



Untersuchung des Häm-bindenden bakteriellen Proteoms mittels chemischer Proteomik

Isabel V. L. Wilkinson, Max Bottlinger, Yasmine El Harraoui, und Stephan A. Sieber*

Abstract: Häm ist ein Cofaktor mit unzähligen Funktionen, der für fast alle lebenden Organismen essentiell ist. Neben dem klassischen Transport von Gasen und katalytischen Funktionen wird Häm zunehmend als streng kontrolliertes Signalmolekül wahrgenommen, das die Proteinexpression reguliert. Häm-Akquisition, -Biosynthese und -Regulation sind jedoch nur in wenigen Modellorganismen gut erforscht und darüber hinaus ist das Häm-bindende Proteom in Bakterien noch nicht vollständig charakterisiert. Da die Häm-Homöostase jedoch für das Überleben von Bakterien essentiell ist, sind Häm-bindende Proteine vielversprechende Angriffspunkte für Medikamente. In dieser Publikation beschreiben wir eine chemische Proteomik Methode für die umfassende Untersuchung des Häm-bindenden Proteoms in lebenden Zellen. Der Einsatz einer Auswahl von sowohl klickbaren Häm-basierten Sonden und Photoaffinitätssonden ermöglichte die Untersuchung von bis zu 32–54 % des bereits bekannten Häm-bindenden Proteoms in grampositiven und gramnegativen Bakterien. Diese einfach zu implementierende Methode könnte auf verschiedene Zelltypen und Systeme angewandt werden und die künftige Erforschung im Feld der Häm Biologie vorantreiben.

Einleitung

Häm ist ein eisenkoordinierter Protoporphyrin-Cofaktor, der für fast alle lebenden Organismen essentiell ist. Typischerweise kann Häm nicht kovalent (als Häm b) an Proteine gebunden sein oder aber über kovalente Bindungen zwischen den Vinylgruppen des Häms und zwei Cysteinthiolen (als Häm c). Häm erfüllt eine Vielzahl an Funktionen, darunter den Transport, die Speicherung und den Stoffwechsel von molekularem Sauerstoff sowie die Katalyse

von Elektronenübertragungsreaktionen. Zunehmend wird Häm auch eine bedeutende Rolle bei der Signaltransduktion durch Häm-sensitive Sensoren zugesprochen, die zahlreiche Funktionen wie Transkription, DNA-Bindung, miRNA-Biogenese, Translation, Proteinkinaseaktivität, Proteinabbau, Proteininstabilisierung, Ionenkanalaktivität und vieles mehr regulieren.^[1–4] Die Vielseitigkeit von Häm als Cofaktor ist zum Teil auf die diversen Proteinstrukturen zurückzuführen, die zu sehr unterschiedlichen Bindungsaffinitäten führen, die von wenigen pM für Globinstrukturen bis zu $\approx \mu\text{M}$ für Häm-Chaperone oder Häm-regulierte Proteine reichen.^[5,6] Bislang wurden mehr als 30 verschiedene Proteinstrukturen identifiziert,^[7] wobei neue Proteinstrukturen und potenzielle therapeutische Anwendungen immer noch entdeckt werden.^[8–10]

Pathogene benötigen Eisen für ihr Wachstum und die Besiedlung des Wirts, aber freies extrazelluläres Eisen ist als Teil der angeborenen Immunantwort des Menschen begrenzt.^[11] Daher haben Pathogene eine Reihe von Methoden entwickelt, um Eisen aus dem Wirt zu extrahieren, insbesondere aus Häm und Häm-bindenden Proteinen (HBPs) wie Hämoglobin.^[12] Über den Erwerb, die Biosynthese und die Regulierung von Häm ist nur bei einigen wenigen Modellorganismen etwas bekannt, und das Häm-bindende Proteom von Bakterien sowie Menschen muss erst noch vollständig charakterisiert werden.^[13,14] Allerdings wurden die Wege des Häm-Erwerbs und des Häm-Stoffwechsels vor kurzem als potenzielle therapeutische Ziele gegen protozoonische Parasiten,^[15] *Mycobacterium tuberculosis*^[16] und gramnegative Bakterien^[17] identifiziert, für die alle ein hoher ungedeckter Bedarf an neuen Medikamenten besteht. Die Untersuchung des Häm-bindenden Proteoms in Bakterien ist von großer Bedeutung für das Verständnis der Rolle von Häm bei Infektionen und könnte auch neue antibiotische Ziele identifizieren.

Tatsächlich ist die Untersuchung des Häm-bindenden Proteoms schon seit langem Bestandteil der Forschung, wobei die größten Fortschritte durch computergestützte Vorhersagen erzielt wurden. Dazu gehören Hilfsmittel zur Vorhersage von Häm-Bindungsstellen auf der Grundlage der Proteinstruktur,^[18] der Proteinsequenz^[19–21] oder beidem.^[22,23] Ergänzt werden diese Hilfsmittel durch den kürzlich entwickelten Webserver HeMoQuest,^[24,25] der Proteinreste identifiziert, die Häm potentiell transient binden können. Die große strukturelle und funktionelle Vielfalt der Häm-Bindung erschwert jedoch die Homologie abhängige in silico Vorhersage. Darüber hinaus erfordern in silico Methoden eine experimentelle Validierung, für die der Ansatz einer unvoreingenommenen umfassenden proteomi-

[*] I. V. L. Wilkinson, M. Bottlinger, Y. El Harraoui, S. A. Sieber
Centre for Functional Protein Assemblies, Technische Universität
München
Ernst-Otto-Fischer-Straße 8, 85748 Garching (Deutschland)
E-mail: stephan.sieber@tum.de

© 2022 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

schen Untersuchung eine Lösung mit hohem Durchsatz bieten könnte.

Nach unserem Kenntnisstand beschränken sich die bisherigen Versuche HBPs experimentell zu untersuchen auf lösliche Lysate oder Extrakte, für die typischerweise Affinitätschromatographie mit Häm-konjugierten Agaroseharzen, gefolgt von SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) und/oder LC-MS/MS (Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie) zur Identifizierung der gereinigten Proteine genutzt wird.^[26–32] Diese Methode hat die Entdeckung bisher unbekannter Häm-bindender Proteindomänen (z.B. hERG3^[27]) ermöglicht, weist jedoch einige Einschränkungen auf: Erstens können Häm-konjugierte Harze sterisch so anspruchsvoll sein, dass sie nicht zu Häm-Bindungsstellen gelangen können oder in Häm-bindende Proteine eingebaut werden können. Außerdem können Häm-konjugierte Harze nicht in lebenden Zellen eingesetzt werden, konkurrieren möglicherweise schlecht um die Bindung an HBPs, die bereits mit freiem Häm gesättigt sind oder können Proteine mit niedriger Affinität nicht binden. Während dieses Manuskript in Bearbeitung war, wurde eine Publikation über die Untersuchung des chemischen Proteoms von Häm-Proteinen in menschlichen Zelllysaten veröffentlicht.^[33] Unter Verwendung einer einzigen Häm-basierten Photoaffinitätssonde isolierten die Autoren 19 Proteine, von denen bekannt ist, dass sie Häm binden ($\approx 10\%$ aller bekannten Hämoproteine^[14]).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Methode zur spezifischen Entdeckung von Häm-bindenden Proteinen in lebenden Zellen noch nicht bekannt ist, aber einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von Häm-Transport, -Stoffwechsel und -Regulation leisten könnte. In dieser Publikation berichten wir über eine chemische Proteomik-Methode für die umfassende Untersuchung von Häm-bindenden Proteinen *in situ*, die auf verschiedene Zelltypen und Systeme angewendet werden kann. Die Anwendung der Methode ermöglichte die Untersuchung von 32–54 % des bekannten Häm-bindenden Proteoms in grampositiven und gramnegativen Bakterien und deckte bisher unbekannte potentielle Häm-Interaktoren auf.

Ergebnisse und Diskussion

Chemisch proteomische Ansätze zur Untersuchung von Proteinbindungspartnern anderer Cofaktoren als Häm sind bereits etabliert und wurden kürzlich veröffentlicht.^[34] In dieser Arbeit wird eine ähnliche Strategie angewandt, beginnend mit der Entwicklung und Synthese von Häm-Sonden, die metabolisch in lebende Zielzellen aufgenommen werden können. Die Sonden wurden so konzipiert, dass sie reaktive “Klick”-Gruppen enthalten, die eine Anreicherung des Sonden-HBP-Komplexes nach der Aufnahme in die Zielzellen ermöglichen. Angereicherte Sonden gebundene HBPs können dann verdaut und die Peptide durch LC-MS/MS identifiziert werden (Abbildung 1). In dieser Arbeit wird der Begriff “Häm” für Protoporphyrin IX verwendet, das entweder Fe^{II} oder Fe^{III} enthält.

Die Einführung von Modifikationen sollte idealerweise nur minimale Auswirkungen auf die Fähigkeit der Sonde haben, mit ihren kognitiven Bindungspartnern zu wechselwirken und das ursprüngliche Molekül zu kopieren. Häm kann mit Bindungsproteinen durch Van-der-Waals- und π - π -Wechselwirkung seines hydrophoben Porphyrinrings, axiale Ligandenkoordination des Fe-Ions (typischerweise Histidin, Methionin, Cystein oder Tyrosin^[7]), kovalent an Cystein über seine Vinyleinheiten oder durch Wasserstoffbrückenbindungen oder Salzbrücken zu seinen Propionatgruppen (in der Regel über Arginin^[35]) wechselwirken. Häm ist in der Regel im inneren eines Proteins verankert, bindet aber im Allgemeinen so, dass mindestens eine Propionat-Seitenkette dem Lösungsmittel ausgesetzt ist.^[36] Aus diesem Grund wurden die Propionatgruppen als Modifikationsstelle für die Sonden Synthese gewählt. Alkine und Azide wurden aufgrund ihrer geringen Größe als Click-Einheit für die Fusionierung über bioorthogonale kupferkatalysierte Cycloaddition oder Staudinger-Reaktion ausgewählt.^[37]

Die Funktionalisierung der Protoporphyrin-Propionatgruppen durch Amidkupplung^[38–43] und die anschließende Rekonstitution von exemplarischen Hämoproteinen ist hinlänglich bekannt.^[44–48] In allen Fällen waren die doppelt umgesetzten Diamidprodukte zwar von den Monoamiden separierbar, jedoch waren die Kupplungen in Bezug auf die beiden Carbonsäuren nicht regioselektiv, was zu untrennbaren Mischungen von Monoamid-Regioisomeren führte. In dieser Arbeit wurden die Monoamid Fe^{III} Häm-Sonden (1–6, Abbildung 1) als Regioisomergemische aus Hämchlorid (Fe^{III}-Protoporphyrin IX-Chlorid) durch Amidkupplung unter Zuhilfenahme von HBTU ((2-(1*H*-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluroniumhexafluorophosphat) und HOBt (Hydroxybenzotriazol) synthetisiert (Schema S1). Neben der Propargylamid-Sonde 1 und der Azid-Sonde 3 wurde auch eine Polyethylenglykol (PEG)-Linker haltige Alkin-Sonde 2 synthetisiert, um die Löslichkeit zu verbessern und die Zugänglichkeit des Alkins für die Click-Reaktion nach Bindung der Sonde an ihr Ziel zu diversifizieren. Die Fähigkeit dieser Monoamidsonden die Aktivität der Häm-abhängigen Meerrettichperoxidase (HRP) zu rekonstituieren, wurde durch *in vitro* Experimente unter Verwendung des Apo-Enzyms gezeigt (Abbildung S1), deren Resultate auf den Erhalt der biologischen Aktivität hindeuten. Im Gegensatz dazu war die doppelt substituierte Dipropargylamid-Sonde 7 (Abbildung S1) nicht in der Lage, die Aktivität von HRP zu rekonstituieren.

Da die meisten HBPs Häm nicht kovalent binden, könnte die Verwendung einer Photoaffinitäts-Häm-Sonde, die in der Lage ist nach UV-Aktivierung kovalent an ihr Ziel zu binden,^[49] die Zahl der in diesen Experimenten identifizierten Proteine erheblich erhöhen. Der Einbau von Photoaffinitäts-Gruppen in die Sondenstruktur ohne dabei die Aktivität zu beeinträchtigen, ist nicht trivial, wurde aber durch die Entwicklung linearer “minimalistischer” Alkin- und Diazirin-haltiger Photocrosslinker durch die Yao-Gruppe^[50] erleichtert. Kürzlich wurde die Eigenschaften von linearen, verzweigten und terminalen Diazirin-Linkern verglichen, wobei festgestellt wurde, dass die Anreicherung der Zielproteine von der Art des Linkers abhängen kann und

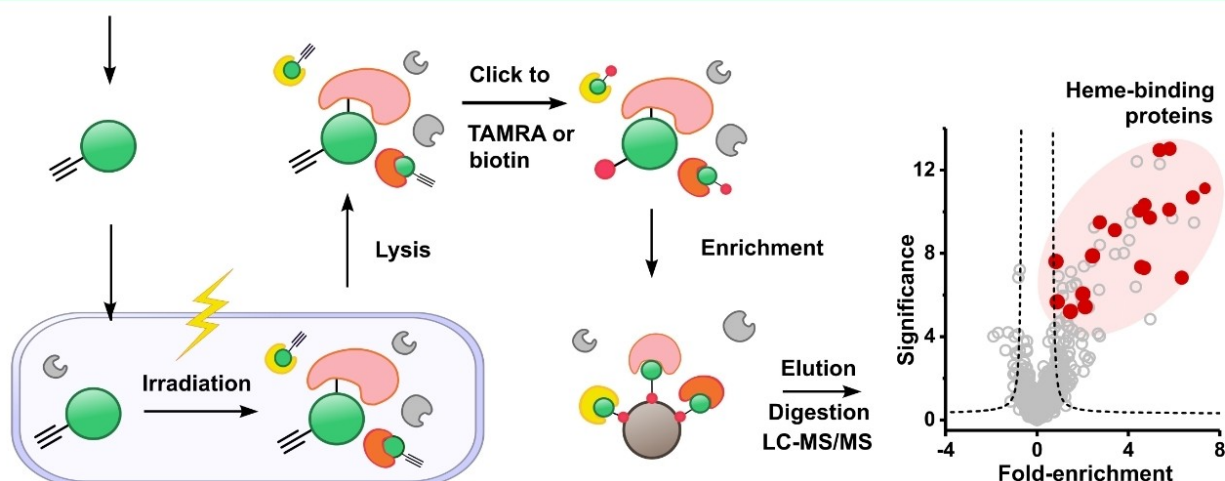
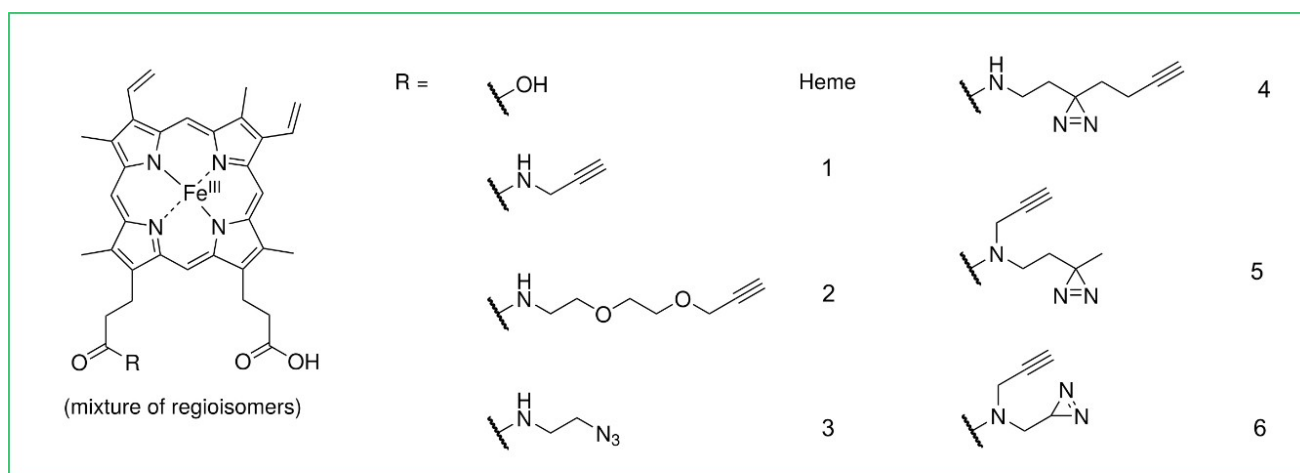


Abbildung 1. Strukturen der Alkin- und Azid-enthaltenden Häm-Sonden 1–3 und der Photoaffinitätssonden 4–6 sowie das Schema der chemischen Proteomik-Strategie zur Untersuchung des Häm-bindenden Proteoms. Lebende Zellen werden mit einer ausgewählten Häm-Sonde behandelt, wobei Photoaffinitätssonden bestrahlt werden (300 oder 365 nm), um eine kovalente Bindung an benachbarte Biomoleküle zu ermöglichen. Die behandelten Zellen werden lysiert und die Sonden markierten Zellen über eine kupferkatalysierte Cycloaddition oder eine Staudinger-Reaktion an Biotin oder TAMRA gebunden. Fluorophor-markierte Proben werden mittels SDS-PAGE und Gelfluoreszenz analysiert, während biotinylierte Proben an Avidin-Kügelchen angereichert werden. Die angereicherten Proteine werden reduziert, alkyliert und verdaut, und die resultierenden Peptide werden vor der Analyse durch Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) zur Identifizierung entsalzt. SDS-PAGE: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese; TAMRA: Tetramethylrhodamin.

dass eine maximale Identifizierung der bindenden Proteine am besten durch die parallele Verwendung mehrerer Photoaffinitäts-Sonden erreicht werden kann.^[51] Daher wurden auch Photoaffinitäts-Häm-Sonden synthetisiert, die einen linearen, verzweigten oder terminalen Diazirin-Photocrosslinker enthalten (Sonden 4, 5 bzw. 6, Abbildung 1).

Die Fähigkeit der sechs synthetisierten Häm-Sonden unmodifiziertes Häm in einem zellulären Kontext biologisch nachzuahmen, wurde überprüft. Eine Trennung der Regioisomere der einzelnen Sonden 1–6 war nicht möglich, jedoch wird spekuliert, dass die gemeinsame Dosierung des regioisomeren Gemisches der Monoamide die Abdeckung des zugänglichen Häm-bindenden Proteoms erhöht, da bei einigen Häm-Bindungsstellen eine bestimmte Propionatgruppe (aber nicht die andere) an der Proteinbindung beteiligt ist.^[36] Daher würde die Verwendung beider Isomere zusammen idealerweise nur diejenigen Stellen vom Zugang aus-

schließen, die beide Propionatgruppen für die Bindung benötigen.

Erste Experimente wurden mit dem Häm-auxotrophen grampositiven Bakterium *Enterococcus faecalis* (Stamm V583) durchgeführt, einem fakultativ anaeroben Bakterium, das keine Häm Biosynthese besitzt, aber in Gegenwart von exogen zugeführtem Häm die Expression von Häm-bindenden Proteinen aktiviert.^[52] *E. faecalis* V583-Zellen, die in TSBG-Medium (tryptische Sojabouillon mit 1 % Glukose, die $< 0.05 \mu\text{M}$ Häm enthält^[53]) kultiviert wurden, wurden 6 Stunden lang in der exponentiellen Phase mit der Alkin-Sonde 1 ($5 \mu\text{M}$), Heminchlorid ($10 \mu\text{M}$) oder DMSO (Dimethylsulfoxid)-Vehikel (1 %) behandelt, und die Auswirkungen der Behandlung auf das Häm-bindende Proteom wurden mittels quantitativer Massenspektrometrie untersucht (Abbildung 2a). Erfreulicherweise wurde die Expression der Häm-regulierten Transport-Efflux-Pumpe HrtBA^[54] (EF 0792 und EF 0793), des Häm-Chaperon HemW

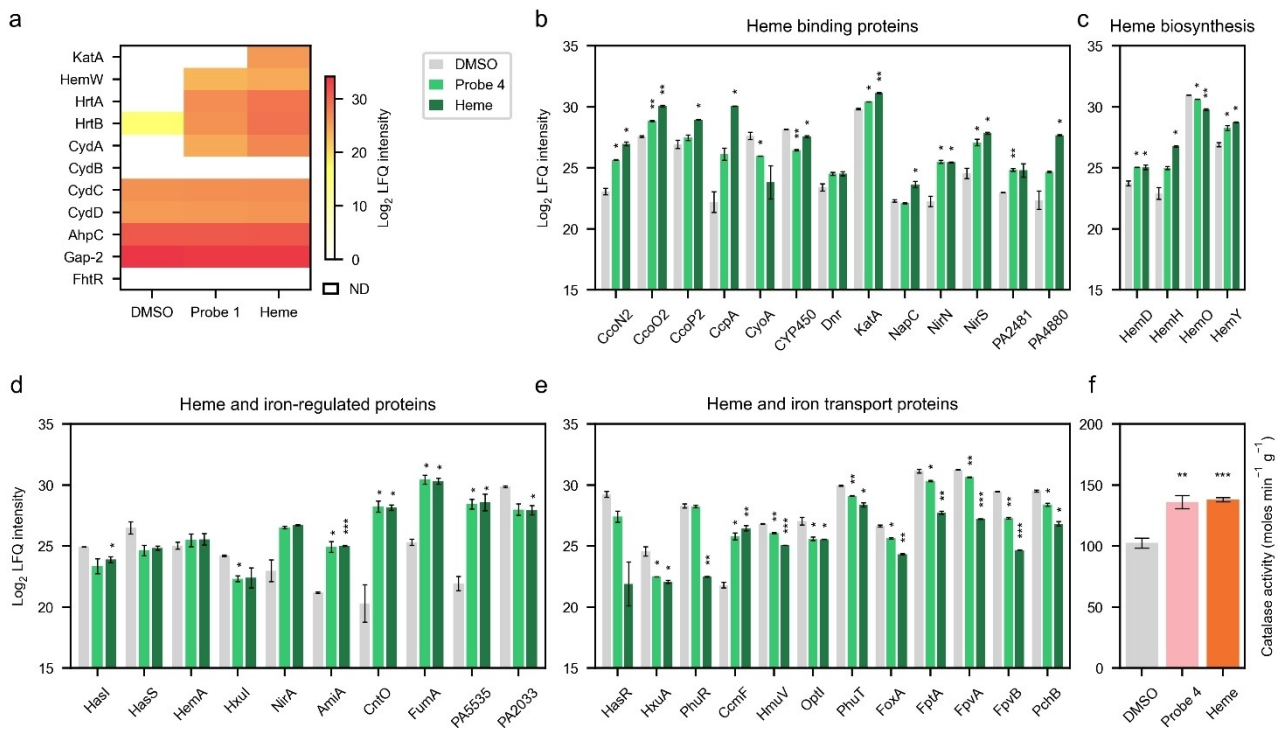


Abbildung 2. Validierung der Häm-Sonden. A) Heatmap der Abundanz Häm-bindender Proteine nach 6-stündiger Behandlung von *E. faecalis* V583-Zellen in der exponentiellen Phase mit Alkin-Sonde 1 (5 μ M), Hemin-Chlorid (10 μ M) oder DMSO-Vehikel (1 %); b) Abundanz Häm-bindender Proteine nach 6-stündiger Behandlung von *P. aeruginosa* PAO1 Zellen in der stationären Phase mit der Photoaffinitätssonde 4 (5 μ M) oder Häm (5 μ M); c) Abundanz der Häm-Biosynthesepoteine nach 6-stündiger Behandlung von PAO1 Zellen in der exponentiellen Phase mit der Photoaffinitätssonde 4; d) Abundanz der Häm- und eisenregulierten Proteine (HasI bis NirA bzw. AmiA bis PA2033) nach 1-stündiger Behandlung von PAO1 Zellen in der exponentiellen Phase mit der Photoaffinitätssonde 4; e) Häufigkeit der Häm- und Eisentransportproteine (HasR bis PhuT bzw. FoxA bis PA4514) nach 6-stündiger Behandlung von PAO1 Zellen in der Exponentialphase mit der Photoaffinitätssonde 4; f) Katalaseaktivität pro Gramm PAO1-Lysat, das aus Zellen gewonnen wurde, die in der Exponentialphase 6 Stunden lang mit DMSO, 4 (5 μ M) oder Hämchlorid (5 μ M) behandelt wurden. DMSO: Dimethylsulfoxid; LFQ: markierungsfreie Quantifizierung; ND: nicht nachgewiesen; alle Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar; die Sterne bezeichnen die mit dem t-Test berechnete Signifikanz: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$.

(EF 1305) und der Cytochrom bd-Untereinheit CydA in Gegenwart von Häm oder der Häm-Sonde 1 deutlich induziert. Die Expression der Häm-Transporter-Proteine CydC^[55,56] (EF 2058 und EF 2059) und der nicht-kanonischen Häm-Chaperone AhpC und Gap-2^[57] wurde weder durch die Behandlung mit Häm noch durch die Häm-Sonde 1 beeinflusst, während weder CydB noch der neu publizierte Häm-Transport-Regulator FhtR^[54] durch Massenspektrometrie nachgewiesen werden konnten. Die Expression der Häm-abhängigen Katalase KatA^[53] wurde jedoch nur in Gegenwart von Häm und nicht von Häm-Sonde 1 induziert. Die Analyse der publizierten KatA-Kristallstruktur^[58] zeigt, dass der Häm-Cofaktor stark im inneren des Proteins vergraben ist, wobei beide Propionatgruppen Salzbrücken mit Argininresten an der Bindungsstelle bilden, was erklärt, warum Monoamid 1 nicht in der Lage ist an dieser Stelle zu binden. Die Wachstumsrate von *E. faecalis* V583-Zellen in TSBG-Medium, das mit Sonde 1 ergänzt wurde, war langsamer als mit Häm, erreichte aber in der stationären Phase die gleiche maximale optische Dichte (Abbildung S2a). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Sonde 1 in lebenden Bakterien auf ähnliche Weise aufgenommen und eingebaut wird wie das unmodifizierte

Häm. Die Ausweitung der Studie auf die Sonden 2, 3 und 4 zeigte die gleiche Wirkung auf die Expression der Häm-bindenden Proteine, wie sie durch die Sonde 1 gezeigt wurde (Abbildung S3).

Als Nächstes wurde die Eignung der Sonden für Experimente in *Pseudomonas aeruginosa* analysiert, einem pathogenen gramnegativen Bakterium mit antibiotikaresistenten Stämmen, die dazu geführt haben, dass es von der WHO (Weltgesundheitsorganisation) als prioritäres Pathogen eingestuft wurde.^[59] *P. aeruginosa* kann Häm direkt aufnehmen über das sekretierte Hämophor HasAp.^[17,60,61] Die klinische Bedeutung des Verständnisses der Häm-Aufnahme wurde durch eine Studie an Mukoviszidose-Patienten unterstrichen, die zeigte, dass Mutationen, die sich in *P. aeruginosa* während der Infektion des Wirts entwickelten, die die Aufnahme von externem Häm als einzige Eisenquelle ermöglichten, Wachstumsvorteile verschafften und zu einer chronischen Infektion beitragen.^[62] *P. aeruginosa* PAO1 Zellen, die in einem chemisch definierten Minimalmedium ohne Eisen und Häm wuchsen, wurden ein oder sechs Stunden lang in der exponentiellen Phase oder sechs Stunden lang in der stationären Phase entweder mit der Photoaffinitätssonde 4 (5 μ M), mit Heminchlorid (5 μ M) oder mit

DMSO als Vehikel (1 %) behandelt, und die Auswirkungen der Behandlung auf das Proteom wurden mittels quantitativer Massenspektrometrie untersucht. Im Allgemeinen wurden die durch die Häm-Behandlung induzierten Veränderungen in der Proteinexpression auch bei der Behandlung mit der Häm-Sonde beobachtet. So werden beispielsweise die Cytochrom-c-Proteine CcoN2, CcoO2, CcoP2, CcpA, NirS und PA2481^[60] (die Häm kovalent binden) unter beiden Bedingungen hochreguliert (Abbildung 2b), ebenso die Häm-Biosynthesepoteine HemD, HemH und HemY (Abbildung 2c) und die eisenregulierten Proteine^[63] AmiA, CntO, FumA (PA4333) und PA5535 (Abbildung 2d). Die TonB-Häm-Transporter HasR, HxuA und PhuR werden jedoch in Gegenwart von 5 μM Häm herunterreguliert (höher als die typische Verfügbarkeit von Häm in eukaryotischen Zellen, die auf 0.025 bis 0.3 μM geschätzt wird^[64]), jedoch lediglich HasR und HxuA wurden auch durch die Photoaffinitätssonde 4 herunterreguliert. Von Ferri-Siderophor-Transportern wie FoxA, FptA, FpvA und FpvB wurde bereits berichtet, dass sie in Gegenwart von exogenem Häm herunterreguliert werden, was die Anpassung an den Eisenerwerb durch Häm gegenüber der Eisenaufnahme ermöglicht.^[60] Dementsprechend wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass diese Transporter entweder durch die Behandlung mit Häm oder mit der auf Häm basierenden

Photoaffinitätssonde 4 signifikant herunterreguliert werden (Abbildung 2e). Darüber hinaus wurde bei der Behandlung mit Häm und der Häm-Sonde eine Hochregulierung der Katalase-KatA-Expression und eine erhöhte Katalase-Aktivität beobachtet (Abbildung 2b,f). Schließlich förderte der Zusatz von chemisch definierten Minimalmedien mit Häm, Sonde 1 oder Sonde 4 jeweils das Wachstum von PAO1-Zellen im Vergleich zur Vehikelkontrolle (Abbildung S2b).

Nachdem gezeigt wurde, dass Amid funktionalisierte Häm-Sonden Häm in grampositiven und gramnegativen Spezies ersetzen können, wurde das Augenmerk auf die Anreicherung von Häm-bindenden Proteinen aus lebenden Zellen gerichtet. *E. faecalis* V583-Zellen, die in TSBG-Medium bis zur stationären Phase wuchsen, wurden 1 Stunde lang (37 °C, 200 Umin⁻¹) mit Sonde 1, 2 oder 3 (5 μM) mit und ohne Häm (10 μM) oder DMSO-Vehikel (1 %) behandelt. Überschüssige Sonde wurde durch Waschen entfernt und nach der Lyse wurden die markierten Proteine an Tetramethylrhodamin (TAMRA) Azid (Abbildung S4) oder Biotin Azid für die Anreicherung mit Streptavidin-Kügelchen geklickt. 5 hämbindende Proteine (45 %) wurden durch quantitative Massenspektrometrie als zweifach angereichert gegenüber der Kontrolle nachgewiesen (Abbildung 3a, Tabelle S1 Liste der bis dato bekannten Häm-bindenden Proteine von *E. faecalis* V583).

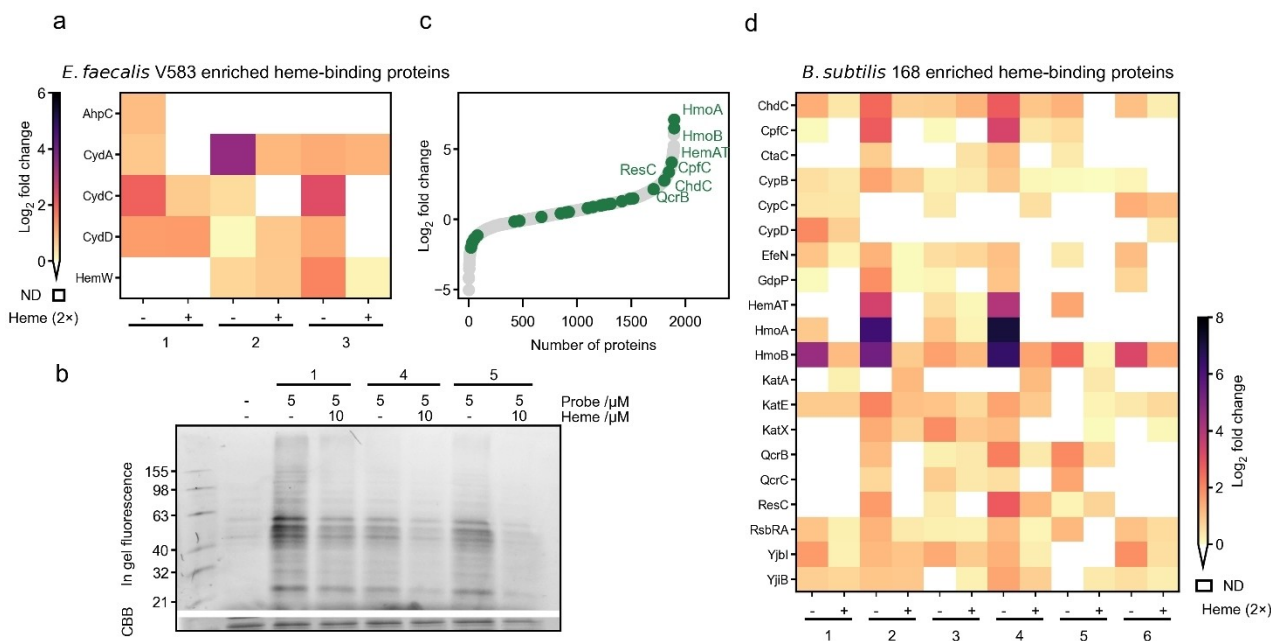


Abbildung 3. Untersuchung des Häm-bindenden Proteoms in den grampositiven Stämmen *E. faecalis* V583 (ein Häm auxotropher Stamm) und *B. subtilis* 168. a) Heatmap der Häm-bindenden Proteine, die durch die Sonden 1, 2 und 3 (5 μM) im Vergleich zur Co-Behandlung mit Häm (+, 10 μM) oder DMSO-Vehikelkontrolle (-, 1 %) in lebenden *E. faecalis* V583-Zellen angereichert wurden. Es werden nur Proteine gezeigt, die durch mindestens eine Sonde zweifach angereichert sind; b) Profiling von Häm-bindenden Proteinen in *B. subtilis* 168 unter Verwendung der Sonden 1, 4 und 5 (5 μM). Die mit TAMRA behandelten Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die markierten Proteine durch Fluoreszenz im Gel sichtbar gemacht. Der Gesamtproteingehalt wurde mit Coomassie Brilliant Blue (CBB) sichtbar gemacht; c) Wasserfalldiagramm der Proteine, die durch die Alkin-Sonde 1 (5 μM) im Vergleich zur DMSO-Vehikelkontrolle (1 %) in lebenden Zellen des *B. subtilis*-Stammes 168 angereichert wurden, grün: Häm-bindende Proteine, von denen diejenigen, die die Kriterien \log_2 fold change > 2 und $p < 0.05$ erfüllen, markiert sind; d) Heatmap der Häm-bindenden Proteine, die durch die Sonden 1–6 (5 μM) im Vergleich zur Co-Behandlung mit Häm (+, 10 μM) oder DMSO-Vehikelkontrolle (-, 1 %) in lebenden *B. subtilis* Stamm 168 angereichert wurden. Es werden nur Proteine gezeigt, die durch mindestens eine Sonde zweifach angereichert sind. ND: nicht nachgewiesen; SDS-PAGE: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese; TAMRA: Tetramethylrhodamin.

Aufbauend darauf, dass die Methode grundsätzlich in *E. faecalis* V583-Zellen funktioniert, wurde dieselbe Methodik auf den grampositiven Modellorganismus *B. subtilis* angewandt, der exogenes Häm für die Cytochrom-c-Synthese nutzen kann^[65] oder um den Verlust der Häm-Biosynthese in einer *HemA*-Mutante^[66] zu überwinden. Die Behandlung von *B. subtilis* (Stamm 168) mit den Sonden 1, 4 oder 5 (5 μM) mit und ohne Häm (10 μM) oder DMSO-Vehikel (1 %) für 1 h (37 °C, 200 U min^{-1}), gefolgt von einer Bestrahlung (5 min, 365 nm) für die Photoaffinitäts- und Klick an TAMRA, führte zu einer Sonden-abhängigen Markierung, die in Gegenwart eines 2-fachen Überschusses an Häm verdrängt werden konnte (Abbildung 3b). Die Untersuchung mit allen sechs Häm-Sonden führte zur Identifizierung von 20 Häm-bindenden Proteinen (Abbildung 3d, Tabelle S2 Liste der bisher bekannten Häm-bindenden Proteine von *B. subtilis* (Stamm 168) (kürzlich überarbeitet^[67])), wobei die Häm-Monooxygenasen HmoA und HmoB die signifikantesten Treffer waren (Abbildung 3c). Interessanterweise wurde eine große Anzahl reversibel bindender Häm-Proteine auch durch Sonden ohne Photocrosslinker angereichert, was darauf hindeutet, dass Proteine mit einem stark gebundenen Cofaktor während der gesamten Proben-vorbereitung eine stabile Bindung haben. Dies steht im Einklang mit früheren Publikationen über ungefaltete Häm-bindende Polypeptide, die ihre Wechselwirkung mit dem Häm-Cofaktor beibehalten.^[68–70]

Der nächste Fokus in dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des Häm-bindenden Proteoms in gramnegativen Stämmen. Zunächst wurden *P. aeruginosa* PAO1-Zellen, die in LB-Medium bis zur stationären Phase wuchsen, in chemisch definiertem Minimalmedium resuspendiert und mit den Sonden 1–6 (5 μM) mit und ohne Häm (10 μM) oder DMSO-Vehikel (1 %) für 1 h (37 °C, 200 U min^{-1}) behandelt, gefolgt von einer Bestrahlung (5 min, 365 nm für die Alkyldiazirin-Sonden 4 und 5 bzw. 300 nm für die terminale Diazirin-Sonde 6, sowie begleitende DMSO-Kontrollen). Nach der Lyse, dem Anklicken von Biotin und der Anreicherung mit Streptavidin-Kügelchen wurde festgestellt, dass zahlreiche Häm-bindende Proteine durch die Sonden selektiv angereichert und in Gegenwart eines zweifachen Überschusses an Häm verdrängt wurden, was auf eine Häm-spezifische Bindung hindeutet (Abbildungen 4a,b,f, Tabelle S3 Liste der bisher bekannten Häm-bindenden Proteine von *P. aeruginosa* PAO1). Eine Gen Ontologie Analyse^[71] der molekularen Funktion von den Proteinen, die von den Häm-Sonden gebunden wurden und in Gegenwart von überschüssigem Häm konkurrieren, ergab eine Anreicherung von Häm-bekannt Funktionen wie Cytochrom-c-Peroxidase- und Oxidase-Aktivität, Häm-Bindung und Oxidoreduktase-Aktivität (z. B. Abbildung 4d für Sonde 3).

Die Untersuchung des Häm-Proteoms wurde auch unter Verwendung der Photoaffinitäts-sonde 4 unter verschiedenen Bedingungen untersucht, z. B. während der exponentiellen Phase, nach 4-stündigem Nährstoffmangel und nach Wachstum ausschließlich in chemisch definierten Minimalmedien (Abbildung 4c), da das Wachstumsstadium und die Nährstoffverfügbarkeit bekanntermaßen die Proteinexpression

beeinflussen^[60,63,72–74] und daher die Identifizierung von Häm-bindenden Proteinen ermöglichen könnten, die zuvor nicht nachgewiesen werden konnten. Mit den sechs Sonden und sieben verschiedenen Markierungsbedingungen wurden insgesamt 57 verschiedene Häm-bindende PAO1-Proteine identifiziert (Abbildung 4f). Einige, wie die Häm-Oxygenase HemO und das Häm-Chaperon CcmE, waren über mehrere Sonden und Bedingungen hinweg signifikant und selektiv angereichert, während andere, wie die Nitrit-Reduktase NirS und das potentielle Cytochromc PA4571, nur in einer Teilmenge der Bedingungen identifiziert wurden, was die Notwendigkeit unterstreicht verschiedene Sonden und Markierungsbedingungen zur Maximierung der Häm-Protein Abdeckung zu nutzen. Darüber hinaus wurde die Untersuchung des Häm-Proteoms auch in Zell Lysaten durchgeführt, was zu einer deutlich geringeren Anreicherung von Häm-bindenden Proteinen im Vergleich zur Untersuchung in lebenden Zellen führte (Abbildung 4f), was die Vorteile unserer in situ Strategie unterstreicht. Die Analyse der identifizierten Häm-bindenden Proteine zeigte, dass sowohl Proteine, die Häm kovalent binden (sie enthalten Häm c, 43 % der insgesamt identifizierten Proteine) als auch nicht-kovalent gebundene Proteine mit unseren Häm-Sonden leicht zugänglich sind (Abbildung 4e).

Schließlich wurde die Untersuchung des Häm-Proteoms in dem uropathogenen *Escherichia coli* Stamm CFT073 durchgeführt, der die TonB-abhängigen Häm-Transporter ChuA und Hma (c2482) exprimiert, die für die Virulenz bei Mäusen erforderlich sind.^[75,76] In CFT073-Zellen, die in chemisch definiertem Minimalmedium angewachsen sind und 1 Stunde lang in der Exponentialphase mit der Sonde 4 behandelt wurden (Bedingung EMM, Photoaffinitäts-sonde 4, 5 μM), konnten Häm-bindenden Proteine gegenüber nicht Häm-bindenden Proteinen signifikant angereichert werden ($p=0.00465$, Abbildung 4g, Tabelle S4 Liste der bisher bekannten Häm-bindenden Proteine des *E. coli*-Stammes CFT073). Über die Sonden 1, 4 und 5 und vier verschiedenen Markierungsbedingungen in lebenden Zellen wurden 15 Häm-bindende Proteine gefunden, darunter Häm-Enzyme (ChuS, EfeB, HemH, Hmp, SdhC, YfeX), Transporter (ChuA) und Chaperone (CcmE) (Abbildung 4h).

Ein Vorteil der umfassenden, unvoreingenommenen experimentellen Untersuchung des Proteoms ist die Möglichkeit, bisher nicht annotierte, potenzielle Häm-Interaktoren zu identifizieren oder rechnerische Vorhersagen zu bestätigen. So wurde z. B. für die *P. aeruginosa* PAS1-Domäne, die die redoxabhängige Sensor kinase MxtR (PA3271)^[77] enthält, kürzlich durch Sequenzabgleich^[78] eine Bindung von Häm vorhergesagt und in dieser Arbeit wurde das Protein durch die Photoaffinitäts-sonde 6 um das Zweifache angereichert gegenüber der Vehikelkontrolle (Abbildung 5a, $p=0.039$). Die Filterung der Daten nach Proteinen, die bisher nicht als Häm-Binder beschrieben wurden und die in mindestens zwei Bedingungen mindestens dreifach gegenüber den DMSO- und kompetierenden Häm-Kontrollen angereichert waren, führte zu einer Liste potenzieller Häm-Interaktoren für jede Spezies (Abbildung 5b, Aufschlüsselung der Anreicherung pro Bedingung in Abbildung S5). Da diesen Proteinen, die in die engere Wahl

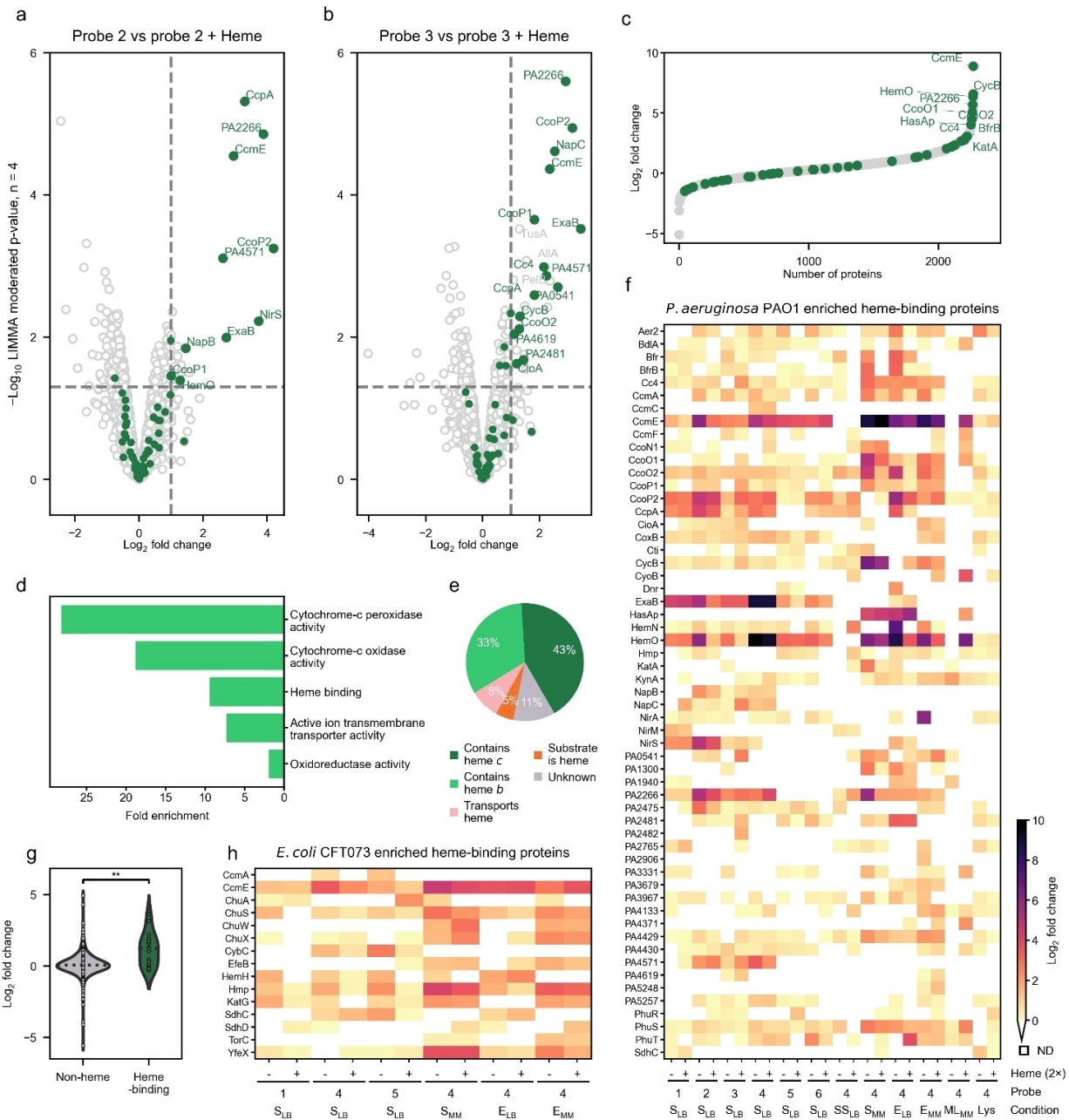


Abbildung 4. Untersuchung von Häm-bindenden Proteinen in den gramnegativen Stämmen *P. aeruginosa* PAO1 und *E. coli* CFT073. Volcano-Plots von Proteinen, die durch Alkin-Sonde 2 (a, 5 μ M) oder Azid-Sonde 3 (b, 5 μ M) in lebenden PAO1-Zellen angereichert wurden. Grüne Punkte: Häm-bindende Proteine, Schwellenwerte: \log_2 -Fold Change > 1 und $p < 0.05$. Fold change und Signifikanz der Proteinanreicherung bei der Behandlung mit der Sonde im Vergleich zur Co-Behandlung mit Häm (2-facher Überschuss) wurden mit einem LIMMA-moderierten t-Test (implementiert in R) berechnet; c) Wasserfalldiagramm der durch die Photoaffinitätssonde 4 (5 μ M) im Vergleich zur DMSO-Vehikelkontrolle (1 %) in lebenden PAO1-Zellen angereicherten Proteine, grün: Häm-bindende Proteine, die die Kriterien \log_2 fold change > 2.75 und $p < 0.05$ erfüllen; d) Gen Ontologie Analyse^[71] der molekularen Funktionen der Proteine, die mit einem \log_2 -Fold-Change > 1 in dem Volcano-Plot (b) angereichert sind; e) Tortendiagramm der gesamten zweifach angereicherten Häm-bindenden Proteine aus PAO1, sortiert nach Art der Häm-Bindung, Aufschlüsselung in Tabelle S5; f) Heatmap der durch die Sonden 1–6 (5 μ M) angereicherten Häm-bindenden Proteine im Vergleich zur Co-Behandlung mit Häm (+, 10 μ M) oder DMSO-Vehikelkontrolle (–, 1 %) in lebenden PAO1-Zellen. Es werden nur Proteine gezeigt, die durch mindestens eine Sonde zweifach angereichert sind. Die Bedingung im Index bezeichnet das Medium, in dem die Zellen angewachsen sind; die Behandlungen wurden in chemisch definiertem Minimalmedium durchgeführt; g) Violin-plot der Proteine, die durch die Photoaffinitätssonde 4 in *E. coli* CFT073-Zellen angereichert wurden, zeigt eine signifikante Anreicherung von Häm-bindenden Proteinen, $p = 0.00465$ bestimmt mit Welch's t-test; h) Heatmap der Häm-bindenden Proteine, die durch die Sonden 1, 4 und 5 (5 μ M) im Vergleich zur Co-Behandlung mit Häm (+, 10 μ M) oder DMSO-Vehikelkontrolle (–, 1 %) in lebenden *E. coli* CFT073-Zellen angereichert wurden. Es werden nur Proteine gezeigt, die von mindestens einer Sonde zweifach angereichert wurden, Farbbalken und Markierungen sind mit (f) identisch. Der Index der Bedingungen bezeichnet das Medium, in dem die Zellen gezüchtet wurden; die Behandlungen wurden in chemisch definiertem Minimalmedium durchgeführt. E: Markierung in der Exponentialphase; ML: metabolische Markierung; LIMMA: Linear Model to Microarray Data; Lys: Lysatmarkierung; ND: nicht nachgewiesen; S: Markierung in der stationären Phase; SS: Markierung in der hungrigen stationären Phase.

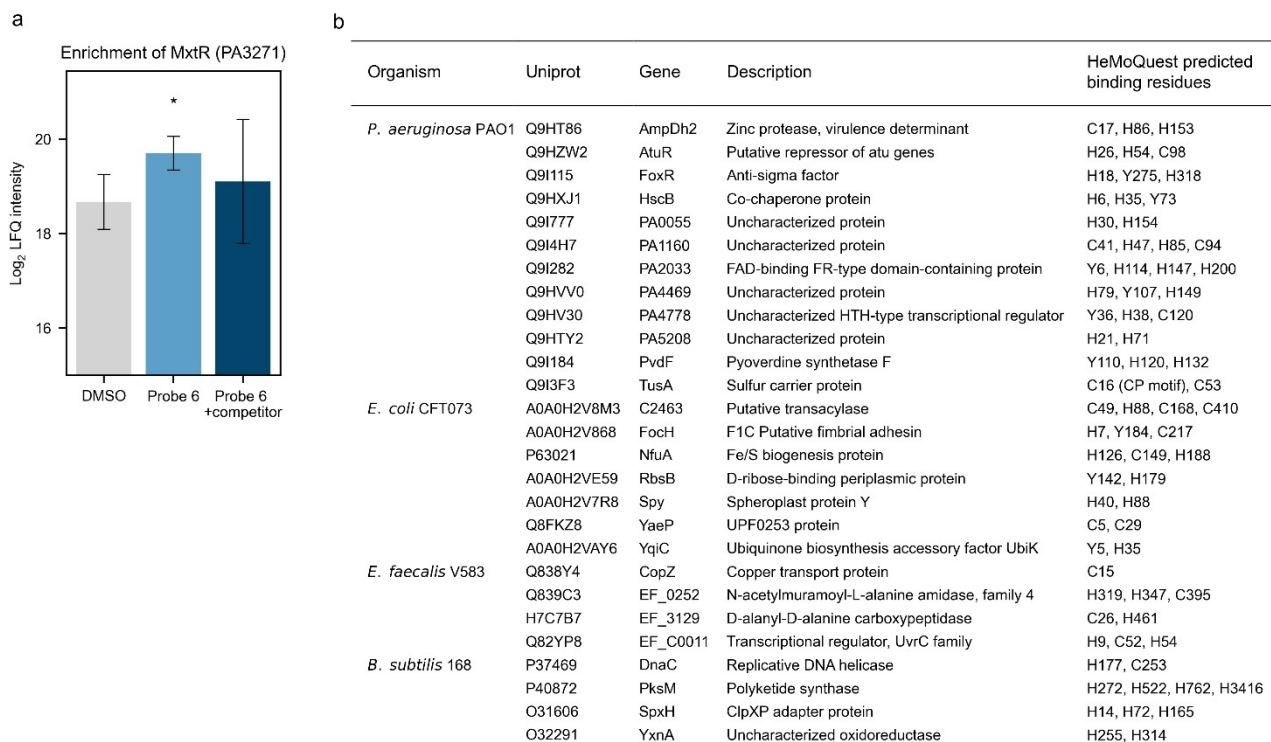


Abbildung 5. Chemische Proteomik Untersuchung zeigt potenzielle Häm-Interaktoren. a) Anreicherung der Sensorkinase MxtR (PA3271), von der kürzlich vorhergesagt wurde, dass sie Häm bindet, durch die terminale Diazirinsonde 6, $p = 0.039$. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar; b) Tabelle der am stärksten angereicherten, bisher nicht annotierten, potenziellen Häm-Interaktor-Proteine ($p < 0.05$, Aufschlüsselung der Anreicherung pro Bedingung in Abbildung S5). Die Vorhersage der Häm-bindenden Reste wurde mit dem HeMoQuest-Webserver^[25] durchgeführt; Reste mit vorhergesagter Bindungsaffinität $\leq 3 \mu\text{M}$ sind angegeben. LFQ: markierungsfreie Quantifizierung.

genommen wurden, jeweils die kanonische CXXCH-Sequenz fehlte, die auf eine Bindung von Häm c hinweist, wurde der HeMoQuest-Webserver^[25] eingesetzt, um mit dem dazugehörigen Algorithmus SeqD-HBM^[24] transiente Häm-Bindungsmotive zu identifizieren. Dieses Tool prognostiziert auch die Häm-Bindungsaffinitäten der einzelnen Motive mit Hilfe eines maschinellen Lernansatzes, der anhand experimenteller Daten trainiert wurde. Die jeweiligen Bindungsstellen mit einer prognostizierten Affinität $< 3 \mu\text{M}$ sind in Abbildung 5b aufgeführt. Unter den in die engere Wahl gezogenen Proteinen befinden sich viele uncharakterisierte Proteine, aber auch plausible Häm-Binder aufgrund ihrer bekannten Funktionen, wie z. B. die putative Oxidoreduktase YxnA aus *B. subtilis* 168 oder das putativ Eisen nutzende PAO1 Protein PA2033, das ebenfalls als Oxidoreduktase annotiert ist.

Um die Häm-Bindung an die identifizierten Proteintreffer zu validieren, haben wir exemplarisch drei Proteine für rekombinante Expression und Markierung ausgewählt. Die Häm-Oxygenase HmoB aus *B. subtilis* diente als Positivkontrolle zusammen mit den zwei nicht charakterisierten Proteinen Spy (*E. coli*) und PA2033 (*P. aeruginosa*), von denen nicht bekannt ist, dass sie Häm binden. Erfreulicherweise zeigten alle Proteine eine Markierung mit der Häm-Sonde sowie eine konzentrationsabhängige Konkurrenz mit freiem Häm, was die Zuverlässigkeit unseres Ansatzes unterstreicht (Abbildung S6).

Zusammenfassung

Auf der Suche nach einer chemischen Proteomik-Strategie für die Untersuchung Häm-bindender Proteine wurden sechs Sonden auf der Basis von Häm durch Amid Funktionalisierung einer der beiden Propionat-Seitenketten synthetisiert. Unter diesen sechs Sonden befanden sich drei Diazirin enthaltende Photoaffinitätssonden. Vergleichende Proteomik-Studien zeigten, dass die Häm-Sonden in lebenden grampositiven und -negativen Bakterien in ähnlicher Weise aufgenommen und eingebaut wurden wie unmodifiziertes Häm, und zwar sowohl in Häm-auxotrophen als auch in nicht -auxotrophen Bakterien. Diese Sonden wurden dann zur Anreicherung und Identifizierung Häm-bindender Proteine aus lebenden Zellen von *E. faecalis* V583, *B. subtilis* 168, *P. aeruginosa* PAO1 und *E. coli* Stamm CFT073 verwendet (Abbildung 6a). Diese Methodik ermöglichte die Anreicherung von Häm-bindenden Proteinen, die sich in Funktion und Art der Häm-Bindung unterscheiden (Abbildung 4d,e), und gleichzeitig die Anreicherung von Homologen in den untersuchten Spezies, z. B. Häm-Chaperone (CcmE oder PhuS/ChuS), Häm-Enzyme (Hmp, SdhC oder EfeB/EfeN), Häm-Rezeptoren (PhuR/ChuA) und Transporter (CcmA/CydD) (Abbildung 6b, Tabelle S6). Die Kombination mehrerer Sonden und verschiedener Wachstumsbedingungen war erforderlich, um die Abdeckung der angereicherten Häm-bindenden Proteine zu erhöhen. So

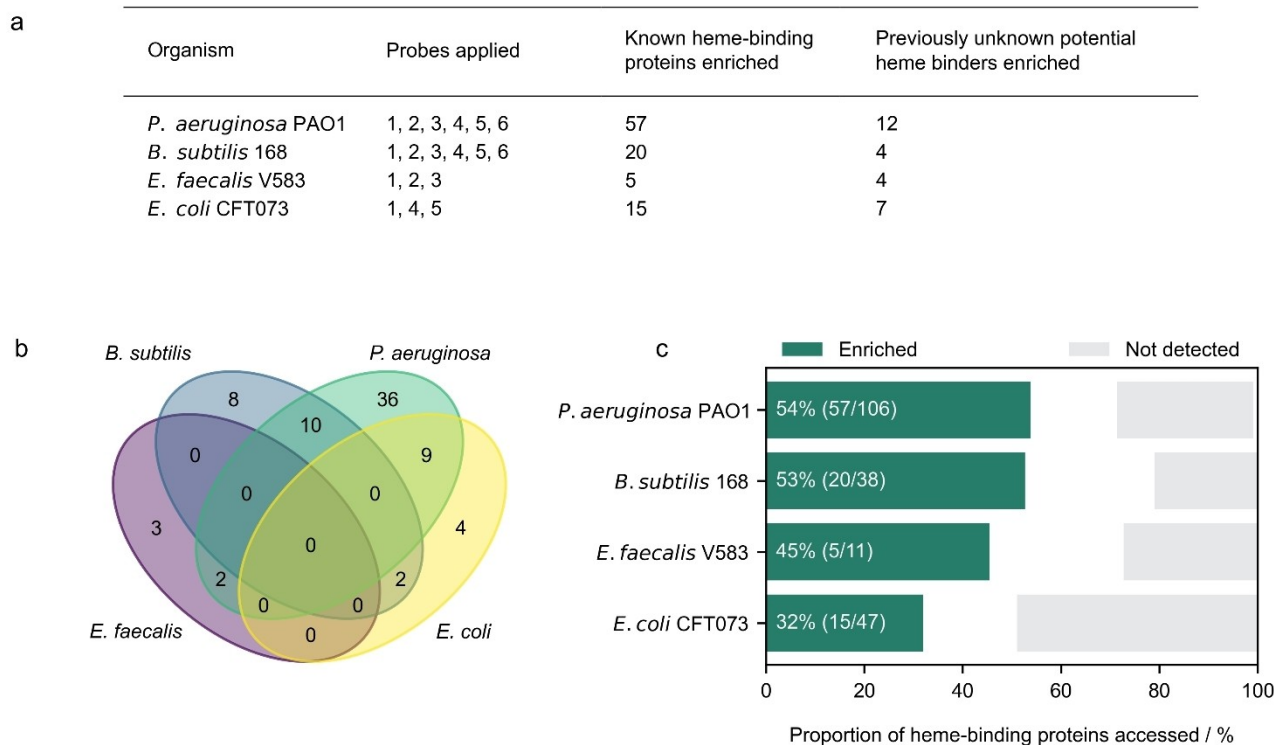


Abbildung 6. Zusammenfassung des in dieser Arbeit erstellten Häm-Bindungs-Proteom-Profiles. a) Zusammenfassende Tabelle der untersuchten Organismen und der verwendeten Sonden; b) Venn-Diagramm der in dieser Studie angereicherten Häm-Bindungs-Proteine, wobei identifizierte Homologe (die mit Blastp^[82] als Sequenzen mit signifikanter Übereinstimmung bestimmt wurden) in den Kreuzungspunkten platziert sind. Alle Homologe sind in Tabelle S6 aufgeführt; c) Anteil der Häm-bindenden Proteine, auf die in dieser Arbeit in den vier untersuchten Stämmen zugegriffen wurde.

wurden in dieser Arbeit 32–54 % des gesamten Häm-bindenden Proteoms in den vier verschiedenen Bakterienarten angereichert (Abbildung 6c), wobei ein leicht anpassbarer und einfach zu implementierender Versuchsaufbau verwendet wurde. Von den bekannten Häm-bindenden Proteinen, die durch diese Strategie nicht angereichert wurden, wurden signifikante Anteile überhaupt nicht durch Massenspektrometrie nachgewiesen (Abbildung 6c). Eine Verbesserung der Abdeckung des Häm-bindenden Proteoms für eine bestimmte Zielspezies kann durch die Optimierung der Markierungsbedingungen oder die Verwendung von Methoden zur Erhöhung der Tiefe der Proteomabdeckung erreicht werden.^[79–81]

Diese Methode zur umfassenden Charakterisierung von Häm-bindenden Proteinen in lebenden Zellen stellt einen technologischen Fortschritt gegenüber allen bisherigen Publikationen dar und könnte ohne weiteres auf andere Häm-aufnehmende Zelltypen übertragen werden. Dazu gehören Krankheitserreger wie *Staphylococcus aureus*,^[83] *Listeria monocytogenes*^[84] oder *Aspergillus*-Arten,^[85] oder Häm-Autotrophe wie *Haemophilus influenzae*,^[86] *Streptococcus pneumoniae*,^[87,88] marine Mikroben^[89] oder *Caenorhabditis elegans*.^[90] Da eine Dysregulation des Häm-Transports und der Häm-Regulierung die bakterielle Pathogenität verringert und die Häm-Homöostase für das bakterielle Überleben essentiell ist, sind Häm-bindende Proteine vielversprechende Zielstrukturen für Medikamente.^[3,12] Die

Untersuchung von Häm-bindenden Proteinen könnte daher die Identifizierung neuer antibiotischer Zielstrukturen ermöglichen und wertvolle Einblicke in die Häm-Regulierung und -Biologie liefern.

Danksagung

I.V.L. Wilkinson dankt der Europäischen Organisation für Molekularbiologie für die finanzielle Unterstützung (ALTF 484-2020). Y.E.H. dankt Till Reinhardt für die Betreuung des Praktikums. SAS dankt dem Europäischen Forschungsrat (ERC) und dem Forschungs- und Innovationsprogramm Horizont 2020 der Europäischen Union (Finanzhilfevereinbarung Nr. 725085, CHEMMINE, ERC Consolidator Grant). Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Proteomikdaten wurden beim ProteomeXchange-Konsortium^[91] über das Partner-Repository PRIDE^[92] hinterlegt. Die Daten sind über ProteomeXchange mit der Kennung PXD036133 verfügbar.

Stichwörter: Chemische Sonden · Cofaktoren · Häm-Proteine · Photoaffinitätsmarkierung · Proteomik

- [1] H. M. Girvan, A. W. Munro, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 13194–203.
- [2] T. Shimizu, A. Lengalova, V. Martínek, M. Martínková, *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 5624–5657.
- [3] H. H. Brewitz, G. Hagelueken, D. Imhof, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2017**, *1861*, 683–697.
- [4] T. Shimizu, D. Huang, F. Yan, M. Stranova, M. Bartosova, V. Fojtíková, M. Martínková, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 6491–6533.
- [5] X. Yuan, N. Rietzschel, H. Kwon, A. B. W. Nuno, D. A. Hanna, J. D. Phillips, E. L. Raven, A. R. Reddi, I. Hamza, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E5144–E5152.
- [6] A. E. Gallio, S. S.-P. Fung, A. Cammack-Najera, A. J. Hudson, E. L. Raven, *JACS Au* **2021**, *1*, 1541–1555.
- [7] T. Li, H. L. Bonkovsky, J. Guo, *BMC Struct. Biol.* **2011**, *11*, 13.
- [8] R. D. Latham, M. Torrado, B. Atto, J. L. Walshe, R. Wilson, J. M. Guss, J. P. Mackay, S. Tristram, D. A. Gell, *Mol. Microbiol.* **2020**, *113*, 381–398.
- [9] S. Che, Y. Liang, Y. Chen, W. Wu, R. Liu, Q. Zhang, M. Bartlam, *FEBS J.* **2022**, *289*, 1911–1928.
- [10] D. Khan, D. Lee, G. Gulten, A. Aggarwal, J. Wofford, I. Krieger, A. Tripathi, J. W. Patrick, D. M. Eckert, A. Laganowsky, J. Sacchetti, P. Lindahl, V. A. Bankaitis, *eLife* **2020**, *9*, e57081.
- [11] C. C. Murdoch, E. P. Skaar, *Nat. Rev. Microbiol.* **2022**, *20*, 657–670.
- [12] J. E. Choby, E. P. Skaar, *J. Mol. Biol.* **2016**, *428*, 3408–28.
- [13] A. D. Smith, A. Wilks, *Current Topics in Membranes*, Academic Press, New York, **2012**, S. 359–392.
- [14] C. Andreini, V. Putignano, A. Rosato, L. Banci, *Metallomics* **2018**, *10*, 1223–1231.
- [15] G. C. Lechuga, M. C. S. Pereira, S. C. Bourguignon, *J. Drug Targeting* **2019**, *27*, 767–779.
- [16] A. Mitra, Y.-H. Ko, G. Cingolani, M. Niederweis, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4260.
- [17] K. L. Richard, B. R. Kelley, J. G. Johnson, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 81.
- [18] R. Liu, J. Hu, *PLoS One* **2011**, *6*, e25560.
- [19] Y. Xiong, J. Liu, W. Zhang, T. Zeng, *Proteome Sci.* **2012**, *10*, S20.
- [20] D. J. Yu, J. Hu, J. Yang, H. Bin Shen, J. Tang, J. Y. Yang, *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinf.* **2013**, *10*, 994–1008.
- [21] Y. F. Liou, P. Charoenkwan, Y. Srinivasulu, T. Vasylenko, S.-C. Lai, H.-C. Lee, Y.-H. Chen, H.-L. Huang, S.-Y. Ho, *BMC Bioinf.* **2014**, *15*, S4.
- [22] J. Zhang, H. Chai, B. Gao, G. Yang, Z. Ma, *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinf.* **2018**, *15*, 147–156.
- [23] R. Liu, J. Hu, *BMC Bioinf.* **2011**, *12*, 207.
- [24] A. Wißbrock, A. A. P. George, H. H. Brewitz, T. Kühl, D. Imhof, *Biosci. Rep.* **2019**, *39*, 20181940.
- [25] A. A. Paul George, M. Lacerda, B. F. Syllwasschy, M. T. Hopp, A. Wißbrock, D. Imhof, *BMC Bioinf.* **2020**, *21*, 124.
- [26] N. Wang, J. Zhang, L. Zhang, X.-Y. Yang, N. Li, G. Yu, J. Han, K. Cao, Z. Guo, X. Sun, Q.-Y. He, *Metallomics* **2014**, *6*, 1451.
- [27] M. J. Burton, J. Cresser-Brown, M. Thomas, N. Portolano, J. Basran, S. L. Freeman, H. Kwon, A. R. Bottrill, M. J. Llansola-Portoles, A. A. Pascal, R. Jukes-Jones, T. Chernova, R. Schmid, N. W. Davies, N. M. Storey, P. Dorlet, P. C. E. Moody, J. S. Mitcheson, E. L. Raven, *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 13277–13286.
- [28] M. Azuma, Y. Kabe, C. Kuramori, M. Kondo, Y. Yamaguchi, H. Handa, *PLoS One* **2008**, *3*, e3070.
- [29] B. R. Otto, S. J. M. Van Dooren, J. H. Nuijens, J. Luirink, B. Oudega, *J. Exp. Med.* **1998**, *188*, 1091–1103.
- [30] B. C. Lee, *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 810–816.
- [31] X. Li, X. Wang, K. Zhao, Z. Zhou, C. Zhao, R. Yan, L. Lin, T. Lei, J. Yin, R. Wang, X. Feng, S. Liu, *Genomics Proteomics Bioinf.* **2003**, *1*, 78–86.
- [32] V. C. Tsolaki, S. K. Georgiou-Siafis, A. I. Tsamadou, S. A. Tsiftoglou, M. Samiotaki, G. Panayotou, A. S. Tsiftoglou, *J. Cell. Physiol.* **2022**, *237*, 1315–1340.
- [33] R. A. Homan, A. M. Jadhav, L. P. Conway, C. G. Parker, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 15013–15019.
- [34] I. V. L. Wilkinson, M. Pfanzelt, S. A. Sieber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202201136; *Angew. Chem.* **2022**, *134*, e202201136.
- [35] S. Schneider, J. Marles-Wright, K. H. Sharp, M. Paoli, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 621–630.
- [36] L. J. Smith, A. Kahraman, J. M. Thornton, *Proteins Struct. Funct. Bioinf.* **2010**, *78*, 2349–2368.
- [37] C. G. Parker, M. R. Pratt, *Cell* **2020**, *180*, 605–632.
- [38] I. C. Reynhout, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2327–2332.
- [39] A. Amirshaghghi, B. Altun, K. Nwe, L. Yan, J. M. Stein, Z. Cheng, A. Tsourkas, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 13550–13553.
- [40] F. Liu, A. Soh Yan Ni, Y. Lim, H. Mohanram, S. Bhattacharjya, B. Xing, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 1639–1647.
- [41] A. Nakagawa, N. Ohmichi, T. Komatsu, E. Tsuchida, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3108–3112.
- [42] I. Hamachi, K. Nakamura, A. Fujita, T. Kunitake, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4966–4970.
- [43] E. Monzani, L. Linati, L. Casella, L. De Gioia, M. Favretto, M. Gullotti, F. Chillemi, *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *273*, 339–345.
- [44] J. J. Woodward, N. I. Martin, M. A. Marletta, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 43–45.
- [45] I. Hamachi, S. Tanaka, S. Tsukiji, S. Shinkai, S. Oishi, *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 4380–4388.
- [46] T. Matsuo, T. Hayashi, Y. Hisaeda, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11234–11235.
- [47] K. Oohora, S. Burazerovic, A. Onoda, Y. M. Wilson, T. R. Ward, T. Hayashi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3818–3821; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 3884–3887.
- [48] M. Sosna, D. Papyane, E. E. Ferapontova, *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *728*, 18–25.
- [49] E. Smith, I. Collins, *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 159–183.
- [50] Z. Li, P. Hao, L. Li, C. Y. J. Tan, X. Cheng, G. Y. J. Chen, S. K. Sze, H.-M. Shen, S. Q. Yao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8551–8556; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 8713–8718.
- [51] L. P. Conway, A. M. Jadhav, R. A. Homan, W. Li, J. S. Rubiano, R. Hawkins, R. M. Lawrence, C. G. Parker, *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 7839–7847.
- [52] M. Baureder, L. Hederstedt, *PLoS One* **2012**, *7*, e36725.
- [53] L. Frankenberg, M. Brugna, L. Hederstedt, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 6351–6356.
- [54] V. Saillant, D. Lipuma, E. Ostyn, L. Joubert, A. Boussac, H. Guerin, G. Brandelet, P. Arnoux, D. Lechardeur, *mBio* **2021**, *12*, e03392-20.
- [55] D. Wu, A. R. Mehdipour, F. Finke, H. G. Goojani, R. R. Groh, T. N. Grund, T. M. Reichhart, R. Zimmermann, S. Welsch, D.

- Bald, M. Shepherd, G. Hummer, S. Safarian, *bioRxiv* **2022**, <https://doi.org/10.1101/2022.04.07.487047>.
- [56] M. Yamashita, M. Shepherd, W. I. Booth, H. Xie, V. Postis, Y. Nyathi, S. B. Tzokov, R. K. Poole, S. A. Baldwin, P. A. Bullough, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 23177–23188.
- [57] M. Baureder, L. Hederstedt, *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press, New York, **2013**, S. 1–43.
- [58] K. O. Håkansson, M. Brugna, L. Tasse, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2004**, *60*, 1374–1380.
- [59] J. C. D. M. Campos, L. C. M. Antunes, R. B. R. Ferreira, *Future Microbiol.* **2020**, *15*, 649–677.
- [60] V. Normant, L. Kuhn, M. Munier, P. Hammann, G. L. A. Mislin, I. J. Schalk, *ACS Infect. Dis.* **2022**, *8*, 183–196.
- [61] J. R. Otero-Asman, A. I. García-García, C. Civantos, J. M. Quesada, M. A. Llamas, *Environ. Microbiol.* **2019**, *21*, 4629–4647.
- [62] R. L. Marvig, S. Damkjaer, S. M. H. Khademi, T. M. Markussen, S. Molin, L. Jelsbak, *mBio* **2014**, *5*, e00966-14.
- [63] C. E. Nelson, W. Huang, L. K. Brewer, A. T. Nguyen, M. A. Kane, A. Wilks, A. G. Oglesby-Sherrouse, *J. Bacteriol.* **2019**, *201*, e00754-18.
- [64] A. R. Reddi, I. Hamza, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1104–1110.
- [65] T. Schiött, M. Throne-Holst, L. Hederstedt, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 4523–4529.
- [66] A. Miczák, *J. Bacteriol.* **1977**, *131*, 379–381.
- [67] L. Hederstedt, *Biochemistry* **2021**, *86*, 8–21.
- [68] P. Wittung-Stafshede, B. G. Malmström, J. R. Winkler, H. B. Gray, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 5599–5601.
- [69] C. R. Robinson, Y. Liu, J. A. Thomson, J. M. Sturtevant, S. G. Sligar, *Biochemistry* **1997**, *36*, 16141–16146.
- [70] P. Wittung-Stafshede, J. C. Lee, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 6587–6590.
- [71] H. Mi, D. Ebert, A. Muruganujan, C. Mills, L. P. Albou, T. Mushayamaha, P. D. Thomas, *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D394–D403.
- [72] S. Klumpp, T. Hwa, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *28*, 96–102.
- [73] R. L. Bertrand, *J. Bacteriol.* **2019**, *201*, e00697-18.
- [74] J. Jaishankar, P. Srivastava, *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2000.
- [75] A. G. Torres, P. Redford, R. A. Welch, S. M. Payne, *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 6179–6185.
- [76] E. C. Hagan, H. L. T. Mobley, *Mol. Microbiol.* **2009**, *71*, 79–91.
- [77] C. Zaoui, J. Overhage, D. Löns, A. Zimmermann, M. Müsken, P. Bielecki, C. Pustelny, T. Becker, M. Nimtz, S. Häussler, *Mol. Microbiol.* **2012**, *83*, 536–547.
- [78] A. Hutchin, C. Cordery, M. A. Walsh, J. S. Webb, I. Tews, *Microbiol. Spectrum* **2021**, *9*, e0102621.
- [79] Q. Zhao, F. Fang, Y. Shan, Z. Sui, B. Zhao, Z. Liang, L. Zhang, Y. Zhang, *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 5179–5185.
- [80] R. Bruderer, O. M. Bernhardt, T. Gandhi, Y. Xuan, J. Sondermann, M. Schmidt, D. Gomez-Varela, L. Reiter, *Mol. Cell. Proteomics* **2017**, *16*, 2296–2309.
- [81] C. Lenz, H. Urlaub, *Expert Rev. Proteomics* **2014**, *11*, 409–414.
- [82] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman, *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410.
- [83] B. S. Conroy, J. C. Grigg, M. Kolesnikov, L. D. Morales, M. E. P. Murphy, *BioMetals* **2019**, *32*, 409–424.
- [84] P. T. dos Santos, P. T. Larsen, P. Menendez-Gil, E. M. S. Lillebaek, B. H. Kallipolitis, *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 3090.
- [85] K. Michels, A. L. Solomon, Y. Scindia, L. Sordo Vieira, Y. Goddard, S. Whitten, S. Vaultont, M. D. Burdick, C. Atkinson, R. Laubenbacher, B. Mehrad, *J. Infect. Dis.* **2022**, *225*, 1811–1821.
- [86] I. Rodríguez-Arce, T. Al-Jubair, B. Euba, A. Fernández-Calvet, C. Gil-Campillo, S. Martí, S. Törnroth-Horsefield, K. Riesbeck, J. Garmendia, *Virulence* **2019**, *10*, 315–333.
- [87] F. Akhter, E. Womack, J. E. Vidal, Y. Le Breton, K. S. McIver, S. Pawar, Z. Eichenbaum, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 15202.
- [88] A. Gruss, E. Borezée-Durant, D. Lechardeur, *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press, New York, **2012**, S. 69–124.
- [89] S. Kim, I. Kang, J. W. Lee, C. O. Jeon, S. J. Giovannoni, J. C. Cho, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2021**, *118*, e2102750118.
- [90] C. Chen, T. K. Samuel, M. Krause, H. A. Dailey, I. Hamza, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 9601–9612.
- [91] J. A. Vizcaíno, E. W. Deutsch, R. Wang, A. Csordas, F. Reisinger, D. Ríos, J. A. Dienes, Z. Sun, T. Farrah, N. Bandeira, P. A. Binz, I. Xenarios, M. Eisenacher, G. Mayer, L. Gatto, A. Campos, R. J. Chalkley, H. J. Kraus, J. P. Albar, S. Martinez-Bartolomé, R. Apweiler, G. S. Omenn, L. Martens, A. R. Jones, H. Hermjakob, *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 223–226.
- [92] Y. Perez-Riverol, A. Csordas, J. Bai, M. Bernal-Llinares, S. Hewapathirana, D. J. Kundu, A. Inuganti, J. Griss, G. Mayer, M. Eisenacher, E. Pérez, J. Uszkoreit, J. Pfeuffer, T. Sachsenberg, Ş. Yilmaz, S. Tiwary, J. Cox, E. Audain, M. Walzer, A. F. Jarnuczak, T. Ternent, A. Brazma, J. A. Vizcaíno, *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D442–D450.

Manuskript erhalten: 16. August 2022

Akzeptierte Fassung online: 10. Dezember 2022

Endgültige Fassung online: 23. Januar 2023