

# Synthetische Hochdurchsatz-Mikroarrays von Peptidoglykan Fragmenten als neuartiges serodiagnostisches Instrument zur Erstellung von Antikörperprofilen bei Patienten

Alexandra Tsouka, Yanyan Fu, Manuel G. Ricardo, Peter H. Seeberger, Yue Wang, Gerald B. Pier, Detlef Schuppan, Louis Boon, Jan Maarten van Dijk, Maria C. Bolling, Girbe Buist,\* Felix F. Loeffler,\* und Jon D. Laman\*

**Abstract:** Peptidoglykane (PGN) sind komplexe Biopolymere, die für die Integrität und Funktion der Zellwand aller Bakterienarten essenziell sind. Während die entzündungsfördernden Eigenschaften von PGN und seinen Muropeptiden in der angeborenen Immunreaktion weithin bekannt sind, ist die adaptive Immunität, insbesondere die Antikörperreaktionen auf PGN, noch wenig erforscht. Die Microarray-Technologie stellt eine kosten- und zeiteffiziente Methode zur Untersuchung solcher Interaktionen dar. Unsere Lasertechnologie ermöglicht die Hochdurchsatzsynthese von Biomolekülen auf funktionalisierten Glasträgern. Hier wurde diese On-Chip-Synthese für PGN-Fragmente weiterentwickelt, um 216 verschiedene Stammpeptide herzustellen und sechs verschiedene Glykaneinheiten, die wichtige Strukturkomponenten bakterieller Zellwände sind, anzukuppeln. Auf diese Weise wurden 864 PGN-Fragmente aus verschiedenen Gram-negativen und Gram-positiven Spezies hergestellt. Die Arrays wurden mit vier verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen PGN oder Poly-*N*-Acetylglucosamin und die Identifizierung ihrer Epitope überprüft. Schließlich wurde ein Konzept für die Erstellung von Antikörperprofilen in Patientenproben demonstriert. Hierzu wurde ein Panel von gut charakterisierten Plasmaproben von Patienten mit Epidermolysis bullosa (EB) mit (chronischen) Wunden, die mit *Staphylococcus aureus* infiziert waren, verglichen. EB-Patienten zeigen eine erhöhte Reaktion auf das Muramyl-Dipeptid. Diese neue Hochdurchsatz-PGN-Glykopeptid-Microarray-Technologie ermöglicht somit die Identifizierung von potentiell verschiedenen Antikörperprofilen gegen das menschliche Mikrobiom bei Krankheiten, insbesondere bei Darmerkrankungen.

[\*] Dr. A. Tsouka, Dr. M. G. Ricardo, Prof. Dr. P. H. Seeberger,  
Dr. F. F. Loeffler  
Department of Biomolecular Systems  
Max Planck Institute of Colloids and Interfaces  
14476 Potsdam, Germany  
E-mail: felix.loeffler@mpikg.mpg.de

Dr. Y. Fu, Prof. Dr. J. Maarten van Dijk, Dr. G. Buist  
Department of Medical Microbiology and Infection Prevention  
University of Groningen, University Medical Center Groningen,  
Groningen, The Netherlands  
E-mail: g.buist@umcg.nl

Prof. Dr. P. H. Seeberger  
Institute of Chemistry and Biochemistry  
Freie Universität Berlin  
14195 Berlin, Germany

Prof. Dr. Y. Wang  
A\*STAR Infectious Diseases Labs  
Agency for Science and Technology Research (A\*STAR)  
Singapore, Singapore 138648

Prof. Dr. G. B. Pier  
Mass General Brigham  
Harvard Medical School  
Boston, MA 02115, USA

Prof. Dr. D. Schuppan  
Institute of Translational Immunology and Celiac Center  
Medical Center, Johannes-Gutenberg University  
55099 Mainz, Germany

Prof. Dr. D. Schuppan  
Division of Gastroenterology  
Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School  
Boston, MA 02115, USA

Dr. L. Boon  
JJP Biologics  
00-728, Warsaw, Poland

Dr. M. C. Bolling  
Department of Dermatology, UMCG Center of Expertise for Blistering Diseases  
University Medical Center Groningen, The Netherlands

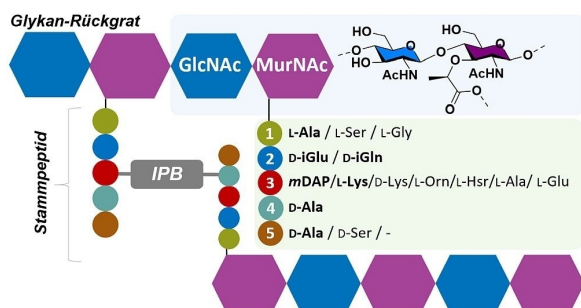
Prof. Dr. J. D. Laman  
Department of Pathology and Medical Biology,  
University of Groningen, University Medical Center Groningen,  
Groningen, The Netherlands  
E-mail: j.d.laman@umcg.nl

© 2025 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

## Einführung

Peptidoglykane (PGN) sind große, starre Biopolymere, die in der Zellwand aller Bakterien existieren. Sie sind essentiell für das Überleben der Bakterien, da sie als integraler Strukturbestandteil und Schutzbarriere dienen und dazu beitragen, den osmotischen Druck und die Form der Zellwand aufrechtzuerhalten.<sup>[1]</sup> Sie bestehen aus einem stabilen Glykan-Rückgrat, das mit einer kurzen und variablen Peptidkette, dem so genannten Stammpeptid, verbunden ist (Abbildung 1). Das Glykan-Rückgrat besteht aus zwei alternierenden Monosaccharid-Einheiten, *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylmuraminsäure (MurNAc), die über eine  $\beta$ -1, 4 glykosidische Bindung miteinander verknüpft sind.<sup>[2]</sup> Im Gegensatz dazu sind die Stammpeptide sehr vielfältig und enthalten verschiedene Kombinationen von *L*- und *D*-Aminosäuren (AS), die bis zu fünf Reste lang sein können. Der archetypische Pentapeptidstamm enthält in der Regel ein *L*-Alanin (*L*-Ala) und zwei *D*-Alaninreste (*D*-Ala) an den Positionen 1, 4 und 5, während die Aminosäuren an den Positionen 2 und 3 bei Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien unterschiedlich sind. Insbesondere *D*-Isoglutamin (*D*-iGln) und *L*-Lysin (*L*-Lys) kommen in Gram-positiven Bakterien vor, während *D*-Isoglutaminsäure (*D*-iGlu) und meso-Diaminopimelinsäure (*m*DAP) in Gram-negativen Bakterien vorkommen. Die Peptidstämme können über eine kurze Interpeptidbrücke mit benachbarten Peptidketten zu einer netzartigen 3D-Struktur miteinander verbunden sein. Diese Brücke kann mehrere Aminosäuren lang sein, wie das Beispiel der Pentaglycin-Brücke in *Staphylococcus aureus* zeigt.<sup>[3,4]</sup>

Das Glykan-Rückgrat und der Peptidstamm werden durch eine Amidbindung zwischen der *D*-Lactoyl-Gruppe des MurNAc und dem *L*-Ala zusammengehalten.<sup>[5]</sup> Verschiedene Modifikationen des Glykangerüsts wie *O*-Acetylierung, *N*-Deacetylierung oder Phosphorylierung treten ein. Zusammen mit spezifischen Aminosäurevarianten ergeben



**Abbildung 1.** Peptidoglykanstruktur und Sequenzvariation des Stammpeptids. Die verschiedenen Glykanstränge verzweigen sich von den MurNAc-Resten mit den Stammpeptiden. Die Länge der Stammpeptide kann bis zu 5 AS betragen, während die Interpeptidbrücke (IPB), die die beiden Stammpeptide verbindet, bis zu sieben AS, typischerweise Polyglycin, enthalten kann. *L*/*D*-Ala: *L*/*D*-Alanin; *L*-Arg: *L*-Arginin; *L*-Cit: *L*-Citrullin; *L*-Gly: *L*-Glycin; *L*-Glu: *L*-Glutaminsäure; *D*-iGlu: *D*-Isoglutaminsäure; *L*/*D*-iGln: *L*/*D*-Isoglutamin; *L*-Hsr: *L*-Homoserin; *L*/*D*-Lys: *L*/*D*-Lysin; *m*DAP: meso-Diaminopimelinsäure; *L*-Orn: *L*-Ornithin; *L*/*D*-Ser: *L*/*D*-Serin.

sich mehr als 10.000 verschiedene kleine PGN-Strukturvarianten (siehe *Unterstützende Informationen, Abschnitt C*, für die Berechnung der Schätzung).<sup>[6–8]</sup>

Die strukturelle Vielfalt dieser PGN-Varianten<sup>[6]</sup> und die Tatsache, dass ihre Rolle in vielen physiologischen und biologischen Prozessen wie Entzündungen, Immunreaktionen und Wirtsinteraktionen noch nicht gut verstanden ist, machen sie zu einem wichtigen Ziel für zelluläre und molekulare Studien. Neuere Forschungen konzentrieren sich vor allem auf ihre Rolle als Antibiotika<sup>[9]</sup> und andere therapeutische Ziele bei Stoffwechsel- und psychischen Erkrankungen,<sup>[10]</sup> als immunstimulierende Aktivatoren,<sup>[11]</sup> aber auch auf ihre Beteiligung an der Entwicklung und Funktion des Gehirns,<sup>[12]</sup> und an chronisch inflammatorischen Erkrankungen (Autoimmunerkrankungen).<sup>[11,13,14]</sup> Insbesondere wurden PGN-Fragmente mit Rheumatoider Arthritis,<sup>[15]</sup> Lyme-Borreliose,<sup>[14]</sup> Alzheimer,<sup>[16–18]</sup> und Multiple Sklerose.<sup>[11,19–21]</sup> Aufgrund der großen Diversität, die ein Muropeptidom repräsentiert, ist es derzeit schwierig, diese riesige Landschaft von PGN-Strukturen zu untersuchen, die sowohl unterschiedliche physiologische als auch pathogene Funktionen haben können.<sup>[22,23]</sup>

Die Microarray-Technologie ermöglicht ein Hochdurchsatz-Untersuchung von Biomolekülen. Die chemische in situ Synthese von Biomolekülen im Array-Format hat die Herstellung von Microarrays von Monaten oder Jahren auf wenige Wochen beschleunigt und zahlreiche Anwendungen in der immunologischen und biomedizinischen Forschung ermöglicht.<sup>[24–30]</sup> Dies ermöglicht einen schnellen und zeitsparenden Zugang zu rational entworfenen Antigenvarianten. Insbesondere werden Peptid-Microarrays häufig zur Untersuchung von Antikörper-Interaktionen (z. B. mAk oder Patientenproben) mit linearen Epitopen durch direkte Inkubation und Fluoreszenz-Scan-Analyse eingesetzt.<sup>[30]</sup>

Frühere PGN-Studien verwendeten verschiedene Synthesestrategien, einschließlich Lösungs- und Festphasensynthese sowie chemische und chemoenzymatische Ansätze.<sup>[31–34]</sup> Wir haben die Automatisierte Glykan Assemblierung (AGA) genutzt, um zehn Oligosaccharidfragmente der PGN-Struktur zu synthetisieren.<sup>[35]</sup> Diese Methoden erzeugen jedoch jeweils nur ein Molekül, was die Notwendigkeit der parallelen Synthese vieler PGN-Varianten für eine schnelle Untersuchung und die Identifizierung potenzieller PGN-Epitope und Krankheitsbiomarker unterstreicht.

Hier berichten wir über die direkte Synthese vieler verschiedener PGN-Zellwandfragmente, die eine Vielzahl von Bakterienspezies repräsentieren, im Microarray-Format. Die Microarray-Synthese verschiedener Stammpeptide wurde mit Hilfe der Laser-induzierten Vorwärtstransfertechnologie (laser-induced forward transfer – LIFT) durchgeführt,<sup>[36]</sup> wobei die jeweiligen Glykanvarianten über eine Amidbindung direkt an den funktionalisierten Glasträger gebunden wurden. Da Stammpeptide *D*- und *L*-Aminosäuren sowie ungewöhnliche Aminosäuren enthalten können, musste ihre Synthese optimiert werden. Dies ermöglichte uns, komplexe PGN-Microarrays mit 864 PGN-Fragmente-Molekülen zu erzeugen. Die synthetisierten Arrays wurden zum Epitope-Mapping von vier verschiedenen monoklonalen Antikör-

pern und zum Screening von Plasmaproben von Patienten mit der genetischen Hautfragilitätsstörung Epidermolysis bullosa (EB) verwendet, die in der Regel viele mit *S. aureus* kolonisierte Wunden haben. Es wurde gezeigt, dass EB-Patienten mehrere verschiedene *S. aureus*-Stämme in ihren Wunden tragen, die eine ausgeprägte Antikörperantwort gegen *S. aureus*-Oberflächenproteine hervor-rufen.<sup>[37,38]</sup>

## Ergebnisse und Diskussion

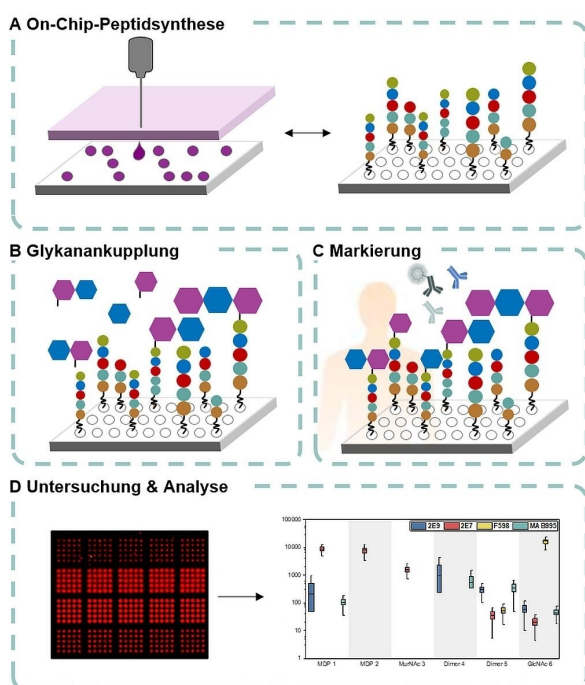
### Synthese von PGN-Arrays und Validierung durch vier monoklonale Antikörper

Für die Erstellung der Microarrays in dieser Antikörper-Untersuchung-Studie wurde die automatisierte, on-Chip Laser-induzierten Synthesetechnologie (LIFT) eingesetzt.<sup>[26]</sup> Diese Technik ermöglicht die parallele Festphasensynthese von Biomolekülen wie Peptiden und Glykanen, indem winzige Mengen verschiedener Bausteine nacheinander auf eine Microarray-Oberfläche gedruckt und gekoppelt werden (Abbildung 2)<sup>[26,28,29,39]</sup> Die gewünschten chemischen Bausteine sind in eine Polymermatrix eingebettet, die auf einen Spenderfilm aufgeschleudert wird. Ähnlich wie bei einer Schreibmaschine werden die verschiedenen Bausteine durch Laserbestrahlung auf ein funktionalisiertes Substrat strukturiert. Dann wird das Bausteinmuster in einem 10-minütigen Ofen bei 95 °C an die Microarray-Oberfläche gekoppelt, gefolgt von Wasch-, Kappen- und Entschützungs-Schritten. Die Druck- und Verarbeitungsschritte werden wiederholt,

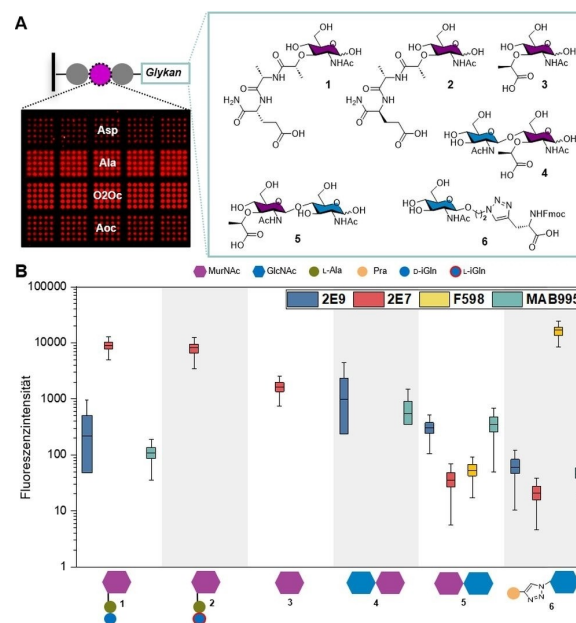
bis die gewünschten Strukturen auf dem Array entstanden sind. Die Wechselwirkungen zwischen monoklonalen Antikörpern und Patientenplasma werden durch Fluoreszenz-Scans mit fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörpern überprüft.

Zuerst haben wir die Möglichkeit der PGN-Synthese auf dem Array-Format durch Lösungssynthese einer Muramyl-Dipeptid (MDP)-ähnlichen Struktur auf einem Glasobjekt-träger ohne Nebenreaktionen und Lösungssynthese eines Pentapeptid-Disaccharids validiert (Abbildung 2B, *Unterstützende Informationen, Abschnitt D*).

Danach haben wir die Auswirkungen der Oberflächen-/Substratfunktionalisierung auf die Antikörperbindung analysiert, indem wir verschiedene Linker/Abstandshalter auf kommerziell  $\beta$ -Ala-PEGMA/MMA-funktionalisierte Glas-substrate übertragen haben. Vier Fmoc-geschützte Bausteine, L-Asparaginsäure (L-Asp), L-Alanin (L-Ala), hydrophile 3,6-dioxaoctansäure (8O<sub>2</sub>Oc), und hydrophobe 8-aminooc-tansäure (8Aoc), wurden als potenzielle Abstandshalter untersucht, indem sie jeweils fünfmal als 5×5 Punkten-Replikat (= 125 Punkten) nebeneinander strukturiert wurden (Abbildung 3). Die Oberfläche wurde weiterbearbeitet, und ein Fmoc-geschütztes  $\beta$ -Ala wurde aus der Lösung auf den mit 5×5×5 Punkten strukturierten Glasträger übertragen. Danach erfolgte die Entschützung der temporär geschützten Gruppen, und die freien Aminogruppen wurden mit den Glykanmolekülen **1–5** reagiert, die jeweils die entsprechenden Carboxylgruppen enthielten (Abbildung 3). Die Kopplung erfolgte entweder in einer einstufigen Reaktion, bei der eine Amidbindung gebildet wurde, oder in



**Abbildung 2.** PGN Microarray Synthese und Überprüfung. A) Synthese von Peptid-Microarrays durch LIFT. B) Bindung von Glykan-Molekülen. C) Antikörpersignal nach Plasmakubation. D) Untersuchung und Analyse der Fluoreszenz-Intensitäten.



**Abbildung 3.** Erstellung von PGN-Fragment-Arrays mit unterschiedlichen Oberflächen-Linker-Funktionalisierungen zur Epitop-Kartierung monoklonaler Antikörper. A) Oberflächenfunktionalisierung durch L-Asparaginsäure (L-Asp), L-Alanin (L-Ala), 3,6-Dioxaoctansäure (8O<sub>2</sub>Oc) und 8-Aminooc-tansäure (8Aoc) auf dem kommerziell PEGMA/MMA- $\beta$ -Ala-funktionalisierten Glasträger sowie Anbindung der Glykanstrukturen über Amidbindungen.

einer zweistufigen Reaktion für Molekül **6**, bei der zunächst ein L-Propargylglycin (Pra) und dann ein GlcNAc-Azid über eine Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC)-Reaktion angelagert wurden (*Unterstützende Informationen, Abschnitt E*).<sup>[28,39]</sup>

Die Bausteine **1–6** wurden entweder nach den üblichen Protokollen synthetisiert<sup>[35]</sup> oder aus kommerziell erhältlichen Vorläufern hergestellt (Abbildung 3A, *Unterstützende Informationen, Abschnitt F*). Muramyl-Dipeptid (MDP, MurNAc-L-Ala-D-iGln) **1** wurde eingesetzt, da es das kleinste bioaktive PGN-motiv ist, das in allen Bakterien vorkommt,<sup>[40]</sup> während das L-Analoge MDP **2** (L-iGln statt D-iGln), als Negativkontrolle verwendet. Die Bausteine **3–6** stehen für verschiedene PGN-Fragmenten, die an einen künstlichen  $\beta$ -Ala-X oder Pra- $\beta$ -Ala-X linker gebunden wurden, wobei X eine der vier genannten AS-Funktionalisierungen ist.

Es wurden zwei Sätze von Array-Typen erzeugt: Einer wurde mit einer Trifluoressigsäure (TFA)-Entschützungs-lösung behandelt, um säurelabile Schutzgruppen zu entfernen, während der andere direkt ohne zusätzliche Behandlung verwendet wurde. Beide Array-Typen wurden mit drei bekannten monoklonalen Maus-Anti-PGN-Antikörpern (mAk), nämlich 2E9,<sup>[21,41]</sup> 2E7,<sup>[13]</sup> und MAB995,<sup>[18]</sup> sowie mit dem bekannten monoklonalen menschlichen Anti-Poly- $\beta$ -1,6-N-Acetylglucosamin (anti-PNAG) Antikörper F598.<sup>[42,43]</sup> Bindende Anti-PGN und Anti-PNAG mAk wurde mit fluoreszenzmarkierten sekundäre Antikörpern gegen den Fc-Fragment spezifischen Anti-Maus-IgG oder Anti-Mensch-IgG (Abbildung 3B).

Acetylierte Arrays ohne Glykane dienten als Hintergrund- und Negativkontrolle. Die Fluoreszenzanalyse der TFA-behandelten Arrays auf dem AS-funktionalisierten Glaträger (Abbildung 3B) zeigte, dass der 2E-Antikörper eine robuste und selektive Bindung an alle Arrays mit einem MurNAc-Monomer (**1**, **2**, **3**). Zusätzlich wurde eine schwächere, aber erkennbare Interaktion beobachtet im Dimer **5** mit einem terminalen MurNAc sowie dem GlcNAc **6**. Im Gegensatz dazu banden die mAk 2E9 und MAB995, die ein ähnliches Bindungsverhalten zeigten, selektiv an MDP**1**, aber nicht an das Kontroll-MDP **2** oder an MurNAc **3**. Dies unterstreicht die Bedeutung der Aminosäuren in den Positionen 1 und 2 der PGN-Stammpeptide. Darüber hinaus banden 2E9 und MAB995 an beide Dimere (**4**, **5**), was darauf eine zweite Selektivität für das Glykan-Grundgerüst hinweist.

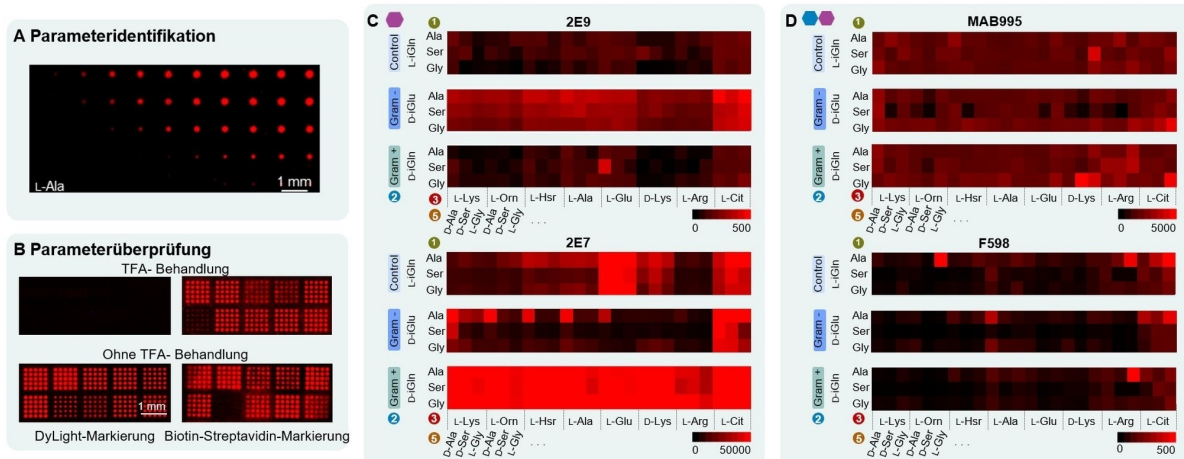
Schließlich zeigte das mAk F598 ein sehr unterschiedliches Bindungsprofil mit hoher Spezifität nur für GlcNAc **6** und einem schwachen Signal für Dimer **5**. Auf Arrays ohne TFA-Behandlung wurden im Allgemeinen höhere Fluoreszenzintensitäten beobachtet, doch die Bindungstrends blieben gleich. Dieses Phänomen wurde vor allem bei Arrays mit D-Lactoyl-Anteilen beobachtet, die wahrscheinlich hydrolytisch gespalten wurden. Diese Spaltung wurde bei GlcNAc-Anteilen aufgrund der CuAAC-Bindung nicht beobachtet, was sowohl für MAB995 als auch für F598 bestätigt wurde (*Unterstützende Informationen, Abschnitt H*).

### Optimierung und Generierung von kombinatorischen PGN-Arrays

Als nächstes stellten wir Mikroarrays auf Glaträgern her, die mit  $\beta$ -Ala-Asp funktionalisiert waren und die großen Teile der PGNs mit kombinatorischen Varianten des Ausgangs-peptids repräsentierten. Da der laserbasierte Ansatz nur für die 20 natürlichen L-Aminosäuren entwickelt wurde, identifizierten und validierten wir vor der Herstellung der kombinatorischen PGN-Arrays die Laser- und Syntheseparameter (Abbildung 4A, B) für fünf verschiedene D-Aminosäuren (D-iGlu, D-iGln, D-Lys, D-Ala, D-Ser) und vier spezielle L-Aminosäuren (L-iGln, L-Orn, L-Hsr, L-Cit). Dabei folgten wir einer etablierten Optimierungspipeline.<sup>[26]</sup>

Die Qualität der erzeugten AS-Punkten wurde durch Fluoreszenzfärbung quantifiziert (abhängig von Lasertransferparametern, Spotgröße, Homogenität und Ausbeute), entweder durch direkte DyLight 633 N-Hydroxysuccinimid-Ester-Markierung oder durch zweistufige N-terminale Biotin-Streptavidin-Markierung. Die Untersuchung der Ergebnisse wurde für beide Markierungstechniken mit und ohne TFA-Seitenkettenentschützung durchgeführt. Wie bereits berichtet, war die beobachtete Fluoreszenzintensität ein Indikator für die Ausbeute/Qualität der Synthese.<sup>[26,29]</sup> Wir haben die Laserparameter und Synthesebedingungen erfolgreich identifiziert und validiert (*Unterstützende Informationen, Abschnitt I*).

Dann generierten wir vollständig kombinatorische PGN-Arrays mit hoher Dichte, die 216 verschiedene Stamm-Pentapeptid-Variantenfragmente als drei Replikate enthielten (für das Muster siehe *Unterstützende Informationen, Abschnitt J*). Die generierten Pentapeptide enthielten alle in Abbildung 1 gezeigten Varianten sowie zusätzliche Pentapeptide, die nach traditionellen Modifikationen gebildet werden können. Für die erste AS-Position wurden die drei Varianten L-Ala, L-Ser und L-Gly eingesetzt. In Position 2 wurden D-iGln, D-iGlu und L-iGln aufgenommen, die jeweils die Gram-positive, Gram-negative und negative Kontrolle (siehe Kontrolle MDP **2**) der Peptidstämme darstellen. In Position 3 wurden L-Lys, L-Orn, L-Hsr, L-Ala, L-Glu, D-Lys, L-Arg und L-Cit verwendet. Die beiden letztgenannten wurden als Teil üblicher post-translationaler Modifikationen im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis aufgenommen, da L-Orn in L-Arg und anschließend in L-Cit umgewandelt werden kann. Die letzten beiden wurden als Teil üblicher post-translationaler Modifikationen im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankheiten wie rheumatoider Arthritis aufgenommen, da L-Orn in L-Arg und anschließend in L-Cit umgewandelt werden kann.<sup>[44]</sup> Die Position 4 wurde immer mit einem D-Ala konstant gehalten, während die Position 5 zwischen D-Ala, D-Ser und L-Gly variiert wurde. Schließlich wurden die Zuckereinheiten **3–5** über Amidbindungen an die synthetisierten Peptidarrays gebunden. Danach wurden diese Arrays zu der Untersuchung der jeweiligen Reaktionen der drei Anti-PGN- und Anti-PNAG-MAK verwendet (Abbildung 4C, D und *Unterstützende Informationen, Abschnitt J*). Die Ergebnisse zeigten eine starke Bindungsabhängigkeit der mAk entweder von der Glykaneinheit oder von dem



**Abbildung 4.** Erzeugung kombinatorischer PGN-Mikroarrays. A) Identifizierung der Laserparameter und Quantifizierung der AA-Kopplung durch Fluoreszenzmarkierung der Aminogruppen. Beispiel einer Fluoreszenzfärbung (DyLight) des L-Ala-Musters bei steigenden Laserparametern. B) Validierung der Bedingungen und Visualisierung durch direkte und indirekte Färbung von L-Ala, D-Ala, L-Lys, L-Orn, D-iGln (obere fünf Aminosäuren, von links nach rechts), D-iGlu, L-Gln, L-Ser, L-iGln, D-Ser (untere fünf Aminosäuren, von links nach rechts). C, D) Optimale Bedingungen wurden für die Erzeugung der PGN-Arrays verwendet. Heatmap des Array-Screenings von 216 Pentapeptid-Variationen mit den jeweiligen Glykananteilen: C) MurNAc **3** und D) Dimer **4**, inkubiert mit monoklonalem Maus-Anti-PGN 2E9, 2E7, MAB995 und monoklonalem Human-Anti-PGN F598. Nachweis mit polyklonalem Ziegen-Anti-Maus-IgG und polyklonalem Ziegen-Anti-Human-IgG. Die Fluoreszenzintensität wurde als Mittelwert von drei Spot-Replikaten bestimmt.

AS, insbesondere an den Positionen 2 und 3 des Peptidstamms, wobei an Position 2 das D-iGln und D-iGlu zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien unterscheiden.

Die mAk 2E9 und 2E7 zeigten eine höhere Selektivität für die Stammpeptidvarianten (Abbildung 4C, *Unterstützende Informationen, Abschnitt J*). Insbesondere 2E9 band an Strukturen mit MurNAc **3** mit einer starken Präferenz für D-iGlu an Position 2 (Gram-negative Stämme), während eine schwache/unspezifische Bindung für D-iGln (Gram-positiv) und L-iGln (Kontrolle) beobachtet wurde. Diese Ergebnisse bestätigen unsere ersten Ergebnisse (Abbildung 3B). In Position 3 wurden die niedrigsten Intensitäten für L-Lys beobachtet, das nur in Gram-positiven Stämmen vorkommt, was die Feststellung der Selektivität für Gram-negative Stämme unterstützt. Umgekehrt wurden die höchsten Intensitäten für L-Cit in Position 3 beobachtet. Ähnliche Signale für 2E9 wurden auch auf den kombinatorischen Arrays mit den Dimeren **4** und **5** beobachtet, wobei Dimer **4** eine höhere Intensität aufwies als Dimer **5**. Im Gegensatz dazu zeigte mAk 2E7 eine ausgeprägte Affinität zu Strukturen mit D-iGln in Position 2 (Abbildung 4C) und L-Lys in Position 3, was auf eine Spezifität für Gram-positive Stämme hindeutet. Die Effekte der AS in den Positionen 1, 3 und 5 sind weit weniger ausgeprägt. Die AS in Position 1 zeigte keine

signifikante Wirkung, sie variierte von L-Gly zu L-Ser und dann zu L-Ala. Die meisten Aminosäuren in Position 3 zeigen hohe Intensitäten, mit Ausnahme von L-Orn, L-Lys und L-Arg, die im Vergleich zu den anderen Aminosäuren relativ niedrige Intensitäten aufweisen. Die letzte Aminosäure in Position 5 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungsneigung. Es gibt jedoch eine erkennbare Änderung

der Intensität, wobei D-Ala (in den meisten Bakterien) das stärkste Signal zeigt, gefolgt von D-Ser und L-Gly. Identische Bindungstrends wurden auf den kombinatorischen Arrays mit den Dimeren **4** und **5** beobachtet, wobei die Intensität doppelt so intensiv war und die Spezifität anscheinend noch höher war (*Unterstützende Informationen, Abschnitt J*).

Schließlich zeigte die Bindung der mAk MAB995 und F598 keinen signifikanten Einfluss des Stammpeptids auf die Antikörpererkennung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Antikörpererkennung in erster Linie durch das Oligosaccharid und dessen Länge beeinflusst wird und nicht durch die Variation des Stammpeptids. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen früherer Experimente (Abbildung 3B) für beide Antikörper überein, während auf den mit den Strukturen **1–3** funktionalisierten Arrays keine Bindung beobachtet wurde. Im Falle von MAB995 wurde jedoch auf allen Arrays eine Bindung beobachtet, während für F598 im Gegensatz zum vorherigen Experiment nur auf Arrays mit Dimer **4** eine Bindung beobachtet wurde (Abbildung 3B vs. 4D, *Unterstützende Informationen, Abschnitt J*). Die selektive Bindung von F598 wurde durch einen zusätzlichen PGN-Oligosaccharidfragment-Array<sup>[35]</sup> **35** validiert (*Unterstützende Informationen, Abschnitt K*). Für zukünftige Untersuchungen sollten längere Oligosaccharidstrukturen synthetisiert und untersucht werden.

#### Konzeptnachweis durch Screening von Patientenproben mit Epidermolysis bullosa

Ermutigt durch die erfolgreiche Validierung der Microarrays durch das Screening der vier Anti-PGN-mAk und die Kartierung ihrer jeweiligen Epitope, haben wir als Nächstes

versucht, den Konzeptnachweis für unsere ersten Arrays für die IgG-Reaktivität gegen PGN-Strukturen in Plasmaproben von EB-Patienten zu erbringen. Die Wunden von EB-Patienten sind hochgradig mit *S. aureus* kolonisiert und stärker mit *Staphylokokken*-Antigenen infiziert als bei gesunden Personen. Dies scheint eine verstärkte Immunreaktion gegen *S. aureus* auszulösen.<sup>[37,38]</sup> Wir untersuchten 13 Proben von EB-Patienten, 8 gesunden *S. aureus* Trägern (T) und 11 gesunden Nicht-Trägern (NT).

Die EB-Proben umfassten sieben Patienten mit junktionaler EB (JEB\*), bei denen neben der Hautfragilität von Geburt an auch die Wundheilung beeinträchtigt ist und Wunden mit Narbenbildung abheilen, einen Patienten mit Simplex EB (EBS +), bei dem Blasen durch Hitze oder Reibung verursacht werden und relativ problemlos ohne Narbenbildung heilen, sowie fünf Patienten mit dystropher EB (DEB –), bei denen Blasen mit Narbenbildung abheilen und im späteren Leben häufig chronische Wunden bestehen bleiben.

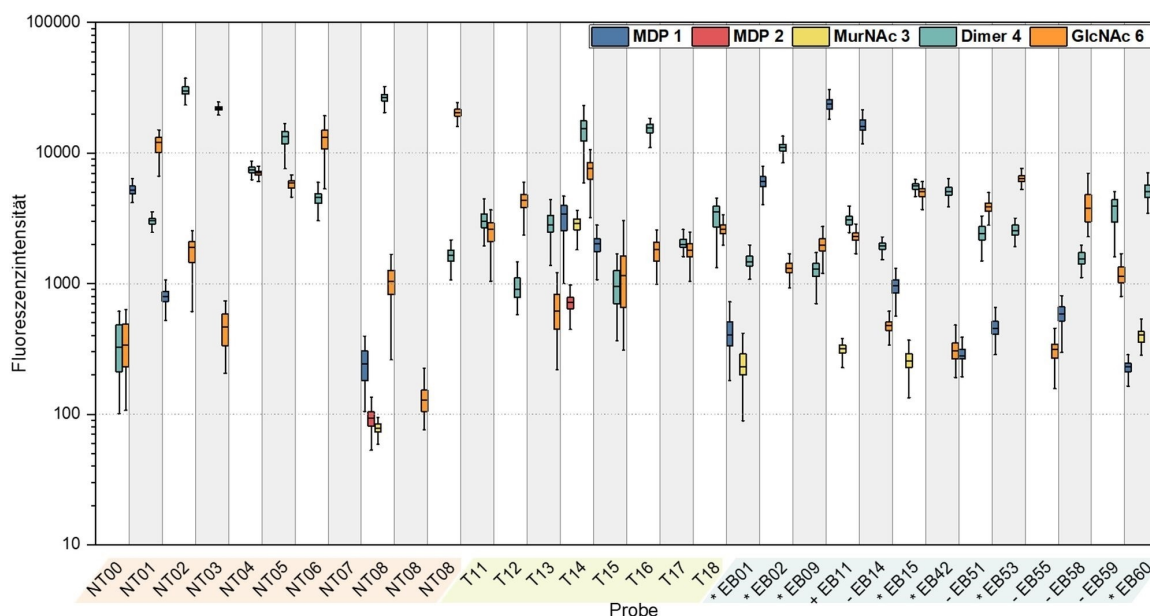
Die Arrays mit den vier  $\beta$ -Ala-X-Funktionalisierungen mit den Glykanteilen 1–4 und 6 wurden einer TFA-Behandlung unterzogen und dann über Nacht bei 4 °C mit den entsprechenden verdünnten Humanplasmaproben inkubiert. Die Sekundärfärbung erfolgte parallel mit Anti-Human-IgG Fc DyLight 650 und Anti-Human-IgA-Rhodamin (TRIC). Da die Ergebnisse der IgA-Färbung weniger aussagekräftig waren, sind sie in den *Unterstützende Informationen* (Abschnitt L) aufgeführt.

Neun der 13 EB-Patientenproben enthielten MDP1-bindendes IgG. Insbesondere EB01, EB15, EB51, EB53, EB58 und EB60 zeigten eine schwache IgG-Antwort, was auf eine schwächere Immunantwort auf PGN im Vergleich zu anderen Proben hinweist. Im Gegensatz dazu zeigten die

Proben der Patienten EB02, EB11 und EB14 starke IgG-Signale, was auf eine robuste

Immunantwort gegen MDP hindeutet, die höchstwahrscheinlich auf einen höheren Gehalt an MDP-spezifischen Antikörpern bei diesen Patienten zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse unterstreichen die Variabilität der Immunantwort auf MDP bei EB-Patienten, die möglicherweise mit dem Schweregrad oder Subtyp der Erkrankung oder dem Grad der Wundbesiedelung durch *S. aureus* zusammenhängt. Allerdings ist eine größere Anzahl von Patienten- und Kontrollproben erforderlich. Interessanterweise wurden auch bei den gesunden Kontrollen NT01 und NT02 IgG-Reaktionen sowohl auf MDP als auch auf das nasale Vehikel C15 beobachtet.

Eine spezifische IgG-Bindung an die mit MurNAc 3 funktionalisierten Arrays (Abbildung 5) wurde bei 7 von 13 EB-Patientenproben beobachtet. Insbesondere Patienten mit JEB (EB01, EB15, EB60) zeigten eine IgG-Antwort auf alle vier getesteten Oberflächenfunktionalisierungen (L-Asp, L-Ala, 8O2Oc, 8Aoc, *Unterstützende Informationen, Abschnitt L*). Im Gegensatz dazu zeigte der EBS-Patient EB11 ohne chronische Wunden eine ausschließliche IgG-Antwort auf die Asp-Funktionalisierung. Interessanterweise zeigten die Proben EB51 und EB55 keine MurNAc-IgG-Reaktion auf die  $\beta$ -Ala-L-Asp-Funktionalisierung, während Reaktionen auf die anderen drei Funktionalisierungen nachgewiesen wurden (*Unterstützende Informationen, Abschnitt L*). Die EB14-Probe zeigte eine MurNAc-IgG-Antwort nur auf die Funktionalisierungen mit 8O2Oc und 8Aoc. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass die spezifische Oberflächenfunktionalisierung von PGN eine entscheidende Rolle bei der IgG-Antwort von Patienten mit verschiedenen EB-Subtypen spielt oder dass eine bisher unbemerkte EB-



**Abbildung 5.** IgG-Antwort von gesunden Nicht-Trägern (NT), gesunden Trägern (T) von *S. aureus* und Patienten mit Epidermolysis bullosa (EB) auf  $\beta$ -Ala-L-Asp-Oberflächenfunktionalisierung. EB-Proben-Gruppen: JEB (\*), DEB (–), EBS (+). Der Nachweis erfolgte mit einem fluoreszenzmarkierten polyklonalen Ziegen-Anti-Human-IgG-Antikörper. Boxplots (Mittellinie: Median; Boxgrenzen: oberes und unteres Quartil; Whisker: äußerster Datenpunkt innerhalb des 1.5-fachen Interquartilbereichs) wurden aus 125 Punkten berechnet.

Subtyp-spezifische Selektivität für die Wundbesiedlung durch bestimmte *S. aureus*-Linien besteht, was die Bedeutung maßgeschneiderter Ansätze für das Antikörperscreening in der Krankheitsätiologie unterstreicht.

Alle Plasmaproben, mit Ausnahme von NT09 und EB55, zeigten eine hohe IgG-Reaktion gegen Dimer **5**. Ebenso zeigten alle Proben, mit Ausnahme von EB01, eine Bindung an GlcNAc **6**. Die Reaktion war bei gesunden Probanden höher als bei Patienten. Die Plasmaproben NT08 und T14 zeigten eine IgG-Reaktion gegen alle Strukturen, jedoch nicht in der Negativkontrolle. Diese Ergebnisse können zumindest teilweise auf eine Lipidkontamination während der Probenentnahme zurückgeführt werden, die die Testleistung beeinträchtigt. Auf den als Negativkontrolle verwendeten einfachen Arrays ohne Glykane wurde ebenso wie auf NT07 keine Bindung beobachtet, was möglicherweise auf Hämolyse oder Infektion zurückzuführen ist.

## Fazit

Zusammenfassend wurde unser automatisierter Hochdurchsatz-LIFT-Synthesizer zur Herstellung von Arrays eingesetzt, die PGN-Fragmente aus Stammpeptiden und Zuckern mit hoher Punktdichte und Präzision enthalten. Das anfängliche Ziel war es, den Einfluss der Oberflächenfunktionalisierung auf die Erkennung von PGN-Glykanfragmenten durch drei Anti-PGN-mAk und ein Anti-PNAG-mAk zu untersuchen.

Anschließend wurde eine Pipeline zur Optimierung der laserbasierten Synthese von PGN-Stammpeptid-Mikroarrays mit den erforderlichen AA-Bausteinen eingesetzt. Verschiedene Färbeprotokolle wurden verwendet, um die Präzision, Reproduzierbarkeit, Punktgröße und Morphologie für jede Struktur zu validieren. Danach wurden kombinatorische PGN-Arrays mit 216 verschiedenen Pentapeptidvarianten durch LIFT generiert und die Glykane **3–5** durch Amidbindung immobilisiert, was die Epitop- und Spezifitätskartierung von vier Anti-PGN/PNAG mAk ermöglichte. Der mAk 2E9 wurde gegen einen unbekanntes Bakterienstamm gezüchtet,<sup>[41]</sup> und unsere Ergebnisse zeigen seine Präferenz für Gram-negative bakterielle Strukturen. Im Gegensatz dazu wurde mAk 2E7 gegen MDP,<sup>[13]</sup> einen Teil der Gram-positiven PGN-Strukturen, gezüchtet, was wir in unserer Epitopkartierung bestätigen konnten. Zusätzlich untersuchten wir die IgG-Reaktivität im Plasma von *S. aureus*-Trägern, Nicht-Trägern und EB-Patienten unter Verwendung von Glykan-basierten PGN-Fragmentarrays mit unterschiedlichen Funktionalisierungen.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Oberflächenfunktionalisierung die IgG-Erkennung beeinflusst, was mit den verschiedenen Subtypen der Erkrankung in Verbindung gebracht werden kann. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um mögliche frühere bakterielle Infektionen oder eine Kreuzreaktivität mit MDP **1** in EB- und NC-Plasmaproben zu bestätigen. Außerdem sollte die Reaktivität der IgG-Subklassen untersucht werden. Der gleiche Ansatz sollte bei Proben von Erkrankungen verfolgt werden, bei denen große Schleimhautoberflächen mit einem

komplexen Mikrobiom in Kontakt kommen, wie z. B. im Gastrointestinaltrakt. Auch hier können IgA- oder IgM-Antikörpertiter wichtige diagnostische oder prognostische Informationen liefern. Darüber hinaus ist die Herstellung komplexerer PGN-Arrays mit längeren Glykananteilen unerlässlich, um die Spezifitäten von MAB995 und F598 weiter zu untersuchen und das diagnostische Portfolio von PGN-Antikörpertests bei Patienten zu erweitern. Schließlich sollte auch die Synthese und Implementierung von mDAP auf den Arrays untersucht werden.

## Danksagung

Die Autoren danken der Abteilung Biomolekulare Systeme des MPIKG für die (technische) Unterstützung, insbesondere Olaf Niemeyer, Eva Settels und Marilet Sigler für die Hilfe bei den analytischen Methoden, Dr. Abagam Joseph für die fruchtbaren Diskussionen, den anonymen EB-Patienten des niederländischen Epidermolysis bullosa-Registers für ihre Blutspenden, als auch Magda van der Kooi-Pol, José Duipmans und Marcel Jonkman für die Sammlung der EB-Patientenseren. Diese Veröffentlichung ist Teil des Projekts „Glycopeptide arrays detecting antibodies to bacterial peptidoglycans: biomarkers for inflammatory disease and therapy monitoring“ (19989), des Forschungsprogramms Open Technology Programme 2022, das (teilweise) vom Niederländischen Forschungsrat (NWO), der Max-Planck-Gesellschaft, dem Deutschen Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF, 13XP5050 A) und dem National Medical Research Council, Singapur (Förderkennzeichen OFIRG23Jul-0077) gefördert wird. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

## Conflict of Interest

F.F.L. ist in einer Patentanmeldung für die laserbasierte Microarray-Synthese genannt. P.H.S. hat ein erhebliches finanzielles Interesse an der GlycoUniverse GmbH & Co. KGaA, dem Unternehmen, das AGA-Syntheseinstrumente, Bausteine und andere Reagenzien vermarktet. Alle anderen Autoren haben keine konkurrierenden Interessen.

## Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind in den Hintergrundinformationen zu diesem Artikel verfügbar.

**Stichwörter:** Laser-Induzierte Vorwärtstransfertechnologie (LIFT) · Festphasensynthese · Autoimmunität · Epidermolysis Bullosa (EB) · Antikörper

[1] K. H. Schleifer, O. Kandler, *Bacteriol. Rev.* **1972**, *36*, 407–477.

- [2] M. F. Dwayne C. Savage, *Bacterial Adhesion*, Springer US, Boston, MA, **1985**.
- [3] R. Wheeler, I. Gomperts Boneca, *Gut Microbes* **2024**, *16*, 2395099.
- [4] M. Wang, G. Buist, J. M. van Dijk, *FEMS Microbiol. Rev.* **2022**, *46*, 1–19.
- [5] S. Garde, P. K. Chodiseti, M. Reddy, *EcoSal Plus* **2021**, *9*, 1–35.
- [6] A. K. Yadav, A. Espallat, F. Cava, *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–9.
- [7] W. Vollmer, D. Blanot, M. A. De Pedro, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 149–167.
- [8] P. J. Moynihan, D. Sychantha, A. J. Clarke, *Bioorg. Chem.* **2014**, *54*, 44–50.
- [9] M. A. Kohanski, D. J. Dwyer, J. J. Collins, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 423–435.
- [10] K. Berding, J. F. Cryan, *Curr. Opin. Psychiatry* **2022**, *35*, 3–9.
- [11] J. D. Laman, B. A. 't Hart, C. Power, R. Dziarski, *Trends Mol. Med.* **2020**, *26*, 670–682.
- [12] A. Adamantidis, *Science* **2022**, *376*, 248–249.
- [13] Z. Huang, J. Wang, X. Xu, H. Wang, Y. Qiao, W. C. Chu, S. Xu, L. Chai, F. Cottier, N. Pavelka, M. Oosting, L. A. B. Joosten, M. Netea, C. Y. L. Ng, K. P. Leong, P. Kundu, K.-P. Lam, S. Pettersson, Y. Wang, *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 766–773.
- [14] B. L. Jutras, R. B. Lochhead, Z. A. Kloos, J. Biboy, K. Strle, C. J. Booth, S. K. Govers, J. Gray, P. Schumann, W. Vollmer, L. K. Bockenstedt, A. C. Steere, C. Jacobs-Wagner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 13498–13507.
- [15] I. A. Schrijver, Y. A. De Man, M. J. Melief, J. M. Van Laar, H. M. Markusse, I. S. Klasen, M. P. Hazenberg, J. D. Laman, *Clin. Exp. Immunol.* **2001**, *123*, 140–146.
- [16] Y. Chen, S. M. Vargas, T. C. Smith, S. L. R. Karna, T. MacMackin Ingle, K. L. Wozniak, F. L. Wormley, J. Seshu, *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1009535.
- [17] M. M. Davis, A. M. Brock, T. G. DeHart, B. P. Boribong, K. Lee, M. E. McClune, Y. Chang, N. Cramer, J. Liu, C. N. Jones, B. L. Jutras, *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1009546.
- [18] J. Miklossy, *J. Alzheimer's Dis.* **2008**, *13*, 381–391.
- [19] I. A. Schrijver, Y. A. De Man, M.-J. Melief, J. M. Van Laar, H. M. Markusse, I. S. Klasen, M. P. Hazenberg, J. D. Laman, *Clin. Exp. Immunol.* **2001**, *123*, 140–146.
- [20] L. Visser, H. Jan de Heer, L. A. Boven, D. van Riel, M. van Meurs, M.-J. Melief, U. Zähringer, J. van Strijp, B. N. Lambrecht, E. E. Nieuwenhuis, J. D. Laman, *J. Immunol.* **2005**, *174*, 808–816.
- [21] W. G. Branton, J. Q. Lu, M. G. Surette, R. A. Holt, J. Lind, J. D. Laman, C. Power, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37344.
- [22] T. Arentsen, Y. Qian, S. Gkatzis, T. Femenia, T. Wang, K. Udekwa, H. Forsberg, R. Diaz Heijtz, *Mol. Psychiatry* **2017**, *22*, 257–266.
- [23] I. Gabanyi, G. Lepousez, R. Wheeler, A. Vieites-Prado, A. Nissant, G. Chevalier, S. Wagner, C. Moigneu, S. Dulauroy, S. Hicham, B. Polomack, F. Verny, P. Rosenstiel, N. Renier, I. G. Boneca, G. Eberl, P.-M. Lledo, *Science* **2022**, *376*, DOI 10.1126/science.abj3986.
- [24] L. C. Szymczak, H.-Y. Kuo, M. Mrksich, *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 266–282.
- [25] D. S. Mattes, N. Jung, L. K. Weber, S. Bräse, F. Breitling, *Adv. Mater.* **2019**, *31*, 1806656.
- [26] G. Paris, J. Heidepriem, A. Tsouka, Y. Liu, D. S. Mattes, S. Pinzón Martín, P. Dallabernardina, M. Mende, C. Lindner, R. Wawrzinek, C. Rademacher, P. H. Seeberger, F. Breitling, F. R. Bischoff, T. Wolf, F. F. Loeffler, *Adv. Mater.* **2022**, *34*, 2200359.
- [27] A. Tsouka, P. Dallabernardina, M. Mende, E. T. Sletten, S. Lechnitz, K. Bienert, K. Le Mai Hoang, P. H. Seeberger, F. F. Loeffler, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 19832–19837.
- [28] M. Mende, A. Tsouka, J. Heidepriem, G. Paris, D. S. Mattes, S. Eickelmann, V. Bordoni, R. Wawrzinek, F. F. Fuchsberger, P. H. Seeberger, C. Rademacher, M. Delbianco, A. Mallagaray, F. F. Loeffler, *Chem. A Eur. J.* **2020**, *26*, 9954–9963.
- [29] A. Tsouka, M. Mende, J. Heidepriem, P. Dallabernardina, M. Garcia Ricardo, T. Schmidt, K. Bienert, P. H. Seeberger, F. F. Loeffler, *Adv. Funct. Mater.* **2024**, *34*, 2310980.
- [30] K. Heiss, J. Heidepriem, N. Fischer, L. K. Weber, C. Dahlke, T. Jaenisch, F. F. Loeffler, *J. Proteome Res.* **2020**, *19*, 4339–4354.
- [31] S. Mashayekh, K. L. Bersch, J. Ramsey, T. Harmon, B. Prather, L. A. Genova, C. L. Grimes, *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 16243–16253.
- [32] S. Inamura, Y. Fujimoto, A. Kawasaki, Z. Shiokawa, E. Woelk, H. Heine, B. Lindner, N. Inohara, S. Kusumoto, K. Fukase, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 232–242.
- [33] C. M. Vacariu, M. E. Tanner, *Chem. A Eur. J.* **2022**, *28*, e202200788.
- [34] N. Wang, A. Hirata, K. Nokihara, K. Fukase, Y. Fujimoto, *Pept. Sci.* **2016**, *106*, 422–429.
- [35] P. Dallabernardina, V. Benazzi, J. D. Laman, P. H. Seeberger, F. F. Loeffler, *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 9829–9832.
- [36] F. F. Loeffler, T. C. Foertsch, R. Popov, D. S. Mattes, M. Schlageter, M. Sedlmayr, B. Ridder, F. X. Dang, C. Von Bojničić-Kninski, L. K. Weber, A. Fischer, J. Greifenstein, V. Bykovskaya, I. Buliev, F. R. Bischoff, L. Hahn, M. A. R. Meier, S. Bräse, A. K. Powell, T. S. Balaban, F. Breitling, A. Nesterov-Mueller, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 1–9.
- [37] M. M. van der Kooi-Pol, C. P. de Vogel, G. N. Westerhout-Pluister, Y. K. Veenstra-Kyuchukova, J. C. Duipmans, C. Glasner, G. Buist, G. S. Elsinga, H. Westra, H. P. J. Bonarius, H. Groen, W. J. B. van Wamel, H. Grundmann, M. F. Jonkman, J. M. van Dijk, *J. Invest. Dermatol.* **2013**, *133*, 847–850.
- [38] F. Romero Pastrana, J. Neef, D. G. A. M. Koedijk, D. de Graaf, J. Duipmans, M. F. Jonkman, S. Engelmann, J. M. van Dijk, G. Buist, *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 3234.
- [39] A. Tsouka, K. Hoetzel, M. Mende, J. Heidepriem, G. Paris, S. Eickelmann, P. H. Seeberger, B. Lepenies, F. F. Loeffler, *Front. Chem.* **2021**, *9*, 931.
- [40] S. E. Girardin, I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Laigne, G. Thomas, D. J. Philpott, P. J. Sansonetti, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8869–8872.
- [41] M. P. H. J. D. L. Ingrid A. Schrijver, M. van Meurs, M.-J. Melief, C. Wim Ang, D. Buljevac, R. Ravid, I. A. Schrijver, M. Van Meurs, M. J. Melief, C. W. Ang, D. Buljevac, R. Ravid, M. P. Hazenberg, J. D. Laman, *Brain* **2001**, *124*, 1544–1554.
- [42] C. Soliman, A. K. Walduck, E. Yuriev, J. S. Richards, C. Cywes-Bentley, G. B. Pier, P. A. Ramsland, *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 5079–5089.
- [43] L. de Vor, B. van Dijk, K. van Kessel, J. S. Kavanaugh, C. de Haas, P. C. Aerts, M. C. Viveen, E. C. Boel, A. C. Fluit, J. M. Kwiecinski, G. C. Krijger, R. M. Ramakers, F. J. Beekman, E. Dadachova, M. G. E. H. Lam, H. C. Vogely, B. C. H. van der Wal, J. A. G. van Strijp, A. R. Horswill, H. Weinans, S. H. M. Rooijackers, *eLife* **2022**, *11*, e67301.
- [44] H. C. Blenkinsopp, K. Seidler, M. Barrow, *J. Am. Nutr. Assoc.* **2023**, *43*, 59–76.

Manuskript erhalten: 28. Oktober 2024  
Akzeptierte Fassung online: 13. Februar 2025  
Endgültige Fassung online: 28. Februar 2025