03.2012
- 43 Schmitz V, Klawitter J, Leibfritz D, Christians U: **Development and validation of an assay for the quantification of 11 nucleotides using LC/LC-electrospray ionization-MS**. Anal Biochem 2007, **365**:230-239.
- 44 Rikanović C: **Metabolomanalytik antiinfektiv wirkender Isochinolinalkaloide**, Dissertation 2011, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Fakultät für Chemie und Pharmazie,

- Universität Würzburg.
- 45 Fuchs S, Mehlan H, Kusch H, Teumer A, Zühlke D, Berth M, Wolf C, Dandekar T, Hecker M, Engelmann S, Bernhardt J: **Protecs, a comprehensive and powerful storage and analysis system for OMICS data, applied for profiling the anaerobiosis response of *Staphylococcus aureus* COL.** Proteomics 2010, **10**:2982-3000.
- 46 Die Geneexpressionsdaten können von **PROTECS** abgerufen werden; hierzu den "public user account" verwenden um nach "IQ-143" zu suchen.
URL: <http://microbio1.biologie.uni-greifswald.de/csp/bio/login.csp>
Stand 21.03.2012
- 47 Charbonnier Y, Gettler B, François P, Bento M, Renzoni A, Vaudaux P, Schlegel W, Schrenzel J: **A generic approach for the design of whole-genome oligoarrays, validated for genotyping, deletion mapping and gene expression analysis on *Staphylococcus aureus*.** BMC Genomics 2005, **6**:95.
- 48 Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T, Yuzawa H, Kobayashi I, Cui L, Oguchi A, Aoki K, Nagai Y, Lian J, Ito T, Kanamori M, Matsumaru H, Maruyama A, Murakami H, Hosoyama A, Mizutani-Ui Y, Takahashi NK, Sawano T, Inoue R, Kaito C, Sekimizu K, Hiramatsu H, Kuhara S, Goto S, Yabuzaki J, Kanehisa M, Yamashita A, Oshima K, Furuya K, Yoshino C, Shiba T, Hattori M, Ogasawara N, Hayashi H, Hiramatsu K: **Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Lancet 2001, **357(9264)**:1225-40.
- 49 Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K: **Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA.** Lancet 2002, **359(9320)**:1819-27.
- 50 Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, Paulsen IT, Kolonay JF, Brinkac L, Beanan M, Dodson RJ, Daugherty SC, Madupu R, Angiuoli SV, Durkin AS, Haft DH, Vamathevan J, Khouri H, Utterback T, Lee C, Dimitrov G, Jiang L, Qin H, Weidman J, Tran K, Kang K, Hance IR, Nelson KE, Fraser CM: **Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain.** J Bacteriol 2005, **187**:2426-2438.
- 51 Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F: **Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Lancet 2006, **367**:731-739.
- 52 Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA, Peacock SJ, Day NP, Enright MC, Foster TJ, Moore CE, Hurst L, Atkin R, Barron A, Bason N, Bentley SD, Chillingworth C, Chillingworth T, Churcher C, Clark L, Corton C, Cronin A, Doggett J, Dowd L, Feltwell T, Hance Z, Harris B, Hauser H, Holroyd S, Jagels K, James KD, Lennard N, Line A, Mayes R, Moule S, Mungall K, Ormond D, Quail MA, Rabinowitsch E, Rutherford K, Sanders M, Sharp S, Simmonds M, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG, Spratt BG, Parkhill J: **Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance.** Proc Natl Acad Sci USA. 2004, **101(26)**:9786-91. Epub 2004 Jun 22.
- 53 Pimentel-Elardo SM, Kozytska S, Bugni TS, Ireland CM, Moll H, Hentschel U: **Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from mediterranean sponges.** Mar Drugs 2010, **8**:373-380.
- 54 Frank A, Unger M: **Analysis of frankincense from various *Boswellia* species with inhibitory activity on human drug metabolising cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography mass spectrometry after automated on-line extraction.** J Chromatogr A 2006, **1112**:255-262.
- 55 Bernhardt J, Funke S, Hecker M, Siebourg J: **Visualizing gene expression data via Voronoi treemaps. Voronoi Diagrams in Science and Engineering, 2009.** ISVD '09. 6th International Symposium on. 0: 233-241. ISBN: 978-0-7695-3781-8.
- 56 Otto A, Bernhardt J, Herbst FA, Siebourg J, Mäder U, Hecker M, Becher D: **System-wide temporal profiling of proteins in glucose starved *Bacillus subtilis*.** Nat. Commun. 1:137
- 57 Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW, and the European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group: **Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis.** PLoS Med 2010, **7**:e1000215.
- 58 Wright JA, Nair SP: **Interaction of staphylococci with bone.** Int J Med Microbiol 2010, **300**:193-204.
- 59 Cheng AG, Kim HK, Burts ML, Krausz T, Schneewind O, Missiakas DM: **Genetic requirements**

- for **Staphylococcus aureus abscess formation and persistence in host tissues**. FASEB J 2009, **23**:3393-3404. Published online 2009.
- 60 Mattner F, Biertz F, Ziesing S, Gastmeier P, Chaberny IF: **Long-term persistence of MRSA in re-admitted patients**. Infection 2010, **38**:363-371. Published online 2010.
- 61 Bringmann G, Gulder T, Reichert M, Meyer F: **Ancisheyneine, the First N,C-Coupled Naphtylisoquinoline Alkaloid: Total Synthesis and Stereochemical Analysis**. Org Lett 2006, **8**:1037-1040.
- 62 Bringmann G, Kajahn I, Reichert, M, Pedersen SHE, Faber, JH, Gulder T, Brun R, Christensen SB, Ponte-Sucre A, Moll H, Heubl G, Mudogo V: **Ancistrocladinium A and B, the First N,C-Coupled Naphtyldihydroisoquinoline Alkaloids, from a Congolese Ancistrocladus Species**. J Org Chem 2006, **71**:9348-9356.
- 63 Bringmann G, Gulder T, Hertlein B, Hemberger Y, Meyer F: **Total Synthesis of the N,C-Coupled Naphtylisoquinoline Alkaloids Ancistrocladinium A and B and Related Analogues**. J Am Chem Soc 2010, **132**:1151-1158.
- 64 Bringmann G, Hertlein-Amslinger B, Kajahn I, Dreyer M, Brun R, Moll H, Stich A, Ndjoko Ioset K, Schmitz W, Hoang Ngoc L: **Phenolic analogs of the N,C-coupled Naphtylisoquinoline alkaloid ancistrocladinium A, from Ancistrocladus cochinchinensis (Ancistrocladaceae), with improved antiprotozoal activities**. Phytochemistry 2011, **72**, 89-93.
- 65 Yang L-K, Glover RP: Yoganathan K, Sarnaik JP, Godbole, AJ, Soejarto DD, Buss AD, Butler MS: **Ancisheyneine, a novel Naphtylisoquinolinium alkaloid from Ancistrocladus heyneanus**. Tetrahedron Lett 2003, **44**:5827-5829.
- 66 Ponte-Sucre A, Faber JH, Gulder T, Kajahn I, Pedersen SEH, Schultheis M, Bringmann G, Moll H: **Activities of Naphtylisoquinoline Alkaloids and Synthetic Analogs against Leishmania major**. Antimicrob Agents Chemother 2007, **51**:188-194.
- 67 Ponte-Sucre A, Gulder T, Wegehaupt A, Albert C, Rikanović C, Schaefflein L, Frank A, Schultheis M, Unger M, Holzgrabe U, Bringmann G, Moll H: **Structure-Activity Relationship and Studies on the Molecular Mechanism of Leishmanicidal N,C-Coupled Aryl isoquinolinium Salts**. J Med Chem 2009, **52**:626-636.
- 68 Ponte-Sucre A, Gulder T, Gulder AM, Vollmers G, Bringmann G, Moll H: **Alterations on the Structure of Leishmania major induced by N-Arylisoquinolines correlate with Compound Accumulation and Disposition**. J Med Microbiol 2010, **59**:69-75.
- 69 Gulder T: **Neuartige Wirkstoffe gegen Infektionskrankheiten : N,C-gekuppelte Naphtylisochinolin-Alkaloide**. Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2008, Abb. 62, S. 120.
- 70 Coen M: **A metabonomic approach for mechanistic exploration of pre-clinical toxicology**. Toxicology 2010, article in press.
- 71 Rikanović C: **Metabolomanalytik antiinfektiv wirkender Isochinolinalkaloide**, Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2011, S. 76-78 und 215ff.
- 72 Kocianova S, Vuong C, Yao Y, Voyich JM, Fischer ER, DeLeo FR, Otto M: **Key role of poly gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of Staphylococcus epidermidis**. J Clin Invest 2005, **115**:688-694.
- 73 Candela T, Fouet A: **Poly-gamma-glutamate in bacteria**. Mol Microbiol 2006, **60**:1091-1098.
- 74 Lotz GP, Lin H, Harst A, Obermann WM: **Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone**. J Biol Chem 2003, **278**:17228-17235.
- 75 Panaretou B, Siligardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, Millson SH, Clarke PA, Naaby-Hansen S, Stein R, Cramer R, Mollapour M, Workman P, Piper PW, Pearl LH, Prodromou C: **Activation of the ATPase activity of Hsp90 by the stress-regulated cochaperone Aha1**. Mol Cell 2002, **10**:1307-1318.
- 76 Lange H: **ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers**. Int J Antimicrob Agents 2003, **22**:188-199.
- 77 Götz F, Otto M: **ABC transporters of staphylococci**. Res Microbiol 2001, **152**:351-356.
- 78 KEGG Pathway map: **Oxidative phosphorylation**
URL: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map00190
Stand 21.03.2012
- 79 Chen LB: **Mitochondrial membrane potential in living cells**. Ann Rev Cell Biol 1988, **4**:155-181.
- 80 Weiss MJ, Wong JR, Ha CS, Bleday R, Salem RR, Steele GD Jr., Chen LB: **Dequalinium, a topical antimicrobial agent, displays anticarcinoma activity based on selective**

- mitochondrial accumulation.** Proc Natl Acad Sci 1987, **84**:5444-5448.
- 81 Suzuki K, Mizuno Y, Yamauchi Y, Nagatsu T, Mitsuo Y: **Selective inhibition of complex I by N-methylisoquinolinium ion and N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in isolated mitochondria prepared from mouse brain.** J Neurol Sci 1992, **109**:219-223.
- 82 McNaught KS, Thull U, Carrupt PA, Altomare C, Cellamare S, Carotti A, Testa B, Jenner P, Marsden CD: **Inhibition of complex I by isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP).** Biochem Pharmacol 1995, **50**:1903-1911.
- 83 Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHM, Wagner H: **vegan: Community Ecology Package.** R package version 2.1-9/r2044.
- 84 ChemAxon: **Marvin Version 5.5.1.0.** 2011.
URL: <http://www.chemaxon.com>
Stand 21.03.2012
- 85 Greenwood BM, Bojang K, Whitty JM, Targett GA: **Malaria.** Lancet 2005; 365:1487–98.
- 86 Trape JF: **The Public Health Impact of Chloroquine Resistance in Africa.** Am J Trop Med Hyg 2001:12-17.
- 87 Trape JF, Pison G, Spiegel A, Enel C, Rogier C: **Combating Malaria in Africa.** Trends Parasitol 2002:224-230.
- 88 Kouyaté B, Sie A, Yé M, De Allegri M, Müller O: **The Great Failure of Malaria Control in Africa: a District Perspective from Burkina Faso.** PLoS Med; 2007:127.
- 89 Sachs JD: **Achieving the Millennium Development Goals – The Case of Malaria.** N Engl J Med; 2005:115-17.
- 90 World Health Organization: **World Malaria Report 2008.**
URL: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241563697/en/index.html/>
Stand 21.03.2012
- 91 Osorio L, Gonzalez I, Olliaro P, Taylor WR: **Artemisinin-Based Combination Therapy for Uncomplicated Plasmodium falciparum Malaria in Colombia.** Malar J 2007:25.
- 92 International Artemisinin Study Group: **Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis.** Lancet 2004:9–17.
- 93 Sutherland CJ, Ord R, Dunyo S, et al: **Reduction of Malaria Transmission to Anopheles Mosquitoes with a Six-Dose Regimen of Co-Artemether.** PLoS Med 2005:92.
- 94 Duffy PE, Sibley CH: **Are We Losing Artemisinin Combination Therapy Already?** Lancet 2005:1908–09.
- 95 Jambou R, Legrand E, Niang M, et al: **Resistance of Plasmodium falciparum Field Isolates to in-Vitro Artemether and Point Mutations of the SERCA-type PfATPase6.** Lancet 2005:1960-3.
- 96 Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith BL, Socheat D, Fukuda MM: **Artemisinin Resistance in Cambodia 1 (ARC1) Study Consortium.** N Engl J Med 2008:2619-20.
- 97 Bloland PB, Ettling M, Meek S: **Combination Therapy for Malaria in Africa: Hype or Hope?** Bull WHO 2000:1387-1388.
- 98 Garner P, Graves PM: **The Benefits of Artemisinin Combination Therapy for Malaria Extend Beyond the Individual Patient.** PLoS Med 2005:105.
- 99 Wiseman V, Kim M, Mutabingwa TK, Whitty CJM: **Cost-Effectiveness Study of Three Antimalarial Drug Combinations in Tanzania.** PLoS Med 2006:373.
- 100 Johnson LJ, Chu CH, Hussey GA: **Quantitative clay mineral analysis using simultaneous linear equations.** Clays and Clay Minerals, Vol 33, No. 2, 107-117, 1985.
- 101 Koga M, Yamamichi Y, Nomoto Y, Irie M, Tanimura T, Yoshinaga T: **Rapid Determination of Anionic Surfactants by Improved Spectrophotometric Method Using Methylene Blue.** Anal. Sci., Vol. 15, p.563, (1999).
- 102 Guttman P, Ehrlich P: **Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria.** Berliner Klinische Wochenschrift. 1891:953–956.
- 103 Coleman MD and Coleman NA: **Drug-Induced Methaemoglobinaemia. Treatment Issues.** Drug Saf 1996:394-405.
- 104 Buchholz K, Schirmer RH, Eubel JK, et al: **Interactions of Methylene Blue with Human Disulfide Reductases and their Orthologues from Plasmodium falciparum.** Antimicrob Agents Chemother; 2008:183-191.
- 105 Schirmer RH, Coulibaly B, Schiek W, et al: **Methylene Blue in the Treatment of Malaria – Past and Presence.** Redox Report; 2003:272-276.
- 106 Mandi G, Witte S, Meissner P, et al: **Safety of the Combination of Chloroquine and Methylene Blue in Healthy Adult Men with G6PD Deficiency from Rural Burkina Faso.** Trop Med Int

- Health; 2005:32–38.
- 107 Meissner P, Mandi G, Coulibaly B, et al: **Methylene Blue for Malaria in Africa: Results from a Dose-Finding Study in Combination with Chloroquine.** *Malaria J* 2006:84.
- 108 Zoungrana A, Coulibaly B, Sié A, et al: **Safety and Efficacy of Methylene Blue Combined with Artesunate or Amodiaquine for Uncomplicated Falciparum Malaria: A Randomized Controlled Trial from Burkina Faso.** *PLoS One* 2008:e1630.
- 109 Wellems TE, Walker-Jonah A, Panton LJ: **Genetic Mapping of the Chloroquine-Resistance Locus on Plasmodium falciparum Chromosome 7.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1991:3382-3386.
- 110 Fidock DA, Nomura T, Talley AK, et al: **Mutations in the P. falciparum Digestive Vacuole Transmembrane Protein PfCRT and Evidence for Their Role in Chloroquine Resistance.** *Mol Cell* 2000:861–871.
- 111 Wellems TE, Plowe CV: **Chloroquine-Resistant Malaria.** *J Infect Dis* 2001:770-776.
- 112 Djimde A, Doumbo OK, Cortese JF, et al: **A Molecular Marker for Chloroquine-Resistant Falciparum Malaria.** *N Engl J Med* 2001:257-263.
- 113 Durand R, Jafari S, Vauzelle J, Delabre JF, Jesic Z, Le Bras J: **Analysis of PfCRT Point Mutations and Chloroquine Susceptibility in Isolates of Plasmodium falciparum.** *Mol Biochem Parasitol* 2001:95-102.
- 114 Lakshmanan V, Bray PG, Verdier-Pinard D, et al: **A Critical Role for PfCRT K76T in Plasmodium falciparum Verapamil-Reversible Chloroquine Resistance.** *EMBO J* 2005:2294-2305.
- 115 Johnson DJ, Fidock DA, Mungthin M, et al: **Evidence for a Central Role for PfCRT in Conferring Plasmodium falciparum Resistance to Diverse Antimalarial Agents.** *Mol Cell*; 2004:867-877.
- 116 Volkman SK, Cowman AF, Wirth DF: **Functional Complementation of the STE6 Gene of Saccharomyces Cerevisiae with the PfMDR1 Gene of Plasmodium falciparum.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1995:8921-8925.
- 117 Duraisingh MT, Cowman AF: **Contribution of the PfMDR1 Gene to Antimalarial Drug-Resistance.** *Acta Trop* 2005:181-190.
- 118 Rohrbach P, Sanchez CP, Hayton K, et al: **Genetic Linkage of PfMDR1 with Food Vacuolar Solute Import in Plasmodium falciparum.** *EMBO J* 2006:3000–3011.
- 119 Plowe CV, Cortese JF, Djimde A, et al: **Mutations in Plasmodium falciparum Dihydrofolate Reductase and Dihydropteroate Synthase and Epidemiologic Patterns of Pyrimethamine-Sulfadoxine Use and Resistance.** *J Infect Dis* 1997:1590-1596.
- 120 Gregson A, Plowe CV: **Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates.** *Pharmacol Rev* 2005:117-145.
- 121 Bozdech Z, Llinas M, Pulliam B, Wong E, Zhu J, DeRisi J: **The Transcriptome of the Intraerythrocytic Developmental Cycle of Plasmodium falciparum.** *PLoS Biol* 2003:5.
- 122 Aurrecoechea C, Brestelli J, Brunk BP, et al: **PlasmoDB: a functional Genomic Database for Malaria Parasites.** *Nucleic Acids Res* 2008:539-43.
- 123 Coulibaly B, Zoungrana A, Mockenhaupt F, et al: **Strong Gametocytocidal Effect of Methylene Blue-Based Combination Therapy against Falciparum Malaria: A Randomised Controlled Trial.** *PLoS ONE* 2009:5318.
- 124 Hisaadaa H, Yasutomo K, Himeno K: **Malaria: immune evasion by parasites.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* April 2005;37(4):700-706.
- 125 Hammer GP, Somé F, Müller O, et al: **Pattern of Cause-Specific Childhood Mortality in a Malaria Endemic Area of Burkina Faso.** *Malaria J* 2006:47.
- 126 Sankoh OA, Ye Y, Sauerborn R, Müller O, Becher H: **Clustering of Childhood Mortality in Rural Burkina Faso.** *Int J Epidemiology* 2001:485-492.
- 127 Kilama W, Ntoumi F: **Malaria: a Research Agenda for the Eradication Era.** *Lancet* 2009:1480-1482.
- 128 Greenwood B: **Can Malaria be Eliminated?** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009:2-5.
- 129 Ehrlich P: **Chemotherapeutics: Scientific Principles, Methods, and Results.** *Lancet* 1913: 445-51.
- 130 Coulibaly B, Zoungrana A, Mockenhaupt FP, et al: **Strong Gametocytocidal Effect of Methylene Blue-Based Combination Therapy against Falciparum Malaria: a Randomised Controlled Trial.** *PLoS ONE* 2009:5318.
- 131 Schirmer RH, Coulibaly B, Stich A, et al: **Methylene blue as an antimalarial agent.** *Redox Rep* 2003:272-276.
- 132 Becker K, Rahlfs S, Nickel C, Schirmer RH: **Glutathione- Functions and Metabolism in the Malarial Parasite Plasmodium falciparum.** *Biol Chem* 2003:551-66.

- 133 Enserink M: **Malaria's Drug Miracle in Danger**. Science 2010:844-846.
- 134 French GL: **The continuing crisis in antibiotic resistance**. Int J Antimicrob Agents 2010, **36**:Suppl 3:S3-7.