

Erschließung kombinatorisch wirksamer antibakterieller Sekundärmetabolite

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jennifer Hage-Hülsmann

aus Krefeld

Krefeld, Dezember 2020

aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

- 1. Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger
- 2. Prof. Dr. Ilka Maria Axmann

Tag der mündlichen Prüfung:12.05.2021

Für meine Mutter

"Das Leben ist wie ein Fahrrad.

Man muss sich vorwärts bewegen, um das Gleichgewicht nicht zu verlieren."

Albert Einstein

Veröffentlichungen

Hage-Hülsmann J., Klaus O., Linke K., Troost K., Gora L., Hilgers F., Wirtz A., Santiago-Schübel B., Loeschcke A., Jaeger K.-E., Drepper T. (2021). Production of C20, C30 and C40 terpenes in the engineered phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. J Biotechnol. 2021 Sep 10;338:20-30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2021.07.002.

Hilgers F., Habash S.S., Loeschcke A., Ackermann Y.S., Neumann S., Heck A., Klaus O., **Hage-Hülsmann J.**, Grundler F.M.W., Jaeger K.-E., Schleker A.S.S., Drepper T. (2021). Heterologous production of β -caryophyllene and evaluation of its activity against plant pathogenic fungi. Microorganisms. 2021 Jan 14;9(1):168. doi: 10.3390/microorganisms9010168.

Loeschcke A., **Hage-Hülsmann J.**, Troost K., Wewer V., Jaeger K.-E., Drepper T. (2019). Heterologous production of plant terpenes in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. Buchkapitel - *eingereicht*.

Hage-Hülsmann J., Metzger S., Wewer V., Buechel F., Troost K., Thies S., Loeschcke A., Jaeger K.-E., Drepper T. (2019). Biosynthesis of cycloartenol by expression of plant and bacterial oxidosqualene cyclases in engineered *Rhodobacter capsulatus*. J Biotechnol. 2019;306S:100014. doi: 10.1016/j.btecx.2020.100014.

Troost K., Loeschcke A., Hilgers F., Özgür A. Y., Weber T. M., Santiago-Schübel B., Svensson V., **Hage-Hülsmann J.**, Habash S. S., Grundler F. M. W., Schleker A. S. S., Jaeger K.-E., Drepper T. (2019). Engineered *Rhodobacter capsulatus* as a phototrophic platform organism for the synthesis of plant sesquiterpenoids. Front Microbiol. 2019 Sep 6;10:1998. doi: 10.3389/fmicb.2019.01998.

Domröse A., **Hage-Hülsmann J.**, Thies S., Weihmann R., Kruse L., Otto M., Wierckx N., Jaeger K.-E., Drepper T., Loeschcke A. (2019). *Pseudomonas putida* rDNA is a favored site for the expression of biosynthetic genes. Sci Rep. 2019 May 7;9(1):7028. doi: 10.1038/s41598-019-43405-1.

Hage-Hülsmann J., Grünberger A., Thies S., Santiago-Schübel B., Klein A. S., Pietruszka J., Binder D., Hilgers F., Domröse A., Drepper T., Kohlheyer D., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2018). Natural biocide cocktails: Combinatorial antibiotic effects of prodigiosin and biosurfactants. PLoS One. 2018 Jul 19;13(7):e0200940. doi: 10.1371/journal.pone.0200940.

Loeschcke A., Dienst D., Wewer V., **Hage-Hülsmann J.**, Dietsch M., Kranz-Finger S., Hüren V., Metzger S., Urlacher V. B., Gigolashvili T., Kopriva S., Axmann I. M., Drepper T., Jaeger K.-E. (2017). The photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 as new hosts for cyclic plant triterpene biosynthesis. PLoS One. 2017 Dec 27;12(12):e0189816. doi: 10.1371/journal.pone.0189816.

Binder D., Bier C., Grünberger A., Drobietz D., **Hage-Hülsmann J.**, Wandrey G., Büchs J., Kohlheyer D., Loeschcke A., Wiechert W., Jaeger K.-E., Pietruszka J., Drepper T. (2016). Photocaged Arabinose: A Novel Optogenetic Switch for Rapid and Gradual Control of Microbial Gene Expression. Chembiochem. 2016 Feb 15;17(4):296-9. doi: 10.1002/cbic.201500609.

Domröse A., Klein A. S., **Hage-Hülsmann J.**, Thies S., Svensson V, Classen T., Pietruszka J., Jaeger K.-E., Drepper T., Loeschcke A. (2015). Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*. Front Microbiol. 2015 Sep 15;6:972. doi: 10.3389/fmicb.2015.00972.

Posterpräsentationen

Hage-Hülsmann J., Thies S., Klein A. S., Pietruszka J., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2018). Combinatorial antibiotic effects of prodigiosin and surfactants. VAAM-Jahrestagung 15-18 April 2018 Wolfsburg, Deutschland.

<u>Klaus O.</u>, Loeschcke A., Linke K., **Hage-Hülsmann J.**, Troost K., Jaeger K.-E., Drepper T. (2018). Engineering *Rhodobacter capsulatus* for the heterologous production of different terpene classes. VAAM-Jahrestagung 15-18 April 2018 Wolfsburg, Deutschland.

Hage-Hülsmann J., Loeschcke A., Klaus O., Wewer V., Metzger S., Kopriva S., Drepper T., Jaeger K.-E. (2017). Engineered *Rhodobacter capsulatus* strains for the heterologous production of triterpenes. "Future Bioeconomy" 2. PhD Day NRW, Bonn, Deutschland 01.12.2017.

Hage-Hülsmann J., Loeschcke A., Klaus O., Wewer V., Metzger S., Kopriva S., Drepper T., K.-E. Jaeger (2017). Synthetic microbes for the production of plant secondary metabolites. CEPLAS Symposium 2017, Köln, Deutschland 2017.

Hage-Hülsmann J., Grünberger A., Thies S., Wewer V., Metzger S., Klein A. S., Binder D., Hilgers F., Domröse A., Windeln L., Dluhosch D., Kopriva S., Drepper T., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2017). A strategy to new antimicrobials: combinatorial effects of natural compounds. GRC Natural Products & Bioactive Compounds, Andover, NH, USA.

Hage-Hülsmann J., Loeschcke A., Wewer V., Metzger S., Drepper T., Jaeger K.-E. (2017). Activation of triterpene production modules in *Rhodobacter capsulatus*. KWS SAAT AG, Einbeck, Deutschland, Januar 2017.

Baumann D., **Hage-Hülsmann J.**, Loeschcke A., Wewer V., Metzger S., Drepper T., Jaeger K.-E., Flügge U. I., Gigolashvili T., Kopriva S. Bioactivity of plant triterpenes produced in *Rhodobacter capsulatus* (2016). International PSE Symposium 2016 - Ghent, Belgium Plant Omics and Biotechnology for Human Health 21.11.2016- 24.11.2016.

Hage-Hülsmann J., Grünberger A., Thies S., Domröse A., Klein A. S., Binder D., Hilgers F., Kohlheyer D., Pietruszka J., Jaeger K.-E., Drepper T., <u>Loeschcke A. (2016</u>). Combinatorial antibiotic effects of natural biocide cocktails. IV International Conference on Antimicrobial Research (ICAR 2016) Jun 29 - Jul 1, 2016 Palacio de Congresos y Exposiciones de la Costa del Sol, Torremolinos, Spanien, 2016.

<u>Thies S.</u>, Loeschcke A., **Hage-Hülsmann J.**, Santiago-Schübel B., Kovacic F., Jaeger K.-E. (2015). Recombinant production of the lipopeptide biosurfactant Serrawettin W1. VAAM-Jahrestagung, Marburg, Deutschland, 2015.

Hage-Hülsmann J., Loeschcke A., Drepper T., Jaeger K.-E. (2016). Recombinant production of plant terpenes in bacteria. CEPLAS Symposium 2016, Düsseldorf, Deutschland, 2016.

<u>Domröse A.</u>, Klein A. S., **Hage-Hülsmann J.**, Pietruszka J., Jaeger K.-E., Drepper T., Loeschcke A. (2015). TREX - a synthetic biology tool used for the bacterial production of prodigiosin. 6th European Conference on Prokaryotic and Fungal Genomics ProkaGENOMICS, Göttingen, Deutschland, 2015.

Loeschcke A., Thies S., **Hage-Hülsmann J.**, Grünberger A., Binder D., Domröse A., Klein A. S., Kohlheyer D., Pietruszka J., Jaeger K.-E., Drepper T. (2015). Heterologous production of antibacterial secondary metabolites from *Serratia marcescens* in *Pseudomonas putida*. 6th Congress of European Microbiologists (FEMS 2015), Maastricht, Niederlande, 2015.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für das Überlassen des wissenschaftlich interessanten und aktuellen Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf anfertigen zu können. Prof. Dr. Ilka Axmann danke ich für die tolle und ertragreiche Kooperation sowie die Übernahme des Korreferats meiner Arbeit und die stetige Ansprechbarkeit und Betreuung. Ebenso danke ich dem Cluster of Excellence on Plant Sciences (CEPLAS) für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und die Möglichkeit, Teil einer hervorragenden Graduiertenschule zu sein. Viele interessante, relevante und sehr hilfreiche Angebote zur Weiterbildung haben mich sowohl beruflich als auch privat weitergebracht. Den Koordinatorinnen des Clusters danke ich für die stetige Unterstützung bei der Durchführung des Curriculums der Promotion sowie für die hervorragende Organisation diverser spannender Veranstaltungen. Dr. Thomas Drepper danke ich für die permanente Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit sowie für seine hilfreichen, wissenschaftlichen Diskussionen zum Fortgang des Projekts. Dr. Anita Loeschcke danke ich für die stetig engagierte und hilfreiche Betreuung während meiner gesamten Promotionszeit sowie für viele wertvolle Ratschläge und Ermutigungen hinsichtlich meiner Arbeit. Jun.-Prof. Dr. Alexander Grünberger, Dr. Stephan Thies und Dr. Dennis Binder danke ich für die wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge und die Möglichkeit, mittels Kooperationen meinen Horizont zu erweitern. Meiner Arbeitsgruppe und allen anderen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die schöne und freundliche Arbeitsatmosphäre. Dr. Sabine Metzger und Dr. Vera Wewer von der Biocenter MS Plattform der Universität zu Köln danke ich für die engagierte und hoch interessante Zusammenarbeit bei der Analyse unserer Proben. Ebenso danke ich allen weiteren Kooperationspartnern und der gesamten Research Area-D für die Möglichkeit, Teil eines interdisziplinären und wissenschaftlich sehr interessanten Netzwerks zu sein. Schlussendlich gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden für die stetige Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Inhaltsverzeichnis

Inha	ltsverzeichnis	I
Abbi	ildungsverzeichnis	IV
Abbi	ildungsverzeichnis des Anhangs	vı
Tabe	ellenverzeichnis	.VII
Tabe	ellenverzeichnis des Anhangs	VIII
Abki	ürzungsverzeichnis	IX
1 Ei	inleitung	1
1.1	Sekundärmetabolite	1
1.2	Antibiotika	2
1.3	Alternative Behandlungsstrategien bakterieller Infektionen	8
1.4	Mikrobiologische und biotechnologische Ansätze dieser Arbeit zur Wirkstofferschließung	. 12
1.5	Eine natürliche Sekundärmetabolit-Kombination aus Serratia marcescens	. 13
1.6	Prodiginine – Fokus Prodigiosin	. 14
1.7	Tenside – Fokus Biotenside	. 17
1.8	Bioaktive pflanzliche Sekundärmetabolite in medizinischen Therapeutika	. 21
1.9	Terpene – Fokus Triterpene	. 24
1.1	0 Heterologe Biosynthese von Terpenen in <i>Rhodobacter capsulatus</i>	. 28
1.1	1 Zielsetzung	. 31
2 IV	Naterial und Methoden	. 32
2.1	Materialien, Verbrauchsmittel und Geräte	. 32
2.2	Bakterienstämme	. 32
2.3	Plasmide	. 33
2.4	Oligonukleotide	. 34
2.5	Allgemeine mikrobiologische Methoden	. 35
	2.5.1 Nährmedien	. 35
	2.5.2 Antibiotika	. 37
	2.5.3 Allgemeine Anzucht und Lagerung von Bakterien	. 38
	2.5.3.1 Kultivierung von Bakterien während Klonierungsarbeiten	. 38
	2.5.3.2 Bestimmung optischer Dichten	. 38
	2.5.3.3 Lagerung von Bakterien	. 38
2.6	Molekularbiologische Methoden	. 39
	2.6.1 Übertragung von DNA in Bakterien	. 39
	2.6.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	. 39

		2.6.1.2 Transformation	40
		2.6.1.3 Konjugation	40
	2.6.2	Molekulargenetische Standardverfahren zur Modifikation von Plasmid-DNA	. 41
2.7	Testn	nethoden zur Bestimmung antibakterieller Eigenschaften	42
	2.7.1	Agardiffusionstest	. 42
	2.7.2	Bouillonverdünnungsmethoden	43
		2.7.2.1 Makrodilutionsmethode	47
		2.7.2.2 Mikrodilutionsmethode	50
	2.7.3	Einzelzellanalyse im mikrofluidischen System	52
2.8	Herkı	unft der untersuchten bioaktiven Substanzen	53
2.9	Heter	ologe Triterpenproduktion in <i>R. capsulatus</i>	. 59
	2.9.1	Mikroaerobe Anzucht von R. capsulatus zur heterologen Expression pflanzlicher	
		Triterpenbiosynthesegene	59
	2.9.2	Untersuchung physiologischer Parameter	60
		2.9.2.1 Wachstum und Pigmentierung	61
		2.9.2.2 Bestimmung des Zelltrockengewichts	61
	2.9.3	Extraktions- und Detektionsverfahren	62
		2.9.3.1 Extraktion	62
		2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse	63
3 Er	gebni	2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse	63 65
3 Er 3.1	gebni Kapiti	2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse sse und Diskussion	63 65 68
3 Er 3.1	gebni Kapita 3.1.1	2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse sse und Diskussion el I Antibakterieller Effekt der natürlichen Sekundärmetabolit-Kombination Prodigiosin	63 65 68
3 Er 3.1	gebni Kapita 3.1.1	2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse sse und Diskussion el I Antibakterieller Effekt der natürlichen Sekundärmetabolit-Kombination Prodigiosin und Serrawettin W1 aus Serratia marcescens	. 63 . 65 . 68
3 Er 3.1	gebni Kapita 3.1.1 3.1.2	2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse sse und Diskussion el I Antibakterieller Effekt der natürlichen Sekundärmetabolit-Kombination Prodigiosin und Serrawettin W1 aus Serratia marcescens Varianz der tensidischen Wirkverstärker-Komponente Serrawettin W1	. 63 . 65 . 68 . 69 . 73
3 Er 3.1	gebni Kapitr 3.1.1 3.1.2	 2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse	. 63 . 65 . 68 . 69 . 73
3 Er 3.1	gebni Kapitu 3.1.1 3.1.2	 2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse	. 63 . 65 . 68 . 69 . 73
3 Er 3.1	gebni Kapitu 3.1.1 3.1.2	 2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse	. 63 . 65 . 68 . 69 . 73 . 73
3 Er 3.1	gebni Kapitu 3.1.1 3.1.2	 2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse	. 63 . 65 . 68 . 69 . 73 . 73 . 80
3 Er 3.1	gebni Kapita 3.1.1 3.1.2	 2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse	. 63 . 65 . 68 . 69 . 73 . 73 . 80
3 Er 3.1	gebni Kapita 3.1.1 3.1.2	 2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse	. 63 . 65 . 68 . 69 . 73 . 73 . 80 . 89 . 89
3 Er 3.1	gebni Kapita 3.1.1 3.1.2	 2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse	. 63 . 65 . 68 . 69 . 73 . 73 . 80 . 89 . 89
3 Er 3.1	gebni Kapitu 3.1.1 3.1.2	 2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse	. 63 . 65 . 68 . 73 . 73 . 80 . 89 . 89 . 94
3 Er 3.1	gebni Kapita 3.1.1 3.1.2	 2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse	. 63 . 65 . 68 . 73 . 73 . 80 . 89 . 89 . 94 . 98
3 Er 3.1	gebni Kapita 3.1.1 3.1.2 3.1.3	 2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse	. 63 . 65 . 68 . 73 . 73 . 80 . 89 . 89 . 94 . 98 108

		3.1.3.2 N-Myristoyltyrosin und das Prodigiosin-Derivat-F	114		
	3.1.4	Abgeleitete antibakterielle Stoffkombinationen zweiten Grades mit N-Myristoyl-			
		tyrosin als fester Kombinationskomponente	119		
		3.1.4.1 N-Myristoyltyrosin und etablierte Antibiotika	119		
		3.1.4.2 N-Myristoyltyrosin und pflanzliche Triterpene	127		
3.2	Kapite	el II	138		
	3.2.1	Etablierung von R. capsulatus als Expressionswirt der heterologen Triterpen-			
		produktion	139		
		3.2.1.1 Modularer Aufbau des Triterpenbiosynthesewegs	139		
		3.2.1.2 Heterologe Biosynthese zyklischer Triterpene in <i>R. capsulatus</i>	143		
		3.2.1.3 Effekte der heterologen Triterpenproduktion auf die Zellfitness von			
		R. capsulatus	151		
	3.2.2	Optimierung der Triterpenproduktion	155		
		3.2.2.1 Optimierung der Squalenproduktion	157		
		3.2.2.2 Optimierung der Cycloartenolproduktion	161		
3.3	Kapite	el III	175		
	3.3.1	Belegt das Beispiel S. marcescens, dass Mikroorganismen komplexer Ökosysteme,			
		hier des Bodenhabitats, eine Inspirationsquelle für kombinatorisch antibakteriell			
		aktive Stoffkombinationen sind?	176		
	3.3.2	Welche Vorteile bietet der phototrophe Expressionswirt R. capsulatus zur Bereit-			
		stellung von Triterpenen durch die heterologe Biosynthese?	179		
Zusai	mmen	ifassung	185		
Sumr	nary.		187		
Litera	teraturverzeichnis				
Anha	ng		219		
Auth	uthor Contributions Statement239				
Eides	stattl	iche Versicherung	241		

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Beispiele fördernder Faktoren der Entstehung und Verbreitung von Antibiotika- resistenzen	. 5
Abbildung 2:	Wirkweisen von Antibiotika und bakterielle Resistenzmechanismen.	. 7
Abbildung 3:	Mögliche Wirkweisen von antimikrobiellen Wirkverstärkern	11
Abbildung 4:	Das Tripyrrol-Prodiginin Prodigiosin	14
Abbildung 5:	Vereinfachter amphiphiler Aufbau von Tensiden.	17
Abbildung 6:	Das Biotensid Serrawettin W1	20
Abbildung 7:	Das Biotensid N-Myristoyltyrosin	21
Abbildung 8:	Biosynthesewege verschiedener Terpenklassen	26
Abbildung 9:	Der Triterpenbiosyntheseweg inklusive verschiedener Umsetzungsarten von 2,3-Oxidosqualen durch Oxidosqualenzyklasen	27
Abbildung 10:	Das Plasmid pRhon5Hi-2.	33
Abbildung 11:	Korrelation zwischen im Photometer und im Plattenphotometer gemessenen optischen Dichten	49
Abbildung 12:	Analyse der verwendeten Charge von Prodigiosin	54
Abbildung 13:	Analyse der verwendeten Charge von Serrawettin W1.	56
Abbildung 14:	Analyse der verwendeten Charge von N-Myristoyltyrosin.	57
Abbildung 15:	Korrelation zwischen Zelltrockengewichten und optischen Dichten in <i>R. capsulatus</i> -Expressionskulturen	62
Abbildung 16:	Antibakterielle Wirkung von Streptomycin gegen <i>C. glutamicum</i> im Agardiffusionstest	70
Abbildung 17:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und Serrawettin W1 gegen C. glutamicum im Agardiffusionstest.	71
Abbildung 18:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und Triton X-100 gegen C. glutamicum im Agardiffusionstest.	74
Abbildung 19:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und SDS gegen <i>C. glutamicum</i> im Agardiffusionstest.	75
Abbildung 20:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und Tween 20 gegen <i>C. glutamicum</i> im Agardiffusionstest.	77
Abbildung 21:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und Rhamnolipiden gegen C. glutamicum im Agardiffusionstest.	82
Abbildung 22:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und Mannosylerythritol- lipiden gegen <i>C. glutamicum</i> im Agardiffusionstest	84

Abbildung 23:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und <i>N</i> -Myristoyltyrosin gegen <i>C. glutamicum</i> im Agardiffusionstest	. 86
Abbildung 24:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin gegen C. glutamicum im Makrodilutionstest zur MIC-Bestimmung.	. 91
Abbildung 25:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und <i>N</i> -Myristoyltyrosin gegen <i>C. glutamicum</i> im Makrodilutionstest zur MBC-Bestimmung	. 95
Abbildung 26:	Bildung von Mikrokolonien des Bakteriums <i>C. glutamicum</i> unter dem separaten sowie dem kombinierten Einfluss von Prodigiosin und <i>N</i> -Myristoyltyrosin	100
Abbildung 27:	Vergleich der <i>C. glutamicum</i> -Morphologie unter Einfluss von Prodigiosin und <i>N</i> -Myristoyltyrosin	101
Abbildung 28:	Effekt einer kombinierten Applikation von Prodigiosin und <i>N</i> -Myristoyltyrosin auf die Anfälligkeit von <i>C. glutamicum</i> gegen diese Stoffe.	102
Abbildung 29:	Unterschiedlich substituierte Prodigiosin-Derivate.	110
Abbildung 30:	Kombinierte antibakterielle Aktivitäten von <i>N</i> -Myristoyltyrosin und Prodigiosin bzw. dem Prodigiosin-Derivat-F im Mikrodilutionstest gegen <i>S. aureus</i>	116
Abbildung 31:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von <i>N</i> -Myristoyltyrosin und Streptomycin gegen <i>C. glutamicum</i> im Agardiffusionstest	120
Abbildung 32:	Makrodilutionstest zur Bestimmung der kombinatorischen Wirkung von <i>N</i> -Myristoyltyrosin und Streptomycin gegen <i>C. glutamicum</i>	122
Abbildung 33:	Die Triterpene Oleanol- und Ursolsäure.	128
Abbildung 34:	Kombinierte antibakterielle Wirkungen des Biotensids N-Myristoyltyrosin und Oleanol- bzw. Ursolsäure gegen S. aureus.	129
Abbildung 35:	Strategie zur Implementierung des Triterpenbiosynthesewegs aus A. thaliana in R. capsulatus	141
Abbildung 36:	LC-MS-Analysen der Aktivierung von <i>A. thaliana</i> -Triterpenbiosynthesewegen in <i>R. capsulatus</i>	145
Abbildung 37:	LC-MS-Analyse des im Rahmen der heterologen Triterpenbiosynthese in <i>R. capsulatus</i> zusätzlich vorkommenden, als LupX bezeichneten Produkts	147
Abbildung 38:	MS/MS-Spektren der Triterpene Squalen, 2,3-Oxidosqualen, Cycloartenol, Lupeol und LupX.	148
Abbildung 39:	Wachstum und Carotinoidbildung von <i>R. capsulatus</i> während der heterologen Triterpenproduktion	152
Abbildung 40:	Heterologe Produktion von Squalen und 2,3-Oxidosqualen in verschiedenen <i>R. capsulatus</i> -Stämmen	163
Abbildung 41:	Klonierungsstrategie zur Expression verschiedener Cycloartenolsynthasegene	164
Abbildung 42:	Heterologe Cycloartenolproduktion in verschiedenen <i>R. capsulatus</i> -Stämmen mittels unterschiedlicher Cycloartenolsynthasen.	165

Abbildung 43:	Detektion e	eines	zusätzlichen	Triterpe	nprodukts	während	der	heterol	ogen	
	Cycloartenol	biosyr	nthese mittels	diverser	Cycloarten	olsynthase	en in ve	erschiede	enen	
	R. capsulatu	s-Stärr	nmen							168
Abbildung 44:	Detaillierte A	Analys	e des Triterpe	nprodukt	s CasX				•••••	170
					_					
Abbildung 45:	Gesteigerte	Prod	igiosinproduk	tion in	S. marceso	<i>cens</i> in	Anwes	senheit	von	
	tensidischen	Verbi	ndungen		••••••	•••••		•••••		178

Abbildungsverzeichnis des Anhangs

Anhang-Abbildung 1:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und einem Leervektor-Extrakt des Produktionswirts <i>P. putida</i> im Agardiffusionstest gegen <i>C. glutamicum</i>
Anhang-Abbildung 2:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und Rohextrakt des <i>U. maydis</i> -Stamms UMa2112 im Agardiffusionstest gegen <i>C. glutamicum</i> 222
Anhang-Abbildung 3:	Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 224
Anhang-Abbildung 4:	Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13032 225
Anhang-Abbildung 5:	Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057
Anhang-Abbildung 6:	Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Anhang-Abbildung 7:	Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 228
Anhang-Abbildung 8:	Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen <i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Spektrum der antibakteriellen Wirkung von Prodigiosin.	۱5
Tabelle 2:	In medizinischen Therapeutika etablierte pflanzliche Substanzen.	22
Tabelle 3:	Verwendete Bakterienstämme	32
Tabelle 4:	Verwendete Expressionsplasmide	34
Tabelle 5:	Verwendete Oligonukleotide	34
Tabelle 6:	Zusammensetzung der Nährmedien	35
Tabelle 7:	Antibiotikakonzentrationen zur Generierung von Selektionsdrücken	37
Tabelle 8:	Beispiele unterschiedlicher Kategorien zur Evaluierung von FICI-Werten im Rahmen der Klassifizierung kombinierter antibakterieller Effekte	15
Tabelle 9:	Anzeige der Reduktion an benötigten Stoffmengen einzelner und kombinierter Verbindungen zur Inhibition bakteriellen Wachstums durch beispielhafte FIC- bzw. FICI-Werte.	16
Tabelle 10:	Prodigiosin-Derivate	55
Tabelle 11:	Übersicht kombinatorischer antibakterieller Effekte zwischen Prodigiosin und tensidischen Verbindungen	38
Tabelle 12:	Klassifizierung des kombinatorischen antibakteriellen Effekts von Prodigiosin und <i>N</i> -Myristoyltyrosin gegen <i>C. glutamicum</i>	93
Tabelle 13:	Minimale Hemmkonzentrationen verschiedener Prodigiosin-Derivate gegen humane Modellpathogene11	12
Tabelle 14:	Kombinatorische antibakterielle Effekte von <i>N</i> -Myristoyltyrosin und etablierten Antibiotika gegen <i>C. glutamicum</i>	24
Tabelle 15:	Chemische Eigenschaften der in Kombination mit <i>N</i> -Myristoyltyrosin eingesetzten antibakteriellen Verbindungen	34
Tabelle 16:	Summenformeln mit einigen ausgewählten berechneten m/z-Werten der im Zuge der heterologen Produktion detektierten Triterpene	14
Tabelle 17:	Mengenangaben der heterolog produzierten Triterpene in R. capsulatus SB1003 15	50
Tabelle 18:	Produktionstiter von Squalen in <i>R. capsulatus</i> bei heterologer Expression verschiedener Squalensynthasen und Vorstufenbiosynthesegene	58

Tabellenverzeichnis des Anhangs

Anhang-Tabelle 1:	Physikochemische Eigenschaften und gemessene antibakterielle Effekte der eingesetzten Tenside
Anhang-Tabelle 2:	Konvertierungstabelle der zur MIC-Bestimmung verwendeten Stoffmengenkonzentrationen diverser Prodiginine in Massenkonzentra- tionen
Anhang-Tabelle 3:	In Massenkonzentrationen umgerechnete minimale Hemmkonzentra- tionen von Prodigiosin und diversen Prodigiosin-Derivaten gegen humane Modellpathogene
Anhang-Tabelle 4:	Codon-optimierte Sequenz der bakteriellen Cycloartenolsynthase aus S. aurantiaca DW4/3-1
Anhang-Tabelle 5:	Codon-optimierte Sequenz der bakteriellen Cycloartenolsynthase aus S. aurantiaca Sg a15
Anhang-Tabelle 6:	Codon-optimierte Sequenz der pflanzlichen Cycloartenolsynthase aus A. thaliana
Anhang-Tabelle 7:	Codon-optimierte Sequenz der pflanzlichen Squalensynthase aus A. thaliana
Anhang-Tabelle 8:	Codon-optimierte Sequenz der pflanzlichen Squalenepoxidase aus A. thaliana
Anhang-Tabelle 9:	Codon-optimierte Sequenz der pflanzlichen Lupeolsynthase aus A. thaliana
Anhang-Tabelle 10:	Cycloartenolmengen in <i>R. capsulatus</i>

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
CBC	Sessel-Boot/Wanne-Sessel-Konformation (engl.: chair-boat-chair)
CCC	Sessel-Sessel-Sessel-Konformation (engl.: chair-chair-chair)
CFU	koloniebildende Einheit (engl.: <i>colony forming units</i>)
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DCW	Zelltrockengewicht (engl.: dry cell weight)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
EIC	extrahiertes Ionenchromatogramm (engl.: extracted ion chromatogram)
ESI	Elektrospray-Ionisation (engl.: electrospray ionization)
EVC	Leervektor (engl.: <i>empty vector control</i>)
FIC	Fractional Inhibitory Concentration
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index
g	Gramm
xg	ein Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde(n) (engl.: <i>hour</i>)
kb	Kilobasen
L	Liter
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mМ	Millimolar
MBC	minimale bakterizide Konzentration (engl.: minimum bactericidal concentration)
MIC	minimale Hemmkonzentration (engl.: minimum inhibitory concentration)
Min	Minuten
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i> , analysenrein
ppm	parts per million (wörtlich übersetzt "Anteile pro Million")
RT	Retentionszeit (engl.: retention time)
S	Sekunde(n)
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volumen
W	Gewicht (engl.: <i>weight</i>)
(w/v)	Gewicht pro Volumen (engl.: <i>weight per volume</i>)
(v/v)	Volumen pro Volumen (engl.: <i>volume per volume</i>)
°C	Grad Celsius
μ	mikro
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar

1 Einleitung

Die stetige Zunahme antibiotikaresistenter Bakterien, mitunter vieler multiresistenter Stämme, und zugleich die Abnahme der Anzahl effektiver Wirkstoffe zur Behandlung bakterieller Infektionen sind eine enorme Herausforderung für das Gesundheitssystem der gesamten Welt (Antão et al., 2018; Brooks & Brooks, 2014; Giono-Cerezo et al., 2020; Morehead & Scarbrough, 2018; Theuretzbacher, 2013). Da die evolutive bakterielle Resistenzentstehung derzeit wesentlich schneller als die Entdeckung und Entwicklung wirksamer Antibiotika ist, steigt die Dringlichkeit neue effektive Behandlungsmethoden zu finden kontinuierlich (Coates et al., 2011; da Rosa et al., 2020; Podolsky, 2018; Zaman et al., 2017). Neben der Identifizierung bislang unbekannter antimikrobiell wirksamer Verbindungen bieten kombinierte Applikationen, bei denen eine zweite Substanz zur Verstärkung der antibakteriellen Wirkung mit in die Therapie einbezogen wird, einen alternativen Lösungsansatz zur Bekämpfung resistenter Bakterien (Bernal et al., 2013; Brooks & Brooks, 2014; Ejim et al., 2011; Schneider et al., 2017). Dabei existieren verschiedene Kombinationstypen, etwa bestehend aus (i) zwei Antibiotika oder (ii) einem Antibiotikum und einem Nicht-Antibiotikum (Bernal et al., 2013; Brooks & Brooks, 2014; Kalan & Wright, 2011; Schneider et al., 2017). Solche wirkverstärkenden Substanzen können in unterschiedliche Klassen unterteilt werden. Eine dieser Klassen ist nach Brooks und Brooks die Gruppe der natürlichen und biologischen Wirkverstärker, der unter anderem Biotenside und pflanzliche Sekundärmetabolite zugeordnet werden (Brooks & Brooks, 2014). Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit genau dieser Art antibakteriell wirkender Substanzkombinationen bestehend aus einer Antibiotikum-Komponente und einer Wirkverstärker-Komponente, bei denen im Speziellen (Bio)Tenside und/oder pflanzliche Sekundärmetabolite involviert sind. Insgesamt soll im Rahmen dieser Arbeit ein Beitrag zur weiteren Erforschung derartiger Stoffkombinationen durch die "Erschließung kombinatorisch wirksamer antibakterieller Sekundärmetabolite" mittels zwei mikrobiologischer bzw. biotechnologischer Ansätze geleistet werden.

1.1 Sekundärmetabolite

Der Begriff Sekundärmetabolite wurde ursprünglich von Albrecht Kossel im Jahr 1891 geprägt und bezeichnet jene Substanzen eines Organismus, welche nicht zum primären Lebenserhalt notwendig sind, und damit keinen direkten Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung eines Organismus haben (Ahmed *et al.*, 2017; Croteau *et al.*, 2000; Kossel, 1891; Thirumurugan *et al.*, 2018). Sekundärmetabolite erfüllen in der Natur eine Reihe verschiedener Aufgaben, zu denen mitunter die Funktionen als (i) Botenstoffe zur Kommunikation in ökologischen Interaktionen, (ii) Sexualhormone, (iii) Metallionen-transportierende Moleküle oder (iv) Differenzierungsfaktoren bei der Entwicklung von Pflanzen zählen (Demain & Fang, 2000; Thirumurugan et al., 2018). Des Weiteren sind viele Sekundärmetabolite Bestandteile chemischer Verteidigungsmechanismen, wodurch die Verbindungen ihren Produzenten schützen und ihm einen Überlebensvorteil verschaffen (Berenbaum, 1995). Dementsprechend können pflanzliche Sekundärmetabolite beispielsweise einen Schutz vor Herbivoren bieten (Ahmed et al., 2017; War et al., 2012). Bakterielle Sekundärmetabolite können das Wachstum von mikrobiellen Konkurrenten in einem gemeinsamen Habitat einschränken bzw. gänzlich stoppen, wodurch die Sekundärmetabolit-produzierenden Bakterien einen Selektionsvorteil haben und ihr Überleben gesichert wird (Demain & Fang, 2000). Neben den natürlichen Funktionen sind Sekundärmetabolite oder davon abgeleitete Derivate aufgrund ihrer diversen Bioaktivitäten ebenfalls hinsichtlich des pharmazeutischen Gebrauchs für den Menschen nützlich, sodass Naturstoffe seit Jahren eine schier unerschöpfliche Quelle für die Entdeckung neuer Arzneimittel sind (Bérdy, 2005; Demain, 1999; Newman & Cragg, 2016; Vaishnav & Demain, 2011). Diesbezüglich ist eine früh entwickelte und bis in die heutige Zeit reichende weitverbreitete Applikation die Verwendung antibakterieller Naturstoffe zur Behandlung von Infektionen, wodurch sich viele Substanzen als klinisch relevante Antibiotika etablierten (Gould, 2016; Katz & Baltz, 2016; Mohr, 2016).

1.2 Antibiotika

Definition Antibiotikum

- vom Ursprung bis zur heutigen Auffassung -

Der Wortstamm des Begriffs "Antibiotikum" liegt im Griechischen und setzt sich aus den Wörtern "gegen" (anti) und "Leben" (bios) zusammen (Keyes *et al.*, 2003). Geprägt wurde der Begriff zunächst im Französischen durch das Wort *Antibiose* (Bentley & Bennett, 2003). Dessen Definition stammt von Jean-Paul Vuillemin aus dem Jahr 1889 und wird oftmals sinngemäß als folgendes natürliches Phänomen zitiert "...*one creature destroying the life of another in order to sustain its own...*" (Manikprabhu & Li, 2015; Vuillemin, 1889; Waksman, 1947). Zu dem Zeitpunkt der Markteinführung des Antibiotikums Penicillin (1941) und der beginnenden Entdeckung verschiedener antimikrobieller Sekundärmetabolite wurde die Definition eines für diese Substanzen gültigen Begriffs erforderlich (Bentley & Bennett, 2003; Waksman, 1947). Daraufhin wurde das Wort "Antibiotikum" in wissenschaftlichen Artikeln von Waksman um das Jahr 1942 verwendet bzw. bekannt gemacht und 1947 von diesem erstmals im heutigen Sinne, wie das nachfolgend aufgeführte wörtliche Zitat belegt, definiert (Waksman, 1947): "An antibiotic is a chemical substance, produced by micro-organisms, which has the capacity to inhibit the growth of and even to destroy bacteria and other micro-organisms. The action of an antibiotic against micro-organisms is selective in nature, some organisms being affected and others not at all or only to a limited degree; each antibiotic is thus characterized by a specific antimicrobial spectrum. The selective action of an antibiotic is also manifested against microbial vs. host cells. Antibiotics vary greatly in their physical and chemical properties and in their toxicity to animals. Because of these characteristics, some antibiotics have remarkable chemotherapeutic potentialities and can be used for the control of various microbial infections in man and in animal."

Während im zweiten Teil der Definition mit dem heutigen Verständnis deckungsgleich die Wirkintensität, das spezifische Wirkspektrum und die Anwendungsmöglichkeiten beschrieben sind, werden dabei jedoch nur jene natürlichen Substanzen als Antibiotika verstanden, welche aus Mikroorganismen stammen. Pflanzliche Sekundärmetabolite waren hingegen in der ursprünglichen Definition gänzlich ausgeschlossen. Ebenso erfolgte zunächst keine Aussage hinsichtlich eines maximalen Konzentrationsbereichs, bis zu dem der betrachtete Stoff eine antimikrobielle Wirksamkeit aufweisen muss, um als sogenanntes Antibiotikum klassifiziert zu werden. Später folgte diesbezüglich eine von Waksman selbst vorgenommene Verfeinerungen der oben genannten Definition, durch den auch derzeit noch gültigen Zusatz, dass als Antibiotika bezeichnete Substanzen bereits bei geringen Konzentrationen eine Wirkung zeigen müssen (Bennett, 2015; Bentley & Bennett, 2003). Heutzutage ist der Begriff wesentlich weiter gefasst und es existieren vielfältige Definitionen aus verschiedenen Fachbereichen, welche beispielshalber semisynthetische und synthetische Verbindungen sowie teilweise pflanzliche Naturstoffe mit einbeziehen (Bennett, 2015; Bentley & Bennett, 2003; EUCAST, 2000). Des Weiteren wird der Terminus Antibiotikum zum Teil auf ausschließlich antibakterielle Eigenschaften, im Gegensatz zu antimikrobiellen Wirkungen wie sie von Waksman beschrieben wurden, bezogen (Bentley & Bennett, 2003). Schlussendlich ist somit auch heute keine umfassend gültige Definition des Wortes Antibiotikum vorhanden, sodass es vielmehr diverse Bedeutungen und Konnotationen besitzt (Bennett, 2015; Bentley & Bennett, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wird hauptsächlich zwischen (i) klinisch etablierten Antibiotika zur Behandlung bakterieller Infektionen, (ii) nicht etablierten antibakteriellen Substanzen mikrobiellen bzw. bakteriellen Ursprungs, und (iii) pflanzlichen Sekundärmetaboliten mit antibakteriellen Eigenschaften unterschieden.

Die Historie der Antibiotika

- von der Entdeckung über die Resistenzentwicklung bis hin zur heutigen Situation -

Im Jahre 1928 setzte Alexander Flemming mit der Entdeckung eines der wohl bekanntesten Antibiotika der Welt, des Penicillins, in Pilzen der Gattung Penicillium, einen Meilenstein im Bereich der Medizin (Fleming, 1929). Bereits im Jahre 1941 wurden erste klinische Studien mit Penicillin erfolgreich durchgeführt, woraufhin das Antibiotikum für medizinische Therapien etabliert wurde (Fletcher, 1984; Lobanovska & Pilla, 2017). Dies sorgte für einen enormen Fortschritt in der Bekämpfung bakterieller Infektionen. Der riesige Erfolg sowie die große Bedeutung der Penicillineinführung ist unter anderem an den zahlreichen gelungenen Behandlungen von Soldaten und Zivilisten im Zweiten Weltkrieg erkennbar und spiegelte sich ebenfalls in dem damaligen sehr präsenten Werbeslogan "Thanks to PENICILLIN ... He Will Come Home!" wider (Huttner et al., 2013; Lobanovska & Pilla, 2017). Nach der Erforschung von Penicillin begann das sogenannte "goldene Zeitalter der Antibiotika-Entdeckung". Dies beschreibt die darauffolgenden Jahrzehnte von ungefähr 1940-1960, in denen eine Reihe neuer Antibiotika, wie etwa Chloramphenicol, Tetracyclin, Streptomycin, Erythromycin und Vancomycin, entdeckt wurden (Silver, 2011; Singh & Barrett, 2006; Walsh & Wencewicz, 2014). Als A. Flemming im Jahre 1945 mit dem Nobelpreis für seine Entdeckung ausgezeichnet wurde, postulierte er jedoch bereits in seiner Dankesrede sowohl die Leichtigkeit, mit der Mikroben Resistenzen entwickeln können, als auch die damit verbundenen Gefahren (Barriere, 2015; Fleming, 1945). Obwohl bis 1944 nur wenige resistente Bakterien gefunden wurden, bestätigten sich A. Flemmings Vermutungen und Befürchtungen kurz darauf, wie der rasante Anstieg Penicillin-resistenter Staphylococcus-Stämme in den Krankenhäusern Londons zeigt (Barber & Rozwadowska-Dowzenko, 1948; Huttner et al., 2013). In den folgenden Jahren kamen viele weitere bakterielle Resistenzen auf, sodass die Anzahl neuer resistenter bzw. multiresistenter Bakterien stetig bis in die heutige Zeit anstieg und kontinuierlich weiter ansteigt (Brooks & Brooks, 2014; Huttner et al., 2013; Levy & Marshall, 2004; Martens & Demain, 2017; Morehead & Scarbrough, 2018). Diese permanente Neuentwicklung sowie die damit verbundene Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen wurden und werden durch diverse Faktoren gefördert (Abbildung 1). Dies hat zur Folge, dass inzwischen zahlreiche multiresistente Bakterien existieren. Die Gruppe der mit dem Akronym ESKAPE bezeichneten bakteriellen Pathogene (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus* aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa und Enterobacter spp.) ist sehr problematisch, da die Vertreter dieser Gruppe besonders resistent gegen diverse Antibiotika sind und den Ursprung für viele nosokomiale Infektionen darstellen (da Rosa et al., 2020; Ma et al., 2019; Rice, 2008).



Abbildung 1: Beispiele fördernder Faktoren der Entstehung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen. Diverse Faktoren fördern heutzutage die Bildung und Ausbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien. Dazu zählen beispielshalber (i) die falsche Applikation von Antibiotika, zu der ein übermäßiger und ein fehlerhafter Einsatz zählen, (ii) der nicht-therapeutische Gebrauch etwa in der Viehzucht und in Aquakulturen und (iii) die Globalisierung, welche das internationale Reisen und den Gesundheitstourismus fördert. Fotografien von Jennifer Hage-Hülsmann.

Zu den fördernden Faktoren der Entstehung und Verbreitung von Antibiotikaresistenzen zählen unter anderem der fehlerhafte, aber auch übermäßige Einsatz von Antibiotika mit dem Ziel der Infektionstherapie beim Menschen (Alnemri et al., 2016). Dieser ist in vielen Ländern auf Unwissenheit bzw. fehlendes Bewusstsein bezüglich des Themas, einen leichten Zugang zu Antibiotika ohne Rezepte, die Einnahme übrig gebliebener Antibiotikareste aus vorherigen Therapien und die dadurch mögliche Selbstmedikation zurückzuführen (Alnemri et al., 2016; Machowska & Stålsby Lundborg, 2019). Ebenso ist der nicht-therapeutische Gebrauch in der Viehzucht und in Aquakulturen ein großer Teilaspekt (Cantas et al., 2013; Levy & Marshall, 2004; Marshall & Levy, 2011; Woolhouse et al., 2015). Des Weiteren begünstigt die Globalisierung, welche das weltweite Reisen einschließlich des Gesundheitstourismus fördert, die Ausbreitung (Barlam & Gupta, 2015; Collignon & Kennedy, 2015). Ferner spielen Gesundheitsdienstleister, wie Ärzte, eine entscheidende Rolle, indem deren Wissen sowie ihre Einstellung und Wahrnehmung zu dem Thema Antibiotika und Antibiotikaresistenzen das Verschreiben dieser Arzneimittel beeinflussen (Machowska & Stålsby Lundborg, 2019). Ein weiterer Ausbreitungsweg ist die Übertragung von Resistenzelementen zwischen Tieren in der Viehzucht und dem Menschen (Marshall & Levy, 2011; Woolhouse et al., 2015).

Schlussendlich ist die erfolgreiche Behandlung von Patienten mit bakteriellen Infektionen heutzutage wieder gefährdet, womit es sich um ein ernstzunehmendes weltweites Gesundheitsproblem handelt,

welches an das "Prä-Antibiotika-Zeitalter" erinnert und neue globale Strategien bzw. Lösungsansätze erforderlich macht (Arias & Murray, 2009; Aslam *et al.*, 2018; Elder *et al.*, 2016).

Wirkweisen und Resistenzmechanismen

- zelluläre antibiotische Angriffspunkte und bakterielle Schutzmechanismen -

Die gröbste Klassifizierung von antibakteriell wirksamen Antibiotika ist die Unterteilung anhand ihrer Wirkweise in bakteriostatisch und bakterizid wirkende Substanzen. Während bakteriostatische Antibiotika für ein verlangsamtes oder gestopptes Wachstum der bakteriellen Zellen sorgen, töten bakterizide Stoffe die Population der Mikroorganismen fast gänzlich ab (Nemeth *et al.*, 2015; Pankey & Sabath, 2004). Dabei sind die molekularen Wirkmechanismen vielfältig, sodass das Bakterium je nach antibakterieller Substanz an unterschiedlichen zellulären Stellen angegriffen wird (Abbildung 2 A). Eine Unterteilung nach den bakteriellen Angriffspunkten bzw. Wirkweisen erfolgt oftmals in drei Hauptgruppen, nach denen es Antibiotika gibt, die (i) in die Zellwandbiosynthese eingreifen, (ii) die Proteinbiosynthese stören oder (iii) die Nukleinsäurebiosynthese beeinflussen (Kapoor *et al.*, 2017; Walsh, 2000). Neben diesen drei bekannten Klassen, werden oftmals zwei weitere Gruppen gezählt, nämlich Antibiotika, welche (iv) die Permeabilität der cytoplasmatischen Zellmembran verändern und jene, die (v) den Folsäuremetabolismus inhibieren können (Džidić *et al.*, 2008; Kapoor *et al.*, 2017).

So vielfältig die Wirkweisen von Antibiotika sind, so divers sind ebenfalls die Resistenzmechanismen der Bakterien, welche in den Mikroorganismen evolutiv entstanden sind. Anhand des Ursprungs bzw. des Mechanismus des Erwerbs können diese in (i) intrinsische, (ii) erworbene und (iii) adaptive Antibiotikaresistenzen gegliedert werden (Fernández & Hancock, 2012; Pontesa et al., 2018). Bei den ersten beiden handelt es sich um stabile Resistenzen, welche weiter vererbt werden können (Blair et al., 2015; Fernández & Hancock, 2012). Die adaptive Resistenz ist reversibel, wird durch Umwelteinflüsse wie subletale Antibiotikakonzentrationen ausgelöst und existiert in dem Bakterium temporär solange dieser Selektionsdruck erhalten bleibt (Fernández & Hancock, 2012; Pontesa et al., 2018; Sandoval-Motta & Aldana, 2016). Erworbene Resistenzmechanismen können entweder durch Mutationen oder durch den Erhalt von fremder DNA erlangt werden (Keyes et al., 2003; Munita & Arias, 2016; Pontesa et al., 2018; Rodríguez-Rojas et al., 2013). Letzteres erfolgt durch den Prozess des horizontalen Gentransfers, bei dem Bakterien externe mobile genetische Elemente erhalten (Juhas, 2015; Keyes et al., 2003; Pontesa et al., 2018). Die Übertragung dieser Elemente erfolgt mittels Vektoren wie Plasmide, Transposons, Bakteriophagen oder sogenannter naked DNA über molekulare Mechanismen, zu denen etwa die Transformation, die Transduktion und die Konjugation zählen (Alekshun & Levy, 2007; Keyes et al., 2003; Levy & Marshall, 2004; Mazodier & Davies, 1991). Mutationen in chromosomalen Genen können spontan auftreten oder ebenfalls durch den Antibiotika-vermittelten Selektionsdruck aus der Umwelt gefördert werden (Andersson & Hughes, 2014; Džidić *et al.*, 2008). Die daraus resultierenden Resistenzen besitzen unabhängig von den drei genannten Entstehungswegen spezifische zelluläre Funktionsweisen, nach denen diese ebenfalls gruppiert werden können (Abbildung 2 B).



Abbildung 2: Wirkweisen von Antibiotika und bakterielle Resistenzmechanismen.

(A) Antibiotika wirken auf verschiedene Weisen gegen Bakterien, indem unterschiedliche zelluläre Orte angegriffen werden (Brooks & Brooks, 2014; Džidić *et al.*, 2008; Kapoor *et al.*, 2017; Lewis, 2013; Patait *et al.*, 2015; Petchiappan & Chatterji, 2017; Singh & Barrett, 2006; Walsh, 2000). (B) Bakterielle Resistenzen gegen Antibiotika beruhen auf verschiedenen Mechanismen (Blair *et al.*, 2015; Džidić *et al.*, 2008; Kapoor *et al.*, 2017; Levy & Marshall, 2004; Liu *et al.*, 2019a; Munita & Arias, 2016; Petchiappan & Chatterji, 2017; Walsh, 2000). Tet^R: Tetracyclin-Resistenz (Fernández & Hancock, 2012; Munita & Arias, 2016), diverse*: die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien ist eine Diffusionsbarriere für größere Moleküle, sodass viele hydrophile Antibiotika, wie β -Lactam-Antibiotika, nicht in die bakteriellen Zellen eindringen können (Blair *et al.*, 2015; Hancock, 1997; Munita & Arias, 2016). Spec^R: Spectinomycin-Resistenz (Kehrenberg *et al.*, 2005; Stern *et al.*, 2018), Amp^R: Ampicillin-Resistenz (Munita & Arias, 2016), Rif^R: Rifampicin-Resistenz (Munita & Arias, 2016).

Häufig erfolgt eine Kategorisierung in die nachgehend beschriebenen drei Wirkprinzipien (Džidić *et al.*, 2008; Kapoor *et al.*, 2017; Petchiappan & Chatterji, 2017): Der erste dieser Wirkmechanismen hat das Ziel, die intrazelluläre Antibiotikakonzentration möglichst niedrig zu halten. Dies kann über das Verändern der Permeabilität der äußeren Membran durch beispielsweise eine andere Funktionsweise oder eine geringe Anzahl an Porinen, den Transmembranproteinen der äußeren Membran, erreicht werden (Fernández & Hancock, 2012). Des Weiteren kann das Herauspumpen der antibakteriellen Substanz über Membranproteine, die als Effluxpumpen fungieren, erfolgen (Fernández & Hancock, 2012). Der zweite Wirkmechanismus ist die Inaktivierung des Antibiotikums durch dessen enzymatischen Abbau oder dessen enzymatische Modifikation (Wright, 2005). Als Drittes kann die Veränderung des antibiotischen Ziels (z. B. eines bestimmten Proteins) in Form einer geringen strukturellen Abwandlung auf Basis einer DNA-Mutation dazu führen, dass die Interaktion mit dem Antibiotikum verhindert wird (Blair *et al.*, 2015; Kapoor *et al.*, 2017).

Um Bakterien, welche diese vielfältigen Resistenzmechanismen besitzen, weiterhin effektiv bekämpfen zu können, werden inzwischen diverse alternative antibakterielle Behandlungsstrategien erforscht und zum Teil bereits in medizinischen Therapien verwendet.

1.3 Alternative Behandlungsstrategien bakterieller Infektionen

Ein Arsenal diverser Strategien

- Bakteriophagen, antimikrobielle Peptide, Antivirulenztherapien, Drug-Delivery-Systeme -

In der Forschung und Entwicklung werden derzeit verschiedenste alternative antibakterielle Therapien diskutiert (Belete, 2019; da Rosa *et al.*, 2020; Mulani *et al.*, 2019; Tse *et al.*, 2017). Einen Ansatz bieten Behandlungen mittels Bakteriophagen (Lin *et al.*, 2017; Morrisette *et al.*, 2020; Rehman *et al.*, 2019; Saha & Mukherjee, 2019) oder antimikrobiellen Peptiden (Kang *et al.*, 2017; Mahlapuu *et al.*, 2016; Sierra *et al.*, 2017). Eine weitere Strategie ist die Verwendung sogenannter *Virulence Disruptors*, welche ebenfalls als *Antivirulence Drugs* bezeichnet werden (Calvert *et al.*, 2018; Dickey *et al.*, 2017). Des Weiteren gehören diverse *Drug-Delivery-*Systeme zu den neuen Ideen im Bereich der Antibiotikatherapie (Pham *et al.*, 2019; Walvekar *et al.*, 2019).

Bakteriophagen, kurz als Phagen bezeichnet, sind 20 bis 200 nm große Viren, die Bakterien speziesspezifisch invasiv befallen (Rehman et al., 2019). Viele Bakteriophagen haben einen lytischen Lebenszyklus, der in einer Zelllyse der Bakterien resultiert, wodurch die Bakterien abgetötet werden und die Phagen dementsprechend als natürliche Killer antibakteriell wirken (Cahill & Young, 2019; Lin et al., 2017). Antimikrobielle Peptide sind innerhalb des physiologischen pH-Bereichs positiv geladene kleine Peptide, welche in erster Linie Bestandteile von Verteidigungsmechanismen lebender Organismen sind und in allen Domänen des Lebens vorkommen, sodass sie etwa in Pflanzen, Tieren und Bakterien gefunden werden können (Belete, 2019; Haney et al., 2017; Wang, 2010). Die positive Ladung ermöglicht eine Interaktion mit den anionischen Bestandteilen der Zelloberfläche von Bakterien, die dadurch in ihrer Permeabilität eine Veränderung erfährt, welche den Hauptmechanismus der antibakteriellen Aktivitäten der Peptide darstellt (Haney et al., 2017; Mahlapuu et al., 2016). Die Behandlung mit sogenannten Virulence Disruptors wird ebenso als Antivirulenztherapie bezeichnet. Sie dient im Allgemeinen der Inhibierung der Pathogenese durch die Verhinderung der Aktivierung von Virulenzfaktoren und -mechanismen, sodass das Immunsystem des Wirts die oft als "entwaffneten Bakterien" bezeichneten Pathogene beseitigen kann (Belete, 2019; Cegelski et al., 2008; Mühlen & Dersch, 2015; Tse et al., 2017). Zu den zellulären Angriffspunkten bzw. Wirkweisen der Antivirulenztherapien gehören beispielshalber (Calvert et al., 2018; Cegelski et al., 2008; Mühlen & Dersch, 2015): (i) die bakteriellen Adhäsions- und Invasionsmechanismen an bzw. in die Wirtszelle, (ii) die Bildung und der Erhalt von Biofilmen sowie (iii) die direkte Inaktivierung von Toxinen einschließlich der Inhibierung ihrer Sekretion und (iv) der Mechanismus des *Quorum Sensings*, welcher der bakteriellen Kommunikation dient. Die Funktionsweise von *Drug-Delivery*-Systemen ist ein verbesserter Transport von antimikrobiellen Stoffen, einschließlich etablierter Antibiotika, durch ein erleichtertes Überwinden bakterieller Zellhüllen und Zellmembranen von Säugetieren zum Erreichen intrazellulärer Pathogene (Pham *et al.*, 2019). Dabei werden die Arzneimittel etwa mit Siderophoren, Peptiden oder Nanopartikeln kovalent verbunden (Pham *et al.*, 2019). Siderophore sind kleine eisenbindende Substanzen, die in der Natur für die Eisenaufnahme bei Bakterien, Pilzen und einigen Pflanzen verantwortlich sind und damit natürlicherweise für das Passieren von bakteriellen Zellwänden und Membranen hervorragend geeignet sind (Hider & Kong, 2010). Zu *Drug-Delivery*-Systemen mit Nanopartikeln gehören beispielsweise Metall-basierte Nanopartikel aus Gold oder Silber, Polymer-basierte Nanopartikel und Lipid-basierte *Drug-Delivery*-Systeme, zu denen mitunter Liposomen (also uni- oder multilamellare Vesikel), bestehend aus Cholesterol oder natürlichen Phospholipiden, gehören (Pham *et al.*, 2019; Walvekar *et al.*, 2019).

Wie das letztgenannte Beispiel der *Drug-Delivery*-Systeme verdeutlicht, werden die Wirkungen vieler alternativer Stoffe oder Agenzien in Kombination mit in der Therapie angewendeten Antibiotika als neue Strategien untersucht. So wurden schon häufig verbesserte antibakterielle Effekte zwischen antimikrobiellen Peptiden und klinisch etablierten Antibiotika beschrieben (Sierra *et al.*, 2017). Ebenso wird postuliert, dass einige der Strategien einschließlich der Antivirulenztherapie Anwendung als sogenannte adjunktive, also begleitende Therapien zu primären Antibiotika-Behandlungen, fungieren können, da diese alleine nicht antibakteriell wirken, jedoch die Effektivität von Antibiotika verstärken könnten (Tse *et al.*, 2017). Insgesamt veranschaulicht dies den Trend von Monotherapien hin zu kombinierten Ansätzen in der Bekämpfung bakterieller Infektionen.

Kombinierte antibakterielle Therapien

- Wirkverstärker im Forschungsfokus -

Bei kombinierten Antibiotika-basierten Therapien von Infektionskrankheiten ist das allgemeine Ziel die Verbesserung der antibakteriellen Wirkeffektivität (Bernal *et al.*, 2013; Ejim *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2019b; Schneider *et al.*, 2017). Dabei können die Komponenten der Kombinationen aus funktional unterschiedlichen Verbindungen bestehen, sodass Zusammensetzungen aus etwa (i) zwei Antibiotika oder (ii) einem Antibiotikum und einem Nicht-Antibiotikum existieren (Ahmed *et al.*, 2014; Bernal *et al.*, 2013; Brooks & Brooks, 2014; Kalan & Wright, 2011; Schneider *et al.*, 2017). Generell können kombinierte Therapien auf verschiedene Arten und Weisen einen positiven Effekt auf die Wirksamkeit der Behandlung bakterieller Infektionen haben. So sprechen unter anderem folgende

Gründe für kombinierte Applikationen: (i) die Erweiterung des Wirkspektrums eines Antibiotikums um relevante Erreger, (ii) eine verstärkte antibakterielle Wirkung bei der Kombinationstherapie und/oder (iii) die Verzögerung bzw. Unterdrückung von Resistenzentwicklungen bzw. die Inhibierung bestehender Resistenzelemente (Ahmed et al., 2014; Bernal et al., 2013; Douafer et al., 2019). Im Zuge der Evaluierung von Interaktionen zweier Substanzen in Experimenten zur Determination von deren antibakterieller Wirkung erfolgt eine Klassifizierung anhand der beobachteten gemeinsamen Wirkintensität im Vergleich zu der jeweiligen alleinigen Wirkstärke der Stoffe. Dabei wurden zur Detektion, Quantifizierung und Interpretation kombinatorischer antibakterieller Effekte verschiedene Modelle und Definitionen entwickelt, die weiterhin diskutiert werden, sodass keine gänzlich allgemeingültige Methodik zur Klassifizierung vorhanden ist (Bonapace et al., 2002; Roell et al., 2017). Nichtsdestotrotz existieren auf europäischer Ebene allgemeingültige Richtlinien, die von dem European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) erhoben wurden, um eine Vereinheitlichung dieser Klassifizierung und dementsprechend eine Vergleichbarkeit von Testergebnissen zu Antibiotikawirkungen zwischen verschiedenen Laboratorien zu schaffen. Das EUCAST ist ein wissenschaftliches Komitee, das ein Äquivalent zu dem amerikanischen Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ist, welches knapp 30 Jahre vor dem EUCAST gegründet wurde. Nach der EUCAST-Standardisierung antimikrobieller Empfindlichkeitsprüfungen mittels einer europäischen Norm können Interaktionen zweier Substanzen in vier Kategorien eingeteilt werden, sodass sie als (i) antagonistisch, (ii) indifferent, (iii) additiv oder (iv) synergistisch bezeichnet werden (EUCAST, 2000). Unter den genannten Begriffen werden folgende kombinatorische Wirkeffekte verstanden: Bei einem antagonistischen Effekt ist die kombinatorische antibakterielle Wirkung zweier Stoffe in der Summe kleiner als der einzelne Effekt der wirksameren Substanz. Indifferenz bezeichnet eine kombinatorische antibakterielle Wirkung, welche dem Effekt der wirksameren Substanz entspricht. Handelt es sich um eine additive Wirkweise, so stellt der kombinatorische antibakterielle Effekt exakt die Summe der separaten Effekte dar. Von Synergie wird gesprochen, sobald die kombinatorische antibakterielle Wirkung die theoretische Summe der einzelnen Effekte übersteigt.

Studien aus dem "goldenen Zeitalter der Antibiotika-Entdeckung" zeigen, dass die Idee der kombinierten Applikation zur antibakteriellen Wirkverstärkung ebenso alt wie die Entdeckung der Antibiotika selbst ist. So wurde etwa in den 1950er Jahren Penicillin in verschiedenen Untersuchungen mit anderen Antibiotika wie beispielsweise Streptomycin, Erythromycin, Aureomycin (Chlortetracyclin) oder Terramycin (Oxytetracyclin) kombiniert (Finland & Wilcox, 1953; Gunnison *et al.*, 1955, 1953; Klein & Schorr, 1953). Bei den genannten Kombinationen handelt es sich um Zusammensetzungen bestehend aus zwei Antibiotika. Derzeit ist die Untersuchung kombinatorisch wirkender antibakterieller Stoffzusammensetzungen aus einem klinisch etablierten

10

Antibiotikum und einer zweiten Komponente zur Verstärkung bzw. zur Wiedergewinnung der antibakteriellen Wirkung des Antibiotikums ein aktuelles Forschungsgebiet (Douafer *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019b; Melander & Melander, 2017; Tyers & Wright, 2019). Letztere Substanzen werden als Wirkverstärker bezeichnet und sind im Allgemeinen Verbindungen, die den antibakteriellen Effekt eines Antibiotikums verstärken und/oder den Resistenzmechanismus des Bakteriums blockieren, wobei diese Stoffe keine nennenswerte eigene antibakterielle Wirkung aufweisen und ihnen nur in einigen Definitionen geringe antibakterielle Eigenschaften eingeräumt werden (Bernal *et al.*, 2013; Douafer *et al.*, 2019; González-Bello, 2017; Melander & Melander, 2017). Da viele Stoffe zugleich diverse Eigenschaften wie antibakterielle Wirkungen und Oberflächenaktivitäten besitzen, können sie teils sowohl die Antibiotikum-Komponente einer Kombination als auch die Wirkverstärker-Komponente darstellen. Damit ist eine trennscharfe Zuordnung nicht immer möglich.

Insgesamt wurde eine Vielzahl an Substanzen gefunden, die die antibakterielle Aktivität eines Antibiotikums verstärken, und welche ebenso wie herkömmliche Antibiotika jeweils nach unterschiedlichen molekularen Mechanismen wirken (Bernal *et al.*, 2013; Kalan & Wright, 2011). Einige dieser spezifischen Wirkweisen, für die bereits Wirkverstärker gefunden wurden, sind nachfolgend beschrieben (Abbildung 3).



Abbildung 3: Mögliche Wirkweisen von antimikrobiellen Wirkverstärkern.

Beispiele von Wirkverstärkern, die die antibakterielle Wirkung klinisch etablierter Antibiotika (AB) in kombinierten Therapien auf verschiedene Weisen durch das Einwirken an unterschiedlichen bakteriellen Wirkorten verstärken können (Bernal *et al.*, 2013; Kalan & Wright, 2011): Verbindungen, die Analoga zu Tetracyclin darstellen (Tet-Analoga), können als kompetitive Inhibitoren wirken und so die Effluxpumpen blockieren. Weitere Wirkverstärker sind etwa die Clavulansäure, die ein β-Lactamase-Inhibitor ist und der pflanzliche Naturstoff Eugenol, welcher die bakterielle Membran schädigt und somit die Permeabilität erhöht. Anti-Biofilm Exopolysaccharide (EPS) sorgen für eine Zerstreuung im Biofilm wachsender Bakterien und das Antibiotikum Fosfomycin inhibiert die Synthese sowie die Reparatur der bakteriellen Zellwand. So fungieren manche Verbindungen als Inhibitoren von Effluxpumpen, wodurch das Herauspumpen des Antibiotikums gehemmt ist, sodass es weiterhin mit dem zellulären Wirkort interagieren kann und die antibakterielle Funktion infolgedessen bestehen bleibt (Pagès & Amaral, 2009). Des Weiteren können Wirkverstärker die Aufnahme eines Antibiotikums verbessern, die Physiologie resistenter Bakterien verändern und Biosynthesewege oder bestehende Resistenzelemente inhibieren (Bernal *et al.*, 2013; Kalan & Wright, 2011). Bezüglich Letzterem ist das hauptsächlich unter dem Namen Augmentin[®] vermarktete Kombinationspräparat Co-Amoxiclav ein prominentes, in der Medizin etabliertes Beispiel. Es besteht aus dem β -Lactam-Antibiotikum **Amoxi**cillin und der **Clav**ulansäure, einem β -Lactamase-Inhibitor, der als Wirkverstärker fungiert (Bernal *et al.*, 2013; Bryan, 2011; Grayson *et al.*, 2010; White *et al.*, 2004).

1.4 Mikrobiologische und biotechnologische Ansätze dieser Arbeit zur Wirkstofferschließung

Naturstoffe stellen nach wie vor eine wertvolle Ressource zur Erschließung neuer wirksamer Antiinfektiva dar. Neben der Betrachtung einzelner Sekundärmetabolite sind deren Kombinationen ebenso dienliche Inspirationsquellen und Ansatzpunkte zum Finden kombinatorisch wirksamer Verbindungen. Das gemeinsame Auftreten bioaktiver Sekundärmetabolite kann durch die gleichzeitige Bildung in einem Organismus vorkommen oder in Gemischen von Substanzen, die in mikrobiellen Gemeinschaften, etwa im Bodenhabitat, gebildet werden. Insgesamt ist der Boden ein Habitat mit einer riesigen Diversität mikrobieller Organismen (Schloss & Handelsman, 2006), sodass er ein komplexer und sehr kompetitiver Lebensraum ist. Dies legt nahe, dass ein starker evolutiver Selektionsdruck vorliegt, wodurch die Entwicklung besonders wehrhafter Mikroorganismen mit effektiven chemischen Werkzeugen gefördert werden könnte. Das Phänomen wiederum ermöglicht neue Strategien, in dem natürlicherweise funktional gekoppelte, über Jahre evolutiv entwickelte Kombinationen bioaktiver Substanzen aufgedeckt und direkt nutzbar gemacht werden können. Zusätzlich können von den gefundenen Stoffkombinationen weitere wirksame Zusammensetzungen aus ähnlichen Komponenten abgeleitet werden und beispielshalber bei der Bekämpfung mikrobieller Infektionen zum Einsatz kommen. Das Bodenbakterium Serratia marcescens ist ein Beispiel für einen Produzenten mehrerer antibakteriell wirksamer Verbindungen und dient den Studien dieser Arbeit als Ausgangspunkt. Zu seinen Sekundärmetaboliten zählen unter anderem Prodigiosin und Serrawettin W1, welche hier im Fokus stehen und im folgenden Kapitel 1.5 näher erläutert werden. Außerdem ist der Zugang zu Naturstoffen mit diversen chemischen Grundgerüsten und wertvollen biologischen Eigenschaften essentiell. In diesem Zusammenhang spielen neben bakteriellen Naturstoffen ebenso pflanzliche Sekundärmetabolite eine wichtige Rolle (Kapitel 1.8). Wie das Beispiel der Gruppe der Terpene zeigt, können diese besonders divers sein. Ihre Isolierung in relevanten Mengen aus den entsprechenden natürlichen pflanzlichen Produzenten kann jedoch eine Herausforderung sein, sodass rekombinante Produktionen eine wertvolle alternative Methode zur Bereitstellung dieser Biomoleküle darstellen.

Die mikrobiologische und biotechnologische Forschung kann somit durch die Charakterisierung von in der Natur vorkommenden Substanzkombinationen mit antibakterieller Wirkung zur Wirkstofferschließung beitragen sowie die Bereitstellung einer Fülle an Naturstoffen durch rekombinante Produktion sicherstellen.

1.5 Eine natürliche Sekundärmetabolit-Kombination aus Serratia marcescens

Das Gram-negative Bakterium Serratia marcescens lebt natürlicherweise im Boden und ist ein opportunistisches Humanpathogen. Es bildet neben anderen Naturstoffen die Sekundärmetabolite Prodigiosin und Serrawettin W1 (Matsuyama et al., 2011, 1985; Tanikawa et al., 2006). Prodigiosin ist ein hydrophobes rotes Pigment und Serrawettin W1 ein Biotensid, welche jeweils antibakterielle Wirkungen besitzen (Danevčič et al., 2016b, 2016a; Kadouri & Shanks, 2013; Lapenda et al., 2015; Suryawanshi et al., 2014). In dem natürlichen Produzenten wird eine Koregulation der zugrundeliegenden Biosynthesewege und somit eine Koproduktion dieser Verbindungen postuliert. Einige Studien konnten nachweisen, dass die Produktion von Prodigiosin und Serrawettin W1 in S. marcescens gleichermaßen von verschiedenen Faktoren wie etwa der Temperatur, dem Medium und der Wachstumsphase abhängig sind (Kadouri & Shanks, 2013; Khanafari et al., 2006; Matsuyama et al., 2011, 1986, 1985; Tanikawa et al., 2006; Yamashita et al., 2001). Ebenso konnten auf molekularer Ebene verschiedene Transkriptionsfaktoren in den Zusammenhang mit der Biosynthese beider Naturstoffe gebracht werden (Romanowski et al., 2019; Shanks et al., 2013; Stella et al., 2015; Tanikawa et al., 2006). Diese Koregulation und das somit sichergestellte gemeinsame Vorliegen beider Substanzen wirft die Frage nach einer natürlich gekoppelten Funktion, wie etwa einer voneinander abhängigen kombinatorischen antibakteriellen Wirkung auf. In ersten Experimenten wurde dieser Fragestellung bereits nachgegangen. Die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität verschiedener Deletionsmutanten von Serratia 39006 zeigte gegenüber einem E. coli-Stamm, dass antibakteriellen Wirksamkeit sowohl der Prodigiosinbiosyntheseweg, als zur auch der Biotensidbiosyntheseweg des Bakteriums intakt sein müssen (Williamson et al., 2008). Auf dieser Basis wurde postuliert, dass das Biotensid insofern eine Rolle bezüglich der antibakteriellen Wirkung spielt, als dass dieses für das Lösen und die Verteilung von Prodigiosin sorgen könnte (Williamson et al., 2008).

1.6 Prodiginine – Fokus Prodigiosin

Prodiginine sind hydrophobe, rote Sekundärmetabolite, deren Grundstruktur aus drei Pyrrolringen besteht (Abbildung 4; Ring A, B und C), sodass sie zu den Tripyrrolen zählen (Hu *et al.*, 2016; Williamson *et al.*, 2006). Anhand der molekularen Struktur des C-Rings können Prodiginine in lineare Prodiginine, welche unterschiedliche *N*-Alkyl-Reste tragen, und zyklische Prodiginine, bei denen ein Ringschluss vorliegt, eingeteilt werden (Darshan & Manonmani, 2015; Hu *et al.*, 2016; Williamson *et al.*, 2006). Einen bekannten Vertreter der Prodiginine mit Alkylketten stellt Prodigiosin dar (Abbildung 4).



Abbildung 4: Das Tripyrrol-Prodiginin Prodigiosin.

Das hydrophobe, rote Pigment besteht aus drei Pyrrolringen (Ring A, B und C). Prodigiosin wird natürlicherweise in verschiedenen Bakterien produziert, wobei ein prominenter und viel erforschter Produzent das Gram-negative Bakterium *S. marcescens* ist (Harris *et al.*, 2004; Matsuyama *et al.*, 2011; Williamson *et al.*, 2006).

In der Natur wird Prodigiosin von unterschiedlichen Bakterien produziert (Darshan & Manonmani, 2015; Khanafari *et al.*, 2006; Williamson *et al.*, 2006). Dazu zählen beispielsweise diverse Gramnegative *Serratia*-Arten, etwa das Bodenbakterium *S. marcescens* (Thomson *et al.*, 2000; Williamson *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde Prodigiosin in einigen Gram-negativen marinen Bakterien, mitunter in *Hahella chejuensis* (Jeong *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2010), *Zooshikella rubidus* (Lee *et al.*, 2011) oder *Vibrio psychoerythrus* (D'Aoust & Gerber, 1974), gefunden. In Gram-positiven Actinomyceten, wie beispielshalber *Streptomyces coelicolor* A3(2), wurde das Vorkommen von diversen Prodigininen ebenfalls beschrieben (Gerber, 1975; Harris *et al.*, 2004; Mo *et al.*, 2008; Tsao *et al.*, 1985).

Prodigiosin wird wie alle Prodiginine über einen in zwei Teile gegabelten Biosyntheseweg, welcher etwa in dem Übersichtsartikel von Williamson *et al.* ausführlich dargestellt ist, generiert (Williamson *et al.*, 2006). In *S. marcescens* liegen die 14 sogenannten *pig*-Gene, die alle beteiligten Enzyme des zweigeteilten Biosynthesewegs kodieren, unidirektional angeordnet in einem 21 kb großen Gencluster vor (Harris *et al.*, 2004). Die Prodigiosinbiosynthese beginnt ausgehend von den Verbindungen 2-Octenal und der Aminosäure Prolin (Williamson *et al.*, 2006). Diese werden in den zwei Teilwegen zu 4-Methoxy-2,2'-bipyrrol-5-carbaldehyd (MBC) beziehungsweise 2-Methyl-3-*n*-amyl-pyrrol (MAP) umgesetzt, welche anschließend zu dem Tripyrrol Prodigiosin kondensiert werden

(Harris *et al.*, 2004; Williamson *et al.*, 2006). Dieser Biosyntheseweg konnte bereits erfolgreich in *Pseudomonas putida* transferiert und zur effektiven heterologen Produktion von Prodigiosin genutzt werden (Domröse *et al.*, 2015).

Prodigiosin weist eine Reihe interessanter und relevanter Bioaktivitäten, wie etwa Wirksamkeiten gegen Krebs (Darshan & Manonmani, 2015; Elahian *et al.*, 2013; Hong *et al.*, 2014; Montaner *et al.*, 2000; Yip *et al.*, 2019), antimykotische Wirkungen (Gulani *et al.*, 2012; You *et al.*, 2019) und antiprotozoale Aktivitäten (Herráez *et al.*, 2019; You *et al.*, 2019) auf. Des Weiteren wurden antibakterielle Effekte von Prodigiosin gegen diverse Gram-positive und Gram-negative Bakterien (Tabelle 1) beschrieben (Yip *et al.*, 2019; You *et al.*, 2019).

Tabelle 1: Spektrum der antibakteriellen Wirkung von Prodigiosin.

Der rote bakterielle Sekundärmetabolit Prodigiosin besitzt antibakterielle Eigenschaften gegen eine Reihe Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien. Diese wurden mittels verschiedener Testsysteme, wie beispielsweise Tests zur Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen oder Agardiffusionstests, beschrieben.

	Bakterium	Referenzen
	Bacillus cereus	(Gulani <i>et al.,</i> 2012); (Arivizhivendhan <i>et al.,</i> 2018); (Ibrahim <i>et al.,</i> 2014)
	Bacillus pumilus	(Herráez <i>et al.,</i> 2019)
	Bacillus subtilis	(Danevčič <i>et al.,</i> 2016a); (Herráez <i>et al.,</i> 2019); (Ibrahim <i>et al.,</i> 2014)
ositiv	Enterococcus faecalis	(Lapenda <i>et al.,</i> 2015); (Herráez <i>et al.,</i> 2019)
ram-p	Micrococcus sp.	(Ibrahim <i>et al.,</i> 2014)
Ū	Streptococcus pyogenes	(Lapenda <i>et al.,</i> 2015)
	Staphylococcus aureus	(Lapenda <i>et al.,</i> 2015); (Herráez <i>et al.,</i> 2019); (Gulani <i>et al.,</i> 2012); (Arivizhivendhan <i>et al.,</i> 2018); (Ibrahim <i>et al.,</i> 2014)
	Staphylococcus epidermidis	(Ibrahim <i>et al.,</i> 2014)

	Bakterium	Referenzen		
	Acinetobacter anitratus	(Ibrahim <i>et al.,</i> 2014)		
	Agrobacterium tumefaciens	(Ibrahim <i>et al.,</i> 2014)		
	Alteromonas sp.	(Priya <i>et al.,</i> 2013)		
	Clostridium botulinum	(Arivizhivendhan et al., 2018)		
>	<i>Erwinia</i> sp.	(Ibrahim <i>et al.,</i> 2014)		
Gram-negativ	Escherichia coli	(Danevčič <i>et al.,</i> 2016b); (Herráez <i>et al.,</i> 2019); (Arivizhivendhan <i>et al.,</i> 2018); (Ibrahim <i>et al.,</i> 2014)		
	Gallionella sp.	(Priya <i>et al.,</i> 2013)		
	Pseudomonas aeruginosa	(Herráez <i>et al.,</i> 2019)		
	Salmonella enterica	(Arivizhivendhan et al., 2018)		
	Vibrio vulnificus	(Arivizhivendhan <i>et al.,</i> 2018)		

Wurde ein antimikrobiell wirkender Naturstoff gefunden, so ist die Derivatisierung dieser Substanz eine gängige Methode zum Erhalt weiterer davon abgeleiteter bioaktiver Verbindungen mit verbesserten Eigenschaften für pharmazeutische Applikationen (etwa geringere Toxizität, bessere Löslichkeit etc.) (von Nussbaum et al., 2006). Dies ist ebenso im Fall der Prodiginine vielversprechend, da diese natürlicherweise eine gewisse strukturelle Vielfalt aufweisen, die mit unterschiedlichen Bioaktivitäten einhergeht (Hu et al., 2016; Sakai-Kawada et al., 2019; You et al., 2019). Die Zahl an Vertretern der Prodiginin-Gruppe und die strukturellen Unterschiede sind jedoch im Vergleich zu anderen Naturstoffen, wie Terpenen, limitiert. Aus diesem Grund ist die Gewinnung und Untersuchung nicht-natürlicher Prodigiosin-Derivate besonders interessant und eine Möglichkeit zur Generierung weiterer strukturell diverser Verbindungen mit verschiedenen Bioaktivitäten, wie beispielsweise die Evaluierungen natürlicher und synthetischer Prodiginine hinsichtlich Anti-Malaria-Wirkungen zeigen (Papireddy et al., 2011). Ein Beispiel für ein intensiv erforschtes synthetisches Prodigiosin-Derivat ist das sogenannte Obatoclax, welches bereits als Anti-Krebsmittel in klinischen Studien untersucht wurde (Hwang et al., 2010; O'Brien et al., 2009; Paik et al., 2011; Schimmer et al., 2014). Zudem wird in der aktuellen Krebsforschung die kombinierte Wirkung von Obatoclax mit anderen Chemotherapeutika, wie etwa Gemcitabin, Paclitaxel oder Cisplatin, untersucht (Hou et al., 2018; Jiménez-Guerrero et al., 2018; Steele et al., 2019).

Derivatisierungen können mittels verschiedener chemischer Reaktionen, woraus etwa Dekorationen, Substitutionen oder Degradationen von Verbindungen resultieren können, beispielsweise über chemische Semi- oder Vollsynthesen, erreicht werden (von Nussbaum et al., 2006). Eine weitere Möglichkeit zur Derivatisierung ist die Mutasynthese, welche ebenfalls als mutational biosynthesis bezeichnet wird (Kennedy, 2008; Kirschning et al., 2007; Klein et al., 2018, 2017): Bei dieser Methode werden das Prinzip des Metabolic Engineerings und die Technik der chemischen Synthese kombiniert. Hierzu werden Analoga von ausgewählten Vorstufenverbindungen, also künstliche Intermediate des adressierten Biosynthesewegs, welche ebenso als Mutasynthone bezeichnet werden, chemisch synthetisiert. Parallel dazu wird ein Mikroorganismus, der die ausgewählte Biosynthese intrinsisch besitzt oder heterologe entsprechende Biosynthesegene trägt, genetisch so verändert, dass er defizient in einem Schlüsselschritt dieses Biosynthesewegs ist und daher die gewählte Vorstufenverbindung nicht mehr herstellen kann. Anschließend wird die generierte Mutante des Mikroorganismus mit den zuvor synthetisierten Mutasynthonen gefüttert. kann der Mikroorganismus das zugefügte Analogon in die Biosynthese Infolgedessen implementieren, sodass modifizierte Produkte, also nicht-natürliche Derivate, entstehen.

Das Prinzip der Mutasynthese wurde bereits für die Herstellung sowohl verschiedener linearer Prodigiosin-Derivate als auch diverser zyklischer Prodiginine erfolgreich angewendet (Klein *et al.*, 2018, 2017). Einige dieser Verbindungen weisen eine gegenüber Prodigiosin verbesserte Bioaktivität, wie eine verstärkte Autophagie-Modulation und einer Apoptose-Induktion von Brustkrebszellen, auf (Klein *et al.*, 2017).

1.7 Tenside – Fokus Biotenside

Tenside sind Substanzen, die im Allgemeinen aus einem hydrophilen, polaren Kopfteil und einem lipophilen, apolaren Schwanzteil aufgebaut sind (Abbildung 5) und daher als amphiphil bezeichnet werden (Karsa & Houston, 2007; Kubicki *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2016; Shah *et al.*, 2013).



Abbildung 5: Vereinfachter amphiphiler Aufbau von Tensiden. Tenside sind aus einem hydrophilen, polaren Kopfteil und einem lipophilen, apolaren Schwanzteil aufgebaut (Karsa & Houston, 2007; Santos *et al.*, 2016; Shah *et al.*, 2013).

Aufgrund dieser Struktur sind tensidische Verbindungen oberflächenaktiv, weshalb sie im Englischen von der Umschreibung *surface active agents* abgeleitet als *surfactants* bezeichnet werden (Christofi & Ivshina, 2002; Marchant & Banat, 2012; Shah *et al.*, 2013; Sonawane *et al.*, 2015). Die amphiphilen Eigenschaften von Tensiden ermöglichen beispielshalber das Herabsetzen von Oberflächen- oder Grenzflächenspannungen sowie die Verbesserung der Löslichkeit hydrophober Substanzen in Wasser (Christofi & Ivshina, 2002; Desai & Banat, 1997; Shah *et al.*, 2013).

Synthetische Tenside können anhand der polaren Eigenschaften ihres Kopfteils gruppiert werden (Karsa & Houston, 2007; Mishra et al., 2009; Shah et al., 2013; Sonawane et al., 2015): Dabei werden sie hauptsächlich in vier verschiedene Klassen, die (i) kationischen, (ii) anionischen, (iii) amphoteren und (iv) nichtionischen Tenside, unterteilt. Während kationische Tenside über eine positiv geladene funktionelle Gruppe verfügen, weisen anionische Tenside eine negativ geladene funktionelle Gruppe auf (Mishra et al., 2009). Amphotere Tenside werden ebenso als zwitterionische Tenside bezeichnet, die sowohl eine negative, als auch eine positiv geladene funktionelle Gruppe tragen (Mishra et al., 2009). Nichtionische Tenside besitzen keine geladene bzw. dissoziierbare funktionelle Gruppe, wodurch Vertreter dieser Klasse nicht als Ionen in wässrigen Lösungen vorliegen (Mishra et al., 2009; Sonawane et al., 2015). Besonders bekannte Vertreter von synthetischen Tensiden sind etwa Natriumlaurylsulfat und die Polysorbate. Eine der ersten und heute noch populären Alltagsanwendungen von Tensiden ist die Applikation als Inhaltsstoff in Reinigungsmitteln wie Seifen (Karsa & Houston, 2007; Sonawane et al., 2015). Insgesamt werden diese Substanzen in vielzähligen unterschiedlichen Bereichen und Produkten (z. B. Haushalt, Landwirtschaft, Lebensmittelindustrie, pharmazeutischer und Kosmetiksektor) eingesetzt, wo sie etwa Funktionen als waschaktive Substanzen bzw. Detergenzien, Benetzungsmittel, Emulgatoren, Schaummittel oder Dispergiermittel erfüllen (Karsa & Houston, 2007; Mishra *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2013). Im Zuge von Formulierungen effektiver Pharmazeutika wird häufig der Einsatz von Tensiden zur verbesserten Löslichkeit oder Überwindung biologischer Membranen, um eine insgesamt gesteigerte Bioverfügbarkeit des jeweiligen Wirkstoffs zu erzielen, evaluiert (Bhadoriya et al., 2013; Bnyan et al., 2018; Madsen et al., 2018).

Im Allgemeinen ist die globale Nachfrage an Tensiden enorm hoch, wobei zusätzlich in den letzten Jahrzenten aus Gründen der Nachhaltigkeit das Interesse an sogenannten erneuerbaren Tensiden gestiegen ist (Le Guenic *et al.*, 2019). Zu letzteren zählen Biotenside, die etwa von Mikroorganismen durch Biosynthese hergestellt werden und diverse positive Eigenschaften aufweisen können, sodass sie eine Alternative zu synthetischen Tensiden darstellen (Le Guenic *et al.*, 2019). Biotensiden werden beispielshalber (i) eine hohe Stabilität bei extremen Temperaturen, pH-Werten und Salzgehalten, (ii) eine geringere Toxizität und (iii) eine leichte biologische Abbaubarkeit zugeschrieben (Desai & Banat, 1997; Santos *et al.*, 2016; Vijayakuma & Saravanan, 2015). Diese

Merkmale sind zum einen vorteilhaft für industrielle Anwendungen und machen die Verbindungen zum anderen vergleichsweise umweltfreundlich. Des Weiteren ist es möglich, Biotenside aus erneuerbaren Ressourcen und diversen Industrieabfällen zu produzieren, wodurch fossile Ressourcen geschützt werden können und die Produktion damit generell umweltfreundlicher gestaltet werden kann (Le Guenic *et al.*, 2019; Makkar *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2016).

Biotenside werden in der Natur von einer Bandbreite an Mikroorganismen wie etwa Hefen, Pilzen und Bakterien als Sekundärmetabolite hergestellt (Kubicki et al., 2019; Shekhar et al., 2015; Vijayakuma & Saravanan, 2015). Dabei stellt Serratia eine Gattung der bakteriellen Produzenten dieser Naturstoffe dar (Clements et al., 2019). Biotenside werden entsprechend ihrer chemischen Zusammensetzung grundlegend in die nachfolgenden Hauptklassen gruppiert: (i) Glykolipide, (ii) Lipopeptide und (iii) polymere Biotenside, wobei des Weiteren zwischen Lipoproteinen, Fettsäuren, Phospholipiden, neutralen Lipiden und partikulären Biotensiden unterschieden werden kann (Desai & Banat, 1997; Pacwa-Płociniczak et al., 2011; Santos et al., 2016; Shekhar et al., 2015; Vijayakuma & Saravanan, 2015). Ebenso wie synthetische Tenside eignen sich Biotenside für eine Vielzahl von industriellen Applikationen, wie etwa den Einsatz in dem Kosmetiksektor, der Lebensmittelindustrie, der Landwirtschaft, dem Bereich der biologischen Entgiftung von Ökosystemen durch Bioremediation (biologische Sanierung) und dem medizinisch-pharmazeutischen Sektor (Clements et al., 2019; Pacwa-Płociniczak et al., 2011; Santos et al., 2016; Shekhar et al., 2015; Vijayakuma & Saravanan, 2015). Für den letztgenannten Bereich relevante Aktivitäten dieser tensidischen Biomoleküle sind etwa antitumor, antivirale, antimikrobielle und fäulnisverhütende Eigenschaften (Clements et al., 2019; Shekhar et al., 2015). Ebenso sind antibakterielle Effekte von diversen Biotensiden gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien einschließlich verschiedener pathogener Stämme beschrieben (Díaz De Rienzo et al., 2016; Garg et al., 2018; Gaur et al., 2019; Giri et al., 2019; Ndlovu et al., 2017).

Ein Beispiel für intensiv erforschte und industriell etablierte Vertreter von Biotensiden sind die Rhamnolipide. Sie gehören zu der Glykolipid-Gruppe und werden von verschiedenen Mikroorganismen natürlicherweise gebildet, wobei das humanpathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* ein bekannter Produzent ist (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2018). Für Rhamnolipide bieten sich vielfältige Applikationen in diversen Bereichen wie etwa der Ölgewinnung, der Bioremediation, der Agrarwirtschaft, dem biomedizinischen Bereich, der Lebensmittelindustrie sowie im Kosmetiksektor an (Chong & Li, 2017; Irorere *et al.*, 2017; Naughton *et al.*, 2019; Tiso *et al.*, 2017). Folglich wird die biotechnologische Produktion ebenfalls ausgiebig untersucht. Der Fokus liegt dabei sowohl auf einer Reduktion der Produktionskosten als auch dem Verwenden nicht-pathogener Produktionswirte dieser Naturstoffe (Chong & Li, 2017; Tiso *et al.*, 2017). In der Industrie spielt die Rhamnolipidproduktion gleichermaßen eine Rolle, sodass die heterologe Produktion von

19

Rhamnolipiden in *P. putida* beispielsweise von der Firma Evonik vorangetrieben wurde (Beuker *et al.,* 2016).

Neben *P. putida* produziert das oben erwähnte und für die vorliegende Arbeit als Ausgangspunkt der Experimente dienende Bakterium *S. marcescens* ein Biotensid, nämlich Serrawettin W1 (Abbildung 6), welches ursprünglich als Serratamolid A bezeichnet wurde (Matsuyama *et al.*, 1985; Wasserman *et al.*, 1962, 1961). Strukturell betrachtet handelt es sich um ein symmetrisches, amphiphiles Lipopeptid, welches aus zwei Serinmolekülen sowie zwei β-Hydroxyfettsäuren besteht (Dwivedi *et al.*, 2008; Wasserman *et al.*, 1962). Die Biosynthese von Serrawettin W1 in *S. marcescens* erfolgt durch eine nichtribosomale Peptidsynthetase, die von dem Gen *swrW* kodiert wird (Li *et al.*, 2005). Neben der Hauptkomponente von Serrawettin W1, die aus zwei β-Hydroxyfettsäuren mit einer Kettenlänge von je zehn C-Atomen besteht, generiert die Peptidsynthetase SwrW weitere Kongenere, die stattdessen β-Hydroxyfettsäuren mit anderen Kettenlängen tragen (Dwivedi *et al.*, 2008; Thies *et al.*, 2014).



Abbildung 6: Das Biotensid Serrawettin W1.

Serrawettin W1 ist ein symmetrisches Lipopeptid, welches aus zwei Serinmolekülen und zwei β -Hydroxyfettsäuren aufgebaut ist (Dwivedi *et al.*, 2008; Wasserman *et al.*, 1962). Natürlicherweise wird Serrawettin W1 von dem Gramnegativen Bakterium *S. marcescens* durch die nichtribosomale Peptidsynthetase SwrW hergestellt (Li *et al.*, 2005).

Dem Biotensid Serrawettin W1 konnten bereits früh antibakterielle Eigenschaften gegen beispielsweise *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* zugeschrieben werden (Wasserman *et al.*, 1962). Des Weiteren wurde mithilfe diverser *S. marcescens*-Mutanten eine Korrelation zwischen der Biosynthese von Serrawettin W1 und dessen antibakterieller Wirkung gegen verschiedene Grampositive Bakterien wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* sowie einen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stamm nachgewiesen (Kadouri & Shanks, 2013). Die heterologe Biosynthese des Naturstoffs Serrawettin W1 in dem Wirtsbakterium *E. coli* ist etabliert, wodurch eine Herstellung in einem nicht-pathogenen Expressionsstamm möglich ist (Thies *et al.*, 2014).

Eine weitere, jedoch bislang wenig erforschte, Biotensid-Gruppe sind die *N*-Acylaminosäuren. Diese Biomoleküle stellen Konjugate von Fettsäuren mit bestimmten Aminosäuren dar. Beispielsweise
besteht *N*-Myristoyltyrosin (Abbildung 7), das zu der Gruppe der *N*-Acyltyrosinen gehört, aus einem Tyrosin und der Myristinsäure (Tetradecansäure) (Thies *et al.*, 2016).



Abbildung 7: Das Biotensid N-Myristoyltyrosin.

N-Myristoyltyrosin ist ein Biotensid, welches aus Tyrosin und Myristinsäure (Tetradecansäure) gebildet wird (Thies *et al.*, 2016). Es wird in der Natur durch die *N*-Acyltyrosin-Synthase Nas354 gebildet, die natürlicherweise *N*-Myristoyltyrosin als Hauptbestandteil eines Gemischs verschiedener *N*-Acyltyrosine generiert und in einer Metagenomuntersuchung zur Identifizierung neuer Biotenside entdeckt wurde (Thies *et al.*, 2016).

N-Acylaminosäure-Synthasen wurden bereits mehrfach in unterschiedlichen Metagenomstudien, in denen nach Substanzen mit antibakteriellen Eigenschaften gesucht wurde, entdeckt (Brady et al., 2004; Brady & Clardy, 2000; Craig et al., 2010; Lee et al., 2019). Dementsprechend wurden für N-Acyltyrosine oft antibakterielle Wirkungen, beispielsweise gegen das Gram-positive Bakterium Bacillus subtilis, beschrieben (Brady et al., 2004; Brady & Clardy, 2000; Lee et al., 2019). Ebenso konnten zusätzlich antibakterielle Effekte gegen das Gram-positive Bakterium Corynebacterium alutamicum sowie gegen die Gram-negativen Bakterien Sorangium cellulosum und Chromobacterium violaceum nachgewiesen werden (Thies et al., 2016). Die N-Acyltyrosin-Synthase Nas354, die N-Myristoyltyrosin bildet, wurde im Zusammenhang einer Metagenomstudie zur Identifizierung neuer Biotenside gefunden (Thies et al., 2016). Da die N-Acyltyrosin-Synthase nicht vollständig selektiv für eine bestimmte Fettsäure ist, können die Kettenlängen der integrierten Fettsäuren variieren, sodass verschiedene N-Acyltyrosine neben einem Hauptprodukt detektiert wurden (Thies et al., 2016). Bei einer heterologen Expression der Synthase in E. coli konnte gezeigt werden, dass das Hauptprodukt das Biomolekül N-Myristoyltyrosin ist (Thies et al., 2016). Neben der biosynthetischen Herstellung kann das Biotensid ebenfalls mittels chemischer Synthese gewonnen werden (Aha, 1999; Thies et al., 2016). Insgesamt ist N-Myristoyltyrosin ein bislang wenig untersuchter Naturstoff.

1.8 Bioaktive pflanzliche Sekundärmetabolite in medizinischen Therapeutika

Pflanzen sind mit ihrer enormen Vielfalt an Sekundärmetaboliten eine riesige Quelle für Naturstoffe mit unterschiedlichsten Bioaktivitäten, wie etwa antioxidativen Eigenschaften, antimikrobiellen Aktivitäten oder antidiabetischen Wirkungen, weshalb diese Stoffe nützlich für pharmazeutische Applikationen sind (Bérdy, 2005; Jain *et al.*, 2019). Dementsprechend sind einige aus Pflanzen stammende Substanzen als Bestandteile in verschiedenen Arzneimittel-Präparaten etabliert

(Tabelle 2).

Tabelle 2: In medizinischen Therapeutika etablierte pflanzliche Substanzen.

Pflanzliche Sekundärmetabolite aus verschiedenen Substanzklassen, wie der Gruppe der Terpene oder der Alkaloide, sind Bestandteile etablierter Arzneimittel.

Wirkstoff	Beispiel eines Arzneimittel-Präparats	Anwendungsbereich
Artemether (Artemisinin-Derivat, Sesquiterpen) + Lumefantrin (synthetischer Arylaminoalkohol)	Riamet® 20 mg/120 mg Tabletten Novartis Pharma GmbH (Basel, Schweiz)	Antiprotozoikum
Paclitaxel (Diterpen)	Paclitaxel HEXAL® 300 mg/50 mL Hexal AG (Holzkirchen, Deutschland)	Anti-Krebsmittel
Morphin (Alkaloid)	Morphin HEXAL® 100 mg Retardtabletten Hexal AG (Holzkirchen, Deutschland)	Analgetikum
Atropin (Alkaloid)	Atropin-POS® 0,5 %, Augentropfen URSAPHARM Arzneimittel GmbH (Saarbrücken, Deutschland)	Mydriatikum

Ein populäres Beispiel für solch ein Präparat stellt das aus der Pflanze *Artemisia annua* (Einjähriger Beifuß) stammende Sesquiterpen Artemisinin dar (Weathers *et al.*, 2011). Diese Verbindung sowie inzwischen vor allem von ihr abgeleitete Derivate werden weltweit als Anti-Malaria-Arzneimittel eingesetzt (Badshah *et al.*, 2018; Martino *et al.*, 2019; Naing *et al.*, 2015; Visser *et al.*, 2014; WHO, 2015). Aktuell empfiehlt die Weltgesundheitsorganisation (engl.: *World Health Organization*, WHO) die Verwendung von kombinierten Therapien in der Behandlung von Malaria (WHO, 2019). So sind Arzneimittel-Präparate wie Riamet[®], welches aus der festgelegten Wirkstoffkombination des Artemisinin-Derivates Artemether und dem ebenfalls als Antiprotozoikum wirksamen Lumefantrin besteht, etabliert und kommerziell erhältlich (Novartis Pharma GmbH, 2011, 2002). Neben dieser bekannten Applikation von Artemisinin und dessen Derivaten wurden diese Substanzen mittlerweile zudem in vorklinischen und klinischen Studien als Anti-Krebsmittel untersucht (Efferth, 2017;

Slezakova & Ruda-Kucerova, 2017). Dies zeigt die funktionale Diversität pflanzlicher Sekundärmetabolite und das damit verbundene Potenzial sowie den Wert für die pharmazeutische Industrie und medizinische Therapien. Ein weiteres prominentes und in der klinischen Anwendung etabliertes Biomolekül ist Paclitaxel, das aus der Rinde der Pflanze Taxus brevifolia (Pazifische Eibe) gewonnen werden kann (Walsh & Goodman, 2002). Das Diterpen ist Gegenstand der aktuellen Krebsforschung und bereits unter dem Handelsnamen Taxol® bekannt, da es in der Krebstherapie zur Behandlung verschiedener Krebsarten erfolgreich etabliert ist (Elserafi et al., 2018; Gridelli et al., 2018; HEXAL AG, 2010; Rivera et al., 2019; Schneider et al., 2019; Vrdoljak et al., 2019). Ein weiterer in gängigen Arzneimitteln eingesetzter pflanzlicher Stoff ist das Alkaloid Morphin, auch als Morphium bezeichnet, welches aus Papaver somniferum (Schlafmohn) stammt und in der Schmerztherapie Anwendung findet (Casamayor et al., 2018; Cooper et al., 2017; Pathan & Williams, 2012; Piper et al., 2018). Ebenso zu der Stoffklasse der Alkaloide gehört das Atropin, das in diversen Pflanzenarten zu finden ist (Kohnen-Johannsen & Kayser, 2019). Der Naturstoff Atropin ist in der Medizin im Bereich der Augenheilkunde als Mydriatikum zur Pupillenerweiterung etabliert und wird des Weiteren zur Verhinderung des Fortschreitens einer Myopie (Kurzsichtigkeit) diskutiert (Kesarwani; Mumbai Group of Paediatric Ophthalmologists and Strabismologists, 2019; Prousali et al., 2019; URSAPHARM Arzneimittel GmbH, 2014; Wu et al., 2019). Sowohl verschiedene Artemisinin-Derivate, als auch Paclitaxel, Morphin und Atropin sind in der aktuellen Version der "World Health Organization Model List of Essential Medicines" aufgeführt, was die derzeitige Bedeutung und Relevanz der erwähnten pflanzlichen Naturstoffe im medizinischen bzw. pharmazeutischen Bereich verdeutlicht (WHO, 2019). Neben den anhand der ausgewählten Beispiele aufgezeigten Bioaktivitäten und darauf basierenden Applikationen als (i) Anti-Malariamittel, (ii) Anti-Krebsmittel, (iii) Analgetikum oder (iv) Mittel in der Augenheilkunde können pflanzliche Naturstoffe ebenfalls antimikrobielle, mitunter antibakterielle, Eigenschaften aufweisen. Obwohl die ursprüngliche Definition der Antibiotika von Waksman (Waksman, 1947) Substanzen aus Pflanzen generell nicht einschließt (vgl. Kapitel 1.2), ist die Untersuchung pflanzlicher Sekundärmetabolite bezüglich antimikrobieller Eigenschaften inzwischen ein großer Forschungsbereich (Compean & Ynalvez, 2014; Gokhale & Wadhwani, 2015; Savoia, 2012; Shin et al., 2018). Dabei gehören die gegen zahlreiche Bakterien wirkenden Biomoleküle unterschiedlichen Stoffklassen, wie etwa Alkaloiden, Flavonoiden oder Terpenen an (Compean & Ynalvez, 2014; Gokhale & Wadhwani, 2015). Die pentazyklischen Triterpene Ursolsäure und Oleanolsäure sind Beispiele für intensiv untersuchte, aus Pflanzen stammende Stoffe, welche neben einer Diversität an Bioaktivitäten eine Reihe an antibakteriellen Eigenschaften gegen beispielsweise Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis (Fontanay et al., 2008) und Mycobacterium tuberculosis (Jiménez-Arellanes et al., 2013) besitzen.

1.9 Terpene – Fokus Triterpene

Terpene sind mit über 80.000 strukturell diversen Verbindungen eine prominente und enorm große Gruppe von Naturstoffen (Christianson, 2017; Pemberton et al., 2017). Obwohl Terpene in nahezu allen Organismen aus den drei Domänen des Lebens vorkommen, sind diese in besonders hoher Anzahl in Pflanzen zu finden (Dickschat, 2016; Pichersky & Raguso, 2018; Schrader & Bohlmann, 2015). In der Natur besitzen Terpene vielseitige Funktionen, welche grob in (i) die Verteidigung gegen Prädatoren, Pathogene und Konkurrenten sowie (ii) die Übermittlung von Informationen über die Anwesenheit von Nahrung bzw. Nährstoffen, Fortpflanzungspartnern oder Feinden unterteilt werden können (Gershenzon & Dudareva, 2007). Triterpene, die in dieser Arbeit adressiert werden, scheinen eine zentrale Rolle in der Pflanzenentwicklung zu spielen (Moses et al., 2014). Des Weiteren besitzen viele pflanzliche Terpene neben den bereits erwähnten Beispielen Artemisinin, Paclitaxel, Oleanolund Ursolsäure ebenfalls außerhalb ihres natürlichen Produzenten wertvolle industriell verwendbare Bioaktivitäten, wie beispielsweise Anti-Krebs-Wirkungen und antimikrobielle Eigenschaften, welche diese zu Inhaltsstoffen bzw. potentiellen Kandidaten für Bestandteile von zahlreichen Pharmazeutika machen (Efferth, 2017; Fontanay et al., 2008; Lu et al., 2012; Singh & Sharma, 2015; Wong et al., 2017). Einige Terpene haben des Weiteren einen angenehmen Geruch oder einen besonderen Geschmack, sodass diese Verbindungen in Kosmetik- und Lebensmittelprodukten genutzt werden (Kallscheuer et al., 2019; Schempp et al., 2018; Tetali, 2019; Wolosik et al., 2013). Eine häufig verwendete Stoffgruppe sind die zu den Tetraterpenen zählenden Carotinoide. Diese besitzen mitunter antioxidative Eigenschaften, die Schutz vor Schädigung durch UV-Strahlung bieten, weshalb sie insbesondere in verschiedenen Kosmetikartikeln, wie etwa sogenannter Nutrikosmetik-Produkte, zu finden sind (Meléndez-Martínez et al., 2019; Tetali, 2019). Carotinoide verfügen des Weiteren über eine intensive gelbe bis rote Farbe, aufgrund derer sie als Farbstoffe in Nahrungsmitteln eingesetzt werden (Bogacz-Radomska & Harasym, 2018; Meléndez-Martínez, 2019; Mortensen, 2006).

Das Grundgerüst der Terpene ist laut der *"isoprene rule"* nach Ruzicka aus C₅-Isopreneinheiten aufgebaut (Ruzicka, 1953). Je nach Anzahl der Isopreneinheiten und damit einhergehend der Anzahl der Kohlenstoffatome werden die Verbindungen hauptsächlich in Mono- (C₁₀), Sesqui- (C₁₅), Di- (C₂₀), Tri- (C₃₀) und Tetraterpene (C₄₀) unterteilt (Ahmed *et al.*, 2017; Croteau *et al.*, 2000; Moser & Pichler, 2019). Zusätzlich zu diesen Hauptklassen wurden Hemi- (C₅), Sester- (C₂₅), Sesquar- (C₃₅) und Polyterpene (>C₄₀) beschrieben (Ludwiczuk *et al.*, 2017; Moser & Pichler, 2019; Sato, 2013). Die C₅-Grundbausteine der Terpene sind die Verbindungen Isopentenylpyrophosphat (IPP) und dessen Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) (Frank & Groll, 2017; Oldfield & Lin, 2012). Diese beiden Substanzen können zum einen über den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg), welcher über die Verbindungen 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat und 2-*C*-Methyl-D-erythritol-4-phosphat läuft, und

daher auch 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Weg (DXP-Weg) genannt wird, produziert werden (Frank & Groll, 2017). Zum anderen bildet der Mevalonat-Weg (MVA-Weg) die Verbindung IPP (Kirby & Keasling, 2009; Schempp et al., 2018) (Abbildung 8). Obwohl der MVA-Weg hauptsächlich in Eukaryoten zu finden ist, liegt der Biosyntheseweg ebenfalls in der Gruppe der Archaea sowie in einigen wenigen Bakterien vor (Boucher & Doolittle, 2000; Lombard & Moreira, 2011). Der MEP-Weg wird besonders von Bakterien, Cyanobakterien und Grünalgen verwendet, ist aber darüber hinaus zudem in Pflanzen vorhanden (Frank & Groll, 2017; Zhao et al., 2013). Dabei sind beide Wege in Pflanzen räumlich voneinander getrennt, sodass der MEP-Weg in Plastiden und der MVA-Weg im Cytosol vorliegt (Kirby & Keasling, 2009; Tetali, 2019). Die Ausgangsverbindungen des MEP-Wegs sind D-Glyceraldehyld-3-Phosphat (G3P) und Pyruvat (Frank & Groll, 2017). Im MVA-Weg bildet Acetyl-CoA den Ausgangsstoff (Kirby & Keasling, 2009; Lombard & Moreira, 2011). Auf die Vorstufenbiosynthesewege, also den MEP- bzw. den MVA-Weg, folgen weitere in diversen Organismen hochkonservierte Biosyntheseschritte, die als die eigentliche Isoprenoidbiosynthese aufgefasst werden können. Dabei ist der erste Schritt die Isomerisierung der aus den beiden Vorstufenbiosynthesewegen stammenden C5-Verbindungen IPP und DMAPP über die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase bzw. Isopentenyldiphosphat-Isomerase (Idi) (Frank & Groll, 2017; Withers & Keasling, 2007). Anschließend werden diese Substanzen über diverse Prenyltransferasen zu verschiedenen linearen Prenylpyrophosphaten, aus welchen wiederum Terpene unterschiedlicher Klassen hervorgehen können, verlängert (Abbildung 8)(Christianson, 2017; Croteau et al., 2000; Withers & Keasling, 2007; Wong *et al.*, 2017): Dazu wird zunächst die C_{10} -Verbindung Geranylpyrophosphat (GPP) mittels der Kondensation von DMAPP und IPP durch eine Geranylpyrophosphat-Synthase (GPPS) gebildet. Diese wird anschließend zusammen mit IPP von einer Farnesylpyrophosphat-Synthase (FPPS) weiter zu der C_{15} -Substanz Farnesylpyrophosphat (FPP) verknüpft. Letzteres kann von einer Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase (GGPPS) zusammen mit IPP weiter zu der C_{20} -Verbindung Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) umgesetzt werden. Die genannten verlängerten Prenylpyrophosphate des Isoprenoidbiosynthesewegs dienen als Vorstufen zur Generierung von Terpenen verschiedener Klassen im Zuge der anschließenden spezifischen Terpenbiosynthesewege. So können aus der C10-Verbindung GPP Monoterpene entstehen. Aus FPP können direkt Sesquiterpene mit einem C15-Gerüst oder aus zwei FPP-Molekülen Triterpene mit einem C_{30} -Körper gebildet werden. Des Weiteren gehen Di- und Tetraterpene aus einem Molekül beziehungsweise zwei Molekülen der C_{20} -Verbindung GGPP hervor. Diese Umsetzungen der Prenylphosphate werden von Terpensynthasen katalysiert, die zumeist zyklische Verbindungen generieren und daher ebenso oft als Terpenzyklasen bezeichnet werden (Christianson, 2017). Im Fall der Mono-, Sesqui- und Diterpene stellen die Prenylphosphate selbst die Substrate der Terpensynthasen dar, während Tri- und Tetraterpene über zusätzliche Schritte gebildet werden

(Croteau *et al.*, 2000). Hier nicht gezeigt, können die Grundstrukturen sämtlicher Triterpenmoleküle weiter funktionalisiert werden, etwa mittels einer anschließenden Oxidation durch P450-Monooxygenasen-katalysierte Reaktionen und darauf folgenden Umsetzungen durch Glykosyltransferasen zu sogenannten Triterpensaponinen (Sawai & Saito, 2011).



Abbildung 8: Biosynthesewege verschiedener Terpenklassen.

Die Ausgangsverbindungen IPP und DMAPP des Isoprenoidbiosynthesewegs können über die Vorstufenbiosynthesewege, nämlich den MVA- und den MEP-Weg, hergestellt werden. Dabei resultieren beide Biosynthesewege in der Bildung der Verbindung IPP. Der MEP-Weg endet ebenfalls in der Produktion von DMAPP. Die beiden Verbindungen werden durch Idi isomerisiert und stellen die Ausgangsverbindungen für den gesamten Isoprenoidbiosyntheseweg dar. Eine GPP-Synthase (GPPS) kann aus einem IPP-Molekül und einem DMAPP-Molekül die C10-Verbindung GPP generieren. Aus letzterer und einem IPP-Molekül wird durch eine FPP-Synthase (FPPS) die C15-Verbindung FPP gebildet. Diese kann zusammen mit einem weiteren IPP-Molekül über eine GGPP-Synthase (GGPPS) zu der C20-Verbindung GGPP umgesetzt werden. Mittels der stückweisen Verlängerung der Prenylpyrophosphate sind alle wichtigen Verbindungen, nämlich GPP, FPP und GGPP, für die darauffolgenden spezifischen Terpenbiosynthesewege zur Entstehung von Mono-, Sesqui-, Tri, Di- und Tetraterpenen bereitgestellt. MVA: Mevalonat; MEP: 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat; IPP: Isopentenylpyrophosphat; DMAPP: Dimethylallylpyrophosphat; Idi: Isopentenylpyrophosphat-Isomerase; GPP: Geranylpyrophosphat; **FPP** Farnesylpyrophosphat; GGPP: Geranylgeranylpyrophosphat.

Vielfältige Verbindungen der verschiedenen Terpenklassen konnten bereits in Mikroorganismen durch heterologe Genexpression und Biosynthese hergestellt werden, wobei die Triterpene dabei allerdings deutlich unterrepräsentiert sind und Etablierungen in eukaryotischen Systemen überwiegen (Moser & Pichler, 2019; Schempp *et al.*, 2018). Dies mag damit zusammenhängen, dass die Triterpenbiosynthese bestimmte Besonderheiten aufweist und die beteiligten Enzyme möglicherweise spezifische Herausforderungen bei der funktionellen Expression in Mikroorganismen stellen (Qiao *et al.*, 2019). So werden bei der Triterpenbiosynthese zunächst zwei FPP-Moleküle durch eine Squalensynthase (SQS) zu der linearen C₃₀-Verbindung Squalen kondensiert. Dieses wird weiter über eine Squalenepoxidase (SQE) zu 2,3-Oxidosqualen epoxidiert. Die Verbindung kann nun durch eine Reihe verschiedener Oxidosqualenzyklasen (engl.: *oxidosqualene cyclases*, OSC) zu den unterschiedlichsten Triterpenen zyklisiert werden (Abbildung 9).



Abbildung 9: Der Triterpenbiosyntheseweg inklusive verschiedener Umsetzungsarten von 2,3-Oxidosqualen durch Oxidosqualenzyklasen.

Das Isoprenoid Farnesylpyrophosphat (FPP) besitzt ein C_{15} -Gerüst und ist die Ausgangsverbindung der Triterpene. Eine Squalensynthase (SQS) kondensiert zwei Moleküle FPP zu einem Molekül der linearen C_{30} -Verbindung Squalen. Dieses wird über eine Squalenepoxidase (SQE) zu 2,3-Oxidosqualen epoxidiert. Die Enzyme SQS und SQE kommen in jedem Triterpenbiosyntheseweg vor (konservierte Schritte). Von der C_{30} -Verbindung 2,3-Oxidosqualen ausgehend zweigen vielzählige spezifische Triterpenbiosynthesewege ab, sodass diese durch diverse Oxidosqualenzyklasen (OSC) in unterschiedliche Triterpene umgesetzt werden kann. Die Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen durch Oxidosqualenzyklasen (OSC) erfolgt im Allgemeinen entweder über die Faltung des Substrats entsprechend der CBC-Konformation (engl.: *chair-boat-chair*) oder der CCC-Konformation (engl.: *chair-chair-chair*). Die Faltung in CBC-Konformation wird von OSC durchgeführt, welche Substanzen mit Sterolgerüsten hervorbringen, zu denen etwa Cycloartenolsynthasen zählen. OCS, die 2,3-Oxidosqualen über die CCC-Konformation falten, generieren Stoffe mit nicht-sterolischen, häufig pentazyklischen Triterpengerüsten. Obwohl den Triterpenen grundsätzlich sämtliche C_{30} -Verbindungen ab der Bildung von Squalen zugehören, wird der Begriff häufig zur spezifischen Benennung dieser nicht-sterolischen, zyklischen Produkte der OCS gebraucht.

Damit stellt 2,3-Oxidosqualen den Punkt der Triterpenbiosynthese dar, nach welchem sich der bislang gemeinsame Biosyntheseweg dieser Stoffe in zahlreiche spezifische Wege aufgabelt, woraus schlussendlich eine Fülle diverser Triterpene entstehen können (Sawai & Saito, 2011; Thimmappa et al., 2014). Die Klasse der zyklischen Triterpene wird entsprechend der Entstehungsweise aus der Verbindung 2,3-Oxidosqualen in zwei Gruppen unterteilt (Thimmappa et al., 2014): Dabei gibt es zum einen den Weg der Entstehung über die CBC-Konformation des Substrats, wobei ein tetrazyklisches Sterolgerüst gebildet wird. Zum anderen kann die Faltung von 2,3-Oxidosqualen in die CCC-Konformation stattfinden, welche Verbindungen mit nicht-sterolischem, häufig pentazyklischem Triterpengerüst hervorbringt. Meist wird nur die letztere Gruppe mit dem Begriff "Triterpene" bezeichnet, obwohl grundsätzlich sämtliche C₃₀-Verbindungen ab dem Schritt der Squalenbildung Triterpenverbindungen darstellen. Die beispielsweise in der Modellpflanze Arabidopsis thaliana vorkommenden Triterpene Cycloartenol und Lupeol stellen jeweils einen Vertreter der beschriebenen Kategorien dar (Abbildung 9). So wird das tetrazyklische Phytosterol Cycloartenol über die CBC-Konformation und das pentazyklische Triterpen Lupeol über den Weg der CCC-Konformation gebildet. Nach der Faltung der Verbindung 2,3-Oxidosqualen über einen der beiden Wege entsteht jeweils ein Carbokation, welches anschließend deprotoniert wird, woraus die entsprechenden Verbindungen entstehen (Thimmappa et al., 2014). Die pentazyklischen Triterpene können ferner anhand ihres strukturellen Grundgerüsts kategorisiert werden, wobei unter anderem zwischen (i) dem Oleanan-Typ, (ii) dem Lupan-Typ und (iii) dem Ursan-Typ unterschieden wird (Sheng & Sun, 2011). Zur erstgenannten Klasse zählt beispielsweise Oleanolsäure, während Ursolsäure ein Vertreter des Ursan-Typs ist. Lupeol, Betulin sowie die Betulinsäure besitzen ein Grundgerüst des Lupan-Typs.

1.10 Heterologe Biosynthese von Terpenen in Rhodobacter capsulatus

Neben der klassischen Extraktion von Naturstoffen aus Pflanzen und der chemischen Synthese von Verbindungen spielt die biotechnologische heterologe Produktion von Sekundärmetaboliten in Mikroorganismen eine große Rolle bei der Gewinnung von ausgewählten Stoffen (Marienhagen & Bott, 2013; Moser & Pichler, 2019; Schempp *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2017). Diese kann gegenüber der Extraktion hochkomplexer pflanzlicher Stoffgemische mit schwierig zu kontrollierender Zusammensetzung Vorteile bieten. So können rekombinante Mikroorganismen idealerweise in skalierbaren Verfahren zur Bildung standardisierter, weniger komplexer Gemische genutzt werden, wodurch die Produktanalyse und Isolation vereinfacht werden. Obwohl inzwischen einige Expressionswirte in Forschung und Industrie etabliert sind, ist das Erforschen und Erschließen neuer Plattformen von stetigem Interesse. Eine insbesondere im Sinne der Nachhaltigkeit vielversprechende Klasse von Wirten sind phototrophe Organismen. Diese können durch Photosynthese chemische Energie über die Nutzung der Strahlungsenergie des Lichts herstellen und etwa zur Generierung von Biomasse und Metaboliten verwenden (Tang *et al.*, 2011). Da hierfür das

Sonnenlicht zur Verfügung steht, erlauben diese Organismen eine ökologisch nachhaltige Kultivierung, welche wiederum interessant für die biotechnologische Industrie sein könnte, wie erste Anwendungsbeispiele der Firma Isobionics (inzwischen BASF) zeigen (https://www.basf.com /global/de/media/news-releases/2019/09/p-19-346.html). Darüber hinaus ist bekannt, dass sich mikrobielle Wirte unterschiedlich gut zur heterologen Produktion verschiedener Naturstoffe eignen können (Cravens et al., 2019; Moser & Pichler, 2019), sodass die Verfügbarkeit diverser Expressionswirte für die Erschließung der sehr großen Klasse der Terpene grundsätzlich günstig ist. Neben beispielsweise den Cyanobakterien stellen α -Proteobakterien eine Gruppe von Prokaryoten mit einer phototrophen Lebensweise dar. Ein prominenter Vertreter, welcher vor allem in den letzten Jahren hinsichtlich heterologer Genexpression und Metabolitproduktion erforscht, optimiert und etabliert wurde, ist das Gram-negative Bakterium Rhodobacter capsulatus (Heck & Drepper, 2017). Für diesen Organismus wurden bereits verschiedene genetische Werkzeuge, wie eine Toolbox diverser Expressionsplasmide, entwickelt (Katzke et al., 2010). R. capsulatus kann unter chemotrophen oder phototrophen Bedingungen wachsen, wobei Bakteriochlorophyll a und das Carotinoid Spheroiden als Photopigmente genutzt werden. Eine chemotrophe Kultivierung erfolgt in Anwesenheit von Sauerstoff und im Dunkeln. Für die phototrophe Kultivierung sind hingegen anaerobe Bedingungen und die Belichtung der Zellen notwendig. Unter letztgenannten Kultivierungsbedingungen bildet Rhodobacter durch Einstülpung der cytoplasmatischen Membran eine sogenannte intracytoplasmatische Membran (ICM) aus, die zur Einlagerung des Photosystems bestehend aus Reaktionszentrum und Lichtsammelkomplexen dient (Chory et al., 1984). In diesen liegen die Photopigmente einschließlich des Carotinoids Spheroiden vor. Hinsichtlich biotechnologischer Produktionen von Terpenen bietet die ICM einen potenziellen Speicherraum für Membran-assoziierte Biosynthese-Enzyme sowie für hydrophobe Zwischen- und Endprodukte (Heck & Drepper, 2017). Des Weiteren besitzt das Bakterium einen intrinsischen Isoprenoidbiosyntheseweg (vgl. Abbildung 8) zur Bildung der Carotinoide aus Isopreneinheiten. Dementsprechend sind die Ausgangsverbindungen IPP und DMAPP, welche im Bakterium natürlicherweise über den MEP-Weg gebildet werden, auch in diesem Wirt die Vorstufen für die Synthese der wirtseigenen Terpene. Die Kondensation von IPP und DMAPP zu GPP erfolgt mittels des Enzyms IspA, welches sowohl die Funktion der GPPS als auch der FPPS übernimmt und demnach anschließend das entstandene GPP zusammen mit einem weiteren IPP-Molekül zu FPP umsetzt. Im darauffolgenden Schritt fungiert das Enzym CrtE als GGPPS, sodass aus FPP und IPP ein Molekül GGPP (C_{20}) gebildet wird. Davon ausgehend können Phytoen (C40), und in weiteren Schritten die spezifischen Carotinoid-Endprodukte Spheroiden sowie in Anwesenheit von Sauerstoff Spheroidenon synthetisiert werden. Folglich stellt R. capsulatus natürlicherweise Prenylphosphate sämtlicher Längen als relevante Vorstufenverbindungen für eine heterologe Terpenproduktion bereit.

Das gezielte Einbringen von heterologen Terpenbiosynthese-Enzymen in diesen Expressionswirt wurde bereits zur Herstellung unterschiedlicher Terpene genutzt. Beispielsweise wurde die heterologe Produktion des Tetraterpens β -Carotin in *R. capsulatus* mittels eines Genclusters aus dem Bakterium Pantoea ananatis demonstriert (Loeschcke et al., 2013). Das Spektrum der rekombinant produzierten Terpene in R. capsulatus wurde mit der Produktion der Sesquiterpene Valencen und Patchoulol und des Triterpens Squalen durch Expression von Synthasen aus Pflanzen bzw. einer Mikroalge ausgeweitet (Khan et al., 2015; Troost et al., 2019). Darüber hinaus wurden bereits unterschiedliche Metabolic-Engineering-Strategien zur Erhöhung der Produktlevel in Rhodobacter implementiert. Es wurde versucht, die Bereitstellung der Verbindungen IPP und DMAPP einerseits über die Plasmid-basierte Koexpression spezifischer Gene des MEP-Wegs zu verbessern. Dazu wurden eine FPP-Synthase sowie eine 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (Dxs) und eine Isopentenylpyrophosphat-Isomerase (Idi) hinzugezogen (Khan et al., 2015; Troost et al., 2019). Andererseits wurde durch die Einführung des MVA-Wegs aus dem Bakterium Paracoccus zeaxanthinifaciens ein alternativer Weg zur Generierung der Verbindungen IPP und DMAPP in R. sphaeroides bzw. R. capsulatus geschaffen (Beekwilder et al., 2014; Troost, 2017; Troost et al., 2019). In den Studien wurden die Gene des MVA-Wegs nicht nur Plasmid-basiert, sondern auch Genom-integriert exprimiert. Dementsprechend wurde im Zuge dessen der R. capsulatus-Stamm SB1003-MVA (Troost et al., 2019) generiert. Dieser Stamm enthält ein ins genomische nifHDK-Operon integriertes Gencluster des MVA-Wegs aus dem Bakterium Paracoccus zeaxanthinifaciens ATCC 21588 (Gene: mvaA-idi-hcs-mvk-pmk-mvd) (Hümbelin et al., 2002; Troost et al., 2019). Zur Selektion wurde das Gentamicin-Resistenz vermittelnde Gen aacC1 ebenfalls inseriert. Da R. capsulatus das aus dem zentralen Metabolismus kommende Acetyl-CoA über eine intrinsische Acetyl-CoA-Acetyltransferase zu Acetoacetyl-CoA umsetzt (Erkal et al., 2019; Petushkova & Tsygankov, 2017; Strnad et al., 2010), liegt der erste Umsetzungsschritt des MVA-Wegs (Croteau et al., 2000; Hümbelin et al., 2002) natürlicherweise in diesem Bakterium vor. Aus diesem Grund wurde der MVA-Weg erst ab dem Enzym MvaA eingebracht (Hümbelin et al., 2002). Durch den zusätzlichen MVA-Weg ist eine zweite Route für die Umsetzung von Acetoacetyl-CoA zu IPP gegeben, sodass in diesem Stamm von einer höheren Bereitstellung dieses Isopren-Bausteins auszugehen ist.

Sowohl die Plasmid-basierte als auch die Genom-integrierte Realisierung des MVA-Wegs in *R. capsulatus* konnten zu gesteigerten Produktleveln der jeweiligen Terpene führen. Die Reihe erfolgreicher Studien zur heterologen Produktion verschiedener Terpene in *R. capsulatus* sowie die Vielzahl nützlicher genetischer Werkzeuge, wie die genannten Plasmide und Stämme, bieten gute Voraussetzungen, um die bislang in der heterologen Biosynthese in Prokaryoten unter-repräsentierten zyklischen Triterpene zu adressieren.

1.11 Zielsetzung

Bakterielle Infektionen sind ein ernstzunehmendes globales Gesundheitsproblem, deren erfolgreiche Behandlungen aufgrund steigender neuer Resistenzbildungen und einer sinkenden Verfügbarkeit effektiver Antibiotika gefährdet ist. Daher müssen dringend alternative Wege zur wirksamen Therapie gefunden werden. Die Applikationen von Substanzkombinationen stellen einen möglichen Therapieansatz dar, wobei bioaktive Naturstoffe sowie natürlich vorliegende Stoffkombinationen diesbezüglich Inspirationen bieten. Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Erschließung neuer kombinatorisch wirksamer antibakterieller Sekundärmetabolite. Dabei wurden natürlich vorkommende Kombinationen von bioaktiven Sekundärmetaboliten als Inspirationsquelle verwendet. Die mikrobiologische und biotechnologische Forschung kann hierzu zum einen durch die Charakterisierung von in der Natur vorkommenden antibakteriellen Substanzkombinationen einen Betrag leisten und zum anderen die Bereitstellung einer Fülle an Naturstoffen mittels rekombinater Produktionen sicherstellen.

Dementsprechend soll im Kapitel I der Frage nachgegangen werden, inwiefern aus der in Bakterien evolvierten Kombination antibakterieller Substanzen neue Wirkstoffkombinationen abgeleitet werden können. Als Ausgangspunkt soll hierbei die aus dem Bodenbakterium *S. marcescens* stammende Sekundärmetabolit-Kombination bestehend aus Prodigiosin und Serrawettin W1 dienen. Im Zuge dessen wurde Prodigiosin als Antibiotikum-Komponente und Serrawettin W1 als Wirkverstärker-Komponente definiert. Zur Bestimmung kombinatorischer Effekte wird daher im ersten Schritt die antibakterielle Wirkung von Prodigiosin zusammen mit Serrawettin W1 untersucht. Anschließend sollen durch den Austausch des Biotensids Serrawettin W1 abgeleitete Kombinationen evaluiert werden. Die Untersuchung antibakterieller Aktivitäten von Prodigiosin-Derivaten soll für eine Ausweitung der natürlichen Stoffkombination in Richtung der Antibiotikum-Komponente sorgen. Die antibakteriellen Evaluierungen sollen anhand des Mykobakteriums *C. glutamicum* sowie einigen ausgewählten Modellorganismen als Vertreter der ESKAPE-Bakterien durchgeführt werden.

In Kapitel II soll evaluiert werden, ob das phototrophe Bakterium *R. capsulatus* als heterologer Produktionswirt zur Bereitstellung von (zyklischen) Triterpenen geeignet ist. Dazu soll zunächst die heterologe Biosynthese der Triterpenvorstufen Squalen und 2,3-Oxidosqualen etabliert werden. Anschließend sollen die Biosynthesewege bis hin zur Produktion der Triterpene Cycloartenol bzw. Lupeol erweitert werden. Dabei sind die beiden ausgewählten Oxidosqualenzyklasen jeweils ein Beispiel für die zwei möglichen Faltungswege von 2,3-Oxidosqualen im Zuge der Synthese von zyklischen Triterpenen. Zur Optimierung der Produktionsleistungen sollen funktional gleiche Enzyme des Terpenbiosynthesewegs aus unterschiedlichen Herkunftsorganismen komparativ evaluiert werden. Ebenso sollen verschiedene in vorherigen Studien als förderlich befundene *Metabolic-Engineering*-Strategien inkludiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien, Verbrauchsmittel und Geräte

Die verwendeten Materialien, Verbrauchsmittel und Geräte entsprechen der Standardausstattung eines mikrobiologischen Laboratoriums. Falls erforderlich, wird an entsprechenden Stellen eine genaue Beschreibung des jeweiligen Materials oder Verbrauchsmittels sowie der spezifischen Geräte gegeben.

2.2 Bakterienstämme

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme.

Die *E. coli*-Stämme wurden für Klonierungsarbeiten und den Plasmidtransfer mittels Konjugation verwendet. Alle genannten *R. capsulatus*-Stämme wurden im Rahmen der heterologen Expression von Triterpenen eingesetzt. Die weiteren aufgelisteten bakteriellen Stämme wurden in Tests zur Untersuchung antibakterieller Wirkungen ausgewählter Substanzen benutzt.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
Escherichia coli DH5α	$F^{-} \Phi 80 lacZ\Delta M15$ $\Delta(lacZYA-argF) U169$ $recA1 endA1 hsdR17 (r_{\kappa}, m_{\kappa}^{+}) phoA supE44 \lambda^{-} thi-1$ gyrA96 relA1	Hanahan, 1983
Escherichia coli S17-1	recA, pro, hsdR, RP4-2-Tc ^R ::Mu-Km ^R ::Tn7, Tmp ^R , Spc ^R , Sm ^R	Simon <i>et al.,</i> 1983
Corynebacterium glutamicum	Wildtyp	ATCC 13032
Serratia marcescens	Wildtyp	ATCC 13880 (DSM 30121)
Staphylococcus aureus	Wildtyp	ATCC 25923 (DMS 1104)
Staphylococcus epidermidis	Wildtyp	ATCC 12228 (DMS 1798)
Enterococcus faecium	Wildtyp	ATCC 6057 (DMS 2146)
Pseudomonas aeruginosa	Wildtyp	ATCC 27853 (DMS 1117)
Rhodobacter capsulatus SB1003	Wildtyp <i>, Rif^R</i>	Strnad <i>et al.</i> , 2010
Rhodobacter capsulatus SB1003-MVA	SB1003 mit MVA-Operon, <i>Rif^r, Gm^r, Tet^r</i>	Troost <i>et al.,</i> 2019
Rhodobacter capsulatus SB1003-∆crtE	SB1003 Δ <i>crtE</i> (Ω- <i>Spc^R</i>)	Hage-Hülsmann <i>et al.</i> , 2019; Troost, 2017

2.3 Plasmide

Alle Plasmide, die für die heterologe Biosynthese von Triterpenen in verschiedenen *R. capsulatus*-Stämmen verwendet wurden, basieren auf dem Vektor pRhon5Hi-2 (Troost *et al.*, 2019) (Abbildung 10).



Abbildung 10: Das Plasmid pRhon5Hi-2.

Der zur Triterpenbiosynthese in *R. capsulatus* verwendete Vektor besitzt eine Chloramphenicol- und eine Kanamycin-Resistenz, wobei ausschließlich letztere im Zuge dieser Arbeit als Selektionsmarker benutzt wurde. Ebenso weist das Plasmid eine Mobilitäts-(MOB) Region auf, die der Übertragung der Plasmid-DNA in Empfängerzellen mittels Konjugation dient. Der pBBR1-oriV- und der pBBR1-REP-Bereich dienen der Replikation des Plasmids. Charakteristisch für das pRhon5Hi-2-Plasmid ist der P_{nif}-Promotor, welcher aus der nativen Promotor-Region der *nifHDK*-Gene des Molybdänabhängigen Nitrogenase-Komplexes und einem ersten Teil dieses *nifH*-Gens des Bakteriums *R. capsulatus* besteht (Troost *et al.*, 2019). Hinter den P_{nif}-Promotor wurden die ausgewählten Triterpengene eingebracht (Tabelle 4). Modifiziert nach Loeschcke et al., 2017.

Die zur Triterpenbiosynthese in *R. capsulatus* verwendeten pRhon5Hi-2-basierten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Expressionsplasmide.

SQS1: Squalensynthase 1 aus *A. thaliana* [At4g34640, (Busquets *et al.*, 2008)]; SQE1: Squalenepoxidase 1 aus *A. thaliana* [At1g58440, (Rasbery *et al.*, 2007)]; CAS1 bzw. *At*CAS1: Cycloartenolsynthase 1 aus *A. thaliana* [At2g07050, (Corey *et al.*, 1993)]; LUP1: Lupeolsynthase 1 aus *A. thaliana* (At1g78970) (Herrera *et al.*, 1998); *Sa*SgCAS: Cycloartenolsynthase aus *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 (Bode *et al.*, 2003); *Sa*DWCAS: Cycloartenolsynthase aus *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 (Huntley *et al.*, 2011); 6H: Hexahistidin-Tag. Die Sequenzen der jeweiligen Gene sind im Anhang aufgeführt (Anhang-Tabelle 4 bis Anhang-Tabelle 9).

Plasmid	Referenz
pRhon5Hi-2-SQS1	Loeschcke <i>et al.,</i> 2017
pRhon5Hi-2-SQS1-SQE1	Loeschcke <i>et al.,</i> 2017
pRhon5Hi-2-CAS1-SQS1-SQE1	diese Arbeit (Loeschcke et al., 2017)
pRhon5Hi-2-LUP1-SQS1-SQE1	diese Arbeit (Loeschcke <i>et al.,</i> 2017)
pRhon5Hi-2-AtCAS1-6H-SQS1-SQE1	diese Arbeit (Hage-Hülsmann <i>et al.,</i> 2019)
pRhon5Hi-2-SaSgCAS-6H-SQS1-SQE1	diese Arbeit (Hage-Hülsmann <i>et al.,</i> 2019)
pRhon5Hi-2-SaDWCAS-6H-SQS1-SQE1	diese Arbeit (Hage-Hülsmann <i>et al.,</i> 2019)

2.4 Oligonukleotide

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide.

Übersicht der in dieser Arbeit zu Klonierungs- und Sequenzierungszwecken verwendeten Oligonukleotide. Es sind die Namen, die Sequenzen sowie die gesamte Länge und die jeweiligen Verwendungen der Oligonukleotide angegeben. Alle Oligonukleotide wurden mit einer HPSF (engl.: <u>High Purity Salt Free</u>) Reinheit der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Oligonukleotide	Sequenz (5´→ 3´)	Größe (bp)	Verwendung
LUP1-His for	ATATACATATGTGGAAACTG AAGATCGGGAAGGG	34	PCR zur Klonierung von: pRhon5Hi-2-LUP1-SQS1-SQE1
LUP1-His rev	ATATACATATGTCAATTCCTT GTCAAAGGCTTAATTGACGA TGAAGACGACC	52	PCR zur Klonierung von: pRhon5Hi-2-LUP1-SQS1-SQE1
CAS1-His for	ATATACATATGTGGAAACTG AAAATCGCGGAAGG	34	PCR zur Klonierung von: pRhon5Hi-2-CAS1-SQS1-SQE1
CAS1-His rev2	ATATACATATGTCAATTCCTT GTCAAAGGCTTATTCGCCCT GCTGCAGCAG	51	PCR zur Klonierung von: pRhon5Hi-2-CAS1-SQS1-SQE1
Pnif	TGACAGCACCCGTCTGATCC	20	Sequenzierung des 5'-Endes des eingebrachten OSC-Gens
5'SQS revSeq OSC	GCGGCTCACTTTATGCAG	18	Sequenzierung des 3'-Endes des eingebrachten OSC-Gens
Seq CAS1-1	ATGGCGATGGCGATATG	17	Sequenzierung

Oligonukleotide	Sequenz (5´→ 3´)	Größe (bp)	Verwendung
Seq CAS1-2	ATAACGGCAGCCAGCTGTG	19	Sequenzierung
SeqLUP1-1	CGCCAATGGATCCTG	15	Sequenzierung
SeqLUP1-2	CCGGACGAGACCGATG	16	Sequenzierung
JHH_Sa-CAS_Sga15-T2 (fw)	GCCCGACCGATGTGTATACC	20	Sequenzierung
JHH_Sa-CAS_Sga15-T3 (fw)	GGCGTGGCGCAAACATCATC	20	Sequenzierung
JHH_ SaLSS-T2 (fw)	TGAGCCCGACCGATGTGTTC	20	Sequenzierung
JHH_ SaLSS-T3 (fw)	TGGTGGATGTGAGCTATGTG	20	Sequenzierung

2.5 Allgemeine mikrobiologische Methoden

2.5.1 Nährmedien

Tabelle 6: Zusammensetzung der Nährmedien.

Die Sterilisation der Nährmedien erfolgte bei einer Temperatur von 121 °C für eine Zeit von 20 Minuten und einem Druck von 200 kPa (= 2 bar) in einem Autoklav des Gerätetyps Systec VX-55 (Systec GmbH, Linden, Deutschland).

Medium (Hersteller/Referenz)	Zusammensetzung
Luria/Miller (LB)-Medium (Carl Roth GmbH + Co. KG,	10 g L ⁻¹ Trypton 5 g L ⁻¹ Hefeextrakt 10 g L ⁻¹ NaCl
Karlsruhe, Deutschland)	pH-Wert: 7,0 ± 0,2
Terrific-Broth (TB)-Medium modifiziert für die Mikrobiologie (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)	12 g L ⁻¹ Casein, enzymatisch verdaut 24 g L ⁻¹ Hefeextrakt 9,4 g L ⁻¹ K ₂ HPO ₄ 2,2 g L ⁻¹ KH ₂ PO ₄ 4 mL L ⁻¹ Glycerin hinzufügen pH-Wert: 7.2 ± 0.2

Medium (Hersteller/Referenz) Zusammensetzung 2 g L⁻¹ Fleischinfus **Mueller-Hinton** 17,5 g L⁻¹ Caseinhydrolysat (MH)-Medium 1,5 g L⁻¹ Stärke (MERCK KGaA pH-Wert: 7,4 ± 0,2 bei 25 °C Darmstadt, Deutschland) **Pepton-Hefe** 10 g L⁻¹ Bacto[™] Peptone (PY)-Medium (Pepton, Becton, Dickinson and Company nach (Klipp et al., 1988) Franklin Lakes, New Jersey, USA) 0,5 g L⁻¹ Bacto[™] Yeast Extract (Hefeextrakt, Becton, Dickinson and Company Franklin Lakes, New Jersey, USA) **RCV-Medium** 40 mL L⁻¹ 10 % Malat-Lösung, $1 \text{ mL L}^{-1} 20 \% \text{ MgSO}_4 (w/v),$ nach (Weaver et al., 1975) 1 mL L⁻¹ 7,5 % CaCl₂ (w/v), 2 mL L⁻¹ 1 % EDTA (w/v), 2,4 mL L⁻¹ 0,5 % FeSO₄ (w/v) mit 2 mL L^{-1} 37 % HCl, $1 \text{ mL L}^{-1} 0, 1 \%$ Thiamin (*w*/*v*), 1 mL L⁻¹ Spurenelementlösung: $0,4 \text{ g MnSO}_4(x \ 1 \ H_2 O),$ 0,7 g H₃BO₃, $0,01 \text{ g Cu}(NO_3)_2(x 3 H_2O),$ 0,06 g ZnSO₄(x 7 H₂O), 0,02 g NaMoO₄(x 2 H₂O) ad 250 mL destilliertes Wasser 9,6 mL L^{-1} 1 M Phosphatpuffer (pH 6,8): 81,3 g KH₂PO₄ 78,7 g K₂HPO₄ ad 500 mL destilliertes Wasser pH 6,8 10 mL L⁻¹ 10 % (NH₄)₂SO₄ bzw. Ammoniumsulfat-Lösung (zur P_{nif}-Repression) oder als alternative Stickstoffquelle: 10 mL L⁻¹ 10 % Serin-Lösung (w/v) (zur Pnif-Induktion) Der Phosphatpuffer sowie die Ammoniumsulfat-bzw. die Serin-Lösung wurden jeweils nach dem Autoklavieren und Abkühlen aller Lösungen hinzugefügt. LB-Medium LB-Agar + 15 g L⁻¹ Agar-Agar Kobe I (Kobe I, pulv., für die Mikrobiologie, Carl Roth GmbH + Co. KG,

Karlsruhe, Deutschland)

Medium (Hersteller/Referenz)	Zusammensetzung
MH-Agar	MH-Medium + 17 g L ⁻¹ Agar-Agar Kobe I (Kobe I, pulv., für die Mikrobiologie, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
PY-Agar nach (Klipp <i>et al.,</i> 1988)	PY-Medium + 20 g L ⁻¹ Select Agar <i>Qualified for Molecular Genetics Applications</i> (Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA)

2.5.2 Antibiotika

Tabelle 7: Antibiotikakonzentrationen zur Generierung von Selektionsdrücken.

Bei der Verwendung von Antibiotikaresistenzen als Selektionsmarker wurden die unten stehenden Antibiotikakonzentrationen eingesetzt. Diese beziehen sich sowohl auf Applikationen in Flüssigmedien als auch auf Kultivierungen auf Festmedien.

Antibiotikum (Hersteller)	Bakterienstamm	Konzentration	Lösungsmittel
Kanamycin -Sulfat (GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland)	E. coli (DH5α, S17-1) R. capsulatus (SB1003, SB1003-MVA, SB1003-ΔcrtE)	50 μg mL ⁻¹ 25 μg mL ⁻¹	steriles, destilliertes H ₂ O
Rifampicin (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (TCI), Tokyo, Japan)	R. capsulatus (SB1003, SB1003-MVA, SB1003-ΔcrtE)	25 μg mL ⁻¹	100 % DMSO
Gentamicin- Sulfat (GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland)	R. capsulatus (SB1003-MVA)	4 μg mL ⁻¹	steriles, destilliertes H₂O
Spectinomycin Dihydrochlorid Pentahydrat Biochemica (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)	R. capsulatus SB1003-∆crtE	10 μg mL ⁻¹	steriles, destilliertes H ₂ O

2.5.3 Allgemeine Anzucht und Lagerung von Bakterien

2.5.3.1 Kultivierung von Bakterien während Klonierungsarbeiten

Zur Kultivierung der *E. coli*-Stämme DH5α (Hanahan, 1983) und S17-1 (Simon *et al.*, 1983) wurde entweder Luria/Miller (LB) oder Terrific-Broth modifiziert (TB) als Medium (vgl. Kapitel 2.5.1) verwendet. Die Anzucht auf Agarplatten erfolgte bei 37 °C über Nacht (16-20 h). Flüssigkulturen wurden in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit einem Füllvolumen von 10 % bei 37 °C ebenfalls für 16-20 h unter konstantem Schütteln (130 UpM) mittels eines Laborschüttlers (Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland) angezogen. Zur Selektion auf Plasmid-tragende Bakterien, wurden den Kulturen die relevanten Antibiotika in entsprechenden Konzentrationen (vgl. Kapitel 2.5.2) hinzugesetzt.

2.5.3.2 Bestimmung optischer Dichten

Die Bestimmung der vorhandenen bakteriellen Zellmengen in Flüssigkulturen erfolgte durch Trübungsmessung. Dazu wurde ein Spektralphotometer des Typs GENESYS 10S UV-Vis-Spectrophotometer bzw. GENESYS 10uv der Firma Thermo Scientific bzw. Thermo Fisher Scientific GmbH Waltham, Massachusetts, USA verwendet. Standardgemäß wurden Trübungen von *E. coli*-Kulturen bei einer Wellenlänge von λ = 580 nm und im Fall von *R. capsulatus*-Kulturen bei λ = 660 nm aufgenommen. Die gemessenen Werte wurden als optische Dichte (OD) bei 1 mL Messvolumen und 1 cm Schichtdicke angegeben. Messungen der optischen Dichte, welche bei anderen Wellenlängen und/oder mit anderen Geräten durchgeführt wurden, werden an den entsprechenden Stellen beschrieben.

2.5.3.3 Lagerung von Bakterien

Die Bakterienstämme wurden als Gefrierkulturen gelagert. Dazu wurden diese zunächst über Nacht im für den jeweiligen Stamm üblichen Medium und unter den jeweils für das einzelne Bakterium spezifischen Bedingungen angezogen. Diese sind in separaten Kapiteln ausführlich dargelegt: (i) *E. coli*: LB-Medium, vgl. Kapitel 2.5.3.1, (ii) *C. glutamicum*: LB- oder MH-Medium, vgl. Kapitel 2.7.1, (iii) *R. capsulatus*: RCV-Medium, vgl. Kapitel 2.9.1 und (iv) bakterielle Humanpathogene: MH-Medium, vgl. Kapitel 2.7.2.2. Anschließend wurden aus den Kulturen 1-1,5 mL entnommen und mit Glycerin versetzt. Die Bakterienstämme *E. coli* und *C. glutamicum* wurden mit 20 % Glycerin versehen und bei -20 °C, insofern es sich um eine kürzere Lagerungsdauer handelte, eingefroren. Längerfristige Lagerungen dieser Bakterien erfolgten bei -80 °C ebenfalls in 20 % Glycerin in LB-Medium. Für Transformationen aufbereitete kompetente *E. coli*-Zellen (DH5α, S17-1) wurden in 100 mM-Calciumchlorid-Lösung, der 20 % Glycerin zugesetzt wurden, bei -80 °C gelagert (vgl. Kapitel 2.6.1.1). Die *R. capsulatus*-Stämme (SB1003, SB1003-MVA, und SB1003-Δ*crtE*) wurden in 50 % Glycerin und 50 % RCV-Medium bei -20 °C gelagert. Die verwendeten pathogenen Bakterienstämme (*E. faecium, P. aeruginosa, S. aureus, S. epidermidis, S. marcescens*) wurden in 20 % Glycerin in MH-Medium bei -80 °C aufbewahrt.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Übertragung von DNA in Bakterien

Das Einbringen von Plasmid-DNA in bzw. die Übertragungen von Nukleinsäuren zwischen Bakterien erfolgten mittels der Standardverfahren der Transformation und der Konjugation.

2.6.1.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

Zur Durchführung einer Transformation wurden zunächst chemisch kompetente Zellen der Stämme *E. coli* DH5α und *E. coli* S17-1 hergestellt. Übernachtkulturen des jeweiligen Bakteriums wurden bei 37 °C und 130 UpM in LB-Medium in 100 mL-Erlenmeyerkolben angezogen. Diese dienten zum Inokulieren weiterer Kulturen mit einer OD_{580 nm} entsprechend 0,05 und einem Kulturvolumen von 10 % des gesamten Kolbenvolumens. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C und 130 UpM bis zu einer OD_{580 nm} entsprechend 0,5 - 0,6. Anschließend wurde die gesamte Kultur mittels Zentrifugation geerntet (10 Minuten, 1780 xg, 4 °C). Ein Zellpellet einer 100 mL-Kultur wurde in 10 mL vorgekühlter 100 mM-Magnesiumchlorid-Lösung aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden ebenfalls unter Kühlung auf Eis durchgeführt. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension in der Magnesiumchlorid-Lösung ein weiteres Mal zentrifugiert (10 Minuten, 1780 xg, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 mL vorgekühlter 100 mM-Calciumchlorid-Lösung aufgenommen. Dieser Lösung wurde zusätzlich 1 mL vorgekühltes Glycerin hinzugesetzt. Anschließend erfolgte eine Portionierung in 100 bzw. 200 μL-Aliquots, welche bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert wurden. Zur Qualitätskontrolle wurde eine Transformation mit Plasmid-DNA durchgeführt. Außerdem wurde ein Antibiogramm angesetzt, indem Zellen eines Aliquots in Anwesenheit sämtlicher gebrauchter Antibiotika (vgl. Kapitel 2.5.2, Tabelle 7) kultiviert wurden. Ausschließlich Chargen chemisch kompetenter Zellen, die nach der Testtransformation Klone auf entsprechendem Selektionsmedium zeigten und keine Resistenzen im Antibiogramm aufwiesen, wurden weiterverwendet.

2.6.1.2 Transformation

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

Die Methode der Transformation wurde eingesetzt, um Plasmid-DNA in *E. coli* einzubringen. Dazu wurde ein Aliquot kompetenter Zellen (vgl. Kapitel 2.6.1.1) des ausgewählten Bakterienstamms auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µL der entsprechenden Plasmid-DNA versetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei -4 °C (auf Eis). Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden durchgeführt. Daraufhin wurden der Mischung 700 µL frisches LB-Medium hinzugefügt. Die hier verwendeten Plasmide basieren alle auf dem Vektor pRhon5Hi-2 (vgl. Kapitel 2.3), womit eine Selektion von Zellen, die das Plasmid trugen, anhand einer Kanamycin-Resistenz möglich war. Zur Ausbildung dieser Resistenz wurden die Bakterien nach dem Hitzeschock bei 37 °C in einem Rotator für Probenröhrchen (Rotator SB2, Stuart, Staffordshire, England) für 2 Stunden bebrütet. Danach wurden die Zellen auf LB-Agarplatten, die Kanamycin enthielten (vgl. Kapitel 2.5.2), ausplattiert und über Nacht bei 37 °C angezogen.

2.6.1.3 Konjugation

(modifiziert nach Klipp et al., 1988)

Die Konjugation wurde für das Einbringen von Plasmid-DNA in R. capsulatus-Zellen benutzt. Dazu wurden zunächst *E. coli*-S17-1-Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA transformiert (vgl. Kapitel 2.6.1.2). R. capsulatus wurde auf PY-Agarplatten, welche mit dem für den jeweiligen Stamm üblichen Antibiotikum-Zusatz (vgl. Kapitel 2.5.2) versetzt waren, angezogen. Die mit der Plasmid-DNA transformierten E. coli-Zellen und die R. capsulatus-Zellen wurden mithilfe einer Impföse von den Agarplatten aufgenommen und in 150 µL bestehend aus 100 µL RCV-Medium mit 0,1 % Ammonium und 50 µL LB-Medium gelöst. Diese Zelllösung wurde auf ein Whatman-Membran-Filterpapier aus Celluloseacetat (GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, Großbritannien), welches zuvor auf eine PY-Agarplatte ohne Antibiotikum-Zusatz gelegt wurde, pipettiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht (16-20 h) bei 30 °C in einem Brutschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland). Danach wurden die Zellen mit 1 mL RCV-Medium (+ 0,1 % Ammonium) von dem Filterpapier gespült und auf PY-Agarplatten, die das notwendige Antibiotikum zur Selektion (vgl. Kapitel 2.5.2) enthielten, ausplattiert. Die Inkubation der Stämme SB1003 und SB1003-MVA erfolgte für 2-3 Tage bei 30 °C und Glühbirnen-Licht in einer Anaerob-Inkubationskammer. Hierzu wurde das Anaerocult A System (Microbiology Anaerocult A system, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) genutzt, bei dem nach Herstellerangaben ein Reagenz zur Erzeugung eines anaeroben Milieus in der Kammer verwendet wurde. Im Fall des Stammes SB1003- $\Delta crtE$ wurden die Zellen bei 30 °C im Dunklen für 2-3 Tage bebrütet. Um die bei der Konjugation eingebrachten E. coli-Zellen zu entfernen, wurden einzelne *R. capsulatus*-Kolonien der Konjugationsausstriche drei weitere Male ausgestrichen.

2.6.2 Molekulargenetische Standardverfahren zur Modifikation von Plasmid-DNA

Die Klonierungsarbeiten erfolgten entsprechend des Standardverfahrens (Sambrook *et al.*, 1989) beziehungsweise der jeweiligen Herstellerangaben.

Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien. Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-DH5α-Zellen wurde das Kit "innuPREP Plasmid Mini Kit" bzw. "innuPREP Plasmid Mini Kit 2.0" der Firma Analytik Jena AG (Jena, Deutschland) verwendet. Alle Schritte wurden nach dem jeweiligen Protokoll *"Isolation of plasmid DNA from bacterial lysates*" bzw. *"Isolation of plasmid DNA from 5-10 mL bacterial culture*" durchgeführt. Die Elution der Plasmid-DNA von der Filtersäule erfolgte abweichend vom jeweiligen Protokoll mittels sterilem, 65 °C warmem, Nuklease-freiem Wasser. Anschließend wurde die gewonnene Plasmid-DNA mit einem Spektralphotometer Nanodrop 2000c der Firma Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, USA) quantifiziert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion. Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction* = PCR) nach Saiki *et al.*, 1988 wurde zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe entsprechender Oligonukleotide (vgl. Kapitel 2.4) und einer DNA-Polymerase (Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Die Reaktionsansätze sowie die Temperaturprogramme wurden nach Standardverfahren bzw. Herstellerangaben angesetzt und angewendet.

Agarose-Gelelektrophorese. Die Agarose-Gelelektrophorese nach Sambrook wurde zur Trennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größen verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Agarosegele setzten sich aus 0,5-fachem TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer, Zusammensetzung: Tris 5,4 g L⁻¹, Borsäure 2,75 g L⁻¹, EDTA 0,375 g L⁻¹) und einer Agarosemenge von 1 % (w/v) zusammen. Jedem Gel wurden entsprechend der Herstellerangaben ungefähr 0,5 µg mL⁻¹ Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor der Beladung des Agarosegels mit DNA-Probenpuffer (Zusammensetzung des 5-fach Probenpuffers: Glycerin 43 % (v/v), 0,05 % Bromphenolblau (w/v), 100 mM EDTA) versetzt. Als Laufpuffer diente 0,5-facher TBE-Puffer. Es wurden horizontale Agarose-Gelelektrophorese-Systeme (Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, Kalifornien, USA) genutzt und die DNA-Proben in einem Gel bei einer Spannung von 125 bzw. 130 Volt für 15-30 Minuten aufgetrennt. Zur Einschätzung der Größe der im Gel aufgetrennten DNA-Fragmente in Basenpaaren diente der Größenmarker *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Die Detektion der Banden erfolgte mittels des Geldokumentationssystems

EagleEye II der Firma Stratagene anhand der bei Bestrahlung mit UV-Licht emittierten Strahlung des in die DNA-Doppelhelix interkalierten Ethidiumbromids.

Hydrolytische Spaltung von DNA. Zur hydrolytischen Spaltung von DNA wurden die Restriktionsendonukleasen *Sal*I (5´ G^TCGAC 3´) und *Nde*I (5´ CA^TATG 3´) inklusive der geeigneten Puffer der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen. Diese wurden nach den vom Hersteller empfohlenen Angaben gebraucht.

Ligation von DNA-Fragmenten. Die enzymatische Verknüpfung zweier DNA-Fragmente erfolgte mittels der T4-DNA-Ligase in dem dazugehörigen T4-DNA-Ligase-Puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Das Ansetzen der Reaktionsansätze sowie die Ligationsdauer wurden nach Standardverfahren bzw. den Angaben des Enzymherstellers durchgeführt.

Sequenzierungen. Die Verifizierung der Sequenz von *in vitro* rekombinierter DNA erfolgte mittels Sequenzierungen, welche durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) oder das Dienstleisterunternehmen Sequiserve (Vaterstetten, Deutschland) durchgeführt wurden.

2.7 Testmethoden zur Bestimmung antibakterieller Eigenschaften

2.7.1 Agardiffusionstest

(modifiziert nach Bauer et al., 1966)

Der Agardiffusionstest nach Bauer *et al.*, 1966 stellt ein etabliertes Standardverfahren zur Evaluierung antibakterieller Effekte von Substanzen dar. Es beruht auf der Diffusion der Testsubstanz von einem Trägermaterial in ein festes Nährmedium, auf welchem Bakterien kultiviert werden. Nach einer definierten Inkubationszeit der Agarplatte entstehen bei gegebener antibakterieller Wirkung sogenannte Hemmhöfe um die Trägerblättchen. In diesem Bereich hat kein bakterielles Wachstum stattgefunden, womit die Hemmzonen die antibakterielle Wirkung der untersuchten Verbindungen repräsentieren.

Experimenteller Ablauf. Der Agardiffusionstest wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um kombinierte antibakterielle Wirkungen zu untersuchen. Es wurde gegen das Modellbakterium *C. glutamicum* ATCC 13032 getestet. Dieses wurde zu Beginn eines Agardiffusionstests aus einer Gefrierkultur auf LB-Agar ohne Antibiotikum ausgestrichen und bei 30 °C über Nacht angezogen. Mit 1-4 Klonen der frisch ausgestrichenen Platte wurden Übernachtkulturen in LB-Medium in einem 100 mL Erlenmeyerkolben mit einem Füllvolumen von 10 % inokuliert. Die Inkubation erfolgte unter permanentem Schütteln (130 UpM) und bei 30 °C über Nacht in einem Multitron Standard Inkubationsschüttler (Infors HT). Aus den Kulturen wurden Bakterienzellsuspensionen zur Herstellung eines gleichmäßigen Bakterienausstrichs für den Test erstellt. Dazu wurde eine OD_{580 nm} von 0,3 pro

1 mL Kochsalz-Lösung (0,9 % Natriumchlorid) eingestellt. Als Festmedium für die Agardiffusionstests wurde LB-Medium verwendet. Je Agarplatte (Petrischale, Quadratisch, 120×120x15,8 mm, mit 4 Nocken, steril; VWR, Cat-No. GOSSBP124-05) wurde 1 mL der Zellsuspension von C. glutamicum in Kochsalzlösung aufgetragen und mit Hilfe von Glasperlen gleichmäßig auf dieser verteilt. Als flüchtiges Lösungsmittel der zu untersuchenden Verbindungen wurde Ethanol (p.a.) eingesetzt. Das Trägermaterial für die Lösungen der Substanzen waren unbehandelte Celluloseblättchen mit einem Durchmesser von 6 mm (Rotilabo-Testblättchen, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Diese wurden in mehreren Schritten mit je 10 µL der Substanzlösung benetzt und jeweils unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank für mindestens 5 Minuten getrocknet. Diese Schritte wurden wiederholt bis die Celluloseblättchen mit den ausgewählten Mengen der zu testenden Stoffe beladen waren. Anschließend wurden sie auf die LB-Agarplatten mit dem noch nicht bebrüteten Ausstrich von C. glutamicum aufgelegt. Die Inkubation erfolgte für 20 h bei 30 °C in einem Inkubationsschrank. Daraufhin wurden entstandene Hemmhöfe mittels einer Digitalkamera (Canon, EOS 600D, Canon, Tokio, Japan) fotodokumentiert. Die Größe der entstandenen Hemmhöfe wurde mit Hilfe des Programms "Microsoft PowerPoint 2010" ausgemessen, um den Durchmesser der Hemmhöfe abzüglich der Größe der Celluloseblättchen von 6 mm zu bestimmen.

Ermittlung von Referenzgrößen. Um Referenzgrößen von gemessenen Hemmhöfen bei Untersuchungen mit dem Modellbakterium *C. glutamicum* zu erhalten, wurden Agardiffusionstests mit dem etablierten antimykobakteriellen Antibiotikum Streptomycin durchgeführt (Trevor *et al.*, 2015). Der experimentelle Ablauf erfolgte wie oben beschrieben. Das Streptomycin-Sulfat wurde von der Firma GERBU Biotechnik GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Da Streptomycin gut wasserlöslich ist, wurde destilliertes H₂O als Lösungsmittel verwendet. Die Konzentrationen in den Arbeitslösungen wurden so eingestellt, dass ein Auftrag von 10 µL zum Aufbringen der ausgewählten Menge auf ein Celluloseblättchen ausreichte. Als Kontrolle diente dementsprechend ein mit 10 µL H₂O benetztes Celluloseblättchen. Diese wurden für 30 Minuten unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank getrocknet. Die trockenen Blättchen wurden auf mit *C. glutamicum* versehene LB-Agarplatten aufgelegt. Die Inkubation erfolgte für 20 h bei 30 °C mit einer anschließenden Fotodokumentation.

2.7.2 Bouillonverdünnungsmethoden

(modifiziert nach EUCAST, 2006)

Bei dem als Bouillonverdünnungs- oder Bouillondilutionsmethode (engl.: *broth dilution method*) bezeichneten Test werden Flüssigkulturen zur Bestimmung der Empfindlichkeit von Mikroben gegenüber Antibiotika verwendet (CLSI, 2012; EUCAST, 2000; Wiegand *et al.*, 2008): Dabei werden

von den zu testenden Verbindungen geometrische Verdünnungsreihen mit einem Verdünnungsfaktor von üblicherweise zwei, auch als serielle Verdünnung (engl.: serial dilution) bezeichnet, in Kulturmedium angefertigt. Anhand in diesen Reihen inokulierter Kulturen werden minimale Hemmkonzentrationen (engl.: *minimum inhibitory concentration*, MIC) der betrachteten Substanz gegenüber den eingesetzten Bakterien bestimmt. Die MIC ist die geringste Konzentration einer Verdünnungsreihe, bei der unter festgelegten Bedingungen in einer definierten Zeit kein bakterielles Zellwachstum detektiert wird (EUCAST, 2000). Eine erweiterte Variante des Bouillonverdünnungstests ist die Checkerboard-Methode, bei der zwei Substanzen zur Evaluierung kombinierter Wirkungen in geometrischen Verdünnungsreihen gegeneinander aufgetragen werden (Eliopoulos & Eliopoulos, 1988). Im Rahmen dessen werden neben den jeweiligen alleinigen MIC-Werten kombinierte MIC-Werte der Verbindungen bestimmt. Die kombinierte MIC ist die geringste Konzentration einer Substanz, bei der zusammen mit dem anderen eingesetzten Stoff das bakterielle Wachstum unterbunden ist. Anhand der abgelesenen alleinigen und kombinierten MIC-Werte können anschließend die sogenannte *Fractional Inhibitory Concentration* (FIC) und der FIC-Index (FICI) berechnet werden. Nach den EUCAST-Richtlinien sind der FIC- und der FICI-Wert wie folgt definiert (EUCAST, 2000): Der FIC-Wert der Verbindung A wird durch die Bildung des Verhältnisses der MIC dieses Stoffes bei kombinierter Anwendung mit Stoff B zu der MIC von Stoff A bei alleiniger Applikation bestimmt. Auf gleiche Weise wird der FIC-Wert des zweiten Stoffes B berechnet. Werden die jeweiligen FIC-Werte der miteinander kombinierten Verbindungen addiert, so resultiert daraus der FIC-Index. Im Zuge eines Bouillonverdünnungstests zweier Verbindungen mit einer Checkerboard-Anordnung kann eine Anzahl verschiedener FICI auftreten. Diese Werte können des Weiteren gemittelt werden, sodass daraus der als "durchschnittlicher FICI" bezeichnete Wert resultiert.

 FIC (A)
 =
 MIC (Stoff A in Anwesenheit von Stoff B) /MIC (A allein)

 FIC (B)
 =
 MIC (Stoff B in Anwesenheit von Stoff A) /MIC (B allein)

 FICI
 =
 FIC (A) + FIC (B)

Anhand des Zahlenwertes des erhaltenen FICI erfolgt anschließend die Beurteilung und Klassifizierung der antibakteriellen Wirkung der zwei in Kombination eingesetzten Verbindungen. Ein Wert von 1 zeigt an, dass die gemeinsame Wirkung direkt der Summe der einzelnen Wirkungen entspricht, während Werte < 1 anzeigen, dass eine verstärkte gemeinsame Wirkung vorliegt und Werte > 1 bedeuten, dass eine geringere Wirkung in Kombination vorhanden ist. Dabei sind die Grenzen für die eindeutige Zuordnung der jeweiligen Kategorien in der Literatur kontrovers diskutiert und demnach nicht vollständig trennscharf, sodass die Kategorien je nach Referenz voneinander

abweichen können (Tabelle 8). Oftmals werden die Grenzen bis 0,5 für Synergie und ab 4 für Antagonismus verwendet. Die in den EUCAST-Richtlinien vorgeschlagenen Grenzen der FICI-Werte zur Einordnung in die jeweilige Kategorie sind in der ersten Zeile der Tabelle aufgeführt. Alle weiteren gelisteten Studien verwenden ebenfalls die Kategorien "synergistisch" und "antagonistisch". In ein paar Untersuchungen werden zusätzlich die Kategorien "additiv", "indifferent" oder "keine Interaktion" benutzt und weitere sprechen von einer Einordung in "partiell-synergistisch" oder "leicht synergistisch".

Tabelle 8: Beispiele unterschiedlicher Kategorien zur Evaluierung von FICI-Werten im Rahmen der Klassifizierung kombinierter antibakterieller Effekte.

FICI: Fractional Inhibitory Concentration-Index

Einteilungen von FICI-Werten					Referenz
≤ 0,5 synergistisch	> 0,5 — 1 additiv	>1-<2 indifferent	≥ 2 antagonistisch		(EUCAST, 2000)
≤ 0,5 synergistisch	> 0,5 keine Int	– 4,0 eraktion	> ⁄ antago	1,0 nistisch	(Odds, 2003)
≤ 0,5 synergistisch	> 0,5 – < 1 partiell- synergistisch	= 1,0 additiv	> antago	1 nistisch	(Samadi <i>et al.,</i> 2012)
≤ 0,5 synergistisch	> 0,5 – < 1 partiell- synergistisch	= 1,0 additiv	> 1,0 – < 4,0 indifferent	≥ 4,0 anta- gonistisch	(Ahmed <i>et al.,</i> 2013; Cai <i>et al.,</i> 2007)
< 0,5 synergistisch	0,5 – 0,75 partiell- synergistisch	0,76 – 1,0 additiv	> 1,0 – 4,0 indifferent	> 4,0 anta- gonistisch	(Asok Kumar <i>et al.,</i> 2004; Joung <i>et al.,</i> 2015; Mazumdar <i>et al.</i> , 2005)
≤ 0,5 synergistisch	> 0,5 – 1 leicht synergistisch	> 1,0 – 1,25 indifferent	> 1,25 – 4,0 leicht anta- gonistisch	> 4,0 anta- gonistisch	(Meletiadis <i>et al.,</i> 2010)

Zur Einordnung dieser Werte gilt zu beachten, dass der FIC-Wert einer Verbindung bedeutet, dass die MIC eines Stoffes in der getesteten Kombination um die x-fache Menge verändert ist. Der FICI-Wert stellt demnach die insgesamt erzielte Modifikation (z. B. Reduktion) der einzusetzenden Stoffmengen bezogen auf beide verwendeten Verbindungen dar. Dabei können die spezifischen Reduktionen jedes einzelnen Stoffes in signifikant unterschiedlichen Größenbereichen liegen, unabhängig davon, ob die

Totalreduktion zunächst verhältnismäßig hoch oder gering erscheint (Tabelle 9). Beispiel: FICI: 0,5 entspricht einer 4-fach geringeren Stoffmenge bezogen auf beide Stoffe in Kombination. Dies könnte bedeuteten, dass ein FIC-Wert von je 0,25 für Stoff A und Stoff B vorliegt. Für jeden Stoff würde das eine individuelle 4-fache Reduktion der benötigten Menge in Kombination bedeuten. Es ist jedoch ebenso möglich, dass sich ein FICI-Wert von beispielsweise 0,403 wie folgt zusammensetzt: FIC Stoff A von 0,4 (entspricht einer 2,5-fachen Mengenreduktion von Stoff A) und FIC Stoff B von 0,003 (entspricht einer 333-fachen Mengenreduktion von Stoff B). Das heißt die Reduktionen der jeweiligen Mengen beider Stoffe erfolgen nicht äquivalent. Dies könnte etwa relevant sein, wenn die eingesetzten Substanzen unterschiedliche Toxizitäten besitzen.

Tabelle 9: Anzeige der Reduktion an benötigten Stoffmengen einzelner und kombinierter Verbindungen zur Inhibition bakteriellen Wachstums durch beispielhafte FIC- bzw. FICI-Werte.

FIC einer Verbindung ¹	Teil-Reduktion ²	FICI zweier Verbindungen ¹	Gesamt-Reduktion ³
0,5	2-fach	0,5	4-fach
0,25	4-fach	0,25	8-fach
0,125	8-fach	0,125	16-fach
0,063	16-fach	0,063	32-fach
0,031	32-fach	0,031	64-fach
0,016	64-fach	0,016	128-fach
0,008	128-fach	0,008	256-fach
0,004	256-fach	0,004	512-fach
0,002	512-fach	0,002	1024-fach

FIC: Fractional Inhibitory Concentration; FICI: Fractional Inhibitory Concentration-Index

¹ Die beispielhaft aufgeführten FIC-Werte wurden ausgehend von dem Startwert 0,5 durch das Teilen mit dem Divisor 2 ermittelt und anschließend auf drei Nachkommastellen gerundet.

² Reduktion der eingesetzten Stoffkonzentration bezogen auf diese Verbindung. Die Teil-Reduktion "2-fach" wurde rechnerisch für den dazugehörigen FIC-Wert von 0,5 bestimmt. Von dieser Teil-Reduktion ausgehend wurden die darunter aufgelisteten Teil-Reduktionen durch ein Multiplizieren mit dem Faktor 2 ermittelt. Die Werte wurden nicht gerundet.

³ Reduktion der eingesetzten Stoffkonzentration bezogen auf die gesamte Menge beider Verbindungen. Diese setzt sich aus den Teil-Reduktionen der beiden gemeinsam eingesetzten Stoffe zusammen und bildet damit die Summe aus den beiden Teil-Reduktionen. Die jeweilige Teil-Reduktion kann dabei sehr unterschiedlich sein. Damit können sich ebenfalls die jeweiligen Reduktionsfaktoren in verschiedenen Größenordnungen befinden. Die Gesamt-Reduktion "4-fach" wurde rechnerisch für den dazugehörigen FIC-Wert von 0,5 bestimmt. Von dieser Teil-Reduktion ausgehend wurden die darunter aufgelisteten Gesamt-Reduktionen durch ein Multiplizieren mit dem Faktor 2 ermittelt. Die Werte wurden nicht gerundet.

Die Bouillondilutionsmethode kann ebenso zur Bestimmung bakterizider Effekte der untersuchten Substanzen angewendet werden. So können zusätzlich sogenannte minimale bakterizide Konzentrationen (MBK) (engl.: *minimum bactericidal concentration*, MBC) determiniert werden. Die MBC bezieht sich auf die Reduktion der Lebendzellzahl der mit den Testsubstanzen behandelten Kulturen. Dabei ist die MBC die geringste Konzentration der Verdünnungsreihe der getesteten Verbindung, bei der unter definierten Bedingungen und Inkubationszeiten sowie einer festgelegten inokulierten bakteriellen Zellzahl eine Reduktion der Lebendzellzahl um 99,9 % stattgefunden hat (EUCAST, 2000). Die Bestimmung dieses Wertes erfolgt durch das Ausplattieren einer bestimmten Menge der Testkultur auf einer unbehandelten Nährmedium-Agarplatte und das Zählen der Koloniezahl nach einer definierten Inkubationszeit.

Des Weiteren können die Bouillondilutions- und die *Checkerboard*-Methode mit verschiedenen Kulturvolumina durchgeführt werden, wonach eine Unterteilung in Makro- und Mikrodilutionstests erfolgt. Hier wurden Bouillonverdünnungstests entsprechend der *Checkerboard*-Anordnung in beiden Maßstäben benutzt. Während MIC in allen hier durchgeführten Bouillonverdünnungstests bestimmt wurden, wurden MBC nur für Experimente im Makromaßstab determiniert. Der jeweils angewendete experimentelle Aufbau der Mikro- und Makrodilutionstests basiert auf den EUCAST- bzw. CLSI-Richtlinien (CLSI, 2012; EUCAST, 2006; Wiegand *et al.*, 2008) und demnach auf den europäischen bzw. amerikanischen Standards zur Normierung antimikrobieller Empfindlichkeitstests von Mikroben gegen klinisch etablierte Antibiotika. Da es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen jedoch um nicht-etablierte, zum Teil schlecht wasserlösliche Subtanzen handelt, war eine Anpassung dieser Standardmethoden notwendig. Dementsprechend wurden zur Adaption an die bearbeitete Fragestellung Modifikationen der in den genannten Richtlinien angegebenen Protokolle vorgenommen, die nachfolgend in der Beschreibung der exakten experimentellen Abläufe detailliert dargelegt sind.

2.7.2.1 Makrodilutionsmethode

Laut der EUCAST-Definition werden Bouillonverdünnungsmethoden ab einem Kulturvolumen von \geq 2 mL als Makrodilutionsmethoden definiert (EUCAST, 2000). In dieser Arbeit werden Kultivierungen mit einem Volumen von 800 µL bereits dazu gezählt.

Experimenteller Aufbau und Ablauf. Der Test wurde verwendet, um kombinierte antibakterielle Effekte zweier Substanzen gegen das Modellbakterium *C. glutamicum* ATCC 13032 mittels der *Checkerboard*-Anordnung zu untersuchen. Dazu wurde das Bakterium aus Gefrierkulturen auf LB-Agarplatten ausgestrichen (30 °C, über Nacht) und die frischen Ausstriche zum Inokulieren von Übernachtkulturen (30 °C, 130 UpM, 10 % Füllvolumen, LB-Medium, 18 h) eingesetzt. Diese dienten zum Ansetzen der Testkulturen in Round Well Plates der Firma m2p-labs GmbH (Baesweiler, Deutschland). Hierzu wurde die OD_{580 nm} in einem Volumen von 776 μL so eingestellt, dass ein zellfreies Volumen von 24 μL berücksichtigt wurde, um in 800 μL eine OD_{580 nm} von 0,05 zu erzielen. Das Volumen von 24 μL wurde für die Zugabe der jeweiligen zu testenden Verbindung verwendet. Bei einer kombinierten Zugabe wurden die beiden Stoffe jeweils in 12 μL gelöst, sodass in der Summe

47

wieder 24 µL hinzugegeben wurden. Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei Experimente im Makrodilutionsmaßstab durchgeführt. Im ersten Experiment wurden die Sekundärmetabolite Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin gegeneinander aufgetragen. Das zweite Experiment untersucht die kombinierte antibakterielle Wirkung von N-Myristoyltyrosin und Streptomycin. Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin wurden in Ethanol (p.a.) und das gut wasserlösliche Antibiotikum Streptomycin in LB-Medium aufgenommen. Die Stofflösungen wurden in geometrischen Verdünnungsreihen mit einem Verdünnungsfaktor von zwei eingesetzt. Bei der Verwendung von Streptomycin wurde eine Zellsuspension von 752 μL mit einer eingestellten OD_{580 nm} von 0,052 inokuliert. Anschließend wurden 24 μL der Streptomycin-Lösung hinzugefügt und daraufhin 24 μL des in Ethanol gelösten *N*-Myristoyltyrosins. Auf diese Weise wurde sowohl eine immer gleichbleibende anfängliche OD_{580 nm}, als auch eine einheitliche Ethanolkonzentration von 3 %, in den verschiedenen Experimenten sichergestellt. Als Kontrolle dienten Kulturen denen nur 3 % Ethanol hinzugesetzt wurden. Die Round Well Plates wurden nach dem Inokulieren mit sterilen atmungsaktiven Viskose-Sheets versiegelt (Breathable rayon film seals for biological cultures, VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) und es folgte eine Inkubation für 20 h bei 30 °C und 600 UpM in einem Eppendorf ThermoMixer C (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Danach wurden die MIC- und MBC-Werte wie folgt bestimmt und ausgewertet.

Bestimmung der MIC. Nach der 20-stündigen Inkubation im Makrodilutionsmaßstab wurden die Kulturen für 20 Minuten bei Raumtemperatur (26 °C) und 4000 UpM zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde abgenommen und verworfen. Die Zellpellets wurden in 800 μL frischem LB-Medium durch Schütteln bei 600 UpM und 20 °C für 12 Minuten in einem Eppendorf ThermoMixer C (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) resuspendiert. Durch diesen Schritt sollten die untersuchten Verbindungen aus den Zellkulturen gewaschen werden. Danach wurden 100 µL in eine sterile 96-Well-F VWR[®] Multiwell-Zellkulturplatte (REF-Nr.: 734-2327, VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) überführt und die optische Dichte jeder Kultur in einem Plattenphotometer des Typs TECAN Infinite[®] M1000 PRO (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Dazu wurde die Platte zunächst für 3 Sekunden geschüttelt. Um eine lineare Korrelation zwischen der Trübungsmessung und der Zelldichte aufrechtzuerhalten und eine Interferenz aufgrund von unerwünschten Resten des roten Pigments Prodigiosin vorzubeugen, wurde die Messung bei einer Wellenlänge von λ = 650 nm durchgeführt. Dieser Wellenlängenbereich befindet sich jenseits des Absorptionsmaximums dieses Sekundärmetabolits. Zum Konvertieren der erhaltenen Messwerte in Werte von optischen Zelldichten, die mittels eines Spektralphotometer (Thermo Scientific™ GENESYS 10S UV/VIS-Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific GmbH Waltham, Massachusetts, USA) ermittelt werden, wurde eine Kalibrierung mit C. glutamicum zwischen den beiden Geräten durchgeführt. Hierzu wurden Kulturen mit eingestellten optischen

Dichten bei einer Wellenlänge von λ = 650 nm in beiden Geräten gemessen und die erhalten Absorptionswerte gegeneinander aufgetragen (Abbildung 11).



Abbildung 11: Korrelation zwischen im Photometer und im Plattenphotometer gemessenen optischen Dichten. Die Absorptionsmessungen von definiert eingestellten optischen Dichten von Kulturen des Bakteriums *C. glutamicum* wurden sowohl im Photometer (Thermo Scientific[™] GENESYS 10S UV/VIS-Spectrophotometer) als auch im Plattenphotometer (TECAN Infinite[®] M1000 PRO) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 650$ nm gemessen. Die erhaltenen Messwerte wurden gegeneinander aufgetragen, sodass die Steigung der Geradengleichung dem Umrechnungsfaktor der Messwerte beider Geräte entspricht. Hier ist eine repräsentative Eichgerade aus einer Dreifachbestimmung gezeigt.

Die Steigungen aus drei unabhängig voneinander generierten Eichgeraden wurden gemittelt, woraus der Umrechnungsfaktor von 5,93 resultierte. Reines LB-Medium wurde mehrfach im Plattenphotometer gemessen und die erhalten Werte gemittelt, sodass sich ein LB-Medium-Leerwert von 0,08 ergab. Dieser wurde von den Plattenphotometer-Werten der Kulturen subtrahiert und die Werte mit dem Umrechnungsfaktor multipliziert. In Betracht der zu Beginn eingesetzten Startzellzahl der Kulturen entsprachen Messwerte > 0,06 den Kulturen, die kein bakterielles Wachstum aufwiesen und zum Ablesen der MIC verwendet wurden.

Bestimmung der MBC. Zur Messung der Überlebensrate der Zellen nach der Inkubation unter Anwesenheit der zu testenden Substanzen wurden die MBC der Verbindungen bestimmt. Dazu wurde aus den zuvor beschriebenen, gewaschenen und im Plattenphotometer gemessenen Kulturen jeweils eine 1:100-Verdünnung hergestellt. Damit wurden bei dem Waschen eventuell verbliebene Reste der eingesetzten Verbindungen so stark verdünnt, dass keine antibakterielle Wirkung von diesen ausgehen kann. Aus den Verdünnungen wurden je 3 µL auf eine frische LB-Agarplatte getropft und für 20 h bei 30 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Ergebnisse mit einer digitalen Kamera fotodokumentiert. Die Auswertungen erfolgten durch Zählung der sichtbaren Kolonien. Anhand der zuvor bestimmten CFU (engl.: *colony forming units*) der Kontrolle (Kulturen des Bakteriums *C. glutamicum* nach 20 h Inkubation bei 30 °C, 600 UpM, mit 3 % Ethanol) wurde ermittelt, dass 55 Kolonien pro 3 μL Kultur einer Überlebensrate von 0,1 % der Zellen der gesamten Kultur entsprach. Im Umkehrschluss bedeutet diese Lebendzellzahl, dass 99,9 % der Zellen abgestorben sind, was als Grenzwert für die MBC definiert ist (EUCAST, 2000).

2.7.2.2 Mikrodilutionsmethode

Zur Bestimmung antibakterieller Effekte diverser Verbindungen gegen ausgewählte Modellpathogene wurde die Mikrodilutionsmethode angewandt. Darunter fallen Bouillonverdünnungstests in Mikrotiterplatten, welche eine Kapazität von mindestens $\leq 500 \,\mu$ L (EUCAST, 2000) bzw. $\leq 200 \,\mu$ L (EUCAST, 2006) pro Well aufweisen, sodass das maximale Kulturvolumen hier 100 μ L betrug. Es wurde gegen die pathogenen Bakterienstämme *S. aureus, S. epidermidis, E. faecium, P. aeruginosa*, und *S. marcescens* (vgl. Tabelle 3) getestet. Als Kontrolle wurde das Modellbakterium *C. glutamicum* mitgeführt.

Experimenteller Aufbau und Ablauf. Für die Mikrodilutionstests wurden sterile Mikrotiterplatten (96-Well-F VWR[®] Multiwell-Zellkulturplatten, REF-Nr.: 734-2327, VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) als Kulturgefäße ausgewählt. Die zu testenden Verbindungen wurden in dem Co-Solvens DMSO gelöst und verschiedene Konzentrationen entsprechend geometrischer Verdünnungsreihen mit einem Faktor von zwei eingestellt. Die Bakterien wurden auf MH-Agarplatten ohne Antibiotikum-Zusatz aus Gefrierkulturen ausgestrichen und bei 37 °C für 18 h angezogen. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut überstrichen (37 °C, 18 h), um potentielle negative Effekte auf das Wuchsverhalten der Bakterien aufgrund der Gefrierlagerung zu minimieren. Die frischen Ausstriche dienten zum Inokulieren der Übernachtkulturen mit 4 Klonen (MH-Medium, Füllvolumen 10 %, 37 °C, 18 h, 150 UpM). Am darauffolgenden Tag wurden die Kulturen für das Ansetzen der Testkulturen mit einer definierten Lebendzellzahl entsprechend des McFarland-Standards von 0,5 genutzt. Dieser bezeichnet eine Lösung mit einer definierten Trübung, welche in der Mikrobiologie als Referenz eingesetzt wird, um die Zellzahl in einer bakteriellen Suspension einzustellen. Der Wert McFarland 0,5 entspricht einer optischen Dichte von 0,08-0,13 bei einer Wellenlänge von λ = 625 nm (EUCAST, 2006) und einer Lebendzellzahl von ungefähr 1-2 x 10⁸ CFU mL⁻¹ (Wiegand *et al.*, 2008). Demnach wurden im ersten Schritt Zellsuspensionen mit einer OD_{625 nm} entsprechend von 0,1 angesetzt (Verdünnung 1). Daraufhin erfolgte in Abhängigkeit des Bakteriums ein spezifischer Verdünnungsschritt, wodurch Zellsuspensionen mit äquivalenten Zellzahlen von ungefähr 1 x 10⁶ CFU mL⁻¹ generiert wurden (Verdünnung 2). Für die hier eingesetzten Bakterien wurden folgende spezifische Verdünnungsschritte verwendet: C. glutamicum (1:50); S. aureus (1:100), S. epidermidis (1:100), E. faecium (1:100), P. aeruginosa (1:200) und S. marcescens (1:200). Von der Zellsuspension (Verdünnung 2) wurden 50 µL in die zuvor mit 50 µL (3 µL DMSO mit der zu testenden

Verbindung + 47 µL MH-Medium) befüllten Wells der Mikrotiterplatte inokuliert. Dadurch enthielten die Testkulturen eine anfängliche Lebendzellzahl von rund 5 x 10⁵ CFU mL⁻¹. Die Platten wurden mit dem dazugehörigen Plastikdeckel verschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Zum Durchmischen der Kulturen wurden die Mikrotiterplatten in dem Plattenphotometer vor der Inkubation für 5 Sekunden geschüttelt. Anschließend wurde die Kultivierung bei gesättigter Luftfeuchtigkeit für 20 h und 37 °C ohne Schütteln durchgeführt. Die Testkulturen der Mikrodilutionstests wurden für die verwendeten bakteriellen Pathogene und das Modellbakterium *C. glutamicum* nach dem eben beschriebenen Protokoll alle gleich angesetzt.

Aufgrund der bakterienspezifischen Größe und Form sowie der verschiedenen Wuchsverhalten unter identischen Kultivierungsbedingungen sind bei Absorptionswerten von Trübungsmessungen gleicher Wellenlängen unterschiedliche Lebendzellzahlen zu erwarten. Um daher die Kulturen der verschiedenen Bakterien mit denselben Lebendzellzahlen inokulieren zu können, mussten die oben genannten bakterienspezifischen Verdünnungsfaktoren für den zweiten Verdünnungsschritt folgendermaßen determinierten werden.

Überprüfung der inokulierten Zellzahl und Ermittlung bakterienspezifischer Verdünnungsfaktoren. Um bei jedem durchgeführten Mikrodilutionstest zu überprüfen, ob die Kulturen mit einer Zellzahl von ungefähr 5 x 10⁵ CFU mL⁻¹ inokuliert wurden, wurden die verwendeten bakteriellen Zellsuspensionen (Verdünnung 2) parallel zu dem eben beschriebenen Ansetzen der Testkulturen in zusätzlichen Reaktionsgefäßen 1:2 verdünnt, sodass dort ebenfalls Verdünnung 3 generiert wurde. Anschließend wurde die Verdünnung 3 ein weiteres Mal 1:1000 verdünnt (Verdünnung 4). Aus dieser Verdünnung wurden je 100 µL auf MH-Agarplatten ausplattiert und parallel zu den Testkulturen in den Mikrotiterplatten bei 37 °C für 20 h inkubiert. Auf diesen Agarplatten werden laut CLSI- und EUCAST-Richtlinien ungefähr 50 bzw. zwischen 20 und 80 Kolonien erwartet. Insofern diese Koloniezahl ermittelt werden konnte, handelte es sich beim Inokulieren der Testkulturen um die vorgesehene bakterielle Zellzahl von ungefähr 5 x 10⁵ CFU mL⁻¹, sodass das Experiment ausgewertet werden konnte. Der in den Richtlinien vorgeschlagene Verdünnungsschritt von 1:100 zur Generierung der Zellsuspension (Verdünnung 2) kann je nach Bakterium variieren, sodass dieser Faktor nicht für alle hier einbezogenen Stämme eingesetzt werden konnte. Zur Vorbereitung der Mikrodilutionstests wurden daher zunächst die bakterienspezifischen Verdünnungsfaktoren determiniert. Dazu wurden verschiedene Verdünnungen bei der Herstellung der Zellsuspension (Verdünnung 2) getestet, sodass sich die oben beschriebenen spezifischen Verdünnungen ergaben. Bestimmung der MIC. Nach der Inkubation der Testkulturen erfolgte die Detektion des

Zellwachstums mittels einer Trübungsmessung bei einer Wellenlänge von λ = 750 nm in einem Multimodus-Mikroplatten-Reader SpectraMax i3x der Firma Molecular Devices, LLC (San Jose, Kalifornien, USA). Um die ermittelten Werte des Plattenphotometers auf Messdaten eines

Spektralphotometers (GENESYS 10uv, Thermo Fisher Scientific GmbH Waltham, Massachusetts, USA) konvertieren zu können, wurde eine Eichgerade zwischen dem genannten Photometer und dem Multimodus-Mikroplatten-Reader erstellt. Aus einer Übernachtkultur von C. glutamicum (4 Klone inokuliert, 10 mL MH-Medium, 100 mL Erlenmeyerkolben, 30 °C, 130 UpM, Schüttler: Multitron Standard Inkubationsschüttler der Firma Infors AG, Bottmingen, Schweiz) wurden Zellsuspensionen mit verschiedenen Trübungen eingestellt. Alle Verdünnungen wurden sowohl im Photometer als auch im Multimodus-Mikroplatten-Reader bei einer Wellenlänge von λ = 750 nm gemessen. Als Leerwert im Plattenphotometer wurde die Absorption von reinem MH-Medium zusätzlich aufgenommen. Die Absorption des reinen MH-Mediums (0,03) wurde bei der Auswertung von den Messwerten der Kulturen subtrahiert. Die Messungen im Multimodus-Mikroplatten-Reader wurden in einer sterilen 96-Well-F Mikrotiterplatte (VWR® Multiwell-Zellkulturplatten (REF-Nr.: 734-2327, VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) ohne einen Deckel und mit einem gesamten Füllvolumen von 100 μL durchgeführt. Messungen im Spektralphotometer erfolgten in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die bei derselben Wellenlänge gemessenen Werte wurden jeweils gegeneinander aufgetragen. Dabei wurden die Messwerte durch den Schnittpunkt Y = 0 gelegt und eine lineare Trendlinie hinzugefügt. Aus den ermittelten Geradengleichungen einer Dreifachbestimmung wurde ein Umrechnungsfaktor von 9,02 determiniert, der zur Umrechnung der in den Mikrodilutionstests ermittelten Werte diente. Messwerte ≤ 0,06 wurden als kein bakterielles Wachstum gewertet, sodass dort die entsprechenden MIC abgelesen werden konnten.

2.7.3 Einzelzellanalyse im mikrofluidischen System

Die Analyse der antibakteriellen Effekte der zu testenden Substanzen auf einzelne Zellen des Bakteriums *C. glutamicum* wurde in Kooperation mit dem Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG) des Forschungszentrums Jülich durchgeführt. Insbesondere Herr Jun.-Prof. Dr.-Ing. Alexander Grünberger wirkte als Mitarbeiter der Arbeitsgruppe "Microscale Bioengineering" von Herrn Prof. Dr. Dietrich Kohlheyer (IBG-1: Biotechnologie) bei der Durchführung der Experimente mit.

Zur Vorbereitung der Experimente wurde autoklaviertes LB-Medium mit Polyethersulfon-Membran-Filtern der Firma VWR (Radnor, Pennsylvania, USA), die eine Porengröße von 0,2 µm aufweisen, steril filtriert. Dies diente der Entfernung in der Messung störender Mikropartikel. Zunächst wurden Übernachtkulturen in 10 mL filtriertem LB-Medium in 100 mL-Erlenmeyerkolben durch Inokulation mit *C. glutamicum*-Zellen einer frischen Agarplatte angesetzt und bei 30 °C und 130 UpM in einem Multitron Standard Inkubationsschüttler (Infors HT) bebrütet. Die Übernachtkulturen wurden verwendet, um Testkulturen in 10 mL filtriertem LB-Medium in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit einer OD_{580 nm} entsprechend von 0,02 bis 0,04 zu inokulieren. Die Testkulturen wurden daraufhin unter den genannten Bedingungen bis zu einer OD_{580 nm} entsprechend von 0,25 bis 0,5 angezogen und für das Inokulieren der Mikrochips verwendet. Die Chips beinhalten Inkubationskammern, in denen Flüssigkulturen im µ-Maßstab durch das Einfangen einzelner Zellen inokuliert werden, sodass dort kleine einschichtige Kolonien anwachsen können. Eine Zufuhr von Nährmedium kann über Kanäle erfolgen, über welche die einzelnen Kammern verbunden sind. Die Mikrochips wurden mit der Zellsuspension solange durchspült, bis in einer Mehrzahl der Kammern einzelne bakterielle Zellen gefangen waren. Die Mikrochip-Herstellung wurde von Herrn Jun.-Prof. Dr.-Ing. Alexander Grünberger nach bestehendem Protokoll durchgeführt (Gruenberger et al., 2013; Grünberger et al., 2012). Anschließend folgte eine Adaptationsphase für die Zellen an den Mikrochip, bei der die C. glutamicum-Zellen mit frischem LB-Medium mit einer Flussrate von 200 nL Min⁻¹ für 3 Stunden bei 30 °C versorgt wurden. In dieser Zeit teilten sich die Zellen ungefähr zweimal. Danach wurden die Zellen den zu testenden Verbindungen Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin ausgesetzt. Die Substanzen wurden dazu in Ethanol (p.a.) gelöst und dem LB-Medium mit einem gesamten Anteil von 3 % in den ausgewählten Konzentrationen zugesetzt. Dementsprechend diente LB-Medium mit 3 % Ethanol (p.a.) als Kontrolle. Die LB-Medien mit den zu testenden Verbindungen wurden an den Mikrochip angeschlossen und die Flussrate für 15 Minuten auf 900 nL Min⁻¹ erhöht, bis das gesamte Medium ausgetauscht war. Daran anschließend wurde der Fluss bis zum Ende des Experiments ausgeschaltet. Zu jeder Versuchsbedingung (Kontrolle, Prodigiosin, N-Myristoyltyrosin, Kombination beider Sekundärmetabolite) wurden mindestens 20 Inkubations-kammern des Mikrochips für 20 h beobachtet. Dabei wurden im Intervall von 10 Minuten Fotos der genannten Kammern mit den sich hier entwickelnden Mikrokolonien aufgenommen. Nach Beendigung des Experiments wurden die Größen der Kolonien mit Hilfe des Programms "ImageJ-win64" ausgemessen. Dabei wurde die Koloniegröße durch die Umrandung der gesamten Kolonie bestimmt. Die so gewonnenen Daten repräsentieren daher die gesamte Fläche der Kolonie inklusive kleiner zwischen den Zellen liegender Hohlräume. Des Weiteren wurden Videos der Kolonie-entwicklung mittels eines "Zeitraffer-Werkzeugs" aus den Bilddaten generiert.

2.8 Herkunft der untersuchten bioaktiven Substanzen

Prodigiosin: Die hier verwendete Prodigiosin-Charge wurde nach bestehendem Protokoll (Domröse *et al.*, 2015) von Dr. Andreas Domröse [Institut für Molekulare Enzymtechnologie (IMET), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHUD)], Dr. Andreas Sebastian Klein, Hannah Ursula Clara Braß und David Paul Klebl [Institut für Bioorganische Chemie (IBOC), HHUD] hergestellt. Dazu wurde der bakterielle Stamm *P. putida* pig-r2, welcher die für die Prodigiosinsynthese relevanten Biosynthesegene (*pig*) aus *S. marcescens* trägt, zur heterologen Produktion der Verbindung

eingesetzt (Domröse *et al.*, 2015). Die Kultivierung erfolgte in TB-Medium bei 25 °C. Das produzierte Prodigiosin wurde mit Hilfe von Polyurethan (PU)-Würfeln, welche der Bakterienkultur zur Inkubation beigefügt wurden, absorbiert. Anschließend wurde das Prodigiosin über eine Soxhlet-Extraktion mit Diethylether aus den PU-Würfeln extrahiert. Das gewonnene Extrakt wurde zweifach mittels einer Säulenchromatographie (Flash-Chromatographie) gereinigt. Die mobile Phase bestand aus Dichlormethan und Methanol, wobei ein Gradient von 0-1 % (*v/v*) verwendet wurde. Silica Gel 60 mit einer Partikelgröße von 0,040-0,063 mm (230-240 *mesh*) diente als stationäre Phase. Damit wurde eine Ausbeute von 65 mg Prodigiosin pro 1 Liter Kultur erzielt. Anhand einer spektrophotometrischen Messung unter Verwendung des zuvor festgelegten Extinktionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 535$ nm (Domröse *et al.*, 2015), konnte eine Reinheit der erhaltenen Prodigiosin-Charge von 97 % bestimmt werden. Darüber hinaus wurde zur Verifizierung der monoisotopischen Masse eine hochauflösende Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie (FTICR-ESI-MS) von Kooperationspartnern [Zentral-institut für Engineering, Elektronik und Analytik (ZEA-3), Frau Dr. Beatrix Santiago-Schübel, Forschungszentrum Jülich] durchgeführt (Abbildung 12). Die hier beschriebene Prodigiosin-Charge wurde in den Experimenten der Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 eingesetzt.









Die mittels heterologer Biosynthese in *P. putida* gewonnene Prodigiosin-Charge wurde mittels Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie analysiert. Dazu wurde das gereinigte Prodigiosin in H₂O/Acetonitril/Ameisensäure in einem Verhältnis von (50/50/0,1 %) gelöst und im Positivmodus gemessen. Gezeigt ist das Masse-zu-Ladungsverhältnis des Protonaddukts (M+H⁺)⁺ der Verbindung Prodigiosin. Die Abweichung der gemessenen Masse zu der exakten, erwarteten Masse des Protonaddukts bezogen auf die monoisotopische Masse ist in ppm aufgeführt. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018. **Prodigiosin-Derivate:** Es wurden sieben verschiedene Derivate des bakteriellen Sekundärmetabolits Prodigiosin von Dr. Andreas Sebastian Klein, Hannah Ursula Clara Braß und David Paul Klebl (Mitarbeiter des IBOC von Prof. Dr. Jörg Pietruszka, HHUD) freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Prodigiosin-Derivate.	
in dieser Arbeit verwendete Kennzeichnung	Synthesename
A: Prodigiosin Hydrochlorid	Prodigiosin Hydrochlorid
B: Prodigiosin-Derivat B	Prodiginin SNY_024_01
C: Prodigiosin-Derivat C	Prodiginin_MS036
D: Prodigiosin-Derivat D	DKL_3.3_P_2
E: Prodigiosin-Derivat E	Prodiginin SNY_028_01
F: Prodigiosin-Derivat F	Prodiginin SNY_021_01
G: Prodigiosin-Derivat G	Prodiginin SNY_022_01
H: Prodigiosin-Derivat H	Prodiginin_015_P.6_01

Die Herstellung der hier eingesetzten Prodigiosin-Derivate erfolgte zum einen mittels des Prinzips der Mutasynthese (Klein *et al.*, 2018, 2017): Dazu wurden Pyrrol-Vorstufen-Verbindungen chemisch via der *Trofimov*-Reaktion synthetisiert und als Mutasynthone verwendet. Der bakterielle Stamm *P. putida* pig-r2 $\Delta pigD$ (Klein *et al.*, 2017) wurde als genetisch veränderter Mikroorganismus, welcher den relevanten Teil des Prodigiosinbiosynthesewegs besitzt, eingesetzt. Zum anderen wurden einige Prodigiosin-Derivate mittels eines biokatalytischen Ansatzes, bei dem diverse homologe PigC-Enzyme verwendet wurden, hergestellt (Brass *et al.*, 2019).

Serrawettin W1: Das Biotensid Serrawettin W1 wurde von Dr. Stephan Thies (IMET, Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger, HHUD) mittels heterologer Expression in *Pseudomonas putida* KT2440 nach bestehendem Protokoll produziert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Thies *et al.*, 2014). Dazu wurde der Vektor pVLT-SwrW (Thies *et al.*, 2014), welcher das Gen *swrW* des Bakteriums *S. marcescens* beinhaltet, in *P. putida* eingebracht. Es wurden mehrere Kulturen von den mit dem Plasmid transformierten *P. putida*-Zellen in LB-Medium inokuliert und bei 30 °C angezogen. Mit dem Erreichen einer OD_{580 nm} entsprechend von 0,5 wurden die verschiedenen Expressionskulturen mit 0,4 mM IPTG induziert. Zusätzlich wurden PU-Würfel zur Absorption des Produkts hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 18 h wurden die Würfel aus den Kulturen entnommen und diese mit Wasser ausgewaschen. Danach wurden die PU-Würfel jeder Kultur mit Ethanol gewaschen, um das angeheftete Produkt zu extrahieren, und die jeweils gewonnenen Extrakte getrocknet. Diese

wurden wieder gelöst und mittels Ethylacetat und Wasser extrahiert, um polare Verbindungen zu entfernen und Serrawettin W1 zu reinigen. Alle Ethylacetat-Extrakte wurden zusammengefügt und ein weiteres Mal getrocknet, woraus sich ein gelblich-weißer Rohextrakt von Serrawettin W1 ergab. Die Ausbeute lag bei 33,7 mg pro 100 mL Kultur. Parallel zu den Expressionskulturen wurde als Kontrolle ein Extrakt aus einem *P. putida*-Stamm, welcher den pVLT33-Vektor enthielt, generiert. Auf diesem Vektor basiert das zur Produktion von Serrawettin W1 verwendete Expressionsplasmid. Das daraus analog hergestellte Extrakt ergab 1 mg pro 100 mL Kultur, womit die Menge 3 % des Gewichts des Serrawettin W1-Extrakts entsprach. Dies lässt darauf schließen, dass das Serrawettin W1-Rohextrakt eine Reinheit von 97 % besaß. Beim Ansetzen des Agardiffusionstests mit dem pVLT33-Kontroll-Extrakt und Prodigiosin wurde die Menge pLVT33-Extrakt eingesetzt, welche rechnerisch in der jeweils eingesetzten Menge des Serrawettin W1-Extrakt vorliegen sollte. Zusätzlich wurde zur Verifizierung der monoisotopischen Masse und Überprüfung der Kongener-Zusammensetzung eine HPLC-ESI-MS-Analyse der Serrawettin W1-Charge am ZEA-3 durchgeführt (Abbildung 13).



Abbildung 13: Analyse der verwendeten Charge von Serrawettin W1.

Serrawettin W1 wurde durch die heterologe Produktion in *P. putida* hergestellt und mittels HPLC-ESI-MS-Messungen analysiert. Das Rohextrakt der Kulturen wurde in der Analyse eingesetzt. Es konnten die Protonaddukte verschiedener Serrawettin-Spezies detektiert werden. Dabei handelt es sich um Kongenere mit unterschiedlichen Fettsäuren, welche in der Länge und dem Sättigungsgrad variieren. Die detektierten Signale sind als übereinander gelegte extrahierte lonenchromatogramme (EIC) mit der dazugehörigen Dalton-Angabe dargestellt. Die einzelnen Maxima entsprechen dabei Verbindungen mit folgenden m/z-Verhältnissen und Aufbau: m/z 547: C10+C11+H₂O (rot), m/z 515: C10+C10 (grün), m/z 573: C10+C13+H₂O (blau), m/z 575: C10+C13+H₂O (violett), m/z 541: C10+C12:1 (pink) und m/z 543: C10+C12 (türkis). Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Synthetische Tenside: Die verwendeten synthetischen Tenside Triton X-100, Tween 20 und SDS wurden von der Firma Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.
Rhamnolipide: Die aus *P. aeruginosa* stammenden Rhamnolipide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) in einer angegebenen Reinheit von 90 % bezogen. Das Produkt stellt ein Gemisch aus Mono- und Di-Rhamnolipiden dar.

N-Myristoyltyrosin: Das Biotensid *N*-Myristoyltyrosin wurde von Alexandra Schmidt-Thaler, einer ehemaligen Mitarbeiterin des Instituts für Bioorganische Chemie (IBOC von Prof. Dr. Jörg Pietruszka, HHUD), entsprechend dem bestehenden Protokoll nach Aha chemisch synthetisiert (Aha, 1999; Thies *et al.*, 2016). Die hier verwendete *N*-Myristoyltyrosin-Charge wurde ebenfalls mittels FTICR-ESI-MS am ZEA-3 analysiert (Abbildung 14).



Abbildung 14: Analyse der verwendeten Charge von N-Myristoyltyrosin.

Die chemisch synthetisierte *N*-Myristoyltyrosin-Charge wurde in H₂O/Acetonitril/Ameisensäure in einem Verhältnis von (50/50/0,1 %) gelöst und mittels einer FTICR-ESI-MS-Messung im Positivmodus analysiert. Die monoisotopische Masse von *N*-Myristoyltyrosin ist über der Graphik angegeben. Abweichungen von den gemessenen monoisotopischen Massen der verschiedenen Addukte zu der monoisotopischen Masse von *N*-Myristoyltyrosin sind in ppm aufgeführt. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Triterpene: Die verwendeten Triterpene Oleanolsäure und Ursolsäure wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) mit einer Reinheit von $\ge 90\%$ für Ursolsäure beziehungsweise $\ge 97\%$ im Fall von Oleanolsäure bezogen.

Mannosylerythritollipide: Die nachfolgend beschriebenen, in dieser Arbeit verwendeten Extrakte wurden von Peter Stoffels aus der Arbeitsgruppe von Dr. Kerstin Schipper, welche dem Institut für Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Feldbrügge der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf angehört erzeugt und freundlicherweise bereitgestellt. Der U. maydis Wildtyp UMa1160 stellt sowohl Ustilaginsäure als auch Mannosylerythritollipide (MEL) natürlicherweise her. Im Zuge dieser Arbeit lag der Fokus auf den MEL, weshalb die nachfolgend genannten Mutanten eingesetzt wurden. Es wurden Rohextrakte von den U. maydis-Mutanten UMa1855 und UMa2112 generiert. In dem Stamm UMa1855 ist das Gen rua1 funktional deletiert, weshalb dieser Stamm nur MEL produzieren kann (Teichmann et al., 2010). Bei dem Stamm UMa2112 sind die Gene rua1 und cyp1 funktional deletiert, wodurch dieser Stamm weder MEL noch Ustilaginsäure produzieren kann (Hewald et al., 2005). Dieser Stamm, in dem keine oberflächenaktiven Produkte erwartet werden, diente als Negativkontrolle. Der durch Extraktion gewonnene Rohextrakt dieses Stammes sollte demnach andere U. maydis-Bestandteile als MEL oder Ustilaginsäure enthalten. Die Kultivierung erfolgte in 20 mL 5 % Glc-YNB-Medium (1,7 % w/v von Yeast Nitrogen Base - without Amino Acids and Ammonium Sulfate) von BD Difco. Die Kulturen wurden mit einer Anfangszelldichte von 0,05 bei 600 nm in 100 mL-Schikanekolben inokuliert. Die Inkubationszeit betrug 3 Tage bei 28 °C und 200 UpM mit einem shaking diameter von 50 mm. Danach erfolgte die Ernte der Vollkulturen, welche anschließend zur Extraktion mit 1 Volumen Ethylacetat für 20 Minuten geschüttelt wurden (Vibrax). Daraufhin wurden die Extrakte für 10 Minuten bei 44641 xg zentrifugiert, sodass anschließend die obere Phase abgenommen werden konnte. Diese wurde verdampft und die jeweils gewonnenen Rohextrakte gewogen. Die Pellets wurden in MeOH aufgenommen und alle Ansätze gleicher Kulturen vereint, sodass die jeweiligen Ausbeuten aus einem gesamten theoretischen Kulturvolumen von 200 mL gewonnen wurden. Für die Negativkontrolle (UMa2112) konnte auf diesem Weg ein Extrakt von 52 mg pro 200 mL Kultur gewonnen werden. Mittels der rua1-Deletionsmutante (Stamm UMa1855) konnten 60 mg pro 200 mL Extrakt gewonnen werden. Da es sich bei den generierten Extrakten um Rohextrakte handelte, ist davon auszugehen, dass bei dem UMa1855-Extrakt Verunreinigungen mit U. maydis-Bestandteilen vorlagen. Genaue Angaben zu der Reinheit der Extrakte sind nicht bekannt. Jedoch kann das Rohextrakt der Doppeldeletionsmutante UMa2112, wie eben beschrieben, als Verunreinigung betrachtet werden. Wird also die Menge des UMa2112-Extrakts (52 mg) von dem UMa1855-Extrakt (60 mg) subtrahiert, ergibt sich eine theoretische Menge an reinen MEL, welche produziert wurde. Die Menge des MEL-Extrakts des Stammes UMa1855 liegt nach der Subtraktion bei 8 mg pro 200 mL Kultur. Damit kann rechnerisch eine Reinheit von 13 % für das MEL-Rohextrakt determiniert werden. Bezogen auf die im Agardiffusionstest eingesetzten Mengen des Rohextrakts bedeutet dies, dass eine Einwaage von 50 μg MEL-Rohextrakt theoretisch 6,5 μg reine MEL enthält. Bei 25 μg Einwaage sind es dementsprechend 3,25 µg und bei 10 µg Rohextrakt 1,3 µg reine MEL.

2.9 Heterologe Triterpenproduktion in *R. capsulatus*

Um Triterpene mittels biotechnologischer rekombinanter Produktion zugänglich zu machen, wurde der bakterielle Expressionswirt *R. capsulatus* verwendet. Die Detektion der heterologen Triterpenproduktion erfolgte mittels LC-MS- und LC-MS/MS-Analysen in Kooperation mit Dr. Sabine Metzger, Dr. Vera Wewer und Felix Buechel der Biocenter MS Plattform der Universität zu Köln. Die Anzuchtsund Expressionsbedingungen der Kulturen sowie die Extraktion der Triterpenprodukte aus den Kulturen und die anschließende Analyse sind nachfolgend beschrieben.

2.9.1 Mikroaerobe Anzucht von *R. capsulatus* zur heterologen Expression pflanzlicher Triterpenbiosynthesegene

Zur heterologen Produktion von Triterpenen in *R. capsulatus* wurden sogenannte mikroaerobe Kultivierungsbedingungen verwendet. Bei diesen findet die Kultivierung unter nicht-phototrophen Bedingungen im Dunkeln und mit einem mäßigen Sauerstoffeintrag statt. Die Notwendigkeit der gewählten Kultivierungsart liegt zum einen in den exprimierten Enzymen und zum anderen in den verwendeten *R. capsulatus*-Stämmen begründet. So benötigt die Squalenepoxidase zur Epoxidierung von Squalen zu 2,3-Oxidosqualen Sauerstoff. Der unter anderem verwendete *R. capsulatus*-Stamm SB1003- Δ crt*E* ist defizient in der intrinsischen Carotinoidbiosynthese und kann daher nur unter Ausschluss von Licht, also unter nicht-phototrophen Bedingungen, kultiviert werden.

Für die heterologe Triterpenbiosynthese wurden die Stämme SB1003 (Strnad et al., 2010), SB1003-MVA (Troost et al., 2019) und SB1003- Δ crtE (Troost, 2017) verwendet. Für die Anzucht der Bakterien auf Festmedium dienten aus PY-Medium und 2 % (w/v) Select Agar (SELECT AGAR Qualified for Molecular Genetics Applications, Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA) bestehende PY-Agarplatten (vgl. Tabelle 6). Entsprechend der Stämme wurden Antibiotika in folgenden Konzentrationen zugesetzt: SB1003: 25 μg mL⁻¹ Rifampicin, SB1003-MVA: 25 μg mL⁻¹ Rifampicin und 4 μ g mL⁻¹ Gentamicin, SB1003- Δ crtE: 25 μ g mL⁻¹ Rifampicin und 10 μ g mL⁻¹ Spectinomycin (vgl. Kapitel 2.2). Die Stämme SB1003 und SB1003-MVA wurden bei 30 °C in Anaerob-Inkubationskammern unter Glühbirnenlicht für 2-3 Tage angezogen. Der Stamm SB1003-Δ*crtE* wurde, wie bereits erwähnt, aufgrund seiner Deletion im intrinsischen Carotinoidbiosyntheseweg unter aeroben Bedingungen bei 30 °C für 2-3 Tage im Dunkeln angezogen. Die auf diese Weise frisch angezogenen *R. capsulatus*-Zellen wurden für die Konjugation der pRhon5Hi-2-basierten Expressionsplasmide, welche die entsprechenden Triterpenbiosynthesegene tragen, verwendet (vgl. Kapitel 2.6.1.3). Dazu wurden zuvor E. coli S17-1 mit der genannten Plasmid-DNA transformiert (vgl. Kapitel 2.6.1.2). Die erhaltenen Exkonjugate wurden unabhängig von dem verwendeten *R. capsulatus*-Stamm auf PY-Agarplatten mit 25 µg mL⁻¹ Kanamycin und 25 µg mL⁻¹ Rifampicin

inkubiert. Anschließend wurden die Exkonjugate drei weitere Male überstrichen, um mögliche E. coli-Rückstände aus der Konjugation zu eliminieren. Die Inkubationen erfolgten entsprechend des jeweiligen Stammes aerob oder anaerob bei 30 °C. Die letzten Ausstriche wurden unabhängig von den Stämmen unter aeroben Bedingungen angezogen, um die Bakterien an die nachfolgenden mikroaeroben Kultivierungsbedingungen zu adaptieren. Von den frischen Exkonjugaten wurde je Kultur eine Impföse, ungefähr entsprechend einem Volumen von 50-100 µL, der R. capsulatus-Zellen aus dem Einzelzellbereich verwendet, um die Vorkulturen zu inokulieren. Diese wurden mit einem Volumen von 35 mL RCV-Medium mit 0,1 % Ammonium als Stickstoffquelle in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen bei 30 °C und 130 UpM für 48 h angezogen. Das vorhandene Ammonium sorgt für die Repression des Pnif-Promoters, welcher in den verwendeten Expressionsplasmiden den Triterpengenen vorgeschaltet ist (vgl. Kapitel 2.3). Die anschließende Kultivierung zur Expression der Plasmid-basierten heterologen Triterpengene erfolgte unter nichtphototrophen mikroaeroben Bedingungen. Dazu wurden Expressionskulturen mit einem Kulturvolumen von 60 % des Gesamtvolumens des Kolbens angesetzt. Das RCV-Medium wurde mit 0,1 % Serin versetzt, welches als alleinige Stickstoffquelle diente. Die Vorkulturen wurden zum Inokulieren der Expressionskulturen mit einer Start OD_{660 nm} entsprechend 0,05 verwendet. Die gewählten nicht-phototrophen, mikroaeroben Bedingungen sind ausreichend, um für eine Induktion der Bildung der intrazellulären Membran zu sorgen, wie unter anderem die aktivierte intrinsische Carotinoidproduktion belegt (Troost, 2017). Des Weiteren führt die Abwesenheit von Ammonium durch die alternative Stickstoffquelle Serin sowie die mikroaeroben Bedingungen zur Aktivierung des Pnif-Promotors und damit zur Expression der Zielproteine. Die Inkubationszeit der Expressionskulturen betrug ungefähr 2 Tage (45-52 h) im Dunkeln unter permanentem Schütteln (130 UpM) in einem Multitron Standard Inkubationsschüttler (Infors HT) bei 30 °C. Genaue Angaben der Inkubationszeit der Expressionskulturen in Stunden sind an den entsprechenden Stellen im Ergebnisteil genannt. Anschließend erfolgte die Ernte der Zellpellets entsprechend einer optischen Dichte bei einer Wellenlänge von λ = 660 nm von 15 mittels Zentrifugation (10 Minuten, 1780 xg, 4 °C). Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.9.2 Untersuchung physiologischer Parameter

Während der heterologen Expression von Triterpenbiosynthesegenen im Wirt *R. capsulatus* wurden folgende physiologische Parameter untersucht: (i) das Wachstumsverhalten, (ii) das Produktionslevel von intrinsischen Carotinoiden und (iii) die Effekte der Produkte auf dessen Zelltrockengewicht.

Material und Methoden

2.9.2.1 Wachstum und Pigmentierung

Um das Wachstum sowie die Pigmentbildung von *R. capsulatus* während der heterologen Expression der Triterpengene zu überprüfen, wurden sowohl Wachstumskurven der Expressionskulturen als auch Absorptionsspektren der Zellen aufgenommen. Für die Aufnahme der Wachstumskurven wurde die optische Dichte jeder Kultur bei 660 nm mit dem GENESYSTM 10S UV-Vis-269 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific GmbH Waltham, Massachusetts, USA) alle 8 bzw. 16 h aufgenommen. Parallel wurden zu diesen Zeitpunkten Ganzzellspektren von Zellen unter Verwendung von je 1 mL der entsprechenden Kultur mit dem genannten Gerät im Bereich von 300-900 nm mit 1 nm-Intervallen aufgezeichnet. Die Spektren wurden nachträglich auf eine OD_{660 nm} von 1 rechnerisch genormt. Zur Vermeidung von Messstörungen aufgrund des bei der Kultivierung eingesetzten Rifampicin wurden die Zellen vor der Durchführung der Spektralmessung gewaschen. Dazu wurden die entnommenen Proben der Expressionskulturen zentrifugiert, der Überstand mit dem enthaltenen Rifampicin verworfen und das Pellet erneut in gleicher Menge Wasser (= 1 mL) aufgenommen. Die gemessenen Spektren wurden entsprechend der Zelldichte normiert und die Carotinoid-spezifischen Daten bei der Wellenlänge $\lambda = 500$ nm für die Auswertung extrahiert.

2.9.2.2 Bestimmung des Zelltrockengewichts

Zur Bestimmung des Zelltrockengewichts wurden fünf verschiedene mikroaerob wachsende Expressionskulturen von R. capsulatus SB1003 verwendet. Dazu zählten Kulturen der Stämme SB1003-pRhon5Hi-2, SB1003-pRhon5Hi-2-SQS, SB1003-pRhon5Hi-2-SQS-SQE, SB1003-pRhon5Hi-2-CAS1-SQS-SQE und SB1003-pRhon5Hi-2-LUP1-SQS1-SQE1. Die Inkubation erfolgte in RCV-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika-Zusatz und Serin. Bei einer Wellenlänge von λ = 660 nm wurden die optischen Dichten gemessen. Aus jeder Kultur wurden zweimal sechs Zellpellet-Proben mit eingestellten optischen Dichten von OD_{660 nm} 0,5 bis 3 in 0,5er-Schritten per Zentrifugation geerntet. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellpellets im Reaktionsgefäß in einer Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf) für 1 h bei 30 °C und der Programmeinstellung "wässrige Lösungen" getrocknet. Jedes Reaktionsgefäß wurde zuvor zweimal leer und anschließend zweimal mit dem getrockneten Pellet mittels einer Feinwaage gewogen. Die jeweiligen gleichen Messungen wurden gemittelt und die Gewichte der Reaktionsgefäße mit den Zellpellets von den entsprechenden Leergewichten subtrahiert. Daraus ergab sich für jede Kultur eine Reihe aus sechs ermittelten Pellet-Gewichten entsprechend der jeweilig geernteten Zellmasse. Die Gewichte der Zellpellets aller Kulturen wurden gemittelt und genutzt, um eine Eichgerade zur Korrelation zwischen der eingestellten optischen Dichte und dem dazu gehörigen Zelltrockengewicht (engl.: dry cell weight; DCW) zu generieren (Abbildung 15).



Abbildung 15: Korrelation zwischen Zelltrockengewichten und optischen Dichten in *R. capsulatus*-Expressionskulturen. Zur Ermittlung der Zelltrockengewichte spezifischer optischer Dichten von *R. capsulatus*-SB1003-Expressionskulturen wurden fünf verschiedene bakterielle Stämme (SB1003-pRhon5Hi-2, SB1003-pRhon5Hi-2-SQS, SB1003-pRhon5Hi-2-SQS, SB1003-pRhon5Hi-2-SQS-SQE, SB1003-pRhon5Hi-2-CAS1-SQS-SQE und SB1003-pRhon5Hi-2-LUP1-SQS1-SQE1) eingesetzt. Von jedem Stamm wurde eine Expressionskultur mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz in RCV-Medium mit Serin angezogen. Nach der Inkubation entsprechend dem Protokoll einer mikroaeroben Anzucht wurden aus jedem Kolben Zellpellets mit einer definierten optischen Dichte (OD_{660 nm} von 0,5 bis 3) geerntet. Diese wurden getrocknet und die Trockengewichte mittels einer Feinwaage bestimmt. Die gemessenen Gewichte der Zellpellets wurden gegen die jeweilige eingestellte optische Dichte aufgetragen. Hier ist eine repräsentative Eichgerade aus einer Mehrfachbestimmung gezeigt.

Es wurde ein Umrechnungsfaktor von 0,5821 determiniert. Damit entspricht 1 mL $OD_{660 nm}$ = 1 einem Zelltrockengewicht von rund 0,58 mg. Um einen Einfluss des Trocknungsprozesses auf das Gewicht der Reaktionsgefäße auszuschließen, wurden drei leere Reaktionsgefäße auf die gleiche Weise behandelt. Hierbei konnten keine Gewichtsunterschiede festgestellt werden.

2.9.3 Extraktions- und Detektionsverfahren

2.9.3.1 Extraktion

Die Extraktion der heterolog produzierten Terpene zur LC-MS- bzw. LC-MS/MS-Analyse erfolgte aus zuvor bei -20 °C gelagerten *R. capsulatus*-Zellpellets der Größe entsprechend einer OD_{660 nm} von 15. Die eingesetzten organischen Lösungsmittel (Aceton, *n*-Hexan und ein Chloroform-Methanol-Gemisch) wurden mit 0,05 % (*w*/*v*) des Antioxidans Butylhydroxytoluol (BHT) versetzt. Als Erstes wurden je Probe 10 nmol β -Sitosterol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), welches in einem Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1) gelöst war, als interner Standard hinzugefügt. Zum Aufschluss der Zellen wurden daraufhin nacheinander zweimal 0,7 mL Aceton pro OD_{660 nm} 15 verwendet. Zur Verbesserung der Effektivität des Aufschlusses wurden die Zellpellets für 15 Minuten bei 50 °C und 600 UpM in einem Kühl- und Heiz-Thermoschüttler MKR 23 (ehemals "HLC by DITABIS") inkubiert.

Während dieser Zeit wurden die Proben 1-2-mal mit Hilfe eines Vortexers (Reagenzglasschüttlers) durchmischt. Durch anschließendes Zentrifugieren (3 Minuten, 1780 xg) bei Raumtemperatur (22 °C) wurden die Zelltrümmer entfernt. Der Aceton-Überstand beider Aufschlüsse wurde in ein neues Falcon überführt und mit 1,5 mL 1 M NaCl-Lösung durch 3 Sekunden Vortexen vermischt. Danach wurden die Proben ebenfalls zweimal mit *n*-Hexan mit einem gesamten Volumen von 1,8 mL durch 30 Sekunden Vortexen ausgeschüttelt (Extraktion I: 1,2 mL und Extraktion II: 0,6 mL). Durch eine 1-minütige Zentrifugation bei 22 °C und 1780 xg erfolgte die Phasentrennung. Die obere *n*-Hexan-Phase wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 20 - 60 Minuten in einer Vakuumzentrifuge bei 30 °C getrocknet. Anschließend wurden die trockenen Extrakte in 150 µL eines Chloroform-Methanol-Gemischs (2:1) aufgenommen und in entsprechende HPLC-Glasfläschchen überführt. Bis zur Messung wurden die verschlossenen Proben bei -20 °C gelagert.

2.9.3.2 LC-MS- und LC-MS/MS-Analyse

Die LC-MS- und LC-MS/MS-Analysen inklusive der Auswertungen wurden von Dr. Sabine Metzger, Dr. Vera Wewer und Felix Buechel der MS Plattform der Universität zu Köln durchgeführt.

Die in Chloroform-Methanol (2:1) gelösten R. capsulatus-Extrakte wurden für die LC-MS-Analysen 1:100 bzw. 1:50 mit 0,05 % (w/v) BHT enthaltendem Methanol verdünnt. Von jeder Probe wurden 10 µL für die Messung mit einem Dionex HPG 3200 HPLC System (Thermo Fisher Scientific GmbH Waltham, Massachusetts, USA) injiziert. Die Trennung erfolgte über eine 150 x 2,1 mm, 2,7 µm, Cortecs C8-Säule (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) mittels eines binären Gradienten mit zwei mobilen Phasen. Die mobile Phase A setzte sich aus Wasser und 0,1 % Formalinsäure (Ameisensäure) zusammen. Bei der mobilen Phase B handelte es sich um ein Gemisch aus Methanol und 0,1 % Formalinsäure. Der Gradient der mobilen Phase verlief wie folgt: Gestartet wurde mit dem Verhältnis 25 % mobile Phase A zu 75 % mobile Phase B. Letztere wurde innerhalb von 4 Minuten auf 85 % erhöht. Nach 13,5 Minuten erreichte die mobile Phase B 100 %. Diese Bedingung wurde für 4,5 Minuten gehalten. Danach wurde innerhalb von 3 Minuten die Startbedingung wiederhergestellt. Während der gesamten Laufzeit wurde eine Flussrate von 0,5 mL Min⁻¹ eingestellt. Die Analyse der Triterpene erfolgte sowohl mittels Q-TOF-MS (engl.: quadrupole-time-of-flight) als auch mittels einer zusätzlichen MS/MS-Analyse auf einem maXis 4G Instrument (Bruker Daltonics; Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts, USA). Bei der hier verwendeten Ionisierungsquelle handelte es sich um eine Elektrospray-Ionisation (ESI). Das Gerät wurde im Positivmodus betrieben, wobei die Betriebsbedingungen wie folgt waren: dry gas: 8,0 L Min⁻¹ (Stickstoff), dry heater: 220 °C, nebulizer pressure: 1,8 bar, capillary voltage: 4500 V. Zur zusätzlichen Aufzeichnung der MS/MS-Spektren wurden die [M+H]⁺-Ionen der Triterpene für die

Fragmentierung mit 20 eV ausgewählt. Die Quantifizierung der produzierten Triterpene erfolgte mittels zuvor aufgenommener Kalibrierungskurven der zu erwartenden Produkte Squalen, 2,3-Oxidosqualen, Lupeol und Cycloartenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Als interner Standard wurde β-Sitosterol (Sigma-Aldrich) verwendet. Die erhaltenen Triterpenmengen wurden als Titer in mg L⁻¹ und als spezifische Ausbeute in mg gDCW⁻¹ angegeben. Dabei sind alle angegebenen Werte Endpunktbestimmungen, welche nach einer Inkubation der *R. capsulatus*-Expressionskulturen von 2 Tagen determiniert wurden.

3 Ergebnisse und Diskussion

Durch antibiotikaresistente Humanpathogene hervorgerufene bakterielle Infektionen stellen heutzutage ein globales lebensbedrohliches Gesundheitsproblem dar (Antão *et al.*, 2018; Brooks & Brooks, 2014; Morehead & Scarbrough, 2018). Dieses verschärft sich sowohl durch den Rückgang neu entdeckter beziehungsweise entwickelter Antibiotika als auch einer stetigen und schnellen Entwicklung sowie Verbreitung weiterer Resistenzen bei Bakterien (Brooks & Brooks, 2014; Coates *et al.*, 2011; Fernandes & Martens, 2017; Podolsky, 2018; Ventola, 2015). Schlussendlich steigt die Relevanz alternativer wirksamer Behandlungsmöglichkeiten kontinuierlich, wobei kombinierte antimikrobielle Therapien eine vielversprechende Strategie sind (Brooks & Brooks, 2014; Cottarel & Wierzbowski, 2007; Ejim *et al.*, 2011; Tyers & Wright, 2019). Dabei gibt es eine Reihe verschiedener Arten von Kombinationen aus Antibiotika und diversen Komponenten. Einen Typ bilden kombinierte Applikationen eines Antibiotikums (Antibiotikum-Komponente) mit natürlichen, biologischen Wirkverstärkern (Wirkverstärker-Komponente), wie Tensiden oder pflanzlichen Naturstoffen (Brooks & Brooks, 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern Inspirationen bezüglich effektiver antibakterieller Substanzkombinationen aus der Natur gewonnen werden können. Als Ausgangspunkt wurde dazu die Stoffkombination der zwei aus dem Bodenbakterium *Serratia marcescens* stammenden Sekundärmetabolite Prodigiosin und Serrawettin W1 betrachtet. Dementsprechend wurde zunächst die genannte natürliche Sekundärmetabolit-Kombination evaluiert. Anschließend wurden davon abgeleitete neue Kombinationen mit Substanzen derselben Stoffklassen untersucht. Mit Serrawettin W1 gehört eine Komponente der Kombination zu der Substanzklasse der Tenside, weshalb diese entsprechend der eben genannten Erläuterung als Wirkverstärker-Komponente definiert wird. Das hydrophobe, antibakterielle Pigment Prodigiosin stellt die Antibiotikum-Komponente dar. Die Ableitung analoger Kombinationen wird durch den Austausch von Serrawettin W1 mit bekannten Tensiden erreicht. Eine Vielfalt der Antibiotikum-Komponente wird durch die Derivatisierung der Kandidaten-Verbindung Prodigiosin erhalten.

Abgesehen von bakteriellen Naturstoffen bieten pflanzliche Substanzen eine reiche Quelle an bioaktiven Stoffen, welche für den therapeutischen Gebrauch verwendet werden können (Compean & Ynalvez, 2014; Gokhale & Wadhwani, 2015; Jäger *et al.*, 2009). Eine große Gruppe pflanzlicher Sekundärmetabolite sind die Triterpene, deren Vertretern, wie der Oleanol-, der Betulin- und der Ursolsäure selbst, aber auch davon abgeleiteten Derivaten, bereits diverse pharmazeutisch relevante Bioaktivitäten, mitunter antibakterielle Eigenschaften, zugeschrieben wurden (Chung, 2019; Jesus *et al.*, 2015). Einige Triterpene fungierten des Weiteren als Verstärker antimikrobieller Wirkungen in allerlei Stoffkombinationen mit kommerziellen Antibiotika (Zacchino *et al.*, 2017). Daher werden als Repräsentanten pflanzlicher Sekundärmetabolite ausgewählte Triterpene ebenfalls in die

Untersuchung kombinatorischer antibakterieller Effekte aufgenommen. Dies führt zu dem zweiten Aspekt der Arbeit. Zur Untersuchung der Bioaktivitäten von Naturstoffen ist es notwendig, dass ausreichende Mengen der jeweiligen Verbindungen vorliegen. Neben der Extraktion von Sekundärmetaboliten aus Ursprungsorganismen, wie beispielsweise langsam wachsenden Pflanzen, stellt der biotechnologische Prozess der heterologen Produktion von Naturstoffen in Mikroorganismen einen alternativen und gängigen Lösungsansatz zur erleichterten Gewinnung von diesen Substanzen dar (Marienhagen & Bott, 2013; Moser & Pichler, 2019). Während die heterologe Terpenproduktion in Mikroorganismen in den letzten Jahren vor allem mit eukaryotischen Wirten, wie der Hefe, intensiv erforscht wurde, sind prokaryotische Wirte aufgrund verschiedener Vorzüge ebenfalls von Interesse (Moser & Pichler, 2019; Schempp *et al.*, 2018). Aus diesem Grund wird im zweiten Kapitel der Arbeit ein biotechnologischer Ansatz zur Erschließung der Stoffklasse der Triterpene mittels der heterologen Produktion in dem phototrophen, prokaryotischen Wirt *Rhodobacter capsulatus* untersucht, um diese beispielsweise für antimikrobielle Tests zugänglicher zu machen.

Demnach gliedert sich die Arbeit in die folgenden zwei Ergebniskapitel: (i) die Untersuchung der kombinatorischen Wirkung antibakterieller Sekundärmetabolite und (ii) die Erschließung weiterer Sekundärmetabolite durch die Erstellung einer alternativen Plattform für die heterologe Produktion von Triterpenen. Im Rahmen jedes Kapitels werden die vorliegenden Ergebnisse spezifisch diskutiert. Anschließend folgt eine übergeordnete, abschließende Diskussion im dritten Kapitel.

Kapitel I

Kombinatorische Wirkungen antibakterieller Sekundärmetabolite

3.1 Kapitel I

Ein inspirativer Ansatz zum Finden wertvoller neuer antibakteriell wirkender Substanzkombinationen bietet das Kopieren natürlicher Stoffkombinationen, wie sie mannigfaltig in der Natur vorkommen. Verschiedenste Organismen, wie etwa Bakterien, Pilze aber auch Pflanzen, produzieren eine Vielfalt an bioaktiven Sekundärmetaboliten (Demain & Fang, 2000; Osbourn & Lanzotti, 2009). So werden beispielsweise das hydrophobe, antibakterielle Pigment Prodigiosin und das Tensid Serrawettin W1 von dem Bakterium *S. marcescens* produziert (Matsuyama *et al.*, 2011, 1985; Tanikawa *et al.*, 2006). Eine gemeinsam regulierte Koproduktion dieser Sekundärmetabolite, welche im gleichen Maß von Faktoren wie beispielsweise der Temperatur, dem Medium, der Wachstumsphase und auf molekularer Ebene von gleichen Transkriptionsregulatoren abhängig ist, wurde bereits beschrieben (Kadouri & Shanks, 2013; Khanafari *et al.*, 2006; Matsuyama *et al.*, 2011; Shanks *et al.*, 2013; Tanikawa *et al.*, 2006). Ein antibakterielles Zusammenwirken eines intrinsischen Tensids und Prodigiosin wurde ebenfalls anhand von Deletionsmutanten in einem ersten Ansatz aufgezeigt (Williamson *et al.*, 2008).

Damit stellt diese aus *S. marcescens* stammende Stoffkombination den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit dar. Um die gemeinsame Bioaktivität der Stoffe zu analysieren, wird in diesem Teil der Arbeit die antibakterielle Wirkung der beiden Sekundärmetabolite Prodigiosin und Serrawettin W1 untersucht. Dabei stehen zwei Hauptfragen im Vordergrund: (i) Ist eine verstärkte gemeinsame Wirkung von Prodigiosin und Serrawettin W1 bei kombinatorischer Applikation verifizierbar? (ii) Können Rückschlüsse auf weitere effektive, antibakteriell wirkende Kombinationen ausgehend von der natürlichen Substanzkombination gezogen werden?

3.1.1 Antibakterieller Effekt der natürlichen Sekundärmetabolit-Kombination Prodigiosin und Serrawettin W1 aus *Serratia marcescens*

Um ein mögliches, in der Literatur bereits postuliertes Zusammenspiel der beiden aus dem Bakterium S. marcescens stammenden, antibakteriell wirkenden Sekundärmetabolite Prodigiosin und Serrawettin W1 nachzuweisen, wurde die kombinatorische Wirkung dieser Substanzen in isolierter Form untersucht. Hierfür wurde als Testsystem der Agardiffusionstest (vgl. Kapitel 2.7.1) ausgewählt, da in der Masterarbeit "Combinatorial antimicrobial effects of selected secondary metabolites" (Jennifer Hage-Hülsmann, 2015, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), die dieser Arbeit voranging, in ersten Experimenten gezeigt werden konnte, dass kombinatorische antibakterielle Effekte anhand dieses Testsystems nachgewiesen werden können. Generell ist der Test eine etablierte Methode zur qualitativen Bestimmung antibakterieller Wirkungen von Substanzen (Jorgensen & Ferraro, 2009; Matuschek et al., 2014). Hier wurde der Agardiffusionstest als Methode zur Vorauswahl interessanter Substanzkombinationen verwendet, da er eine erste, leichte, schnelle und kostengünstige Visualisierung kombinatorisch antibakterieller Effekte zweier Substanzen ermöglicht. Als nicht-pathogenes Modellbakterium wurde das Gram-positive Bodenbakterium C. glutamicum ATCC 13032 verwendet. Es ist ein Vertreter der Corynebacterineae, die eine Unterordnung der Ordnung Actinomycetales sind und zu denen ebenso die Humanpathogene (i) Mycobacterium tuberculosis (Erreger der Tuberkulose), (ii) Corynebacterium diphtheriae (Erreger der Diphtherie) und (iii) Mycobacterium leprae (Erreger der Lepra-Krankheit) zählen (Baumgart et al., 2016; Burkovski, 2003; Mishra et al., 2007; Stackebrandt et al., 1997). Aus diesem Grund wird C. glutamicum in der Forschung oftmals als ein nicht-pathogenes Modellbakterium für die genannten relevanten bakteriellen Humanpathogene angesehen und verwendet (Mishra et al., 2007; Sorger-Herrmann, 2006). Um Referenzgrößen für im Agardiffusionstest gebildete Hemmhöfe zu erhalten, wurde zunächst das Antibiotikum Streptomycin in diesem Testsystem eingesetzt (Abbildung 16). Streptomycin ist für die Behandlung von Tuberkulose etabliert, sodass es ein geeignetes Referenzantibiotikum darstellt (Trevor *et al.*, 2015). Das Antibiotikum ist gut wasserlöslich und wurde daher in sterilem destillierten Wasser gelöst und Mengen von 0,1 bis 50 µg pro Celluloseblättchen eingesetzt. Die Hemmhöfe des Wachstums wurden als Durchmesser abzüglich der Größe des Celluloseblättchens von 6 mm angegeben. Bei dem Einsatz von Streptomycin bildeten sich ab einer Menge von 1 µg messbare Hemmhöfe mit Größen von rund 4 mm, 12 mm und 15 mm bis hin zu 17 mm bei einer Menge von 50 μg Streptomycin pro Celluloseblättchen (Abbildung 16).



Abbildung 16: Antibakterielle Wirkung von Streptomycin gegen *C. glutamicum* im Agardiffusionstest. Um Referenzgrößen für weitere Agardiffusionstests gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 zu erhalten, wurde Streptomycin in Mengen von 0,1 bis 50 μg pro Celluloseblättchen eingesetzt. Als Kontrolle (0 μg pro Celluloseblättchen) diente Wasser, welches als Lösungsmittel für Streptomycin verwendet wurde. Nach der Benetzung der Celluloseblättchen mit der Antibiotikumslösung wurden diese für 30 Minuten unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank getrocknet. Anschließend wurden sie auf einen *C. glutamicum*-Ausstrich auf einer LB-Agarplatte aufgelegt und diese nach der Rasenbildung durch Inkubation bei 30 °C über Nacht (20 h) fotodokumentiert. Die Hemmhofgrößen sind als Durchmesser abzüglich des Durchmessers der Filterblättchen (= 6 mm) in mm angegeben. Bei den gezeigten Bildern handelt es sich um repräsentative Ergebnisse einer Dreifachbestimmung. Die tabellarisch angegebenen Werte zeigen die Mittelwerte der Hemmhöfe der Dreifachbestimmung mit den entsprechenden Standardabweichungen. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Analog zum Vorgehen mit Streptomycin folgte die Visualisierung der antibakteriellen Wirkung von Prodigiosin und Serrawettin W1 im Agardiffusionstest (vgl. Kapitel 2.7.1) gegen C. glutamicum (Abbildung 17). Das Lipopeptid Serrawettin W1 und das hydrophobe Pigment Prodigiosin wurden dafür zuvor nach bereits bestehenden Protokollen heterolog in Pseudomonas putida KT2440 gewonnen, isoliert (Domröse et al., 2015; Thies et al., 2014) und die jeweilige chemische Zusammensetzung mittels Massenspektrometrie verifiziert (vgl. Kapitel 2.8). Serrawettin W1 wurde als Rohextrakt durch die Plasmid-basierte Expression des Gens swrW aus S. marcescens in P. putida KT2440 hergestellt. Die Extraktion aus einer äquivalent durchgeführten Kultivierung von P. putida mit dem entsprechenden Leervektor (pVLT33) ergab ein Rohextrakt mit einem Gewicht, das 3 % der Menge des gewonnenen Serrawettin W1-Rohextrakts entsprach. So konnte geschätzt werden, dass das Serrawettin W1-Rohextrakt mit einer Reinheit von ungefähr 97 % generiert wurde. Prodigiosin wurde nach der heterologen Produktion in P. putida (hierzu wurde ein Stamm verwendet, der die geclusterten pig-Gene exprimierte) zusätzlich mittels einer Säulenchromatographie gereinigt, wodurch eine Reinheit von 97 % erzielt wurde. Um kombinatorische antibakterielle Effekte von Prodigiosin und Serrawettin W1 nachzuweisen, wurden die Stoffe in Ethanol (p.a.) gelöst und in steigenden Mengen (0, 10, 25, 50 µg pro Celluloseblättchen) miteinander kombiniert (Abbildung 17).



Abbildung 17: Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und Serrawettin W1 gegen *C. glutamicum* im Agardiffusionstest.

(A) Das Tensid Serrawettin W1 und das rote, hydrophobe Pigment Prodigiosin, welches zu der Klasse der Tripyrrole gehört, werden natürlicherweise von dem Bakterium *S. marcescens* produziert. Die beiden Substanzen wurden in *P. putida* KT2440 heterolog produziert und anschließend mit einer Reinheit von ca. 97% für die folgenden Tests eingesetzt. (B) Die Sekundärmetabolite wurden in Ethanol (p.a.) gelöst und jeweils in den Mengen 10, 25 und 50 µg pro Celluloseblättchen im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Als Kontrolle (0 µg pro Celluloseblättchen) diente das verwendete Lösungsmittel (Ethanol). Die mit den Stoffen versehenen Celluloseblättchen wurden auf einen *C. glutamicum*-Ausstrich auf einer LB-Agarplatte aufgelegt und diese nach der Rasenbildung durch Inkubation bei 30 °C über Nacht (20 h) fotodokumentiert. Die Größen der Hemmhöfe sind in mm als Durchmesser abzüglich des Durchmessers der Celluloseblättchen von 6 mm angegeben. Bei dem gezeigten Bild handelt es sich um ein repräsentatives Ergebnis einer Dreifachbestimmung. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Serrawettin W1 zeigte in den hier eingesetzten Mengen keine alleinige antibakterielle Wirkung gegen *C. glutamicum*. Die separate Applikation von Prodigiosin hingegen führte zur Bildung minimaler Hemmhöfe mit einer einheitlichen Größe von < 1 mm für alle verwendeten Mengen. Durch die kombinierte Anwendung beider bakterieller Sekundärmetabolite erschienen einige Hemmhöfe größer als die theoretische Summe der entsprechenden Hemmhöfe bei alleiniger Anwendung. Die Kombination von 50 µg Serrawettin W1 zusammen mit 10 µg Prodigiosin resultierte in einem Hemmhof der Größe 3,7 mm, womit dieser auf eine verstärkte kombinatorische antibakterielle Wirkung hindeutete. Interessanterweise scheint dieser kombinatorische Effekt konzentrationsabhängig zu sein, da alle weiteren Kombinationen Hemmhöfe mit einem Durchmesser von maximal 1,3 mm ergaben. Das bedeutet, dass bei gleichbleibender Tensidmenge von 50 µg pro Celluloseblättchen und steigender Prodigiosinmenge von 10, 25 bzw. 50 µg pro Celluloseblättchen (Abbildung 17) der Hemmhof mit zunächst 3,7 mm, gefolgt von 1,3 mm und schließlich 1,1 mm, stetig kleiner wurde und beinahe die Größe der Hemmhöfe entsprechend der alleinigen Prodigiosin-

Applikation von < 1 mm erreichte. Um ausschließen zu können, dass dieser beobachtete kombinatorische Effekt auf andere Bestandteile des Rohextrakts von Serrawettin W1, welche von anderen Verbindungen aus der *P. putida*-Kultur herrühren könnten, zurückzuführen ist, wurde Prodigiosin zusammen mit einem Extrakt aus einer analog aufgearbeiteten Kultur des Produktionsstammes *P. putida* mit dem Leervektor pVLT33 in einem Agardiffusionstest eingesetzt (vgl. Anhang-Abbildung 1). In diesem Kontrollexperiment wiesen alle Hemmhöfe der kombinierten Anwendung eine Größe von < 1 mm auf. Damit waren kombinatorische antibakterielle Effekte aufgrund von anderen Bestandteilen des Expressionswirts *P. putida* nicht zu beobachten.

Grundsätzlich konnte mithilfe des Agardiffusionstests eine kombinatorische antibakterielle Wirkung der beiden aus S. marcescens stammenden Sekundärmetabolite Prodigiosin und Serrawettin W1 gegen C. glutamicum nachgewiesen werden, was den Vortests der oben genannten Masterarbeit (Hage-Hülsmann, 2015) entspricht. Generell fällt auf, dass die durch die alleinige Applikation von Prodigiosin aufkommenden Hemmhöfe (Abbildung 17) bei einer Gegenüberstellung zu den mit Streptomycin generierten Hemmhöfen (Abbildung 16) vergleichsweise klein sind. Neben einer unterschiedlich starken antibakteriellen Wirkung beider Substanzen kann die geringe Wasserlöslichkeit der jeweiligen Verbindungen die Hemmhofgröße beeinflussen. So liegt anders als bei dem gut wasserlöslichen Streptomycin im Fall des hydrophoben Pigments Prodigiosin eine eingeschränkte Diffusion in der Agarplatte vor. Demnach könnte eine verbesserte Löslichkeit von Prodigiosin durch die Kombination mit dem Tensid Serrawettin W1 zu einem größeren Hemmhof führen, da tensidische Verbindungen aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften Oberflächen- und Grenzflächenaktivitäten besitzen und die Wasserlöslichkeit hydrophober Verbindungen verbessern können (Christofi & Ivshina, 2002; Desai & Banat, 1997; Shah et al., 2013). Die Oberflächenaktivität von Serrawettin W1 ist bereits beschrieben (Matsuyama et al., 2011; Thies et al., 2014), sodass es durchaus die Löslichkeit von Prodigiosin verbessert haben könnte. Demnach könnte damit dessen verstärkte Diffusion aus dem Celluloseblättchen in das wässrige Medium und dort eine weitere Verteilung gefördert worden sein. Infolgedessen könnte ein Hemmhof mit einem größeren Durchmesser entstanden sein, wodurch die antibakterielle Wirkung stärker erschien. Zusätzlich zu dieser Funktion von Serrawettin W1 als Solvens besteht die Möglichkeit einer alleinigen antibakteriellen Aktivität dieser Substanz. Obwohl mit den eingesetzten Mengen an Serrawettin W1 im hier durchgeführten Agardiffusionstest (Abbildung 17) kein separater antibakterieller Effekt zu erkennen war, sind diverse antibakterielle Wirkungen von natürlichen Tensiden gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien beschrieben (Clements et al., 2019; Gaur et al., 2019; Ndlovu et al., 2017). Der antibakterielle Effekt von Serrawettin W1 gegen etwa S. aureus und B. subtilis wurde bereits früh nachgewiesen (Wasserman et al., 1962). Zusätzlich wurden für Serratamolide auch

antibakterielle Eigenschaften gegen verschiedene Mykobakterien, für die *C. glutamicum* hier als Modell eingesetzt wurde, aufgezeigt (Dwivedi *et al.,* 2008).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die separate antibakterielle Wirkung von Prodigiosin durch eine gemeinsame Anwendung mit Serrawettin W1 verstärkt wird. Daher wird im Zuge dieser Arbeit Serrawettin W1 weiterhin als Wirkverstärker und das hydrophobe Pigment Prodigiosin als die Antibiotikum-Komponente der natürlichen Stoffkombination betrachtet. Zusammenfassend stellt die Kombination einen geeigneten Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen anderer, ähnlicher Kombinationen dar.

3.1.2 Varianz der tensidischen Wirkverstärker-Komponente Serrawettin W1

3.1.2.1 Kombinierte antibakterielle Effekte von Prodigiosin und synthetischen Tensiden

Der erfolgreiche Nachweis einer verstärkten kombinatorischen antibakteriellen Wirkung der natürlichen Sekundärmetabolit-Kombination Prodigiosin und Serrawettin W1 wirft die Frage nach einem generell verbesserten antibakteriellen Effekt zwischen Prodigiosin und oberflächenaktiven Substanzen der Stoffklasse der Tenside auf. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Wirkung von Prodigiosin zusammen mit ausgewählten synthetischen Tensiden untersucht. Dazu wurden (i) Triton X-100 (Octylphenolethoxylat) (ii) SDS (engl.: *sodium dodecyl sulfate*), und (iii) Tween 20 (Polysorbat 20) als Vertreter bekannter industrieller Tenside hinzugezogen. Die genannten synthetischen Tenside wurden im Agardiffusionstest (vgl. Kapitel 2.7.1) in Kombination mit Prodigiosin gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Als Referenzwerte für die Größen von Hemmhöfen dienten die für Streptomycin ermittelten Werte (vgl. Abbildung 16). Die Auftragung erfolgte nach anfangs beschriebenem Schema (Y-Achsen: Tenside; X-Achsen: Prodigiosin) und mit zuvor verwendeten Mengen (0, 10, 25 und 50 µg pro Celluloseblättchen).

Zunächst wurde Triton X-100 zusammen mit Prodigiosin (Abbildung 18 A) hinsichtlich kombinatorischer antibakterieller Wirkungen untersucht. Bei alleiniger Applikation von Triton X-100 im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum* waren bei den verwendeten Mengen keine Hemmhöfe erkennbar und demnach keine separaten antibakteriellen Effekte vorhanden (Abbildung 18 B). Bei kombinierter Applikation von Triton X-100 und Prodigiosin konnte, ähnlich der Kombination von Prodigiosin und Serrawettin W1, der größte Hemmhof mit 3,4 mm bei der höchsten Menge an Triton X-100 und der geringsten Prodigiosinmenge gemessen werden (Abbildung 18 C). Ebenso, wie für die natürliche Sekundärmetabolit-Kombination beschrieben, nahm die Größe der Hemmhöfe bei gleichbleibender Menge an Triton X-100 von 50 µg und steigender Prodigiosinmenge ab.



Abbildung 18: Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und Triton X-100 gegen *C. glutamicum* im Agardiffusionstest.

(A) Das hier verwendete Prodigiosin wurde heterolog in *P. putida* KT2440 hergestellt und anschließend gereinigt, sodass es mit einer Reinheit von 97 % eingesetzt werden konnte. Triton X-100 (*n* = 9-10) ist ein synthetisches Tensid, welches kommerziell erhältlich ist. (B) Die beiden Stoffe wurden in Ethanol (p.a.) gelöst und jeweils in den Mengen 10, 25 und 50 μg pro Celluloseblättchen im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Als Kontrolle (0 μg pro Celluloseblättchen) diente das verwendete Lösungsmittel (Ethanol). Prodigiosin wurde entlang der X-Achse und Triton X-100 entlang der Y-Achse aufgetragen. Die mit den Stoffen versehenen Celluloseblättchen wurden auf einen *C. glutamicum*-Ausstrich auf einer LB-Agarplatte aufgelegt und diese nach der Rasenbildung durch Inkubation bei 30 °C über Nacht (20 h) fotodokumentiert. Bei dem gezeigten Bild handelt es sich um ein repräsentatives Ergebnis einer Dreifachbestimmung. (C) Die Größen der Hemmhöfe sind in mm als Durchmesser minus der Größe der Celluloseblättchen von 6 mm angegeben. Die tabellarisch angegebenen Werte zeigen die Mittelwerte der Hemmhöfe der Dreifachbestimmung mit den entsprechenden Standardabweichungen. In grau hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche kleiner 1 mm sind. Farbig hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche größer oder gleich 1 mm sind. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Als Nächstes wurde das synthetische Tensid SDS zusammen mit Prodigiosin (Abbildung 19 A) auf verstärkte antibakterielle Effekte überprüft.



Abbildung 19: Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und SDS gegen *C. glutamicum* im Agardiffusionstest. (A) Das hier verwendete Prodigiosin wurde heterolog in *P. putida* KT2440 hergestellt und anschließend gereinigt, sodass es mit einer Reinheit von 97 % eingesetzt werden konnte. SDS ist ein synthetisches Tensid, welches kommerziell erhältlich ist. (B) Die beiden Stoffe wurden in Ethanol (p.a.) gelöst und jeweils in den Mengen 10, 25 und 50 µg pro Celluloseblättchen im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Als Kontrolle (0 µg pro Celluloseblättchen) diente das verwendete Lösungsmittel (Ethanol). Prodigiosin wurde entlang der X-Achse und SDS entlang der Y-Achse aufgetragen. Die mit den Stoffen versehenen Celluloseblättchen wurden auf einen *C. glutamicum*-Ausstrich auf einer LB-Agarplatte aufgelegt und diese nach der Rasenbildung durch Inkubation bei 30 °C über Nacht (20 h) fotodokumentiert. Bei dem gezeigten Bild handelt es sich um ein repräsentatives Ergebnis einer Dreifachbestimmung. (C) Die Größen der Hemmhöfe sind in mm als Durchmesser minus der Größe der Celluloseblättchen von 6 mm angegeben. Die tabellarisch angegebenen Werte zeigen die Mittelwerte der Hemmhöfe der Dreifachbestimmung mit den entsprechenden Standardabweichungen. In grau hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche kleiner 1 mm sind. Farbig hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche größer oder gleich 1 mm sind. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Bei der alleinigen Anwendung von SDS im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum* wurden Hemmhöfe mit steigender Größe entsprechend der höher werdenden Mengen verzeichnet (Abbildung 19 B). Dabei erhöhte sich die Hemmhofgröße von 0,6 mm (10 µg) über 3,7 mm (25 µg) bis hin zu 6,8 mm (50 µg) vergleichsweise stark (Abbildung 19 C). Die für Prodigiosin + Serrawettin W1 und Prodigiosin + Triton X-100 beschriebene konzentrationsabhängige Hemmhofgröße, konnte in der Kombination von Prodigiosin + SDS ebenfalls beobachtet werden. Bei der kombinatorischen Applikation konnten Hemmhöfe von bis zu 12,1 mm erzielt werden. Damit lagen die Hemmhöfe im Bereich der Größe der Referenzwerte von 10 µg Streptomycin (vgl. Abbildung 16). Der starke kombinatorische Effekt spiegelte sich beispielsweise in der Kombination von 10 µg SDS zusammen mit 10 µg Prodigiosin wider. Hier wurde durch die alleinige SDS-Anwendung ein Hemmhof der Größe 0,6 mm erzielt. Bei 10 µg Prodigiosin ergab sich ein Hemmhof der Größe 0,8 mm. Die theoretische Summe läge damit bei 1,4 mm. Die gemeinsame Applikation mit den genannten Konzentrationen resultierte hingegen in einem Hemmhof der Größe von 4,2 mm. Damit war dieser dreimal so groß wie die theoretische Summe der einzelnen Hemmhöfe.

Als Drittes wurde das synthetische Tensid Tween 20 zusammen mit Prodigiosin (Abbildung 20 A) im Agardiffusionstest gegen C. glutamicum eingesetzt. Die alleinige Applikation von Tween 20 in den gewählten Mengen führte zu keiner Bildung von Hemmhöfen (Abbildung 20 B). Nichtsdestotrotz ergab die gemeinsame Anwendung von Prodigiosin und Tween 20 ebenfalls verstärkte Effekte. kombinatorische antibakterielle Entsprechend der Ergebnisse der anderen Zusammensetzungen wurden die kombinatorischen Hemmhöfe mit steigender Tensidmenge größer. Interessanterweise variierten die Durchmesser der Hemmhöfe jedoch nicht signifikant bei konstanter Tensidmenge zusammen mit höher werdenden Prodigiosinmengen. So wurden etwa bei 50 µg Tween 20 und 10, 25 bzw. 50 µg Prodigiosin Hemmhöfe mit nahezu gleichen Größen von 2,0 mm, 2,1 mm und 2,0 mm generiert (Abbildung 20 C). Damit schien bei dieser Kombination erstmals keine spezifische Konzentrationsabhängigkeit, wie sie bislang für die anderen Kombinationen zu beobachten war, vorzuliegen. Wird des Weiteren die Gesamtgröße der Hemmhöfe betrachtet, so fällt auf, dass es sich etwa im Vergleich zu den Hemmhöfen der Kombination Prodigiosin + SDS um vergleichsweise kleine Hemmhöfe handelt. Dort wurden bei 50 µg SDS und 10, 25 bzw. 50 µg Prodigiosin Hemmhöfe der Größe 12,1 mm, 11,3 mm und 8,8 mm erzielt (vgl. Abbildung 19 C). Obwohl die gemeinsamen Hemmhöfe bei 50 μg Triton X-100 und 10, 25 bzw. 50 μg Prodigiosin mit 3,4 mm, 3,1 mm und 2,7 mm (vgl. Abbildung 18 C) erheblich kleiner sind als die letztgenannten Durchmesser, liegen diese Hemmhöfe ebenso über der maximalen Hemmhofgröße, die bei der Kombination von Tween 20 und Prodigiosin vorlag. Folglich lassen sich anhand dieser Beobachtung die kombinierten antibakteriellen Wirkungen von Prodigiosin und den synthetischen Tensiden entsprechend der jeweiligen Wirkintensität anordnen. Prodigiosin + SDS wirken mit Abstand am stärksten antibiotisch. Darauf folgen Prodigiosin + Triton X-100 und schließlich Prodigiosin + Tween 20. Werden die separaten antibakteriellen Wirkstärken der Tenside mit beachtet, so entspricht die aufgeführte Reihenfolge der kombinierten Wirkungen der jeweiligen alleinigen Wirkstärke der Tenside.



Abbildung 20: Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und Tween 20 gegen *C. glutamicum* im Agardiffusionstest.

(A) Das hier verwendete Prodigiosin wurde heterolog in *P. putida* KT2440 hergestellt und anschließend gereinigt, sodass es mit einer Reinheit von 97 % eingesetzt werden konnte. Tween 20 (w + x + y + z = 16) ist ein synthetisches Tensid, welches kommerziell erhältlich ist. (B) Die beiden Stoffe wurden in Ethanol (p.a.) gelöst und jeweils in den Mengen 10, 25 und 50 µg pro Celluloseblättchen im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Als Kontrolle (0 µg pro Celluloseblättchen) diente das verwendete Lösungsmittel (Ethanol). Prodigiosin wurde entlang der X-Achse und Tween 20 entlang der Y-Achse aufgetragen. Die mit den Stoffen versehenen Celluloseblättchen wurden auf einen *C. glutamicum*-Ausstrich auf einer LB-Agarplatte aufgelegt und diese nach der Rasenbildung durch Inkubation bei 30 °C über Nacht (20 h) fotodokumentiert. Bei dem gezeigten Bild handelt es sich um ein repräsentatives Ergebnis einer Dreifachbestimmung. (C) Die Größen der Hemmhöfe sind in mm als Durchmesser minus der Größe der Celluloseblättchen von 6 mm angegeben. Die tabellarisch angegebenen Werte zeigen die Mittelwerte der Hemmhöfe der Dreifachbestimmung mit den entsprechenden Standardabweichungen. In grau hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche kleiner 1 mm sind. Farbig hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche größer oder gleich 1 mm sind. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Zusammenfassend konnte jeweils eine verstärkte kombinatorische antibakterielle Wirkung zwischen den synthetischen Tensiden Triton X-100, SDS bzw. Tween 20 und Prodigiosin bei gleichzeitiger Applikation im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum* detektiert werden. Triton X-100 ist ein

etabliertes chemisches Detergens, welches etwa in der Biotechnologie standardmäßig in Protokollen zur Isolierung und Reinigung von Proteinen aus biologischen Membranen eingesetzt wird (Arnold &Linke, 2008, 2007). In älteren Untersuchungen wurde Triton X-100 außerdem teils hinsichtlich antibakterieller Effekte evaluiert, wobei sich die Anzahl der Studien nur auf einige wenige beläuft: Eine Testreihe zur alleinigen antibakteriellen Wirkung des Tensids Triton X-100 belegt, dass es die Zelllyse des Gram-positiven Bakteriums Streptococcus faecalis auslöst (Cornett & Shockman, 1978). Neben dem separaten Einsatz wurde Triton X-100 ebenfalls in Kombinationen verwendet. Dabei wurde zum einen der antibakterielle Effekt von dem antimikrobiellen Wirkstoff Chlorhexidin, welcher etwa in der Zahnmedizin bzw. der Mundhygiene Einsatz findet, verstärkt (Giertsen et al., 1989). Zum anderen beschreiben weitere Studien synergistische antibakterielle Wirkungen gegen ursprünglich Methicillin-resistente S. aureus-Stämme, welche durch die kombinierte Applikation von Triton X-100 und Oxacillin wieder sensitiv für das Antibiotikum wurden (Komatsuzawa et al., 1995, 1994). Das als Zweites benutzte Tensid SDS ist üblicherweise sowohl Bestandteil diverser industrieller Produkte, wie beispielshalber Seifen, Shampoos, Zahnpasta, Bodenreiniger, als auch eine etablierte Chemikalie in der Biochemie und der Biotechnologie (Warra, 2012). In letztgenannten Bereichen wird es etwa als Denaturierungsmittel für Proteine eingesetzt, wobei der Einsatz in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) sowie die Verwendung beim Reinigen von Membranproteinen die wohl bekanntesten Applikationen darstellen (Arnold & Linke, 2008; Warra, 2012). Die Daten hinsichtlich antibakterieller kombinatorischer Effekte des Tensids beschränken sich auf ein paar einzelne Studien. Dabei zeigte SDS beispielshalber zusammen mit organischen Säuren verstärkte antibakterielle Wirkungen gegen das sich auf Lebensmitteln beziehungsweise Tierhaut befindliche, krankheitserregende, bakterielle Pathogen E. coli O157:H7 (Elramady et al., 2013; Ortega et al., 2011; Zhao et al., 2009). Polysorbate, zu denen das hier getestete Tween 20 gehört, finden in der Industrie im Allgemeinen Verwendung als Lebensmittelzusatzstoffe, wo diese oftmals die Funktion als Emulgatoren erfüllen (EFEMA, 2019). Des Weiteren wurden die Substanzen als Bestandteile in Kosmetikartikeln, wie beispielsweise Eyelinern (Mercado & Shah, 1991), patentiert. Ebenso sind Polysorbate in zahlreichen medizinischen Produkten vertreten, in denen die Verbindungen häufig als pharmazeutische Hilfsstoffe dienen (EMA/CHMP, 2018; Kang et al., 2015). Dies ist etwa aus stetig aktualisierten Listen zurzeit genehmigter Impfstoffe der U.S. Food and Drug Administration (FDA) unter "Vaccines Licensed for Use in the United States", URL: https://www.fda.gov/vaccines-bloodbiologics/vaccines/vaccines-licensed-use-united-states (aufgerufen am 18.01.2020) zu entnehmen. Spezifische Beispiele pharmazeutischer Produkte sind Infusionslösungen wie IMFINZI® (AstraZeneca GmbH, 2019) oder etwa Präparate zur nasalen Verabreichung von Wirkstoffen, für welche Polysorbate bereits vor vielen Jahren patentiert wurden (Stoltz, 1999). Obwohl als pharmazeutische Hilfsstoffe eingesetzte Verbindungen vorzugsweise pharmakologisch und toxikologisch inert sein

sollen, besitzen Polysorbate wie etwa Tween 80 pharmakodynamische Eigenschaften. So wurden bezüglich antibakterieller Aktivitäten Polysorbate mit klinisch etablierten Antibiotika kombiniert getestet und dabei mit verstärkten Wirkungen in Zusammenhang gebracht. Eine dieser Studien beschreibt etwa synergistische antibakterielle Effekte zwischen Tween 80 und dem bakteriziden, antiparasitären Wirkstoff Metronidazol sowie zwischen Tween 80 und dem Makrolid-Antibiotikum Clarithromycin gegen das Gram-negative Bakterium *Helicobacter pylori* (Figura *et al.*, 2012). In einer weiteren Testreihe hemmte die Kombination aus Polymyxin B und Polysorbat 80 (Tween 80) das Wachstum und die Biofilmbildung von *Stenotrophomonas maltophilia* effektiver als die jeweiligen alleinigen Applikationen der Verbindungen (Malinowski *et al.*, 2017).

Demzufolge zeigen die obigen Ergebnisse, dass eine gemeinsame Applikation von Prodigiosin mit gängigen Tensiden zur Verstärkung der Wirkung möglich ist, falls diese Verbindung aufgrund der antibakteriellen Effekte in Anwendung gebracht werden würde. Im Zuge der industriellen und kommerziellen Nutzung von synthetischen Tensiden werden jedoch immer wieder Nachteile für Umwelt und Mensch diskutiert. Grund sind teils unspezifische toxische Effekte, die einige dieser Verbindungen gegen diverse Mikroorganismen und höhere Organismen, wie Bakterien, Pilze, Algen, Pflanzen und Vertebraten aus sowohl aquatischen als auch terrestrischen Habitaten, besitzen können (Ivanković & Hrenović, 2010; Jardak et al., 2016; Rebello et al., 2014). Die in den obigen antibakteriellen Tests eingesetzten synthetischen Tenside Triton X-100, SDS und Tween 20 können ebenfalls schädigend für die Umwelt sein. Die biologische Abbaubarkeit von Triton X-100 etwa variiert in Abwasserschlamm je nach Zusammensetzung der Mikroorganismen und vorhandener Tensidkonzentration, da das Tensid teilweise ungerichtete toxische Effekte gegen einige Bakterien und Pilze besitzt (Abu-Ghunmi et al., 2014). Abu-Ghunmi et al. schlussfolgern daraus, dass eine gute biologische Abbaubarkeit nicht einfach gegeben ist, sondern von der Wahl der eingesetzten Organismen abhängt und im Umkehrschluss darüber gesteuert werden kann. Dies deutet daraufhin, dass Triton X-100 in der Umwelt, in der naturgemäß keine spezifisch gesteuerte Auswahl an Organismen vorliegt, negative Auswirkungen auf die vorhandene mikrobielle Population haben kann. Eine vergleichende Studie über den Abbau des synthetischen Tensids Triton X-100 und dem Biotensid Rhamnolipid zeigt deutlich, dass letzteres eine bessere Biodegradierbarkeit besitzt (Mohan et al., 2006). Für SDS sind überwiegend aquatische Toxizitäten ausgiebig beschrieben. In Abhängigkeit von der vorhandenen SDS-Konzentration können sich negative Effekte auf die Vitalität von beispielshalber Miesmuscheln abzeichnen (Freitas et al., 2020; Messina et al., 2014). Ebenso wirkte SDS toxisch gegen im Frischwasser lebende, gefährdete Mollusken-Arten aus dem Fluss Mobile River (Alabama, USA), nämlich (i) Fluss- und Teichmuscheln (Unionidae) und (ii) Caenogastropoda, welche die größte Gruppe der Schnecken darstellen (Gibson et al., 2016). Das Tensid zeigte des Weiteren eine inhibierende, konzentrationsabhängige Wirkung auf den Erfolg der Befruchtung von Eizellen der

Dorade (*Sparus aurata* L.; Speisefisch), nachdem die Fischspermien SDS ausgesetzt waren und anschließend zur Befruchtung eingesetzt wurden (Rosety *et al.*, 2001). Letzteres Beispiel zeigt, dass Tenside, wie SDS, ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Vitalität höherer Organismen, wie Wirbeltiere, haben können. Die Gruppe der Polysorbate, welche hier durch Tween 20 vertreten wird, bringt im Zuge der pharmazeutischen Applikation ebenfalls unerwünschte Nebeneffekte mit sich. So ist die Degradation von Polysorbat 20 und 80 durch Autoxidation oder Hydrolyse in biopharmazeutischen Produkten beschrieben (Kerwin, 2008; Kishore *et al.*, 2011). Dieser Abbau kann in der Bildung von visuellen und subvisuellen nicht löslichen Bestandteilen, wie freien Fettsäuren, resultieren, die wiederum die Produktqualität beeinträchtigen können (Kerwin, 2008; Tomlinson *et al.*, 2015).

Aktuell besteht ein Trend dahingehend synthetische Tenside durch Biotenside zu ersetzten, welcher sowohl durch die genannten umweltgefährdenden Eigenschaften von synthetischen Tensiden als auch einige Vorzüge von Biotensiden (vgl. Kapitel 1.7) gefördert wird (Akbari *et al.*, 2018). Daher stellte sich im Rahmen der Arbeit des Weiteren die Frage nach einer Übertragbarkeit des kombinatorischen antibakteriellen Effekts von Prodigiosin und synthetischen Tensiden auf Prodigiosin und Verbindungen aus der Gruppe der Biotenside.

3.1.2.2 Kombinierte antibakterielle Effekte von Prodigiosin und Biotensiden

Nachdem verstärkte antibakterielle Wirkungen zwischen Prodigiosin und synthetischen Tensiden nachgewiesen wurden, wurde im Weiteren überprüft, ob dieser Effekt auf Prodigiosin und Biotenside übertragen werden kann. Insgesamt ist die Nachfrage an Tensiden enorm groß, wobei in den letzten Jahren das Interesse an Biotensiden gestiegen ist (Le Guenic et al., 2019). Den Biomolekülen werden, wie oben beschrieben, eine geringe Toxizität und eine leichte biologische Abbaubarkeit zugeschrieben (Harshada, 2014). Ebenso können diese Stoffe aus erneuerbaren Ressourcen hergestellt werden, wodurch sie nachhaltige und wertvolle Substanzen für industrielle Applikationen darstellen (Marchant & Banat, 2012; Santos *et al.*, 2016). Zur Überprüfung verstärkter antibakterieller kombinatorischer Effekte von Prodigiosin zusammen mit weiteren Biotensiden neben Serrawettin W1 wurden Tenside von jeweils unterschiedlichen Herkunftsorganismen, nämlich Rhamnolipide, Mannosylerythritollipide (MEL) und N-Acyltyrosine, für die durchweg gezeigt wurde, dass sie in der Lage sind sehr hydrophobe Pigmente zu solubilisieren (Kubicki et al., 2020), in die Untersuchungen mit eingebunden. Für die intensiv erforschten Rhamnolipide, die aus dem bakteriellen Humanpathogen Pseudomonas aeruginosa stammen, ist die biotechnologische Produktion bereits etabliert und es werden vielfältige Applikationen diskutiert (Tiso et al., 2017). Die nachfolgend eingesetzten Rhamnolipide sind ein Gemisch aus Mono- und Di-Rhamnolipiden, welche

in einer Reinheit von 90 % kommerziell erworben wurden (vgl. Kapitel 2.8). Die hier hinzugezogenen MEL sind typische Sekundärmetabolite des pflanzenpathogenen Pilzes Ustilago maydis (Hewald et al., 2005; Spoeckner et al., 1999). MEL sind im Allgemeinen Biotenside, die unter die Kategorie der Glykolipide fallen, und von unterschiedlichen Hefe- und Pilzstämmen, wie Organismen des Pilzgenus Pseudozyma, hergestellt werden (Arutchelvi et al., 2008; Morita et al., 2015). Die Verbindungen werden beispielsweise im Hinblick auf diverse Anwendungen im Kosmetiksektor (Morita et al., 2015) und im medizinischen Bereich bezüglich ihrer antibakteriellen Wirkungen sowie Effekte auf Krebszellen charakterisiert (Arutchelvi et al., 2008). Ebenso wird das Potenzial für Applikationen im Umweltsektor, wie etwa der Einsatz zum verbesserten Emulgieren von Kohlenwasserstoffen im Zuge der Öl-Degradation, diskutiert (Yu et al., 2015). MEL können ebenso wie Rhamnolipide im g/L-Maßstab durch mikrobielle Synthese in verschiedenen Organismen gewonnen werden (Günther et al., 2010; Jezierska et al., 2018; Niu et al., 2019). Die hier verwendeten MEL wurden von einem Kooperationspartner aus *U. maydis* in Form eines Rohextrakts gewonnen (vgl. Kapitel 2.8). Das dritte *N*-Myristoyltyrosin nachfolgend verwendete Biotensid ist ein N-Acyltyrosin, dessen Ursprungsorganismus unbekannt ist. Das Gen der bakteriellen N-Acyltyrosin-produzierenden N-Acylaminosäure-Synthase Nas354 wurde in einer Metagenomstudie gefunden (Thies et al., 2016). N-Myristoyltyrosin ist ein bislang wenig untersuchtes Biomolekül, welches sowohl durch das Verfahren der heterologen Produktion als auch durch chemische Synthese hergestellt werden kann (Thies et al., 2016). Somit besteht die Möglichkeit Rhamnolipide, MEL und N-Myristoyltyrosin umweltfreundlich und nachhaltig mittels biotechnologischer Synthesen in Mikroorganismen zu produzieren. Die hier benutzte N-Myristoyltyrosin-Charge wurde jedoch nach bestehendem Protokoll (Thies et al., 2016) von einer Kooperationspartnerin (Alexandra Schmidt-Thaler am Institut für Bioorganische Chemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Pietruszka der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durch chemische Synthese gewonnen. Die chemische Zusammensetzung dieser Charge wurde in der Zentral-Analytik des Forschungszentrums Jülich mittels Massenspektrometrie verifiziert (vgl. Kapitel 2.8) und für alle Experimente dieser Arbeit verwendet. Zur Untersuchung kombinierter antibakterieller Effekte zwischen Prodigiosin und Biotensiden

wurden die Substanzen in Ethanol (p.a.) gelöst und in einem Agardiffusionstest (vgl. Kapitel 2.7.1) gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 in zuvor verwendeten Mengen (10, 25, 50 µg pro Celluloseblättchen) eingesetzt. Als Kontrolle diente das reine Lösungsmittel (Ethanol).

Als Erstes wurde die kombinierte Anwendung von Prodigiosin und den aus *P. aeruginosa* stammenden Rhamnolipiden (Abbildung 21 A) evaluiert.



Abbildung 21: Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und Rhamnolipiden gegen *C. glutamicum* im Agardiffusionstest.

(A) Das hier verwendete Prodigiosin wurde heterolog in *P. putida* KT2440 hergestellt und anschließend gereinigt, sodass es mit einer Reinheit von 97 % eingesetzt werden konnte. Bei den hier verwendeten Rhamnolipiden handelt es sich um ein aus *P. aeruginosa* gewonnenes Extrakt aus Mono- und Di-Rhamnolipiden (hier abgebildet: Di-Rhamnolipidstruktur), welches von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) in einer Reinheit von 90 % bezogen wurde. (B) Die beiden Stoffe wurden in Ethanol (p.a.) gelöst und jeweils in den Mengen 10, 25 und 50 μg pro Celluloseblättchen im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Als Kontrolle (0 μg pro Celluloseblättchen) diente das verwendete Lösungsmittel (Ethanol). Prodigiosin wurde entlang der X-Achse und die Rhamnolipide entlang der Y-Achse aufgetragen. Die mit den Stoffen versehenen Celluloseblättchen wurden auf einen *C. glutamicum*-Ausstrich auf einer LB-Agarplatte aufgelegt und diese nach der Rasenbildung durch Inkubation bei 30 °C über Nacht (20 h) fotodokumentiert. Bei dem gezeigten Bild handelt es sich um ein repräsentatives Ergebnis einer Dreifachbestimmung. (C) Die Größen der Hemmhöfe sind in mm als Durchmesser minus der Größe der Celluloseblättchen von 6 mm angegeben. Die tabellarisch angegebenen Werte zeigen die Mittelwerte der Hemmhöfe der Dreifachbestimmung mit den entsprechenden Standardabweichungen. In grau hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche kleiner 1 mm sind. Farbig hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche größer oder gleich 1 mm sind. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Die alleinige Applikation der Biotenside sorgte ab 25 µg pro Celluloseblättchen für die Bildung kleiner Hemmhöfe mit einer Größe von 0,8 mm, welche mit der nächsthöheren Menge von 50 µg

Rhamnolipide pro Celluloseblättchen auf 2,2 mm stiegen und damit größer wurden (Abbildung 21 B). Alle durch Prodigiosin entstandenen Hemmhöfe befanden sich, wie zuvor bereits beobachtet, unabhängig der eingesetzten Mengen bei < 1 mm (Abbildung 21 C; untere Zeile). Wurden die Rhamnolipide in Kombination mit Prodigiosin verwendet, so war derselbe konzentrationsabhängige Effekt, wie zuvor für Prodigiosin und Serrawettin W1 beziehungsweise Triton X-100 oder SDS beschrieben, zu verzeichnen. Das heißt, dass im Zuge des kombinierten Einsatzes der größte Hemmhof von 5,5 mm bei der höchsten Rhamnolipidmenge von 50 µg und der niedrigsten Prodigiosinmenge von 10 µg zu sehen war. Stieg die Prodigiosinmenge bei gleichbleibender Rhamnolipidmenge von 10 μg auf 25 μg pro Celluloseblättchen Prodigiosin an, so war der gemeinsame Hemmhof bereits < 1 mm. Ebenfalls sank die antimikrobielle Wirkung bei gleichbleibender Menge an Prodigiosin von 10 µg und sinkender Rhamnolipidmenge von 25 µg pro Celluloseblättchen, wie die Hemmhofgröße von 1,7 mm zeigt. Bei allen anderen in diesem Test gezeigten Kombinationen bildeten sich Hemmhöfe der Größe < 1 mm (Abbildung 21 C). Im Vergleich zu den Referenzwerten von Streptomycin (vgl. Abbildung 16) lag der hier gezeigte maximale Hemmhof von 5,5 mm im Größenbereich der mit geringen Mengen an Streptomycin von 1 µg pro Celluloseblättchen generierten Hemmhöfe.

Als Zweites wurde das MEL-Rohextrakt aus U. maydis (Abbildung 22 A) in die Untersuchungen von kombinatorischen Effekten zwischen Prodigiosin und Biotensiden inkludiert. Das MEL-Extrakt sowie ein entsprechendes Kontrollextrakt, das keine MEL enthielt, wurden von Peter Stoffels (aus der Arbeitsgruppe von Dr. Kerstin Schipper, welche dem Institut für Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Feldbrügge der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angehört) erzeugt und freundlicherweise bereitgestellt. Die Rohextrakte wurden aus Kulturen verschiedener U. maydis-Stämme gewonnen. Auf Basis der Ausbeuten wurde eine Reinheit von 13 % für das MEL-Rohextrakt angenommen (vgl. Kapitel 2.8). Die erhaltenen U. maydis-Rohextrakte und Prodigiosin wurden in Ethanol (p.a.) gelöst und zusammen im Agardiffusionstest gegen C. glutamicum eingesetzt. Das MEL-Rohextrakt wurde entlang der Y-Achse gegen Prodigiosin auf der X-Achse aufgetragen (Abbildung 22 B). Da U. maydis natürlicherweise sowohl MEL als auch Ustilaginsäure produziert und letztere ebenfalls oberflächenaktive Eigenschaften besitzt, könnte bei Extrakten aus Wildtyp-Zellen kein spezifisches Ergebnis zur Wirkung der MEL bestimmt werden. Daher wurde der Stamm UMa1855 gewählt, der durch Deletion des Transkriptionsfaktors Rua1 defizient in der Produktion von Ustilaginsäure ist (Teichmann et al., 2010). Da weiterhin bei der Nutzung von Rohextrakten ein Einfluss anderer zellulärer Bestandteile nicht ausgeschlossen werden kann, wurde außerdem ein Kontrollextrakt mittels des Stammes UMa2112 erstellt, der durch Deletion der Gene rua1 und cyp1 weder Ustilaginsäure noch MEL produzieren kann (Hewald et al., 2005). Bei alleiniger Applikation des MEL-Rohextrakts waren keine antibakteriellen Effekte im Agardiffusionstest erkennbar. Allerdings

traten bei der Applikation des MEL-Rohextrakts mit Prodigiosin kombinatorische Effekte auf. Bei der Anwendung von 50 μg MEL-Rohextrakt und 10 μg Prodigiosin pro Celluloseblättchen war ein Hemmhof von 3,1 mm zu erkennen (Abbildung 22 C).



Abbildung 22: Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und Mannosylerythritollipiden gegen *C. glutamicum* im Agardiffusionstest.

(A) Das hier verwendete Prodigiosin wurde heterolog in P. putida KT2440 hergestellt und anschließend gereinigt, sodass es mit einer Reinheit von 97 % eingesetzt werden konnte. Die Mannosylerythritollipide wurden als Rohextrakt (bestehend aus den Kongeneren MEL-A, MEL-B, MEL-C und MEL-D) aus Kulturen der U. maydis-Mutante UMa1855 gewonnen. Die gezeigte Struktur stellt das Grundgerüst von MEL der verschiedenen Kongenere (MEL-A: $R^1 = R^2 = Acetyl;$ MEL-B: $R^1 = Acetyl, R^2 = H;$ MEL-C: R^1 = Acetyl, R^2 = H; MEL-D: R^1 = R^2 = H) dar, wobei die Fettsäuren variieren können (*n*, *m*). Auf Basis des Vergleichs von Ausbeuten der Kulturen weiterer U. maydis-Stämme wurde für das Extrakt eine Reinheit von 13 % angenommen (Rechnung siehe Kapitel 2.8). (B) Die beiden Stoffe wurden in Ethanol (p.a.) gelöst und jeweils in den Mengen 10, 25 und 50 μg pro Celluloseblättchen im Agardiffusionstest gegen C. glutamicum ATCC 13032 eingesetzt. Als Kontrolle (0 μg pro Celluloseblättchen) diente das verwendete Lösungsmittel (Ethanol). Prodigiosin wurde entlang der X-Achse und das MEL-Extrakt entlang der Y-Achse aufgetragen. Die verwendeten Konzentrationen des MEL-Extrakts beziehen sich auf das eingewogene Rohextrakt und nicht den reinen MEL-Anteil. Die mit den Stoffen versehenen Celluloseblättchen wurden auf einen C. alutamicum-Ausstrich auf einer LB-Agarplatte aufgelegt und diese nach der Rasenbildung durch Inkubation bei 30 °C über Nacht (20 h) fotodokumentiert. Bei dem gezeigten Bild handelt es sich um ein repräsentatives Ergebnis einer Dreifachbestimmung. (C) Die Größen der Hemmhöfe sind in mm als Durchmesser minus der Größe der Celluloseblättchen von 6 mm angegeben. Die tabellarisch angegebenen Werte zeigen die Mittelwerte der Hemmhöfe der Dreifachbestimmung mit den entsprechenden Standardabweichungen. In grau hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche kleiner 1 mm sind. Farbig hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche größer oder gleich 1 mm sind.

Bei gleichbleibender Menge an MEL und steigender Prodigiosinmenge nahm die Hemmhofgröße, wie bereits in den vorherigen Agardiffusionstest beobachtet, ab. Um zu überprüfen, ob die Verunreinigungen mit *U. maydis*-Bestandteilen, welche in dem MEL-Rohextrakt angenommen werden, einen Einfluss auf diesen kombinatorischen antibakteriellen Effekt haben, wurde das Extrakt des Ustilaginsäure- und MEL-defizienten Stammes UMa2112 als Negativkontrolle in den üblichen Mengen von 10, 25 und 50 µg pro Celluloseblättchen gegen Prodigiosin in denselben Konzentrationen aufgetragen (Anhang-Abbildung 2). Weder die alleinige Applikation des Kontrollextrakts noch der kombinierte Einsatz mit Prodigiosin führte zu einer Bildung von deutlichen Hemmhöfen. Schlussendlich ist der verstärkte kombinatorische antibakterielle Effekt zwischen dem MEL-Rohextrakt und Prodigiosin demnach auf MEL und nicht auf die sonstigen *U. maydis*-Bestandteile des Extrakts zurückzuführen. Somit lag ebenfalls zwischen Prodigiosin und den aus *U. maydis* stammenden Biotensiden MEL eine gesteigerte kombinatorische antibakterielle Wirkung vor.

Als Drittes wurde N-Myristoyltyrosin in die Reihe der getesteten Biotenside aufgenommen, da erste Experimente in der oben genannten Masterarbeit (Hage-Hülsmann, 2015) bereits darauf hindeuteten, dass diese Verbindung eine gesteigerte antibakterielle Wirkung zusammen mit Prodigiosin in einem Agardiffusionstest zeigt. Hier sollten nun diese Ergebnisse im Vergleich mit den übrigen Biotensiden überprüft werden. Das Biotensid N-Myristoyltyrosin und Prodigiosin wurden nach beschriebenem Protokoll im Agardiffusionstest gegen C. glutamicum eingesetzt und die entsprechende Ethanolkontrolle mitgeführt (Abbildung 23). Nachfolgend wird ein einzelner, repräsentativer Agardiffusionstest, welcher verschiedene Ergebnisse von Mehrfachbestimmungen, bei denen Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin mittels Agardiffusionstests gegen C. glutamicum getestet wurden, detailliert beschrieben. Die alleinigen Prodigiosin-Auftragungen resultierten in den bekannten Hemmhöfen der Größe < 1 mm bei allen verwendeten Mengen. Die separate Applikation des Biotensids N-Myristoyltyrosin zeigte bereits bei 10 µg pro Celluloseblättchen einen kleinen Hemmhof der Größe 1,3 mm. Mit steigender Menge an N-Myristoyltyrosin wurde der Hemmhof größer, sodass bei 50 µg N-Myristoyltyrosin ein Hemmhof von 2,0 mm sichtbar war. Diese durch N-Myristoyltyrosin hervorgerufenen Hemmhöfe wurden durch die Kombination mit 10 µg Prodigiosin pro Celluloseblättchen erheblich größer. So wurden in den genannten Kombinationen Hemmhöfe von 5,7 mm bis hin zu 6,9 mm gemessen. Bei 25 µg Prodigiosin pro Celluloseblättchen stieg die Hemmhofgröße mit zunehmender Menge an N-Myristoyltyrosin ebenfalls. Die verhältnismäßig großen Hemmhöfe deuten darauf hin, dass Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin kombiniert vergleichsweise stark antibakteriell wirken. Dieser starke kombinatorische antibakterielle Effekt beider Sekundärmetabolite war vor allem bei dem Einsatz von 50 µg N-Myristoyltyrosin zusammen mit 10 µg Prodigiosin deutlich zu erkennen. Bei alleiniger Anwendung von 50 µg N-Myristoyltyrosin

ergab sich ein Hemmhof mit einer Größe von 2,0 mm. Für die alleinige Prodigiosin-Applikation lag entsprechend der vorherigen Ergebnisse ein Hemmhof der Größe von < 1 mm vor. Damit ergibt sich eine theoretische additive Hemmhofgröße von ungefähr 3 mm. Die gemeinsame Anwendung resultierte jedoch in einem Hemmhof von 6,9 mm. Damit war dieser Hemmhof mehr als doppelt so groß wie die theoretische additive Hemmhofgröße. Des Weiteren sind bei den Kombinationen die zuvor beschriebenen konzentrationsabhängigen Effekte deutlich zu erkennen. So wurden die Hemmhöfe bei gleichbleibender Biotensidmenge von 50 μg pro Celluloseblättchen und sinkender Prodigiosinmenge konstant kleiner, bis schlussendlich die Größe von < 1 mm erreicht war, welche den Hemmhofgrößen bei alleiniger Prodigiosin-Anwendung entsprach. Damit konnten die Ergebnisse der oben erwähnten Masterarbeit bestätigt werden und vergleichend mit den obigen Ergebnissen evaluiert werden. Insgesamt liegt ein starker konzentrationsabhängiger Kombinatorischer antibakterieller Effekt zwischen Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin gegen *C. glutamicum* vor.



Abbildung 23: Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin gegen *C. glutamicum* im Agardiffusionstest.

(A) Das hier verwendete Prodigiosin wurde heterolog in *P. putida* KT2440 hergestellt und anschließend gereinigt, sodass es mit einer Reinheit von 97 % eingesetzt werden konnte. *N*-Myristoyltyrosin wurde chemisch nach bestehendem Protokoll synthetisiert (Thies *et al.*, 2016). (B) Die beiden Stoffe wurden in Ethanol (p.a.) gelöst und jeweils in den Mengen 10, 25 und 50 µg pro Celluloseblättchen im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Als Kontrolle (0 µg pro Celluloseblättchen) diente das verwendete Lösungsmittel (Ethanol). Prodigiosin wurde entlang der X-Achse und *N*-Myristoyltyrosin entlang der Y-Achse aufgetragen. Die mit den Stoffen versehenen Celluloseblättchen wurden auf einen *C. glutamicum*-Ausstrich auf einer LB-Agarplatte aufgelegt und diese nach der Rasenbildung durch Inkubation bei 30 °C über Nacht (20 h) fotodokumentiert. Bei dem gezeigten Bild handelt es sich um ein repräsentatives Ergebnis verschiedener Mehrfachbestimmungen. Die Größen der Hemmhöfe sind in mm als Durchmesser minus der Größe der Celluloseblättchen von 6 mm angegeben. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Zusammenfassend wurden verstärkte gemeinsame antibakterielle Effekte für die getesteten Kombinationen bestehend aus Prodigiosin und jeweils einer Biotensidkomponente (Rhamnolipide, MEL bzw. N-Myristoyltyrosin) aufgezeigt. Damit wurde gezeigt, dass das Prinzip der Wirkverstärkung auch auf diese Biotenside übertragbar ist. Bei der Untersuchung der gemeinsamen Wirkung von Prodigiosin und Rhamnolipiden war neben der kombinierten Wirkung beider Verbindungen ebenfalls eine leichte alleinige Aktivität der Biotenside gegen C. glutamicum erkennbar (vgl. Abbildung 21 B). Generell sind sowohl separate sowie kombinierte antibiotische Eigenschaften von diversen Rhamnolipiden vielfach charakterisiert. Rhamnolipide können etwa das Wachstum der Grampositiven Bakterien B. subtilis, S. aureus, Staphylococcus epidermidis und Listeria monocytogenes hemmen (Samadi et al., 2012). Des Weiteren zeigt die Studie, dass der gemeinsame Einsatz von Rhamnolipiden und Oxacillin gegen diverse MRSA-Stämme die Wirkung des Antibiotikums verstärkte, sodass in einigen Fällen eine deutliche Synergie vorlag. Synergien zwischen Rhamnolipiden und dem zur Bekämpfung von Lebensmittelpathogenen eingesetzten antibiotisch wirkenden Peptid Nisin gegen L. monocytogenes sind ebenso beschrieben (Magalhães & Nitschke, 2013). Rhamnolipide wurden des Weiteren für antimikrobielle Anwendungen im Bereich der Mundhygiene evaluiert. Wie für die kombinierte Anwendung von Triton X-100 und Chlorhexidin beschrieben (vgl. Kapitel 3.1.2.1), erhöhte sich die antibakterielle Wirkung bei kombinierter Applikation von Rhamnolipiden und Chlorhexidin gegen typische mundpathogene Bakterien (Elshikh et al., 2017). In derselben Untersuchung wurden zudem gesteigerte Aktivitäten bei der Kombination von Rhamnolipiden und den Antibiotika Tetracyclinhydrochlorid bzw. Ciprofloxacin nachgewiesen.

Für die hier als zweites zusammen mit Prodigiosin evaluierten Biotenside MEL sind generell antibakterielle Eigenschaften bekannt (Coelho *et al.*, 2020), wobei diese in nur wenigen Studien anhand von MIC-Werten charakterisiert wurden. Die antibakterielle Aktivität von MEL gegen das Gram-positive Bakterium *B. cereus* etwa wurde detailliert untersucht (Shu *et al.*, 2019). Eine ältere Testreihe aus dem Jahr 1993 beschreibt die Wirkung von MEL gegen sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien, im Zuge derer Unterschiede in der Wirkintensität zweier untersuchter MEL-Derivate beschrieben wurden (Kitamoto *et al.*, 1993). Diese Varianz der Wirksamkeit zeigte sich ebenfalls in einer aktuelleren Untersuchung von synthetisch hergestellten MEL-Derivaten mit unterschiedlichen Alkyl-Kettenlängen, wobei einige Derivate starke Wirkungen gegen die Grampositiven Bakterien *Micrococcus luteus* und *S. aureus* aufwiesen (Nashida *et al.*, 2018).

Im Vergleich aller vorliegenden Agardiffusionstests untereinander sticht die Kombination von Prodigiosin und dem Biotensid *N*-Myristoyltyrosin heraus. So zeigte die kombinierte Anwendung beider Verbindungen in den hier eingesetzten Mengen die größten Hemmhöfe gegen *C. glutamicum* im Vergleich zu den Kombinationen mit den anderen Biotensiden. Dabei lag wiederum ein starker, konzentrationsabhängiger, kombinatorisch antibakterieller Effekt vor. Diesbezüglich scheint das

Verhältnis der tensidischen Verbindung *N*-Myristoyltyrosin zu Prodigiosin eine entscheidende Rolle zu spielen.

Zusammenfassend konnte in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden, dass eine natürliche, kombinatorisch verstärkte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und Serrawettin W1 aus *S. marcescens* besteht und eine kombinatorische antibakterielle Verstärkung von Prodigiosin zusammen mit allen getesteten strukturell unterschiedlichen synthetischen und biologischen Tensiden ebenso erreicht werden konnte (Tabelle 11).

 Tabelle 11: Übersicht kombinatorischer antibakterieller Effekte zwischen Prodigiosin und tensidischen Verbindungen.

 Prodi.: Prodigiosin; Kombi.: Kombination; X: Wirkung vorhanden; --: Wirkung nicht vorhanden.

Alleinige		Kombinierte		Hemmhofgrößen		
antibakterielle		antibakterielle		bei stärkster		
Wirkung		Wirkung		Kombination		
Prodi.	Tensid	Wirkung- verstärkung	Konzentrations- abhängigkeit	Prodi.	Tensid	Kombi.

Prodigiosin + Serrawettin W1										
Х		Х	Х	< 1 mm	0 mm	3,7 mm				
Prodigiosin + Triton X-100										
Х		Х	Х	< 1 mm	0 mm	3,4 mm				
Prodigiosin + SDS										
Х	Х	Х	Х	< 1 mm	6,8 mm	12,1 mm				
Prodigiosin + Tween 20										
Х		Х		< 1 mm	0 mm	2,0 mm				
Prodigiosin + Rhamnolipide										
Х	Х	Х	Х	< 1 mm	2,2 mm	5,5 mm				
Prodigiosin + Mannosylerythritollipide										
Х		Х	Х	< 1 mm	0 mm	3,1 mm				
Prodigiosin + N-Myristoyltyrosin										
Х	X	X	X	< 1 mm	2,0 mm	6,9 mm				

Dies legt nahe, dass dieser Effekt auf die Oberflächenaktivitäten der tensidischen Verbindungen zurückzuführen ist. Dabei können die beobachteten Unterschiede in den wirkverstärkenden Effekten der einzelnen Tenside in diesem Fall nicht mit deren bekannten physikochemischen Eigenschaften korreliert werden (Anhang-Tabelle 1). Grundsätzlich könnte dabei zum einen die Löslichkeit des hydrophoben Pigments verbessert werden. Zum anderen könnten die Bakterien durch das Angreifen der bakteriellen Membran zusätzlich geschwächt werden. Schlussendlich bestätigen die Ergebnisse, dass die natürliche Wirkverstärker-Komponente Serrawettin W1 gegen andere Verbindungen, die zu der Klasse der Tenside gehören und dementsprechend Oberflächenaktivitäten besitzen,

ausgetauscht werden kann. In den Untersuchungen der Biotenside kristallisierte sich *N*-Myristoyltyrosin als besonders geeignet für den kombinierten Einsatz mit Prodigiosin in der antibiotischen Anwendung gegen *C. glutamicum* heraus, weshalb weiterführende, detailliertere Untersuchungen dieser Kombination durchgeführt wurden.

3.1.2.3 Quantitative und qualitative Charakterisierung der kombinatorisch verstärkten antibakteriellen Wirkung von Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin

Während der vorherigen Untersuchungen kombinatorisch antibakterieller Wirkungen von Prodigiosin und ausgewählten Biotensiden ragte vor allem das Biotensid *N*-Myristoyltyrosin als vielsprechender Kandidat zur effektiven Steigerung der antibakteriellen Wirkung von Prodigiosin heraus. Daher wurde im Folgenden eine genauere Untersuchung dieser antibakteriell wirkenden Kombination durchgeführt. Im Zuge dessen wurden minimale Hemmkonzentrationen sowie minimale bakterizide Konzentrationen ermittelt. Anschließend wurden antibiotische Effekte der Sekundärmetabolite auf Einzelzellebene betrachtet.

3.1.2.3.1 Bestimmung kombinierter minimaler Hemmkonzentrationen

Um die alleinigen und gemeinsamen antibakteriellen Eigenschaften von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin genauer zu charakterisieren, wurden zunächst minimale Hemmkonzentrationen (engl.: *minimum inhibitory concentration* = MIC) bestimmt. Die dafür eingesetzten Testsysteme lehnen an die Richtlinien des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) an. Das EUCAST ist ein wissenschaftliches Komitee, dessen Ziel die Standardisierung antimikrobieller Empfindlichkeitsprüfungen mittels einer europäischen Norm ist. Damit werden eine Vereinheitlichung und dementsprechend eine Vergleichbarkeit von Tests zu Antibiotika-Wirkungen zwischen verschiedenen Laboratorien geschaffen. Ein amerikanisches Äquivalent ist die Organisation Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), deren Richtlinien den EUCAST-Vorgaben ähnlich sind. Da es sich bei den EUCAST- und CLSI-Anweisungen um Vorschriften für die Untersuchung etablierter Antibiotika handelt, wurden hier die Rahmenbedingungen der angewendeten Tests an die Fragestellung der Evaluierung antibakterieller Wirkungen nicht klinisch etablierter, bioaktiver Sekundärmetabolite angepasst (vgl. Kapitel 2.7.2). Nichtsdestotrotz wurden die EUCAST-Definitionen, wenn nicht anders kenntlich gemacht, beibehalten. So handelt es sich nach der Definition des EUCAST bei der MIC um die niedrigste eingesetzte Konzentration des jeweiligen Stoffes, bei der unter definierten Rahmenbedingungen kein sichtbares Wachstum der bakteriellen Zellen in einer Flüssigkultur zu erkennen ist (EUCAST, 2000). Zur Bestimmung antibakterieller Aktivitäten mittels MIC-Werten können Flüssigkulturen sowohl im Makro- (vgl. Kapitel 2.7.2.1) als auch im

Mikromaßstab (vgl. Kapitel 2.7.2.2) angesetzt werden (CLSI, 2012; EUCAST, 2000; Jorgensen & Ferraro, 2009). Beide Testvarianten ermöglichen die Determinierung von minimalen Hemmkonzentrationen einzelner sowie in Kombination angewendeter Substanzen. Im Zuge der Ermittlung kombinatorisch antimikrobieller Wirkungen werden üblicherweise sogenannte *Checkerboard*-Anordnungen verwendet (Bonapace *et al.*, 2002; Mackay *et al.*, 2000). Dabei werden zwei zu testende Verbindungen, wie in den oben beschriebenen Agardiffusionstests, gegeneinander in X- und Y-Richtung mit jeweils steigenden Konzentrationen aufgetragen. Die Stoffe werden in Verdünnungsreihen zumeist mit einem Verdünnungsfaktor von zwei verwendet, sodass beispielsweise Konzentrationsreihen mit Werten von 0, 1, 2, 4, 8, 16 und 32 μg mL⁻¹ entstehen.

Für die Untersuchung der kombinatorischen antibakteriellen Effekte von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin wurde der Checkerboard-Test im Makromaßstab (vgl. Kapitel 2.7.2.1) durchgeführt. Es wurden zunächst Kulturen von C. glutamicum in 10 mL LB-Medium inokuliert und diese über Nacht bei 30 °C schüttelnd bebrütet. Die Übernachtkulturen wurden für das Inokulieren der Testkulturen in einer Round Well Plate verwendet. Dies ist eine Kunststoffplatte der Firma m2p-Labs mit 48 runden Wells, welche bei einer Anwendung unter der hier eingesetzten Schüttelfrequenz von 600 UpM ein maximales Füllvolumen von 2400 μL besitzen. Hier wurde jedoch mit einem Kulturvolumen von 800 µL gearbeitet. Die Kulturen wurden in LB-Medium mit einer anfänglichen Startzelldichte von OD_{580 nm} = 0,05 angesetzt. Zu jeder Kultur wurden die in Ethanol (p.a.) gelösten zu testenden Stoffe hinzugegeben, wobei das Zugabevolumen 3 % des gesamten Kulturvolumens entsprach. Das reine Lösungsmittel wurde ebenfalls in der Kontrolle eingesetzt. Kulturen mit der Zugabe von Streptomycin dienten zur Generierung von Referenzwerten. Das Antibiotikum wurde beginnend mit einer Konzentration von 20,48 µg mL⁻¹, die durch zweifache Verdünnungsschritte bis zu der niedrigsten Konzentration von 0,005 μ g mL⁻¹ eingestellt wurde, eingesetzt. Das gut wasserlösliche Streptomycin wurde dazu vor der Zugabe in konzentrierter Form in wässrigem LB-Medium gelöst. Um äquivalente Daten zu den Experimenten mit Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin, bei denen die Stoffe in Ethanol gelöst waren, zu erhalten, wurden zusätzlich 3 % Ethanol hinzugegeben. Prodigiosin wurde beginnend mit 0,005 µg mL⁻¹ bis hin zu 20,48 µg mL⁻¹ und *N*-Myristoyltyrosin von 2 μ g mL⁻¹ bis hin zu einschließlich 32 μ g mL⁻¹ verwendet. Die Kultivierungen wurden in einem Eppendorf ThermoMixer C bei 30 °C und 600 UpM für 20 h durchgeführt. Nach der Inkubation wurde die optische Dichte der Kulturen in 100 µL-Proben mithilfe eines Plattenphotometers ermittelt. Um Interferenzen mit dem Pigment Prodigiosin, das Absorptionsmaxima in wässrigem Medium im Wellenlängenbereich von ungefähr 450-600 nm aufweist (Monk, 1957), während der Messung der optischen Dichte zu vermeiden, wurde bei einer Wellenlänge von λ = 650 nm gemessen. In diesem Bereich zeigt Prodigiosin in wässrigen Kulturen keine Absorption. Die Messwerte wurden rechnerisch adaptiert, um die Daten in den gängigeren OD-Werten, die Geräte Labor-üblicher Spektralphotometer mit Messproben in Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm produzieren, angeben zu können (vgl. Kapitel 2.7.2.1). Diese Daten sind in einer Grafik zusammenfassend dargestellt (Abbildung 24).



Abbildung 24: Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin gegen *C. glutamicum* im Makrodilutionstest zur MIC-Bestimmung.

Flüssigkulturen des Bakteriums *C. glutamicum* ATCC 13032 mit einem Gesamtvolumen von 800 µL wurden zur Bestimmung der MIC-Werte verwendet. Die Stoffe Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin wurden jeweils in Verdünnungsreihen mit einem Verdünnungsfaktor von zwei gegeneinander entsprechend einer *Checkerboard*-Matrix aufgetragen (**A**). Eine Verdünnungsreihe von Streptomycin wurde als Referenz mitgeführt (**B**). Nach 20 h Inkubation der Kulturen bei 30 °C unter permanentem Schütteln (600 UpM) wurde die optische Dichte jeder Kultur zur Bestimmung des Zellwachstums gemessen. Dafür wurden die Kulturen zunächst gewaschen, sodass die Zellen in frischem LB-Medium vorlagen. Von jeder gewaschenen Kultur wurden 100 µL-Proben entnommen und diese in einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 650$ nm gemessen. Durch die Anwendung eines Korrekturfaktors wurden die Messdaten in OD-Werte einer standardisierten OD-Messung (OD_{650 nm}) im Küvetten-Maßstab mit 1 mL Volumen und einer Schichtdicke von 1 cm konvertiert und hier angegeben. Die Farbskala repräsentiert das Wachstum der Kulturen. Grau: Optische Dichte ab 0,06; mittelmäßig beeinflusstes Zellwachstum ab einer optischen Dichte von 1,00; unbeeinflusstes Zellwachstum bei einer optischen Dichte $\geq 4,10$. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und den entsprechenden Standardabweichungen. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Die Stärke des Zellwachstums ist durch einen Farbcode kenntlich gemacht. Kulturen, in denen eine bakterielle Zellteilung zu verzeichnen war, wurden in verschiedenen Blau-Schattierungen gekennzeichnet. In grau hinterlegte Werte lagen unter dem OD_{650 nm}-Messwert 0,06 und wiesen

somit kein Wachstum auf. Oberhalb dieses Grenzwertes wurde das Wachstum in drei Kategorien entsprechend seiner Stärke unterteilt. So wurde ein Wachstum bis 1,00 als stark beeinträchtig, ein Wachstum ab 1,00 bis 4,10 als mäßig beeinträchtigt und ein Wachstum ab 4,10 und höher als ununterscheidbar zur Kontrolle bezeichnet.

Während für *N*-Myristoyltyrosin eine MIC von 32 μ g mL⁻¹ determiniert werden konnte, lag die MIC des Stoffes Prodigiosin bei 2,56 μ g mL⁻¹. Für die Streptomycin-Positivkontrolle konnte ein MIC-Wert von 10,24 μ g mL⁻¹ festgelegt werden. Eine starke Reduktion des Wachstums wurde bereits ab \geq 1,28 μ g mL⁻¹ Streptomycin beobachtet (Abbildung 24 B, hellblauer Bereich). Somit befand sich der für das etablierte Antibiotikum ermittelte MIC-Wert im selben Konzentrationsbereich wie die alleinigen MIC-Werte von Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin. Diese Übereinstimmung der antibakteriellen Wirkintensität zwischen den drei Verbindungen konnte zuvor im Agardiffusionstest nicht gezeigt werden. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Diffusion vom wasserlöslichen Streptomycin in den Agar weniger limitiert ist als die Diffusion hydrophober Verbindungen wie etwa Prodigiosin. Demnach unterstreichen die unterschiedlichen Ergebnisse die große Bedeutung, die dem angelegten Testsystem zukommt. Des Weiteren ist zu beachten, dass jegliche Veränderungen im experimentellen Aufbau (z. B. Mikro- vs. Makromaßstab) zu leichten Schwankungen der ermittelten MIC-Werte führen können.

In dem hier durchgeführten Checkerboard-Test im Makromaßstab sanken bei der kombinatorischen Applikation von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin die MIC-Werte beider Sekundärmetabolite deutlich. Die MIC von Prodigiosin wurde zusammen mit 16 µg mL⁻¹ N-Myristoyltyrosin auf 0,005 µg mL⁻¹ und bei 8 µg mL⁻¹ N-Myristoyltyrosin auf eine Prodigiosin-MIC von 1,28 µg mL⁻¹ herabgesetzt. Im sub-MIC-Bereich von 0,32 bis 1,28 µg mL⁻¹ Prodigiosin lag das Wachstum zwischen OD_{650 nm}-Werten von 0,09 und 0,69 und war damit stark beeinträchtigt. Diese Bereiche, in denen ein deutlich reduziertes Wachstum detektiert wurde und welche in Konzentrationsbereichen unterhalb der MIC auftreten, sind aus anderen Checkerboard-Untersuchungen ebenfalls bekannt (Stokes et al., 2017). Bei einer Zugabe von 2 bis 8 μ g mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin wurde der wachstumsinhibierende Effekt von Prodigiosin weiter ausgedehnt. Dementsprechend war das Wachstum bei 0,16 µg mL⁻¹ Prodigiosin zusammen mit den genannten N-Myristoyltyrosin-Konzentrationen im Vergleich zur alleinigen Applikation ebenfalls stark beeinträchtigt. In der Kombination von 0,08 µg mL⁻¹ Prodigiosin zusammen mit 8 µg mL⁻¹ N-Myristoyltyrosin lag bei der gemeinsamen Anwendung eine signifikant stärkere Hemmung des Wachstums vor als für die jeweilige einzelne Applikation zu beobachten war. In den höheren Konzentrationsbereichen von 5,12 bis 20,48 µg mL⁻¹ Prodigiosin zusammen mit 8 bis 32 µg mL⁻¹ N-Myristoyltyrosin schienen leicht antagonistische antibakterielle Aktivitäten der Stoffkombination aufzutreten. Dementsprechend war bei den genannten Kombinationen des hohen Konzentrationsbereichs mit messbaren optischen Dichten von bis zu 0,15 wieder ein geringes
Wachstum zu verzeichnen. Zusammengenommen zeigten die Kombinationen von Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin abhängig von den eingesetzten Mengen überwiegend verstärkte gemeinsame antibakterielle Wirkungen. Um die beobachteten kombinatorischen antibakteriellen Effekte rechnerisch zu beschreiben und zu klassifizieren, wurden *Fractional Inhibitory Concentrations* (FIC)-Werte und **FIC-Indices** (FICI) bestimmt (vgl. Kapitel 2.7.2, Tabelle 12).

Tabelle 12: Klassifizierung des kombinatorischen antibakteriellen Effekts von Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin gegen *C. glutamicum*.

MIC: minimale Hemmkonzentration in μg mL⁻¹; FIC: *Fractional Inhibitory Concentrations*; FICI: FIC-Index; Kombi: Kombination; P: Prodigiosin; *N*: *N*-Myristoyltyrosin

MIC	Р			2,56		
IVIIC allein	N			32		
		MIC _{Kombi}	FIC	FIC-Index		
Kombination	Р	0,005	0,002	0 502		
Kombination	N	16	0,5	0,502		
Kombination II	Р	1,28	0,5	0 75		
	N	8	0,25	0,70		
durchschnittlicher FICI				0,626		

Die FIC-Werte stellen die relative Wirkung der Stoffkombination im Verhältnis mit der Einzelwirkung dar und werden durch den Quotienten etwa von MIC(Kombination)/MIC(Prodigiosin) gebildet. Der FICI wird durch Addition der beiden FICs, die sich auf Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin beziehen, gebildet und dient als Maß für die Reduktion der in Kombination zur Inhibierung des bakteriellen Wachstums benötigten Mengen parallel eingesetzter Verbindungen. Dabei kommt ein Wert von 1 zustande, wenn die beiden Stoffe in Kombination weder stärker noch schwächer wirken, während Werte <1 eine verstärkte Wirkung und Werte >1 eine verringerte Wirkung bei Kombination anzeigen. Die FICI, welche für die gemeinsame Applikation von (i) 16 µg mL⁻¹ N-Myristoyltyrosin und 0,005 µg mL⁻¹ Prodigiosin und (ii) 8 μ g mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin und 1,28 μ g mL⁻¹ Prodigiosin bestimmt wurden, liegen bei 0,502 und 0,75 (Tabelle 12). Unabhängig von der Totalreduktion können die spezifischen Reduktionen jedes einzelnen Stoffes in signifikant unterschiedlichen Größenbereichen liegen. Dies wird hier etwa in Kombination I sehr deutlich, bei der Prodigiosin eine 512-fache Reduktion erfährt und N-Myristoyltyrosin hingegen eine nur 2-fache. Um fehlerhafte Einteilungen zu vermeiden legt EUCAST als Grenzwert zur eindeutigen Klassifizierung von "Synergie" einen FICI <0,5 fest, während die Grenzwerte in diversen Publikationen höher angesetzt werden (vgl. Kapitel 2.7.2, Tabelle 8). Auf dieser Basis ist festzustellen, dass sowohl die jeweiligen FICI der beiden Kombinationen, als auch der

durchschnittliche FICI der kombinatorischen Wirkungen von Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin gegen *C. glutamicum* eine deutliche Tendenz zur Synergie anzeigen.

3.1.2.3.2 Bestimmung kombinierter minimaler bakterizider Konzentrationen

Die bisherigen Ergebnisse beruhen auf der Beurteilung der hemmenden Wirkung der Verbindungen auf das bakterielle Wachstum. Dabei sind allerdings keine Rückschlüsse auf das Überleben oder Absterben der bakteriellen Zellen im Fall der Inhibition möglich, wozu wiederum weitere Untersuchungen mit einem definierten experimentellen Aufbau durchgeführt werden können. Zur weiteren Beschreibung der alleinigen und kombinierten antibakteriellen Wirkung von Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin wurden daher minimale bakterizide Konzentrationen (engl.: *minimum bactericidal concentrations* = MBC) bestimmt. Nach EUCAST handelt es sich bei der MBC um die geringste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, angegeben in mg L⁻¹, bei der 99,9 % der Bakterien einer Kultur mit definiertem Inokulum innerhalb einer festgesetzten Zeit abgetötet werden (EUCAST, 2000). Um dies zu überprüfen, werden den Kulturen nach der Exposition mit den antibakteriellen Stoffen üblicherweise Proben entnommen und diese in Abwesenheit der Stoffe auf Agarplatten inkubiert, um die Zahl der überlebenden Zellen zu bestimmen.

Die MBC-Werte wurden anhand der Kulturen, welche auch zur Ermittlung der MIC-Werte verwendet wurden, bestimmt. Dazu wurden die Kulturen nach der Inkubation zentrifugiert und der Überstand, welcher die zu testenden Verbindungen Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin enthielt, verworfen. Die erhaltenen Zellpellets wurden in 800 μ L frischem LB-Medium resuspendiert. Dieser Waschschritt, in dem die antibakteriellen Substanzen entfernt wurden, sollte einen unerwünschten Nebeneffekt der zu testenden Substanzen bei der MBC-Bestimmung ausschließen. Aus 1:100-Verdünnungen jeder Kultur wurden 3 μL auf LB-Agarplatten ohne Antibiotika-Zusätze gegeben und bei 30 °C über Nacht erneut inkubiert. Die auf diese Weise erzeugten Agarplatten dienten, wenn möglich, zur Ermittlung der Lebendzellzahl (jede Kolonie repräsentiert hierbei eine lebende Zelle nach Einwirkung der antibiotischen Substanzen) und somit zur Bestimmung der MBC-Werte. Hierzu wurden zuvor die Zellzahlen, die der Modellorganismus C. glutamicum unter den Testbedingungen erreicht, bestimmt und davon abgeleitet, welche Anzahl 0,1 % entspricht. Unter den gewählten Kultivierungsbedingungen ergab sich damit ein Wert von bis zu 55 Kolonien, welche sich nach dem Ausplattieren von 3 µL einer 1:100 verdünnten Kultur bilden und einer Überlebensrate von 0,1 % entsprechen (vgl. Kapitel 2.7.2.1). Bis zu dieser Kolonieanzahl lag dementsprechend in den Testkulturen eine Abtötung von 99,9 % vor, sodass hier MBC-Werte bestimmt werden konnten. Zur Darstellung der Ergebnisse dieser Untersuchungen wurde das Überleben der bakteriellen Zellen mithilfe eines Farb- und Symbolschemas in vier Kategorien unterteilt. Kulturen, in denen 99,9 - 100 %

der Zellen abgestorben waren, wurden in grau und mit einem nicht ausgefüllten Kreissymbol gekennzeichnet. Des Weiteren wurde zwischen einem stark beeinträchtigten (hellblau, Raute), einem mäßig beeinträchtigten (blau, ausgefüllter Kreis) und einem von der Kontrolle ununterscheidbaren Wachstum (dunkelblau, ausgefülltes Quadrat) differenziert (Abbildung 25).



Abbildung 25: Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin gegen *C. glutamicum* im Makrodilutionstest zur MBC-Bestimmung.

Zur Bestimmung der separaten und kombinierten minimalen bakteriziden Konzentrationen (MBC) von Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden Flüssigkulturen im Makrodilutionsmaßstab von 800 μ L verwendet (A). Als Referenz wurde ebenfalls Streptomycin gegen *C. glutamicum* getestet (B). Prodigiosin, *N*-Myristoyltyrosin und Streptomycin wurden in Verdünnungsreihen mit einem Verdünnungsfaktor von zwei eingesetzt. Die Kulturen wurden für 20 h bei 30 °C und permanentem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in frisches LB-Medium ohne die antibakteriellen Stoffe überführt. Jede Kultur wurde 1:100 verdünnt und hiervon 3 μ L auf LB-Agarplatten ohne Antibiotika getropft. Die Inkubation erfolgte für 20 h bei 30 °C. Anschließend wurden die Kolonien gezählt und eine Kategorisierung entsprechend der Anzahl der Kolonien durchgeführt. Eine Abtötung von 99,9 % einer gesamten Kultur wurde durch das Anwachsen von maximal 55 Kolonien angezeigt (graue Schattierung, Kreis). Die niedrigste Konzentration eines Stoffes, bei der dies erreicht wurde, stellt die MBC dar. Des Weiteren wurde wie folgt kategorisiert: (i) stark beeinflusstes Wachstum (hellblaue Schattierung, ausgefüllte Raute); (ii) mittelmäßig beeinflusstes Wachstum (blaue Schattierung, ausgefüllter Kreis); (iii) unbeeinflusstes Wachstums, welches nicht unterscheidbar zur Kontrolle war (dunkelblaue Schattierung, ausgefülltes Quadrat). Die in einem Kästchen dargestellten drei Symbole entsprechen den Ergebnissen einer Dreifachbestimmung. Die Schattierungen spiegeln die gemittelten Ergebnisse wider. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Für Prodigiosin ergab sich demnach eine MBC von 2,56 μg mL⁻¹ und für *N*-Myristoyltyrosin eine MBC von 32 μg mL⁻¹. Damit entsprechen die MBC-Werte den determinierten MIC-Werten. Wie auch zuvor

beschrieben, ist eine stark beeinträchtigte Zellviabilität im Bereich von 0,32 bis 1,28 µg mL⁻¹ Prodigiosin zu verzeichnen. Durch die kombinatorische Applikation mit 2 bis 8 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin wird dieser Effekt auf 0,08 bis 0,16 µg mL⁻¹ Prodigiosin ausgeweitet. Bei 16 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin zusammen mit 0,005 bis 0,32 µg mL⁻¹ Prodigiosin kommt es immer wieder zu einer stark herabgesetzten Überlebensfähigkeit der Zellen. Dieses fluktuiert jedoch, wie die verschiedenen Symbole entsprechend der einzelnen Ergebnisse der Dreifachbestimmungen zeigen. Im Bereich von 0,64 bis 10,24 µg mL⁻¹ Prodigiosin zusammen mit 4 bis 16 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin können des Weiteren leicht antagonistische antibakterielle Effekte beobachtet werden. Diese sind an einer erhöhten Zellviabilität unter- und oberhalb der alleinigen MBC von Prodigiosin zu erkennen. Gegenläufig zu den Ergebnissen der MIC-Bestimmung sind bei der höchsten Prodigiosinkonzentration von 20,48 µg mL⁻¹ und der höchsten Konzentration an *N*-Myristoyltyrosin von 32 µg mL⁻¹ keine lebenden Zellen zu beobachten. Damit scheint eine erste Teilung unter den hohen Konzentrationen beider Stoffe möglich gewesen zu sein. Ein dauerhaftes Überleben kann jedoch nicht sichergestellt werden.

Als Positivkontrolle und Referenz wurde die MBC von Streptomycin gegen *C. glutamicum* unter gleichen Bedingungen bestimmt. Dabei wirkte eine Konzentration von 1,28 µg mL⁻¹ Streptomycin bakterizid. Es fällt auf, dass der MBC-Wert mit 1,28 µg mL⁻¹ Streptomycin unterhalb der zuvor bestimmten MIC von 10,24 µg mL⁻¹ Streptomycin liegt. Jedoch wurde bei der vorherigen MIC-Bestimmung ein stark reduziertes Wachstum ab \geq 1,28 µg mL⁻¹ Streptomycin beobachtet. Diese beiden Beobachtungen könnten auf den antibakteriellen Wirkmechanismus von Streptomycin zurückgeführt werden. Streptomycin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, welches an das S12-Protein der 30S-Unterheit der Ribosomen bindet, sodass die Translation gestört wird und schließlich die Bakterienvermehrung dementsprechend unterbunden ist (Trevor *et al.*, 2015; Wray *et al.*, 2016). Werden die Zellen niedrigen sub-MIC ausgesetzt, so scheinen erste anfängliche Teilungen, wie die Trübungsmessungen der MIC-Bestimmung zeigen, möglich. Jedoch scheinen die gewachsenen Zellen bereits letale Schädigungen zu besitzen, welche eine weitere Vermehrung nicht ermöglichen. Infolgedessen können MBC-Wert bestimmt werden, welche unter dem MIC-Wert liegen. Schlussendlich liegt der MBC-Wert von Prodigiosin mit 2,56 µg mL⁻¹ Streptomycin.

Zusammengenommen lagen die MIC- und MBC-Werte der jeweiligen Verbindungen bei denselben Konzentrationen, sodass Werte von 2,56 µg mL⁻¹ bzw. 32 µg mL⁻¹ für Prodigiosin bzw. *N*-Myristoyltyrosin festgelegt werden konnten. Die separate antibakterielle Aktivität für Prodigiosin wurde bereits mehrfach sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien beschrieben (vgl. Kapitel 1.6, Tabelle 1). In der Literatur wurden beispielshalber MIC-Werte in einem Konzentrationsbereich zwischen 1 und 8 µg mL⁻¹ für verschiedene *S. aureus* sowie *Bacillus* sp. Stämme determiniert (Danevčič et al., 2016a; Herráez et al., 2019; Lapenda et al., 2015). Damit befindet sich die hier ermittelte MIC von Prodigiosin gegen das Gram-positive Bakterium C. glutamicum in derselben Größenordnung. Für das Biotensid N-Myristoyltyrosin wurde eine separate antibakterielle Wirkung gegen die Gram-negativen Bakterien Sorangium cellulosum und Chromobacterium violaceum sowie gegen das Gram-positive Bakterium B. subtilis und das hier verwendete Modellbakterium C. glutamicum in einer vorherigen Studie bereits nachgewiesen (Thies et al., 2016). Eine MIC wurde im Zuge der letztgenannten Studie nicht ermittelt. Damit stellen die hier vorliegenden Ergebnisse eine detailliertere Beschreibung des antibakteriellen Effekts des Biotensids dar. Des Weiteren wurde ein kombinatorischer antibakterieller Effekt von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin, welcher als tendenziell synergistisch klassifiziert werden konnte, beschrieben. So konnte durch den Einsatz des Biotensids bei einer Konzentration von 16 µg mL⁻¹ die MIC von Prodigiosin um drei Größenordnungen auf 0,005 μg mL⁻¹ herabgesetzt werden. Die Idee einer kombinierten Applikation von bioaktiven Verbindungen mit einem weiteren Bestandteil, welcher die Bioaktivität der Stoffe verbessern bzw. verstärken soll, ist inzwischen eine gängige sowie viel und divers erforschte Methode (vgl. Kapitel 1.3), bei der häufig eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit der bioaktiven Substanz beispielsweise über einen besseren Transport oder erhöhte Löslichkeit im Vordergrund steht. Im Bereich der antiparasitären Wirkung von Prodigiosin wurde das Prinzip der Kombination mit Nanopartikeln zum verbesserten Transport der bioaktiven Substanz untersucht. Dabei wurde die alleinige antiparasitäre Wirkung von Prodigiosin mit der kombinierten wuchshemmenden Wirkung von Prodigiosin und Silber- bzw. Gold-Nanopartikeln gegen die Parasiten Plasmodium falciparum und Trypanosoma brucei gambiense verglichen (Rahul et al., 2015). Die Evaluierung erfolgte anhand des IC₅₀-Wertes, der die Konzentration der zu testenden Substanz bezeichnet, bei der 50 % des parasitären Wachstums gehemmt wurden. Der jeweilige IC₅₀-Wert der alleinigen Prodigiosin-Applikation konnte durch den kombinierten Einsatz mit Silber- bzw. Gold-Nanopartikeln für beide betrachteten Parasiten und mittels beider Nanopartikel herabgesetzt werden. Damit scheint die kombinierte Applikation von Prodigiosin zusammen mit wirkverstärkenden Molekülen sowohl, wie in dieser Arbeit gezeigt, die antibakterielle als auch die antiparasitäre Wirkung zu verbessern. In derselben Studie wurde zusätzlich das aus dem Bodenbakterium Chromobacterium violaceum stammende bioaktive Pigment Violacein hinsichtlich der alleinigen und der mit Silber- bzw. Gold-Nanopartikeln kombinierten Wirkung betrachtet, wobei keine verbesserte antiparasitäre Aktivität nachgewiesen werden konnte. In einer anderen Studie konnte hingegen die verstärkte antibakterielle Wirkung von Violacein durch kombinierte Anwendung mit Nanopartikeln gegen S. aureus aufgezeigt werden (Martins et al., 2011). Des Weiteren gibt es Untersuchungen kombinierter Applikationen der Verbindung Violacein mit kommerziellen, klinisch etablierten Antibiotika, welche teils als synergistische antibakterielle Effekte klassifiziert werden konnten (Subramaniam *et al.*, 2014). Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesene tendenziell synergistische antibakterielle Effekt der kombinierten Anwendung von Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin ist wenig untersucht, sodass weitere Betrachtungen auf Einzelzellebene durchgeführt wurden.

3.1.2.3.3 Der kombinatorische antibakterielle Effekt auf Einzelzellebene

Die vorherigen Untersuchungen des kombinierten antibakteriellen Effekts von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin anhand der MIC-Werte spiegeln die durchschnittliche Reaktion der Zellkulturen auf die bioaktiven Verbindungen wider. Die MBC-Testergebnisse deuteten jedoch daraufhin, dass sich die Überlebensfähigkeit einzelner C. glutamicum-Zellen innerhalb verschiedener Kulturen, welche jeweils dieselbe Kombination von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin mit Konzentrationen im sub-MIC-Bereich (vgl. Abbildung 25, hellblauer Bereich) enthielten, stark unterscheiden kann. Dementsprechend waren größere Schwankungen bei der Anzahl überlebender Zellen innerhalb einer Dreifachbestimmung zu beobachten, wie die unterschiedlichen Symbole zur Beurteilung des Wachstums gleich angezogener Kulturen verdeutlichen. Um daher der Frage nach einer Uniformität oder einer Heterogenität der zellulären Antwort auf den kombinatorischen antibakteriellen Effekt von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin auf einzelne C. glutamicum-Zellen nachzugehen, wurden Untersuchungen auf Einzelzellebene durchgeführt. Dazu wurde ein mikrofluidisches Testverfahren eingesetzt. Für die Verwendung einer solchen Testmethodik spricht zum einen die nachgewiesene Eignung dieser Systeme für Studien von bakteriellen Antworten auf Antibiotika-Expositionen und zum anderen die Tatsache, dass diverse mikrofluidische Systeme derzeit hinsichtlich der Anwendbarkeit zu klinischen Diagnostikzwecken für schnellere Antibiotika-Empfindlichkeitstests evaluiert werden (Campbell et al., 2016; Kim et al., 2019a, 2019b; Li et al., 2019). Im Rahmen einer dieser Arbeit vorangegangenen Masterarbeit (Hage-Hülsmann, 2015) wurde bereits die Eignung des nachfolgend eingesetzten mikrofluidischen Testsystems für eine Evaluierung antibakterieller Effekte nachgewiesen. Bei dem hier verwendeten mikrofluidischen System handelt es sich um einen Gerätebeziehungsweise Experiment-Aufbau, der es ermöglicht, über einen ausgewählten Inkubationszeitraum in Inkubationskammern das Wachstum von Bakterien in einer zweidimensionalen Mikrokolonie mittels eines Mikroskops kontinuierlich auf Einzelzellebene zeitaufgelöst zu verfolgen. Auswertungsprogramme ermöglichen die genaue Bestimmung der Zelloder Koloniegrößen, die sich während der Inkubation entwickelt haben. Damit kann mittels der hier beschriebenen Technik das Wachstum individueller Zellen verfolgt werden, sodass darauf geschlossen werden kann, ob die zuvor erhaltenen Ergebnisse der anderen Testsysteme zur

Untersuchung antibakterieller Effekte Resultate einer homogenen Zellantwort auf die angewendeten Substanzen waren oder ein heterogenes Zellverhalten vorliegt.

Zur Durchführung des mikrofluidischen Experiments wurde als Modellbakterium weiterhin C. glutamicum ATCC 13032 benutzt. Die Sekundärmetabolite wurden in Konzentrationen von 1 μg mL⁻¹ Prodigiosin und 15 μg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin verwendet. Vorab wurde determiniert, dass bei diesen Konzentrationen das Zellwachstum in der Mikroinkubationskammer jeweils bereits gehemmt wurde, es jedoch nicht zur vollständigen Wachstumsinhibierung der Mikrokultur kam (Daten nicht gezeigt). Diese subletalen, aber wachstumshemmenden Konzentrationen der Stoffe sind essentiell für den hier verwendeten experimentellen Aufbau, damit sowohl die separaten Effekte der Stoffe auf die bakteriellen Zellen als auch mögliche verstärkte kombinatorische Effekte untersucht werden können. Zunächst wurde C. glutamicum, wie in Kapitel 2.7.3 detailliert beschrieben, bis zu einer OD_{580 nm} von 0,25 bis 0,5 im Erlenmeyerkolben angezogen und anschließend für das Inokulieren der Mikrochips verwendet. Dabei wurde die Zellsuspension durch die Kanäle des Mikrochips gespült, um so einzelne Zellen in die Inkubationskammern einzubringen. Danach folgte eine 3-stündige Inkubationszeit, in der die Zellen durch Perfusion mit frischem LB-Medium versorgt wurden. Diese Zeitspanne diente der Adaptation der Zellen an die Kultivierung im Mikrochip. Anschließend folgte die Zugabe von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin, welche dem jeweiligen LB-Medium zugesetzt wurden, durch kurzzeitige Perfusion bei erhöhter Flussrate. Da die Substanzen in Ethanol (p.a.) gelöst vorlagen, wurde eine Kontrolle, welche aus LB-Medium mit 3 % Ethanol bestand, mitgeführt. Nachdem jede Inkubationskammer mit den entsprechenden Medien versetzt war, wurde der Fluss ausgestellt und die Inkubation bei 30 °C fortgesetzt, sodass insgesamt über 20 h kultiviert und das Zellwachstum dokumentiert wurde.

Nach Beendigung des Experiments wurden Bilddateien in Zeitabständen von 2,5 h extrahiert und im Zeitstrahl angeordnete Bildserien dargestellt (Abbildung 26 A). Nach 12,5 h waren ¾ der Inkubationskammer im Fall in der Kontrolle mit *C. glutamicum* bewachsen. Zum Zeitpunkt 15 h war die Kammer in der Kontrolle bereits vollständig gefüllt. Bei Zugabe von 1 µg mL⁻¹ Prodigiosin waren ¾ der Kammer erst nach 15 h bewachsen. Damit war eine Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen unter dem Einfluss von Prodigiosin zu verzeichnen. Die Zugabe von 15 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin resultierte ebenfalls in einer reduzierten Wachstumsgeschwindigkeit. Hier waren ¾ der Inkubationskammer erst am Ende des Experiments nach 20 h bewachsen. Bei der gemeinsamen Anwendung von 1 µg mL⁻¹ Prodigiosin zusammen mit 15 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin war in einigen Inkubationskammern ein noch stärkerer wachstumshemmender Effekt zu erkennen.





Dargestellt sind Flüssigkulturen im Mikrochip in einem mikrofluidischen System. Die Kultivierungskammern des Mikrochips wurden zum Zeitpunkt "0 Stunden" mit C. qlutamicum ATCC 13032 beimpft. Nach einer Adaptationsphase der Zellen von ungefähr 3 h, während der eine Perfusion mit LB-Medium stattfand, erfolgte der Wechsel zu LB-Medium, welches die zu testenden Stoffe enthielt. Da die Substanzen in Ethanol (p.a.) gelöst zugegeben wurden, diente LB-Medium mit 3 % Ethanol als Kontrolle. Mittels eines Mikroskops, das mit einer Kamera ausgestattet war, wurden die Kultivierungskammern über 20 h in Intervallen von 10 Minuten dokumentiert. (A) Die Mikrokolonien sind zu ausgewählten Zeitpunkten im 2,5 h Abstand gezeigt. Reihe 1: Wachstum der Kontrolle, Reihe 2: Wachstum bei 1 µg mL⁻¹ Prodigiosin, Reihe 3: Wachstum bei 15 μg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin, Reihe 4: Wachstum bei kombinierter Zugabe von 1 μg mL⁻¹ Prodigiosin und 15 μg mL⁻¹ N-Myristoyltyrosin. (B) Es ist die Entwicklung der Flächen repräsentativer Kolonien dargestellt, die dem stattgefundenen Zellwachstum über den gemessenen Zeitraum entspricht. Die Daten stammen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Insgesamt wurde in den drei Experimenten die Entwicklung von ungefähr 60 einzelnen Kolonien pro Bedingung verfolgt. Aus diesem Datenpool wurden die hier gezeigten repräsentativen Kurven ausgewählt. Bei den Bedingungen, bei denen ein einheitliches Zellverhalten beobachtet wurde, sind jeweils drei Kurven gezeigt (grau, rot, gelb). Bei der kombinatorischen Applikation von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin wurde ein inhomogenes bakterielles Wachstum beobachtet. Hier sind fünf Kurven gezeigt (grün). Die Pfeile verweisen auf die Kurven, von denen in Abbildungsteil (A) die Bilder zu entsprechenden Zeitpunkten herausgegriffen und gezeigt wurden. Modifiziert nach Hage-Hülsmann et al., 2018.

Des Weiteren war bei der kombinatorischen Applikation von Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin das Verhalten zwischen einzelnen Zellen und daraus resultierenden Kolonien in unterschiedlichen Kammern inhomogen, sodass in einigen Inkubationskammern das Wachstum zunächst nach der Stoffzugabe stagnierte, die Zellen jedoch nach ungefähr 10 - 12,5 h mit dem Wachsen fortfuhren, wie die in grün gekennzeichneten Wuchskurven zeigen (Abbildung 26 B).

Daher wurde zusätzlich die Morphologie von *C. glutamicum* genauer betrachtet (Abbildung 27). Es ist jeweils eine repräsentative Kolonie pro Kultivierungsbedingung gezeigt. Zum morphologischen Vergleich wurden Kolonien mit gleichen Größen gewählt. Eine Gegenüberstellung zu identischen Inkubationszeiten erlaubte das verhältnismäßig schnelle Wachstum der Kontrolle nicht, da hier ab ungefähr 10 Stunden die Bakterien in den Kolonien so dicht gepackt waren, dass die Zellen dadurch bedingt gequetscht wurden und infolgedessen kleiner und runder erschienen. Die hier evaluierten Kolonien wiesen eine vergleichbare Koloniegröße mit jeweils einem Durchmesser von rund 15 µm auf. Folglich hatten die Zellen ähnlich viele Zellteilung durchlaufen, obwohl diese, wie bereits erwähnt, nach unterschiedlichen Inkubationszeiten erreicht wurden.



Abbildung 27: Vergleich der C. glutamicum-Morphologie unter Einfluss von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin.

Die extrahierten Bilder zeigen Zellen des Bakteriums *C. glutamicum*, welche unter verschiedenen Antibiotika-Einflüssen angezogen wurden. Obere Zeile: Kontrolle mit 3 % Ethanol (Lösungsmittel der untersuchten Verbindungen); 1 µg mL⁻¹ Prodigiosin; 15 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin. Untere Zeile: 1 µg mL⁻¹ Prodigiosin zusammen mit 15 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin. Die Kolonien haben eine gleiche Größe mit einem Durchmesser von ungefähr 15 µm und befanden sich in ähnlichen Wuchsphasen. Dabei wurden die gezeigten Koloniegrößen je Kultivierungsbedingung nach unterschiedlichen Inkubationszeiten erreicht. Während die Kolonien in der oberen Reihe zum Ende der Inkubation nach 20 h die gesamte Inkubationskammer ausfüllten (hier nicht gezeigt), stagnierte das Wachstum der Zellen unter Einfluss der Kombination (siehe untere Zeile, Bild nach 19:10 h). Die Bilder sind Teil des in Abbildung 26 gezeigten Experiments. Rote Pfeile: Zellen mit ungewöhnlich runder Zellform. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Bei Betrachtung der einzelnen Zellen waren morphologische Unterschiede erkennbar. Die der Stoffkombination ausgesetzten Bakterien wiesen im Vergleich zur Kontrolle, aber auch zu den mit einer der Substanzen behandelten Zellen, teils eine ungewöhnliche, runde Zellform auf (siehe rote Pfeile), die sie im Verhältnis zu morphologisch unauffälligen Zellen kleiner aussehen ließ. Dies wurde über Stunden beibehalten, da ein Wachstum ausblieb. Zudem wiesen viele Zellen einen helleren, gräulichen Farbton auf. Insgesamt schienen diese Zellen mit fortschreitender Inkubationszeit zu schrumpfen, sodass im Umkehrschluss größer werdende Zellzwischenräume erkennbar wurden (Abbildung 27 unten, 18:50 und 19:10 h, weißer Bereich). Im Vergleich dazu lagen die Zellen in der Kolonie der Kontrolle und den jeweiligen Kolonien der Kulturen mit separater Zugabe von Prodigiosin bzw. *N*-Myristoyltyrosin verhältnismäßig dicht beieinander (Abbildung 27 oben). Einige Zellen der Kombinationskulturen verringerten ihre Größe so drastisch, dass im Schnelldurchlauf der Bildreihen platzende Zellen erkennbar waren. Demzufolge waren einzelne Zellen am Ende des Experiments gänzlich verschwunden. Das beschriebene Phänomen ist in einem aus den Bildreihen generiertem Video nachzuvollziehen [Video nicht gezeigt, verfügbar unter Hage-Hülsmann *et al.*, 2018].

Um des Weiteren zu überprüfen, ob es sich bei dem beobachteten heterogenen Verhalten bei der kombinatorischen Applikation um die Bildung von Resistenzen, die durch genetische Mutationen hervorgerufen werden und an Tochterzellen weitergegeben werden können, handelt, wurde eine zusätzliche Re-Expositionsstudie durchgeführt (Abbildung 28).



Abbildung 28: Effekt einer kombinierten Applikation von Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin auf die Anfälligkeit von *C. glutamicum* gegen diese Stoffe.

Kulturen des Bakteriums *C. glutamicum* ATCC 13032 wurden unter Einfluss der Kombination bestehend aus den subletalen Konzentrationen von 1 μ g mL⁻¹ Prodigiosin (P) und 15 μ g mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin (N) in 800 μ L LB-Medium für 20 h bei 30 °C inkubiert. Das Ansetzen der Kulturen sowie die Inkubation erfolgten nach der für die Makrodilutionstests beschriebenen Weise [3 % Zugabevolumen der in Ethanol (p.a.) gelösten Stoffe]. Anschließend wurden die Kulturen mit LB-Medium gewaschen und 1:100-Verdünnungen hergestellt. Von diesen wurden 3 μ L auf eine LB-Agarplatte pipettiert und für 20 h bei 30 °C bebrütet (links, Kultivierung 1). Anschließend wurde die Anfälligkeit der gewachsenen Kolonien gegen die Verbindungen Prodigiosin und *N*-Myristoyltyrosin evaluiert. Dafür wurden von den entstandenen Kolonien erneut Kulturen angezogen, wobei diesen entweder 32 μ g mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin oder 2,56 μ g mL⁻¹ Prodigiosin zugesetzt wurde. Die verwendeten Stoffkonzentrationen entsprachen den zuvor ermittelten MBC-Werten beider Substanzen. Nach der zweiten Inkubation wurden erneut 3 μ L einer 1:100-Verdünnung aus zuvor gewaschenen Kulturen auf LB-Agarplatten getropft. Nach einer 20-stündigen Inkubation dieser Agarplatten bei 30 °C erfolgte eine Fotodokumentation (rechts, Kultivierung 2). Im Zuge beider Kultivierungen (1 und 2) wurden Kulturen mit 3 % Ethanol, dem Lösungsmittel der Substanzen, als Kontrollen mitgeführt. Es sind voneinander unabhängige Dreifachbestimmungen gezeigt (I, II, III). Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Dazu wurde C. glutamicum im ersten Kultivierungsschritt mittels verschiedener Flüssigkulturen unter den im mikrofluidischen Testsystem verwendeten Bedingungen angezogen. Im Speziellen wurde das Bakterium der Kombination aus 1 µg mL⁻¹ Prodigiosin und 15 µg mL⁻¹ N-Myristoyltyrosin ausgesetzt. Die Kultivierung erfolgte wie für den zuvor beschriebenen Makrodilutionstest. Nach der Inkubation wurden die Zellen 1:100 verdünnt und ohne Antibiotikum auf einer LB-Agarplatte über Nacht angezogen. Hierbei wurde durch eine stark verringerte Anzahl der Zellkolonien nach der Aussetzung der Zellen der Stoffkombination deutlich, dass eine Selektion stattgefunden hatte, bei der nur ein Bruchteil der Zellen überleben konnte. Im Fall der Bildung einer weitervererbbaren Resistenz, müsste im Genom dieser überlebenden Bakterien die entsprechende Mutation stattgefunden haben. Dadurch hätten diese Bakterien die Empfindlichkeit gegenüber den für den Wildtyp bakteriziden Konzentrationen beider Verbindungen verloren. Um genau dies zu überprüfen, wurden die überlebenden Zellen anschließend in einer zweiten Kultivierung erneut den zuvor als MBC beschriebenen Konzentrationen von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin (vgl. Abbildung 25: Prodigiosin: 2,56 μg mL⁻¹ und *N*-Myristoyltyrosin: 32 μg mL⁻¹) ausgesetzt. Danach wurden diese wieder auf LB-Agarplatten über Nacht angezogen, um die Lebendzellzahlen bestimmen zu können. Bei einer gegebenenfalls entstandenen Resistenz wurde erwartet, dass die Zellen unter Einfluss der MBC überleben würden. Dies war jedoch nicht der Fall. Die Zellen wiesen die gleiche Anfälligkeit gegenüber Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin wie zuvor auf. Damit ist davon auszugehen, dass es sich bei dem hier und in der Mikrofluidik beobachteten Wachstum kleiner Subpopulationen der Zellen in Anwesenheit der antibiotischen Stoffe um eine physiologische Adaptation handelt. Diese zeigt sich eben in einer heterogenen Zellantwort von C. glutamicum bei Applikation eines gewissen Grenzbereichs der Konzentrationen von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin. Es scheint, als seien einige Zellen physiologisch in unterschiedlichen Zuständen, sodass ihr Überleben bei der Exposition ermöglicht wird. Diese beeinflussen die gesamte folgende Zellpopulation. Begründungen für das beobachtete Phänomen und die Vermutung, dass einige Zellen das Schicksal der gesamten Population beeinflussen, können folgende sein: Zum einen ist die beschriebene Entwicklung von phänotypisch unterschiedlichen Subpopulationen für Mykobakterien, mit denen C. glutamicum verwandt ist, bekannt (Vijay et al., 2017). Zum anderen beruhen bakterielle einschließlich mykobakterielle Resistenzen gegen Antibiotika unter anderem auf der Zusammensetzung der Zellhülle (Delcour, 2009; Nasiri et al., 2017), welche im Allgemeinen strukturell komplex und sehr dynamisch ist (Silhavy et al., 2010; Siliakus et al., 2017). Auch hier kann diese sowohl für Prodigiosin als auch N-Myristoyltyrosin zumindest teilweise der zelluläre Angriffspunkt der antibakteriellen Wirkung sein. Daher ist nicht ausgeschlossen, dass Unterschiede in der zellulären Struktur von Bakterien einer Population bzw. Subpopulation individuelle Empfindlichkeiten gegenüber Antibiotika zeigen, wie sie hier beobachtet wurden.

Zusammengenommen war der kombinierte verstärkte antibakterielle Effekt von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin ebenfalls in der mikrofluidischen Untersuchung sichtbar. Des Weiteren ermöglichte dieses Testsystem das Nachvollziehen von morphologischen Veränderungen von C. glutamicum unter dem kombinierten Einfluss der Sekundärmetabolite. Eine mögliche Erklärung für die morphologischen Änderungen ist eine Einwirkung der Verbindungen auf die bakterielle Membran. Es ist nicht auszuschließen, dass die Wirkverstärkung des hydrophoben Pigments und einer tensidischen Verbindung auf individuellen Wirkweisen der Substanzen beruhen können. Derzeit werden diverse molekulare Mechanismen zur Erklärung der antibakteriellen Aktivität des Naturstoffs Prodigiosin diskutiert. Beispielsweise ruft Prodigiosin eine schnelle Autolyse in verschiedenen Bacillus-Arten hervor (Danevčič et al., 2016a), welche mit der für diese Verbindung beschriebenen Aktivität als Proton-Chlorid-Symporter (Busschaert & Gale, 2013; Konno et al., 1998; Sato et al., 1998) in Verbindung gebracht wird. In diesem Kontext wird dort ebenfalls die Erhöhung der Permeabilität der Cytoplasmamembran von B. subtilis durch Prodigiosin gezeigt (Danevčič et al., 2016a). In dem natürlichen Produzenten S. marcescens löste Prodigiosin nach der Absorption von Licht phototoxische Schäden in der Cytoplasmamembran des Bakteriums aus (Wang et al., 2013). Des Weiteren wurden die Auswirkungen der Anwendung von Prodigiosin gegen Bakterien in Zusammenhang mit einem programmierten bakteriellen Zelltod gesetzt (Darshan & Manonmani, 2016): Im Zuge dessen wurde ein Anstieg des Levels an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS-Level) in B. cereus und E. coli nachgewiesen. Dabei lag bei B. cereus, S. aureus, E. coli und P. aeruginosa eine Fragmentierung der DNA vor. Im Rasterelektronenmikroskop konnten auch Brüche in der Zellmembran und ein allgemeiner Verlust bzw. eine Veränderung der Membranintegrität bei B. cereus und E. coli als Folge einer Prodigiosin-Behandlung beobachtet werden. Insgesamt ist die Membran ein essentieller Angriffspunkt dieses Pigments.

Neben den Wirkweisen von Prodigiosin können die molekularen Mechanismen der tensidischen Komponente *N*-Myristoyltyrosin genauso einen Effekt auf die gemeinsame antibakterielle Wirkung haben. Ein Erklärungsansatz der Wirkweise kann die bereits für andere Biotenside, z. B. Rhamnolipide, beschriebene Modifizierung bzw. Verstärkung der Permeabilität der bakteriellen Membranen sein, die etwa in nachfolgend beschriebener Studie gezeigt wurde (Sana *et al.*, 2018): Ein aus *P. aeruginosa* stammendes Rhamnolipid und ein Biotensid aus *Bacillus stratosphericus* A15 wirkten jeweils antibakteriell gegen das Gram-positive Bakterium *S. aureus* und das Gram-negative Bakterium *E. coli*. Ein kombinierter Einsatz der Verbindungen resultierte in synergistischen Effekten. Beide Biotenside wirkten zerstörend auf die Zellmembranen der Bakterien und sorgten damit für eine stärkere Permeabilität. Die mittels eines Rasterelektronenmikroskops aufgenommenen Bilder zeigten, dass die bakteriellen Zellen bei kombinierter Applikation der genannten Biotenside teils platzten. Ein weiteres Beispiel für ein Biotensid, welches die Permeabilität von *B. subtilis* beeinflusst,

ist das Biotensid PS aus Pseudomonas sp. PS-17 (Sotirova et al., 2008). Mit diesem Biotensid behandelte, sich im Wachstum befindliche B. subtilis-Zellen wiesen veränderte Zellformen und faltige Zelloberflächen auf. Im Zuge dessen erlitten nur einige Zellen der gesamten Kultur diese morphologischen Veränderungen. In der Studie wurde vermutet, dass die inhomogenen Reaktionen der Bakterien unter anderem auf den jeweiligen individuellen physiologischen Zustand der einzelnen Zellen in der gesamten bakteriellen Gemeinschaft während der Tensidbehandlung zurückzuführen sind. Insgesamt ähneln die Daten der Studien dem hier erhaltenen Ergebnis, das zeigt, dass der gemeinsame Einsatz von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin zum Teil ebenfalls in deformierten und platzenden C. glutamicum-Zellen resultierte. Dass Biotenside und demnach sehr wahrscheinlich ebenso N-Myristoyltyrosin einen Effekt auf bakterielle Membranen haben, wurde nun noch einmal verdeutlicht. Einen weiteren Hinweis, der die Annahme dieses Angriffsmechanismus von N-Myristoyltyrosin untermauert, gibt eine Untersuchung von diversen N-Acylaminosäuren als Detergenzien zur Solubilisierung und Extraktion von Membranproteinen aus deren natürlicher Umgebung (Abe et al., 2010). Dies hebt ebenfalls den zerstörenden Effekt, den Verbindungen dieser Stoffgruppe auf biologische Membranen besitzen, hervor. Als Folge davon könnte die N-Acylaminosäure N-Myristoyltyrosin damit für eine generelle Schwächung des Mikroorganismus gesorgt haben. Ebenso könnte die Zugänglichkeit des parallel eingesetzten antibiotischen Stoffs Prodigiosin in das Zellinnere auf diese Weise erleichtert worden sein.

Eine kürzlich veröffentlichte Molekulardynamik-Simulationsstudie stellte ein Model zum Eindringen und zur Einlagerung von Prodigiosin in biologische Membranen auf (Ravindran et al., 2020). Ein einzelnes Prodigiosinmolekül im Lösungsmittel Wasser dringt innerhalb von 2 Nanosekunden in die Membran ein. Dabei durchdringt zuerst die Alkylkette die Membran und anschließend folgen die Pyrrolringe. Das Molekül lagert sich daraufhin an die Schnittstelle der Membran und der Wasserschicht an. Neben dem Effekt eines Moleküls auf eine biologische Membran, wurden ebenso die Effekte von 8 bzw. 16 parallel hinzugefügten Prodigiosinmolekülen betrachtet. Sobald 8 Prodigiosinmoleküle dem Lösungsmittel Wasser hinzugefügt werden, kommt es zu einer nahezu sofortigen Zusammenlagerung der Moleküle in einem Cluster. Dieses Cluster diffundiert durch das Lösungsmittel bis es auf die Membran stößt und beginnend mit einer Alkylkette diese penetriert. Nach einer gewissen Zeit beginnen die einzelnen Prodigiosinmoleküle auseinander zu diffundieren und das Cluster wird aufgelöst. Werden 16 Prodigiosinmoleküle parallel dem Lösungsmittel ausgesetzt, so kommt es ebenfalls zu einer Zusammenlagerung in einem Cluster, welches entsprechend größer ist. Im Gegensatz zu dem kleineren Cluster, dringt das größere Cluster innerhalb des in dieser Studie simulierten Zeitraums von 100 Nanosekunden nicht in die biologische Membran ein. Es ist denkbar, dass Prodigiosin in den Experimenten dieser Arbeit zu einem gewissen Anteil ebenfalls als Cluster vorlag. Da die Interaktion von Prodigiosin mit der Membran, wie oben beschrieben, ein essentieller Angriffsmechanismus der antibakteriellen Aktivität dieses Moleküls ist, kann darauf geschlossen werden, dass die Wirkstärke von in Clustern vorliegendem Prodigiosin herabgesetzt ist. Die hier vorliegenden Ergebnisse könnten ebenfalls auf den Mechanismus einer Clusterbildung zurückzuführen sein, da ein paralleler Einsatz von Prodigiosin und einer tensidischen Verbindung die Löslichkeit von Prodigiosin verbessern kann. Damit würden eventuell vorhandene Prodigiosincluster zerstört werden, sodass die hier beschriebene mögliche Einschränkung der Wirkung von Prodigiosin aufgrund zusammengelagerte Moleküle durch die Anwendung von Tensiden entgegengewirkt werden könnte. Die Sinnhaftigkeit dieses Mechanismus wird durch die hier nachgewiesene gemeinsame Wirkung der als Ausgangspunkt dieser Arbeit verwendeten natürlichen Stoffkombination von Prodigiosin und dem Biotensid Serrawettin W1 in dem Bakterium *S. marcescens* (Matsuyama *et al.*, 2011, 1985; Tanikawa *et al.*, 2006) zusätzlich untermauert (vgl. Kapitel 1.5).

Im Zuge der kombinierten Anwendung von Prodigiosin und Tensiden wurde des Weiteren ein auffälliger, konzentrationsabhängiger, kombinatorisch antibakterieller Effekt im Agardiffusionstest beobachtet. Entsprechend dem Simulationsmodell können Prodigiosincluster, wie bereits erwähnt, in den Experimenten dieser Arbeit ebenfalls vorliegen. Diese würden einen Hinweis auf den konzentrationsabhängigen Effekt zwischen Prodigiosin und tensidischen Verbindungen im Agardiffusionstest geben. Während die Hemmhöfe bei gleichbleibender Prodigiosinkonzentration und steigender Konzentration an N-Myristoyltyrosin zunächst größer wurden, wurden sie bei der maximal eingesetzten Tensidkonzentration und steigender Prodigiosinkonzentration kleiner. Theoretisch sollte das Biotensid Prodigiosin besser in Lösung bringen und die Clusterbildung aufheben. Es ist jedoch genauso denkbar, dass ab einer hohen Prodigiosinkonzentration die Prodigiosinaggregate so groß sind, dass diese von dem Tensid nur noch bedingt verkleinert werden können. Insgesamt könnte die Bildung von vesikelartigen Zusammenschlüssen aus beiden Verbindungen vorliegen. Unterschiedliche Verhältnisse von Prodigiosin zum eingesetzten Tensid könnten diese Zusammenlagerungen verändern. Diese größeren Cluster könnten in der Mobilität aus dem Filterblättchen heraus und durch die wässrige Agarplatte eingeschränkter sein, sodass kleinere Hemmhöfe entstehen. Ebenso könnte die Penetration der bakteriellen Membran, wie für ein reines Prodigiosincluster aus 16 Molekülen beschrieben, eingeschränkt sein. Ein mit der Bildung von Vesikeln zusammenhängender biophysikalischer Kennwert von Tensiden ist die kritischen Mizellbildungskonzentration (engl.: critical micelle concentration, CMC). Diese beschreibt die benötigte Menge einer tensidischen Verbindung oberhalb derer die spontane Mizellenbildung ausgelöst wird (Sheng, 2011). Je geringer die CMC ist, umso besser kann sich das betrachtete Tensid zusammenlagern und Mizellen bilden, welche wiederum für das Lösen von hydrophoben Substanzen von Vorteil sind (Otzen, 2017). Im Fall von N-Myristoyltyrosin konnte bereits gezeigt werden, dass bei

106

einer mittels heterologer Biosynthese hergestellten Charge die CMC bei 0,114 % (w/v) bei pH = 12 und bei einer chemisch synthetisierten Charge bei 0,063 % (w/v) bei pH = 12 (Thies *et al.*, 2016) liegt. Die CMC ist demnach für die synthetische Charge bei einer geringeren Menge erreicht (630 µg mL⁻¹) und würde unter diesen Bedingungen im Vergleich schneller zu einer Mizellenbildung führen. Ob ein CMC-abhängiger Effekt in Kombination mit Prodigiosin besteht, müsste in einer vergleichenden Studie evaluiert werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *N*-Myristoyltyrosin und Prodigiosin kombiniert verstärkt wachstumshemmend sowie bakterizid wirken. Die beobachtete inhomogene Reaktion von *C. glutamicum* auf die Exposition im sub-MIC-Konzentrationsbereich weist auf einen Angriffsmechanismus an der bakteriellen Membran hin. Insgesamt wurde die tensidische Wirkverstärker-Komponente Serrawettin W1 aus der natürlichen Stoffkombination mit Prodigiosin erfolgreich ausgetauscht.

Zusammenfassung:

Varianz der Wirkverstärker-Komponente Serrawettin W1

PRODIGIOSIN UND SERRAWETTIN W1 WIRKEN KOMBINATORISCH ANTIBAKTERIELL:

Prodigiosin und Serrawettin W1 (Kapitel 3.1.1)

Die aus dem Bakterium *S. marcescens* stammende natürliche Stoffkombination aus dem hydrophoben, roten Tripyrrol Prodigiosin und dem Biotensid Serrawettin W1 wies einen konzentrationsabhängigen, kombinatorisch verstärkten, antibakteriellen Effekt im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum* auf.

SERRAWETTIN W1 KANN FUNKTIONELL DURCH ANDERE TENSIDE ERSETZT WERDEN:

Prodigiosin und synthetische Tenside (Kapitel 3.1.2.1)

Stoffkombinationen aus Prodigiosin und synthetischen Tensiden (Triton X-100, SDS bzw. Tween 20) zeigten jeweils verstärkte antibakterielle kombinatorische Effekte im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum*, welche bei Triton X-100 bzw. SDS ebenfalls konzentrationsabhängig waren.

Prodigiosin und Biotenside (Kapitel 3.1.2.2)

Die gemeinsamen Anwendungen von Prodigiosin und Biotensiden (Rhamnolipiden, Mannosylerythritollipiden bzw. *N*-Myristoyltyrosin) zeigten jeweils konzentrationsabhängige, kombinatorisch verstärkte antibakterielle Effekte im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum*. *N*-Myristoyltyrosin stach dabei als vielversprechender Kandidat für eine kombinatorische Applikation mit Prodigiosin zur Wirkverstärkung heraus.

ES KONNTE DIE VÖLLIG NEUE ANTIBAKTERIELL WIRKENDE KOMBINATION "PRODIGIOSIN & *N*-Myristoyltyrosin" identifiziert werden:

N-Myristoyltyrosin und Prodigiosin (Kapitel 3.1.2.3)

Für Prodigiosin wurde ein MIC- bzw. MBC-Wert von 2,56 µg mL⁻¹ und für *N*-Myristoyltyrosin von jeweils 32 µg mL⁻¹ determiniert. Die gleichzeitige Applikation von 16 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin verringerte die MIC von Prodigiosin um drei Größenordnungen auf 0,005 µg mL⁻¹, wodurch die kombinatorische Wirkung als tendenziell synergistisch klassifiziert wurde. Der Stoffkombination ausgesetzte *C. glutamicum*-Zellen zeigten inhomogene Reaktionen, welche offenbar auf einer physiologischen Heterogenität basierten. Insgesamt wurde eine neue Stoffkombination erfolgreich von der gegeben natürlichen Zusammensetzung abgeleitet.

PUBLIKATION(EN):

Die Ergebnisse der Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 dieser Arbeit sind in der Publikation "Natural biocide cocktails: Combinatorial antibiotic effects of prodigiosin and biosurfactants." **Jennifer Hage-Hülsmann**, Alexander Grünberger, Stephan Thies, Beatrix Santiago- Schübel, Andreas Sebastian Klein, Jörg Pietruszka, Dennis Binder, Fabienne Hilgers, Andreas Domröse, Thomas Drepper, Dietrich Kohlheyer, Karl- Erich Jaeger, Anita Loeschcke (2018). PLoS One. 2018; 13(7): e0200940. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200940 veröffentlicht.

3.1.3 Modifikation der Antibiotikum-Komponente Prodigiosin

In den vorangegangenen Experimenten wurde die gemeinsame antibakterielle Wirkung der natürlichen Sekundärmetabolit-Kombination bestehend aus (i) Prodigiosin, einem hydrophoben Pigment, und (ii) Serrawettin W1, einem Biotensid, verifiziert. Daraufhin wurden durch den Austausch der Tensidkomponente eine Reihe verschiedener effektiver Stoffkombinationen

erfolgreich abgeleitet. Im Zuge dessen erwies sich besonders das bislang wenig untersuchte Biotensid N-Myristoyltyrosin als geeigneter Verstärker der Prodigiosinwirkung. Anschließend daran sollte durch die Erweiterung der Antibiotikum-Komponente Prodigiosin ebenfalls eine Ableitung in die andere Komponenten-Richtung erfolgen. Für Prodigiosin sind antibiotische Wirkungen gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien vielfach in der Literatur beschrieben (Danevčič et al., 2016b, 2016a; Herráez et al., 2019; Lapenda et al., 2015; Suryawanshi et al., 2014, vgl. Kapitel 1.6, Tabelle 1). Neben Prodigiosin kommen in der Natur strukturell eng verwandte Varianten des Tripyrrols, welche ebenfalls unterschiedliche antibakterielle Eigenschaften besitzen, in Form der Prodiginin-Familie vor (Sakai-Kawada et al., 2019; Williamson et al., 2006). Da diese jedoch aus einer limitierten Anzahl an Stoffen besteht, ist insbesondere die Erschließung neuer Verbindungen, die von den natürlichen Grundgerüsten abgeleitet wurden, von Interesse. Diesbezüglich ist eine gängige und etablierte Vorgehensweise zur Erweiterung des Spektrums antibakteriell wirkender Substanzen deren Derivatisierung, wie sie beispielsweise in den letzten Jahren ausgiebig für die Klasse der Aminoglykosid-Antibiotika erforscht wurde (Chandrika & Garneau-Tsodikova, 2018). Daher soll hier überprüft werden, ob (i) durch eine Derivatisierung von Prodigiosin eine verbesserte, spezifischere oder andere antibiotische Wirkung erzielt werden kann und, ob (ii) eine Derivatisierung von Prodigiosin einen Einfluss auf die kombinatorische Wirkung mit dem Tensid N-Myristoyltyrosin hat.

3.1.3.1 Antibakterielle Wirkungen verschiedener Prodigiosin-Derivate

Um die Antibiotikum-Komponente der natürlichen Sekundärmetabolit-Kombination bestehend aus Prodigiosin und Serrawettin W1 aus *S. marcescens* zu erweitern, wurde ein Spektrum von sieben Prodigiosin-Derivaten hinzugezogen und hinsichtlich antibakterieller Aktivitäten evaluiert. Dieses generierte das Institut für Bioorganische Chemie (IBOC, Institut der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Pietruszka) in Kooperation mit dem IMET durch Mutasynthese oder chemische Synthese und stellte es freundlicherweise zur Verfügung (Brass *et al.*, 2019; Klein *et al.*, 2018, 2017). Insbesondere erfolgte die Herstellung der in der vorliegenden Arbeit benutzten Verbindungen (hier bezeichnet als Prodigiosin-Derivat-B bis -H) durch die Mitarbeiter Hannah U. C. Braß, David P. Klebl, und Dr. Andreas S. Klein. Die Prodigiosin-Derivate-B, -F und -G wurden chemisch hergestellt (Brass *et al.*, 2019). Sowohl die linearen Prodigiosin-Derivate-C, -E und -H (Klein *et al.*, 2017) als auch das einzige hier verwendete zyklische Derivat-D (Klein *et al.*, 2018) wurden mittels Mutasynthese in *P. putida* gewonnen. Strukturell betrachtet unterschieden sich die verwendeten Prodigiosin-Derivate (B-H) an den Resten des C-Rings des Prodigiosinmoleküls (Abbildung 29). Durch die Modifikation des Prodigiosinmoleküls wurden im Allgemeinen veränderte Stoffeigenschaften und möglicherweise Bioaktivitäten der Verbindungen erwartet.



Abbildung 29: Unterschiedlich substituierte Prodigiosin-Derivate.

(A) Prodigiosin, welches als Referenz verwendet wurde. Der A-, B- und C-Ring sind gekennzeichnet. (B) - (H) Prodigiosin-Derivate mit Modifikation am C-Ring der Tripyrrolstrukturen. Die hier verwendeten Buchstaben werden im Folgenden zur Kennzeichnungen der einzelnen Synthesen und damit der unterschiedlichen Derivate verwendet. Die angegebenen Molekulargewichte (engl.: *molecular weight*, MW) beziehen sich auf die Hydrochloride der jeweiligen Verbindungen.

Im Zuge der Herstellung von Derivat-D wurden bereits antimikrobielle Bioaktivitäten der Substanz beschrieben (Klein *et al.*, 2018): Zum einen wurden antibakterielle Wirkungen gegen nicht-pathogene Bakterien nachgewiesen. Dabei wurden MIC-Werte von 6,2 µM für das Gram-negative Bakterium

Ergebnisse und Diskussion

E. coli und 1,1 bzw. 0,3 μM im Fall der Gram-positiven Bakterien *B. subtilis* und *C. glutamicum* determiniert. Zum anderen wurden antimykotische Bioaktivitäten des Prodigiosin-Derivats-D gegen *Pichia pastoris* und *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen.

Insgesamt sind die antibakteriellen Eigenschaften der genannten Prodigiosin-Derivate (B-H) jedoch wenig untersucht, weshalb sich die Verbindungen für eine genauere Charakterisierung der antibiotischen Wirkungen im Rahmen des Austausches der Antibiotikum-Komponente der natürlichen Stoffkombination aus *S. marcescens* eigneten. Anhand der Derivate sollte somit zunächst festgestellt werden, inwieweit die antibakterielle Aktivität der Prodigiosin-Komponente bei genannter struktureller Modifikation unverändert bleibt oder möglicherweise sogar verstärkt wird. Dazu wurden die separaten antibakteriellen Effekte der ausgewählten Derivate (B-H) im Vergleich mit Prodigiosin, dessen Charge ebenfalls im Rahmen der Synthese der Derivate hergestellt wurde, ermittelt. Im Zuge dessen sollte ebenso ein vielversprechender Kandidat für die Untersuchung einer kombinatorischen antibakteriellen Wirkung zusammen mit *N*-Myristoyltyrosin identifiziert werden.

Zur Evaluierung individueller antibiotischer Eigenschaften der Prodiginine wurden MIC-Werte mittels Mikrodilutionstests (vgl. Kapitel 2.7.2.2) anhand von C. glutamicum ermittelt. Darüber hinaus wurde gegen einige Modellorganismen als Vertreter der ESKAPE-Bakterien, nämlich gegen die Grampositiven fakultativen humanen Pathogene (i) Staphylococcus aureus ATCC 25923, (ii) Staphylococcus epidermidis ATCC 12228 und (iii) Enterococcus faecium ATCC 6057 sowie die Gram-negativen Bakterien (iv) Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 und (v) Serratia marcescens ATCC 13880, getestet, um etwaige Änderungen des Wirkspektrums bei Prodigiosin-Derivatisierungen zu erfassen. Die Substanzen lagen im Co-Solvens DMSO gelöst vor und wurden zur MIC-Bestimmung in seriellen Verdünnungsreihen einheitlich auf Stoffmengenkonzentrationen von 0,05 - 25,6 µM in den Testkulturen eingestellt. Die Angabe als Stoffmengenkonzentration anstelle von den bislang in dieser Arbeit verwendeten Massenkonzentrationen wurde ausgewählt, um vergleichende Aussagen über die Wirksamkeit der strukturell sehr ähnlichen Verbindungen entsprechend der eingesetzten Molekülmengen treffen zu können. Da minimale Hemmkonzentrationen üblicherweise in µg mL⁻¹ bzw. mg L⁻¹ angegeben werden (EUCAST, 2000), sind die ermittelten MIC-Werte ebenfalls in den dazugehörigen Massenkonzentrationen in µg mL⁻¹ bezogen auf die Hydrochloride der jeweiligen Verbindungen im Anhang aufgeführt (vgl. Anhang-Tabelle 3).

Die Ergebnisse der komparativen Mikrodilutionstests sind anhand der ermittelten MIC-Werte in Stoffmengenkonzentrationen zusammenfassend dargestellt (Tabelle 13). Für Prodigiosin wurde eine MIC von 12,8 µM gegen *C. glutamicum* ermittelt, welche in Massenkonzentrationen ausgedrückt 5,06 µg mL⁻¹ des Prodigiosin-Hydrochlorids entsprachen. Eine leichte Wachstumsinhibition war bereits bei 6,4 µM (2,53 µg mL⁻¹) des Tripyrrols zu erkennen. Im Vergleich dazu lag die MIC im zuvor verwendeten Makrodilutionstest gegen *C. glutamicum* bei 2,56 µg mL⁻¹ Prodigiosin (vgl. Abbildung 24). Demnach befanden sich die beiden mittels der zwei unterschiedlichen Testsysteme gemessenen MIC-Werte in einem ähnlichen Konzentrationsbereich.

Tabelle 13: Minimale Hemmkonzentrationen verschiedener Prodigiosin-Derivate gegen humane Modellpathogene.

Die MIC-Werte wurden in unabhängigen Triplikatmessungen mittels Flüssigkulturen im Mikrodilutionsverfahren (100 μ L Kulturvolumen) determiniert. Die Inkubationen erfolgten in MH-Medium bei 37 °C und gesättigter Luftfeuchtigkeit für 20 h ohne Schütteln. Die Prodiginine wurden in Verdünnungsreihen mit einem Verdünnungsfaktor von zwei in Konzentrationen zwischen 25,6 bis 0,05 μ M mit 3 % DMSO als Co-Solvens zugegeben. Das Wachstum wurde durch Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von λ = 750 nm in einem Mikroplatten-Reader gemessen. Die Messwerte des zur Kultivierung verwendeten reinen Mediums (MH-Medium) wurden von den gemessenen Absorptionen der Kulturen subtrahiert. Zudem erfolgte durch die Anwendung eines Korrekturfaktors eine Umrechnung auf theoretisch mit einem Spektralphotometer der Serie GENESYS 10S gemessene Werte. Anhand des auf diese Weise detektierten Zellwachstums wurden die nachfolgend zusammengefassten MIC-Werte bestimmt. Dabei ist die MIC die jeweils niedrigste notwendige Konzentration einer Verdünnungsreihe, bei der kein Wachstum im Zuge der Absorptionsmessungen detektiert wurde. Die entsprechenden Massenkonzentrationsangaben der Einheit μ g mL⁻¹ (vgl. Anhang-Tabelle 3) sowie die gesamten Messdaten (vgl. Anhang-Abbildung 3 bis Anhang-Abbildung 8) der Zelldichten sind im Anhang aufgeführt.

MIC in µM		Gram-p Bakte	Gram-negative Bakterien			
Substanz	C. glutamicum	S. aureus	S. epidermidis	E. faecium	P. aeruginosa	S. marcescens
A Prodigiosin Hydrochlorid	12,8	12,8	12,8	12,8		
B Prodigiosin-Derivat-B	12,8	25,6	25,6	25,6		
C Prodigiosin-Derivat-C	12,8	12,8	25,6	25,6		
D Prodigiosin-Derivat-D	12,8	12,8	25,6	25,6		
E Prodigiosin-Derivat-E	12,8	25,6	25,6	25,6		
F Prodigiosin-Derivat-F	12,8	12,8	12,8	12,8		
G Prodigiosin-Derivat-G						
H Prodigiosin-Derivat-H	12,8	12,8	12,8	12,8		

Prodigiosin und die Prodigiosin-Derivate hemmten das Wachstum der Gram-negativen Bakterien *P. aeruginosa* und *S. marcescens* in dem hier eingesetzten Konzentrationsbereich nicht. Im Fall der Gram-positiven Bakterien *S. aureus, S. epidermidis, E. faecium* und *C. glutamicum* wurde für Prodigiosin jeweils eine MIC von 12,8 µM (5,06 µg mL⁻¹) determiniert. Das Derivat-G, das an der 3-Position methyliert ist und eine Ethylgruppe an der 2-Position trägt, zeigte bei den gewählten Konzentrationen weder gegen die Gram-negativen noch die Gram-positiven Bakterien eine MIC.

Jedoch deuteten sich bei der maximalen Konzentration (25,6 µM) dieses Derivats bei *S. aureus*, *C. glutamicum* und *S. epidermidis* sehr leichte Reduktionen des Wachstums an (vgl. Anhang-Abbildung 3 G; Anhang-Abbildung 4 G; Anhang-Abbildung 7 G). Alle übrigen Prodigiosin-Derivate hemmten die Gram-positiven Bakterien mit MIC-Werten von 12,8 oder 25,6 µM im Wachstum. Dabei konnten die Derivate anhand ihrer Wirkstärken und -spektren gegen die humanpathogenen Bakterien in drei Kategorien unterteilt werden: Kategorie I: Zu Prodigiosin äquivalentes Wirkprofil (Intensität und Spektrum) gegen die drei Gram-positiven Humanpathogene. Neben Prodigiosin, also Struktur A, gehörten hierzu Derivat-F und -H, die gegenüber Prodigiosin unterschiedlich verlängerte Alkylketten in der 2-Position und verkürzte Ketten in der 3-Position tragen. Kategorie II: Wirkung gegen *S. aureus* äquivalent zur Prodigiosin-Wirkung, aber schwächer gegen *S. epidermidis* und *E. faecium*. Das Derivat-C, die in 3-Position terminale Alken-Variante von Prodigiosin, sowie das zyklische Derivat-D zeigten dieses Ergebnis. Kategorie III: Bei allen drei Gram-positiven Bakterien schwächere Wirkung im Vergleich zu Prodigiosin. Unter die letztere fallen die Derivate-B, -E und -G, welche alle Substitutionen mit kurzen Alkylketten besitzen.

Zusammengenommen zeigten die Ergebnisse, dass die strukturellen Unterschiede offensichtlich einen deutlichen Einfluss auf die antibakterielle Aktivität der Tripyrrole haben. Für den Naturstoff Prodigiosin ist neben unterschiedlichen molekularen Wirkweisen (vgl. Kapitel 3.1.2.3.3) häufig die bakterielle Membran als Angriffsort in der Literatur genannt (Danevčič *et al.,* 2016a; Darshan & Manonmani, 2016). Diesbezüglich wurde, wie bereits erwähnt, erst kürzlich ein Model mittels einer Molekulardynamik-Simulation beschrieben, welches den Prozess des Eindringens und der Einlagerung von Prodigiosin in die Membran darlegt (Ravindran et al., 2020). Das Model beschreibt, dass ein Prodigiosinmolekül als Erstes mit der Alkylkette und anschließend mit den Pyrrolringen in eine biologische Membran eindringt. Liegen Veränderungen in der Alkylkette wie hier im Fall der Prodigiosin-Derivate vor, könnte diese strukturelle Varianz folglich eine Erklärung für Änderungen der Bioaktivitäten modifizierter Verbindungen sein. Aufgrund des eingeschränkten Datensatzes der vorliegenden Evaluierung konnte keine feste Regel, welche eine Modifikation mit einer daraus resultierenden Wirkstärke in Verbindung bringt, abgeleitet werden. Jedoch zeigten die Prodigiosin-Derivate-F und -H, welche gegenüber Prodigiosin unterschiedlich verlängerte Alkylketten in der 2-Position und verkürzte Ketten in der 3-Position tragen, eine antibakterielle Wirkung mit äquivalenter Wirkstärke im Vergleich zu Prodigiosin. Damit stellten die Verbindungen interessante Kandidaten für weiterführende Untersuchungen kombinatorischer Applikationen mit *N*-Myristoyltyrosin dar.

3.1.3.2 N-Myristoyltyrosin und das Prodigiosin-Derivat-F

Um einen kombinierten antibakteriellen Effekt zwischen N-Myristoyltyrosin und einem Prodigiosin-Derivat exemplarisch zu untersuchen, wurde das mit am stärksten antibakteriell wirkende Derivat-F verwendet. Es wurde gegen das Gram-positive pathogene Bakterium Staphylococcus aureus ATCC 25923 getestet. Dem Bakterium kommt als Modell für Methicillin-resistente S. aureus (MRSA) Stämme, welche kurz nach der Einführung des β-Lactam-Antibiotikums Methicillin Anfang der 1960er Jahre erstmals auftraten (Kashyap et al., 2019; Lobanovska & Pilla, 2017; Ventola, 2015), eine besondere Bedeutung zu. Heutzutage sind diese bakteriellen Humanpathogene weltweit verbreitet und eine enorme Bedrohung für die gesamte globale Gesundheit (Craft et al., 2019; Turner et al., 2019). Zur Behandlung von MRSA-Infektionen existieren aktuell zahlreiche Vorschläge, zu denen neben Monotherapien auch Kombinationstherapien gehören (Davis et al., 2015; Kashyap et al., 2019). Aus diesem Grund bot sich S. aureus als Modell für ein relevantes Humanpathogen zur Untersuchung gemeinsamer antibakterieller Wirkungen an. Neben der Betrachtung der Kombination N-Myristoyltyrosin und Prodigiosin-Derivat-F wurde die Zusammensetzung N-Myristoyltyrosin und Prodigiosin unter denselben experimentellen Bedingungen evaluiert. Dies sollte zum einen der Generierung von Referenzwerten dienen, um eine etwaige spezifisch veränderte kombinatorische Wirkung des Derivats-F aufzuzeigen. Zudem sollte getestet werden, ob die zuvor anhand des Gram-positiven Modellbakteriums C. glutamicum gezeigten kombinatorischen Effekte von *N*-Myristoyltyrosin und Prodigiosin auf *S. aureus* übertragbar sind.

Zur Evaluierung der antibakteriellen Wirkungen wurden Mikrodilutionstests (vgl. Kapitel 2.7.2.2) verwendet. Die zu testenden Verbindungen wurden im Co-Solvens DMSO gelöst und in geometrischen Verdünnungsreihen mit einem Verdünnungsfaktor von zwei eingesetzt. In den Testkulturen belief sich die DMSO-Konzentration auf 3 % des gesamten Kulturvolumens. Die Inkubation der Mikrotiterplatten erfolgte bei 37 °C für 20 h ohne Schütteln. Anschließend wurde das Wachstum der Zellen mittels Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von λ = 750 nm in einem Multimodus-Mikroplatten-Reader detektiert. Die erhaltenen Daten wurden in Spektralphotometer-Messwerte umgerechnet.

Im Referenzexperiment wurden *N*-Myristoyltyrosin und Prodigiosin wie zuvor in Verdünnungsreihen beginnend bei 128 µg mL⁻¹ bzw. 16 µg mL⁻¹ getestet. Die Messungen ergaben eine MIC gegen *S. aureus* von 128 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin, wobei ein sehr stark reduziertes Wachstum der Zellen bereits bei 64 µg mL⁻¹ vorlag (Abbildung 30 A, Y-Achse). Für Prodigiosin wurde eine MIC von 4 µg mL⁻¹ bestimmt und ein leicht eingeschränktes Wachstum bereits bei 2 µg mL⁻¹ beobachtet (Abbildung 30 A, X-Achse). Damit lag die ermittelte MIC von Prodigiosin gegen *S. aureus* im selben Bereich wie die in der Literatur beschriebenen Werte (Herráez *et al.*, 2019; Lapenda *et al.*, 2015; Suryawanshi *et al.*, 2014). In den Messungen waren ebenfalls leichte antibakterielle kombinatorische Effekte von Prodigiosin und N-Myristoyltyrosin gegen S. aureus zu beobachten. So war das vorher schwache Wachstum der Zellen bei alleiniger N-Myristoyltyrosin-Applikation von 64 μ g mL⁻¹ in Kombination mit 0,5 µg mL⁻¹ Prodigiosin gänzlich inhibiert. Eine weitere Reduktion des Wachstums war im Fall der Kombination von 32 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin und 2 µg mL⁻¹ Prodigiosin zu erkennen. Bei der jeweiligen alleinigen Anwendung der Stoffe bei diesen Konzentrationen war ein Wachstum entsprechend der Kontrolle erkennbar. Die kombinatorische Applikation sorgte für ein stark eingeschränktes Zellwachstum. Interessanterweise war bei der höchsten Prodigiosinkonzentration von 16 µg mL⁻¹ zusammen mit 4 - 64 µg mL⁻¹ N-Myristoyltyrosin ein geringes neu aufkommendes Zellwachstum zu verzeichnen. Damit deutete sich zudem eine leichte antagonistische Wirkung an. Das Wiederauftreten von Zellwachstum im höheren Konzentrationsbereich von Prodigiosin wurde ebenfalls in dem vorherigen Experiment gegen C. glutamicum beobachtet (vgl. Kapitel 3.1.2.3.1, Abbildung 24). Insgesamt konnten die kombinierten antibakteriellen Effekte anhand der Zahlenwerte der optischen Dichte als sehr schwach eingestuft werden. Die Bestimmung von FIC-Werten ergab 0,125 für Prodigiosin beziehungsweise 0,5 für N-Myristoyltyrosin. Aus diesen FIC-Werten resultierte ein FIC-Index von 0,625. Damit lag ein antibakterieller kombinatorischer Effekt vor, welcher tendenziell synergistisch war. Obgleich der kombinatorische Effekt von N-Myristoyltyrosin und Prodigiosin gegen S. aureus schwächer als der gemeinsame Effekt gegen C. glutamicum zu sein scheint (vgl. Abbildung 24), konnte erstmalig eine MIC des Biotensids N-Myristoyltyrosin und damit dessen Wirksamkeit gegen das Humanpathogen S. aureus determiniert werden.

Α

$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$			μg mL ⁻¹ Prodigiosin									
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $		0	0,0317	5 0,0625	0,125	0,25	0,5	~	2	6	8	16
$\begin{array}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	0	1,03 ± 0,07	1,24 ± 0,35	0,98 ± 0,02	1,02 ± 0,04	1,24 ± 0,31	1,08 ± 0,12	0,92 ± 0,03	0,72 ± 0,17	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,02
128 $0,03 \\ \pm 0,01$ $0,01 \\ \pm 0,01$ $0,00 \\ \pm 0,01$ $0,01 \\ \pm 0,01$ $0,02 \\ \pm 0,02$ $0,01 \\ \pm 0,01$ $0,01 \\ \pm 0,01$ $0,02 \\ \pm 0,00$ $0,01 \\ \pm 0,01$ $0,01 \\ \pm 0,00$ $0,02 \\ \pm 0,00$ $0,01 \\ \pm 0,00$ $0,02 \\ \pm 0,00$ $0,03 \\ \pm 0,00$	2	1,01 ± 0,28	0,97 ± 0,23	1,23 ± 0,35	1,15 ± 0,24	1,05 ± 0,12	1,09 ± 0,17	1,50 ± 0,71	1,14 ± 0,18	0,07 ± 0,05	0,02 ± 0,02	0,05 ± 0,01
128 $0,03 \\ \pm 0,01$ $0,01 \\ \pm 0,00$ $0,01 \\ \pm 0,01$ $0,00 \\ \pm 0,01$ $0,02 \\ \pm 0,02$ $0,00 \\ \pm 0,01$ $0,01 \\ \pm 0,00$ $0,02 \\ \pm 0,00$ $0,00 \\ \pm 0,00$ $0,01 \\ \pm 0,00$ $0,02 \\ \pm 0,00$ $0,00 \\ \pm 0,00$ $0,03 \\ \pm 0,00$	u Bri 4	1,01 ± 0,14	1,14 ± 0,42	1,12 ± 0,32	1,39 ± 0,48	1,11 ± 0,20	1,30 ± 0,41	1,70 ± 0,92	1,41 ± 0,40	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,07 ± 0,01
128 $0,03$ $\pm 0,01$ $0,01$ $\pm 0,01$ $0,00$ $\pm 0,01$ $0,01$ $\pm 0,01$ $0,02$ $\pm 0,02$ $0,01$ $\pm 0,01$ $0,01$ $\pm 0,01$ $0,01$ $\pm 0,01$ $0,01$ $\pm 0,00$ $0,01$ $\pm 0,01$ $0,01$ $\pm 0,01$ $0,01$ $\pm 0,00$ $0,01$ $\pm 0,01$ $0,01$ $\pm 0,00$ $0,02$ $\pm 0,00$ $0,03$ $\pm 0,00$	< 8	1,06 ± 0,05	1,10 ± 0,13	1,33 ± 0,28	1,19 ± 0,11	1,17 ± 0,11	1,42 ± 0,22	1,38 ± 0,11	1,28 ± 0,05	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,03	0,10 ± 0,04
128 $0,03$ $\pm 0,01$ $0,01$ $\pm 0,01$ $0,00$ $\pm 0,01$ $0,01$ $\pm 0,01$ $0,02$ $\pm 0,02$ $0,00$ $\pm 0,01$ $0,01$ $\pm 0,00$ $0,01$ $\pm 0,01$ $0,01$ $\pm 0,00$ $0,01$ $\pm 0,01$ $0,01$ $\pm 0,01$ $0,02$ $\pm 0,00$ $0,04$ $\pm 0,01$ 64 $0,15$ $\pm 0,09$ $0,19$ $\pm 0,03$ $0,13$ $\pm 0,02$ $0,27$ $\pm 0,21$ $0,25$ $\pm 0,28$ $0,03$ $\pm 0,03$ $0,01$ $\pm 0,03$ $0,03$ $\pm 0,00$ $0,03$ 	16	1,15 ± 0,10	1,08 ± 0,10	1,09 ± 0,07	1,09 ± 0,09	1,15 ± 0,07	1,17 ± 0,13	1,21 ± 0,17	0,73 ± 0,13	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,18 ± 0,06
$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1,51 ± 0,04	1,44 ± 0,18	1,69 ± 0,63	1,73 ± 0,72	1,46 ± 0,39	1,43 ± 0,47	2,52 ± 1,32	0,36 ± 0,34	0,02 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,10 ± 0,03
$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	ISO161	0,15 ± 0,09	0,19 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,27 ± 0,21	0,25 ± 0,28	0,05 ± 0,08	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,02
	128 ⊆	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,01

Abbildung 30: Kombinierte antibakterielle Aktivitäten von *N*-Myristoyltyrosin und Prodigiosin bzw. dem Prodigiosin-Derivat-F im Mikrodilutionstest gegen *S. aureus*.

- Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite -

В												
Ę	128	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,01
tyrosi	64	0,15 ± 0,03	0,35 ± 0,01	0,21 ± 0,05	0,37 ± 0,07	0,25 ± 0,11	0,13 ± 0,06	0,07 ± 0,06	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,11 ± 0,03
istoyl	32	1,34 ± 0,16	1,55 ± 0,28	2,25 ± 0,31	2,28 ± 0,45	2,14 ± 0,62	2,48 ± 0,21	2,49 ± 0,51	2,83 ± 0,86	0,11 ± 0,09	0,03 ± 0,03	0,13 ± 0,01
/-Myr	16	1,08 ± 0,12	1,15 ± 0,16	1,21 ± 0,15	1,25 ± 0,09	1,62 ± 0,24	1,34 ± 0,27	1,28 ± 0,04	1,10 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,12 ± 0,01
nL-1 ^	8	1,16 ± 0,19	1,32 ± 0,31	1,71 ± 0,57	1,79 ± 0,60	1,50 ± 0,29	1,74 ± 0,23	1,39 ± 0,09	1,49 ± 0,35	0,32 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,00
u brl	4	1,17 ± 0,68	1,23 ± 0,75	1,61 ± 0,30	1,99 ± 0,57	1,53 ± 0,45	1,45 ± 0,42	2,44 ± 0,84	1,07 ± 0,06	0,55 ± 0,17	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,01
	2	1,14 ± 0,76	1,31 ± 0,66	1,88 ± 0,51	1,64 ± 0,90	1,16 ± 0,59	1,95 ± 0,63	2,64 ± 0,47	1,47 ± 0,33	0,49 ± 0,09	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,01
	0	1,41 ± 0,79	1,47 ± 0,81	1,59 ± 0,95	1,12 ± 0,49	1,48 ± 0,98	1,71 ± 0,57	0,98 ± 0,09	1,37 ± 0,64	0,67 ± 0,09	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02
µg n	ոL ⁻¹	0	0,017	0,035	0,069	0,138	0,217	0,553	1,107	2,214	4,427	8,854
	μM	0	0,05	0,1	0,2	0,0	0,8	16	3,2	6 [,]	12 ⁸	25,6
	Prodigiosin Derivat-F											
Farbkategorien entsprechend der gemessenen OD _{750nm}												
			kein Zellwachstum > 0,70 starkes Zellwachstum									
		≤ 0,06	kein Zellw	achstum			> 0,70	starkes 2	2ellwachs	um		

Abbildung 30: Kombinierte antibakterielle Aktivitäten von *N*-Myristoyltyrosin und Prodigiosin bzw. dem Prodigiosin-Derivat-F im Mikrodilutionstest gegen *S. aureus*.

Zur Bestimmung der kombinatorischen Aktivitäten anhand von MIC-Werten wurden Flüssigkulturen des Bakteriums Staphylococcus aureus ATCC 25923 im Mikrodilutionsmaßstab mit einem maximalen Kulturvolumen von 100 µL verwendet. Prodigiosin, Prodigiosin-Derivat-F und N-Myristoyltyrosin wurden jeweils in Verdünnungsreihen mit einem Verdünnungsfaktor von zwei gegeneinander entsprechend einer Checkerboard-Matrix aufgetragen. Als Co-Solvens diente DMSO, welches demnach ebenfalls in der Kontrolle (0 µg mL⁻¹) eingesetzt wurde. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und ohne Schütteln für 20 Stunden. Anschließend wurden die optischen Dichten der Kulturen zur Bestimmung des Zellwachstums bei einer Wellenlänge von λ = 750 nm mittels eines Multimodus-Mikroplatten-Readers gemessen. Die Messwerte des zur Kultivierung verwendeten reinen Mediums (MH-Medium) wurden von den gemessenen Absorptionen der Kulturen subtrahiert. Zudem erfolgte durch die Anwendung eines Korrekturfaktors eine Umrechnung auf theoretisch mit einem Spektralphotometer der Serie GENESYS 10S gemessene Werte, welche in der obigen Abbildung dargestellt sind. Die Farbskala repräsentiert die Stärke des Wachstums der Kulturen anhand verschiedener Schattierungen. Grau: OD_{750 nm} ≤ 0,06 (kein Wachstum); hellrot: OD_{750 nm} ≤ 0,70 (beeinträchtigtes Zellwachstum); rot: OD_{750 nm} > 0,70 (starkes Zellwachstum). Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und die entsprechenden Standardabweichungen. (A) Kombinierte antibakterielle Aktivitäten von N-Myristoyltyrosin und Prodigiosin. (B) Kombinierte antibakterielle Aktivitäten von N-Myristoyltyrosin und Prodigiosin-Derivat-F.

Zur Evaluierung einer kombinierten antibakteriellen Wirkung zwischen *N*-Myristoyltyrosin und Prodigiosin-Derivat-F wurden die beiden Verbindungen in den zuvor als effektiv befundenen Konzentrationen angewendet. Dadurch ergaben sich für das Biotensid *N*-Myristoyltyrosin Konzentrationen von 2 bis 128 µg mL⁻¹ und für Prodigiosin-Derivat-F Konzentrationen von 0,05 bis 25,6 µM bzw. 0,017 bis 8,854 µg mL⁻¹ (vgl. Anhang-Tabelle 2). Bei der Kombination des Biotensids *N*-Myristoyltyrosin und Prodigiosin-Derivat-F deuteten sich im Konzentrationsbereich

nahe der alleinigen MIC-Werte verstärkte antibakterielle kombinatorische Wirkungen gegen *S. aureus* an (Abbildung 30 B). Die Berechnung der separaten FIC-Werte der Stoffe und der dazugehörige FICI für die Kombination bestehend aus 64 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin und 3,2 µM (1,107 µg mL⁻¹) des Prodigiosin-Derivats-F ergab einen FICI von 0,75. Damit konnte der kombinatorische antibakterielle Effekt dieser Kombination als tendenziell synergistisch eingestuft werden. Des Weiteren sorgten Kombinationen bestehend aus 6,4 µM (2,214 µg mL⁻¹) des Prodigiosin-Derivats-F zusammen mit 16 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin oder höheren Biotensidkonzentrationen für eine starke Inhibition des Wachstums der bakteriellen Zellen.

Zusammenfassend sind in beiden betrachteten Stoffkombinationen N-Myristoyltyrosin und Prodigiosin sowie N-Myristoyltyrosin und Prodigiosin-Derivat-F jeweils sehr leichte kombinatorisch verstärkte antibakterielle Effekte gegen das humane Pathogen S. aureus erkennbar. Im Allgemeinen wurde jedoch durch die Derivatisierung des Naturstoffes Prodigiosin keine signifikante Verbesserung der separaten sowie kombinierten Wirkintensität erzielt. Generell wurden Prodiginine bislang wenig hinsichtlich kombinatorischer Applikationen zur Verbesserung antibakterieller Wirkungen erforscht. Damit stehen zahlreiche unerforschte Kombinationsmöglichkeiten für weitere Experimente zur Verfügung. Zusammensetzungen aus den anderen in dieser Arbeit getesteten Prodigiosin-Derivaten (vgl. Abbildung 29) und N-Myristoyltyrosin könnten etwa evaluiert werden. Im Zuge dessen wäre es interessant zu wissen, ob N-Myristoyltyrosin die antibakteriellen Effekte der schwächer wirkenden Derivate-B, -E und -G der Kategorie III steigern könnte. Eine weitere Option wären kombinierte Anwendungen von Prodigiosin bzw. Prodigininen und in der Therapie bereits eingesetzten Antibiotika. Bezogen auf die hier getesteten Stoffkombinationen wäre ferner der Einsatz tensidischer Derivate eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der gemeinsamen Wirkung. Für einige in dieser Arbeit eingesetzte Biotenside existieren bereits derivatisierte Verbindungen. Beispielsweise wurden Derivate von Rhamnolipiden synthetisiert, welche stärkere antibakterielle Wirkungen gegen S. aureus aufzeigten (Aleksic et al., 2017). Die Derivatisierung von MEL führte teils ebenso zu verstärkten antibakteriellen Effekten gegen M. luteus, S. aureus, Enterococcus faecalis und E. faecium (Nashida et al., 2018). Des Weiteren zeigten verschiedene N-Acylaminosäuren Unterschiede in der Effektivität der Solubilisierung von Membranproteinen (Abe et al., 2010), sodass veränderte antibakterielle Wirkintensitäten dieser Verbindungen erwartet werden können. Ein weiterer zu beachtender Aspekt ist, dass die im Rahmen der heterologen Produktion hergestellte Charge von N-Myristoyltyrosin neben dieser Verbindung ohnehin weitere N-Acyltyrosine mit anderen Acylkettenlängen aufweist (Thies et al., 2016). Dabei handelt es sich im Gegensatz zu den verschiedenen N-Acylaminosäuren der zuvor genannten Studie um jeweils dasselbe Kopfteil (Tyrosin). Nichtsdestotrotz kann die veränderte Kettenlänge in verschiedenen Eigenschaften der Tenside resultieren, wie es bei den vorliegenden Prodigiosin-Derivaten beobachtet wurde. Die

Generierung reiner Chargen von *N*-Acyltyrosinen mit jeweils definierten Acylketten könnte daher eine Möglichkeit zur Gewinnung zusätzlicher Verbindungen mit im Vergleich zu *N*-Myristoyltyrosin modifizierten Bioaktivitäten sein. In einer gemeinsamen Applikation eines der genannten tensidischen Derivate zusammen mit Prodigiosin bzw. Prodigiosin-Derivat-F könnten möglicherweise verbesserte kombinatorische antibakterielle Aktivitäten gegen *S. aureus* verzeichnet werden. Die obige ausführliche Aufzählung diverser Beispiele für Stoffkombinationen zeigt, dass die Ergebnisse der Arbeit einen Grundstein zur Ableitung einer Bandbreite weiterer theoretischer Kombinationen zweiten Grades legen.

Zusammenfassung:

Modifikation der Antibiotikum-Komponente Prodigiosin

DIE HIER VORLIEGENDEN DERIVATISIERUNGEN VON PRODIGIOSIN FÜHREN ZU KEINER VERBESSERTEN ANTIBAKTERIELLEN AKTIVITÄT:

Antibakterielle Wirkung diverser Prodigiosin-Derivate (Kapitel 3.1.3.1)

Die sieben am C-Ring modifizierten Prodigiosin-Derivate und Prodigiosin besitzen in den getesteten Konzentrationen keine antibakterielle Wirkung gegen die Gram-negativen bakteriellen Humanpathogene *P. aeruginosa* und *S. marcescens*. Hingegen wirken alle acht Verbindungen antibiotisch gegen die inkludierten Gram-positiven Bakterien. Dabei wirkt kein Prodigiosin-Derivat stärker als das natürliche Prodigiosin. Die Derivate-F und -H, die gegenüber Prodigiosin unterschiedlich verlängerte Alkylketten in der 2-Position und verkürzte Ketten in der 3-Position tragen, zeigen eine äquivalente Wirkintensität zu Prodigiosin auf.

N-Myristoyltyrosin und Prodigiosin-Derivat-F (Kapitel 3.1.3.2)

In der Evaluierung der Stoffkombinationen *N*-Myristoyltyrosin und Prodigiosin bzw. Prodigiosin-Derivat-F gegen *S. aureus* wurden sehr geringe kombiniert verstärkte antibakterielle Wirkungen sichtbar. Im Zuge dessen wurde erstmals eine alleinige MIC von 128 µg mL⁻¹ für das Biotensid *N*-Myristoyltyrosin gegen *S. aureus* determiniert.

3.1.4 Abgeleitete antibakterielle Stoffkombinationen zweiten Grades mit *N*-Myristoyltyrosin als fester Kombinationskomponente

In den vorangegangenen Untersuchungen konnten durch die Variation der tensidischen Komponente Serrawettin W1 und die Derivatisierung der Antibiotikum-Komponente Prodigiosin neue, antibakteriell aktive Stoffkombinationen aufgedeckt werden. Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen wurden nachfolgend weitere Substanzkombinationen entsprechend einer Ableitung zweiten Grades aufgestellt und hinsichtlich kombinierter antibakterieller Wirkungen untersucht. Gemeint sind damit Stoffkombinationen, bei denen weder Prodigiosin noch Serrawettin W1 inkludiert sind, und damit kein Bestandteil aus dieser natürlichen Kombination herrührt. Die Ableitungen zweiten Grades sind dennoch insofern an die natürliche Kombination angelehnt, als dass mindestens eine artverwandte Verbindung der beiden Naturstoffklassen hinzugezogen wurde. Aus den Daten zur Varianz der Wirkverstärker-Komponente geht hervor, dass *N*-Myristoyltyrosin ein vielversprechender Kandidat zur Kombination mit Prodigiosin ist. Daher sollte überprüft werden ob, *N*-Myristoyltyrosin für die Modulation der Wirkstärke von etablierten Antibiotika verschiedener Klassen und ausgewählten antibakteriellen pflanzlichen Verbindungen eingesetzt werden kann.

3.1.4.1 *N*-Myristoyltyrosin und etablierte Antibiotika

Das Biotensid *N*-Myristoyltyrosin zeigte in den vorangegangenen Experimenten eine verstärkte kombinatorische antibakterielle Wirkung zusammen mit Prodigiosin gegen *C. glutamicum*. Dieses Bakterium wird unter anderem als Modell für *M. tuberculosis* verwendet. Bei der Behandlung von *M. tuberculosis*-Infektionen sind kombinierte Therapien im Allgemeinen bereits fest etabliert (Trevor *et al.*, 2015). Aufgrund von Resistenzentwicklungen werden auch hier neue Ansätze erforscht, wobei beispielsweise ein spezifischer verstärkter antibiotischer Effekt zwischen dem Tensid DDM (*n*-Dodecyl-β-D-Maltosid) und dem bereits für die Behandlung von *M. tuberculosis* etablierten Antibiotikum Isoniazid (Isonicotinsäurehydrazid) nachgewiesen werden konnte (Risin *et al.*, 2014). Daher könnte das bislang wenig untersuchte Biotensid *N*-Myristoyltyrosin ebenfalls ein potenzieller Kandidat für die Wirkverstärkung eines Antituberkulotikums, aber auch generell etablierter Antibiotika sein. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob das Biotensid die effektiven Konzentrationen bekannter, klinisch angewendeter Antibiotika herabsetzen kann.

Um der Frage nach einer Wirkverstärkung eines Antituberkulotikums durch *N*-Myristoyltyrosin nachzugehen, wurde zunächst die Kombination aus Streptomycin und *N*-Myristoyltyrosin detailliert untersucht. Das Aminoglykosid-Antibiotikum Streptomycin ist neben der gängigen alleinigen Applikation bereits für die kombinierte Anwendung zusammen mit anderen Antibiotika in der klinischen Behandlung des humanpathogenen Bakteriums *M. tuberculosis* etabliert (Trevor *et al.*,

2015). Zur Untersuchung der neuen Kombination gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde (i) der Agardiffusionstest zur Visualisierung antibakterieller Effekte (Abbildung 31) und (ii) der Makrodilutionstest zur MIC- und MBC-Bestimmung eingesetzt.



Abbildung 31: Kombinierte antibakterielle Wirkung von *N*-Myristoyltyrosin und Streptomycin gegen *C. glutamicum* im Agardiffusionstest.

(A) Die hier verwendete *N*-Myristoyltyrosin-Charge wurde chemisch nach bestehendem Protokoll synthetisiert (Thies *et al.*, 2016). Das verwendete Streptomycin-Sulfat wurde von der Firma GERBU Biotechnik GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen. (B) Die beiden Stoffe wurden in Ethanol (p.a.) gelöst und im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Als Kontrolle (0 µg pro Celluloseblättchen) diente das verwendete Lösungsmittel (Ethanol). *N*-Myristoyltyrosin wurde entlang der Y-Achse in Konzentrationen von 10, 25 und 50 µg mL⁻¹ aufgetragen, Streptomycin entsprechend auf der X-Achse. Aufgrund des starken alleinigen antibakteriellen Effekts von Streptomycin (Abbildung 16), wurden Konzentrationen von 0,1 µg, 1 µg und 10 µg pro Celluloseblättchen eingesetzt. Die mit den Stoffen versehenen Celluloseblättchen wurden auf einen *C. glutamicum*-Ausstrich auf einer LB-Agarplatte aufgelegt und diese nach der Rasenbildung durch Inkubation bei 30 °C über Nacht (20 h) fotodokumentiert. Bei dem gezeigten Bild handelt es sich um ein repräsentatives Ergebnis einer Dreifachbestimmung. (C) Die Größen der Hemmhöfe sind in mm als Durchmesser minus der Größe der Celluloseblättchen von 6 mm angegeben. Die tabellarisch angegebenen Werte zeigen die Mittelwerte der Hemmhöfe der Dreifachbestimmung mit den entsprechenden Standardabweichungen. In grau hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche kleiner 1 mm sind. Farbig hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche größer oder gleich 1 mm sind.

Aufgrund der starken separaten antibakteriellen Wirkung von Streptomycin gegen *C. glutamicum*, welche zuvor im Agardiffusionstest beobachtet wurde (vgl. Abbildung 16), wurden hier zur Untersuchung kombinatorischer Wirkungen 0,1 µg, 1 µg bzw. 10 µg Streptomycin pro Celluloseblättchen verwendet. Für das Biotensid *N*-Myristoyltyrosin wurden die zuvor eingesetzten Mengen von 10 µg, 25 µg und 50 µg pro Celluloseblättchen beibehalten. Beide Substanzen wurden nach bekanntem Schema gegeneinander aufgetragen, inkubiert und die Agarplatten nach der Rasenbildung fotodokumentiert (Abbildung 31). Übereinstimmend mit den vorherigen Ergebnissen waren bei der jeweiligen separaten Applikation von *N*-Myristoyltyrosin kleine Hemmhöfe und bei Streptomycin Hemmhöfe entsprechend der zuvor determinierten Größen (0,1 µg: kein Hemmhof; 1 µg: ca. 4 mm; 10 µg: ca. 11 mm) erkennbar (vgl. Abbildung 16). Der kombinierte Einsatz resultierte in einem leichten kombinatorischen Effekt der Substanzen. Dementsprechend wurde bei 10 µg *N*-Myristoyltyrosin und 0,1 µg Streptomycin ein gemeinsamer Hemmhof von 1,5 mm sichtbar, während bei alleiniger Applikation der beiden Substanzen in diesen Konzentrationen keine Hemmhöfe zu erkennen waren (Abbildung 31, weißer Rahmen).

Zur Bestimmung der kombinatorischen MIC-Werte von *N*-Myristoyltyrosin und Streptomycin wurden die Verbindungen in Konzentrationsreihen mit einem Verdünnungsfaktor von zwei im Makrodilutionstest gegen *C. glutamicum* eingesetzt. Die Ergebnisse der Zelldichtemessung am Ende der Exposition sind graphisch dargestellt (Abbildung 32). Mit 32 µg mL⁻¹ entsprach die MIC von *N*-Myristoyltyrosin den bisherigen Daten (vgl. Kapitel 3.1.2.3.1, Abbildung 24). Da im Fall von Streptomycin eine neue Konzentrationsreihe eingesetzt wurde, wurde eine MIC von 8 µg mL⁻¹ ermittelt, welche im Vergleich mit den vorherigen Ergebnissen (vgl. Abbildung 24 B) im erwarteten Konzentrationsbereich lag. Bei kombinierter Applikation des Biotensids zusammen mit Streptomycin wurden verstärkte kombinatorische antibakterielle Effekte beobachtet. Dabei wurde die alleinige MIC des Antibiotikums Streptomycin von 8 µg mL⁻¹ zusammen mit 16 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin auf 0,25 µg mL⁻¹ herabgesetzt (Abbildung 32 A).

Auf Basis der alleinigen und kombinierten MIC-Werte von *N*-Myristoyltyrosin und Streptomycin wurden die entsprechenden FICI-Werte berechnet, anhand derer eine Klassifizierung der kombinatorischen Effekte durchgeführt wurde. Für die Kombination bestehend aus 0,25 µg mL⁻¹ Streptomycin und 16 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin ergaben sich FIC-Werte von 0,015625 bzw. 0,5. Somit lag ein FICI von ungefähr 0,52 vor, welcher damit als tendenziell synergistisch eingestuft wurde (vgl. Tabelle 8). Außerdem war deutlich erkennbar, dass im Bereich ab 2 µg mL⁻¹ Streptomycin maximal zwei Zellteilungen über die Dauer der Inkubation erfolgten. Die gleichzeitige Applikation von 2 µg mL⁻¹ Streptomycin und 2 bzw. 4 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin reduzierte das Wachstum weiter. Die Kombination von 2 µg mL⁻¹ Streptomycin und 8 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin resultierte in einem vollständigen Wachstumsarrest. Die Zugabe von 2, 4 bzw. 8 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin zusammen

mit 1, 0,5 bzw. 0,25 μg mL⁻¹ Streptomycin setzte das Zellwachstum, welches im Fall der alleinigen Anwendung der niedrigeren Konzentrationen von Streptomycin auftrat, ebenfalls deutlich herab.



Abbildung 32: Makrodilutionstest zur Bestimmung der kombinatorischen Wirkung von *N*-Myristoyltyrosin und Streptomycin gegen *C. glutamicum*.

Es wurden Flüssigkulturen des Bakteriums *C. glutamicum* ATCC 13032 mit einem Gesamtvolumen von 800 μ L zur Bestimmung von MIC- und MBC-Werten inokuliert. *N*-Myristoyltyrosin und Streptomycin wurden in Verdünnungsreihen mit einem Verdünnungsfaktor von zwei gegeneinander entsprechend einer *Checkerboard*-Matrix aufgetragen und für 20 h bei 30 °C und permanentem Schütteln inkubiert. (A) Zur Bestimmung der separaten und kombinierten minimalen Hemmkonzentrationen (MIC) von *N*-Myristoyltyrosin und Streptomycin wurden nach der Bebrütung die jeweilige optische Dichte der Kulturen gemessen. Dafür wurden die Kulturen zunächst gewaschen, sodass die Zellen in frischem LB-Medium vorlagen. Von jeder Kultur wurden 100 μ L-Proben entnommen und diese in einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von λ = 650 nm gemessen. Durch die Anwendung eines Korrekturfaktors wurden die Messdaten in OD-Werte

einer standardisierten OD-Messung (OD_{650 nm}) im Küvetten-Maßstab mit 1 mL Volumen und einer Schichtdicke von 1 cm konvertiert und hier angegeben. Die Farbskala repräsentiert das Wachstum der Kulturen. Grau: Optische Dichten < 0,06, definiert als kein Wachstum; blaue Schattierungen: stark beeinflusstes Zellwachstum bei einer optischen Dichte ab 0,06; mittelmäßig beeinflusstes Zellwachstum ab einer optischen Dichte von 1,00; unbeeinflusstes Zellwachstum bei einer optischen Dichte≥4,10. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit den entsprechenden Standardabweichungen. (B) Zur Bestimmung der separaten und kombinierten minimalen bakteriziden Konzentrationen (MBC) von N-Myristoyltyrosin und Streptomycin gegen C. glutamicum wurde die zur optischen Dichtemessung gewaschenen Kulturen verwendet. Jede Kultur wurde zunächst 1:100 verdünnt und hiervon je 3 µL auf LB-Agarplatten ohne Antibiotika getropft. Die Inkubation erfolgte für 20 h bei 30 °C. Anschließend wurden die Kolonien gezählt und eine Kategorisierung entsprechend der Anzahl der Kolonien durchgeführt. Eine Abtötung von 99,9 % einer gesamten Kultur wurde durch das Anwachsen von maximal 55 Kolonien angezeigt (graue Schattierung, Kreis). Die niedrigste Konzentration eines Stoffes, bei der dies erreicht wurde, stellt die MBC dar. Des Weiteren wurde wie folgt kategorisiert: (i) stark beeinflusstes Wachstum (hellblaue Schattierung, ausgefüllte Raute), (ii) mittelmäßig beeinflusstes Wachstum (blaue Schattierung, ausgefüllter Kreis) und (iii) unbeeinflusstes Wachstum, welches nicht unterscheidbar zur Kontrolle war (dunkelblaue Schattierung, ausgefülltes Quadrat). Die in einem Kästchen dargestellten drei Symbole entsprechen den Ergebnissen einer Dreifachbestimmung. Die Schattierungen spiegeln die gemittelten Ergebnisse wider. Teilabbildung (A) modifiziert nach Hage-Hülsmann et al., 2018.

Zur Überprüfung der bakteriziden Wirkung der Kombination N-Myristoyltyrosin und Streptomycin gegen C. glutamicum wurde das Überleben der Zellen nach der Exposition determiniert (Abbildung 32 B). Das Biotensid *N*-Myristoyltyrosin zeigte wieder eine MBC von 32 μ g mL⁻¹, welche dem im vorherigen Experiment ermittelten MBC-Wert entsprach (vgl. Abbildung 25). Für das Aminoglykosid-Antibiotikum Streptomycin konnte ein MBC-Wert von 2 µg mL⁻¹ festgelegt werden. In den zuvor erhobenen Daten (vgl. Abbildung 25) wurde mit der anderen Konzentrationsreihe eine MBC von 1,28 µg mL⁻¹ Streptomycin festgelegt. Dementsprechend liegen die beiden mittels unterschiedlicher Verdünnungsreihen ermittelten MBC-Werte von Streptomycin gegen *C. glutamicum* im selben Konzentrationsbereich. Die MBC von Streptomycin (2 μ g mL⁻¹) konnte bei kombinierter Zugabe mit 16 μg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin auf 0,25 μg mL⁻¹ Streptomycin herabgesetzt werden. Bei der Kombination von 0,25 µg mL⁻¹ Streptomycin zusammen mit 8 µg mL⁻¹ N-Myristoyltyrosin lag in zwei von drei Proben der Dreifachbestimmung ein stark beeinträchtigtes Wachstum und in der dritten Probe kein Wachstum von C. glutamicum vor (Abbildung 32 B, hellblau hinterlegtes Feld). Bereits 1 µg mL⁻¹ Streptomycin führte zu einer starken Reduktion der Koloniezahl, sodass die Zugabe von 2 μg mL⁻¹ N-Myristoyltyrosin für ein völliges Abtöten der Bakterien sorgte.

Durch die gemeinsame Applikation von *N*-Myristoyltyrosin und Streptomycin wurde eine deutliche Verstärkung der wachstumsinhibierenden und bakteriziden Wirkung festgestellt. Damit wird deutlich, dass das Biotensid nicht nur die Wirkung von unlöslichen antibiotischen Verbindungen wie Prodigiosin, sondern auch von gut löslichen Antibiotika wie Streptomycin verstärken kann. Aus diesem Grund wurden des Weiteren im Rahmen einer assoziierten Bachelorarbeit von Leonie Maria Windeln (Windeln, 2016) Studien zur Aktivität von Kombinationen aus *N*-Myristoyltyrosin und sieben verschiedenen etablierten Antibiotika durchgeführt. Dazu wurden die Breitbandantibiotika Ampicillin (Einsatz z. B. bei HNO-Erkrankungen oder Infektionen des Magen-Darm-Traktes), Chloramphenicol (Einsatz z. B. bei Typhus, Diphtherie und Malaria) und Tetracyclin (Einsatz z. B. bei Cholera,

Magenentzündungen und -geschwüren) verwendet. Des Weiteren wurden die Aminoglykosid-Antibiotika Gentamicin [Notfallantibiotikum für sehr schwere bakterielle Infektionen wie etwa Entzündungen der Hirnhaut (Meningitis) und Blutvergiftungen (Sepsis)], Kanamycin (topische Anwendung bei Bindehautentzündungen), Spectinomycin (zur Behandlung von Gonorrhö) und das zuvor verwendete Streptomycin (Einsatz z. B. bei Tuberkulose) getestet. Der Einsatz von Streptomycin diente der Generierung einer Referenz. Zur Evaluierung wurden Agardiffusionstests und Makrodilutionstests gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten chemisch synthetisierten Charge von *N*-Myristoyltyrosin handelte es sich bei der in der Bachelorarbeit eingesetzten Charge um mittels heterologer Biosynthese hergestelltes *N*-Myristoyltyrosin. Dies zeigte die Möglichkeit einer biotechnologischen Gewinnung des Naturstoffes auf. Im Folgenden sind ausgewählte Ergebnisse der Arbeit von Leonie M. Windeln tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 14).

Tabelle 14: Kombinatorische antibakterielle Effekte von *N*-Myristoyltyrosin und etablierten Antibiotika gegen *C. glutamicum*.

Die hier zusammengefassten Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Leonie M. Windeln erhoben. In Makrodilutionstests wurde das Biotensid *N*-Myristoyltyrosin (*N*) zusammen mit diversen etablierten Antibiotika gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 hinsichtlich antibakterieller kombinatorischer Wirkungen getestet. *N*-Myristoyltyrosin wurde für diese Experimente heterolog in *E. coli* hergestellt. Alle anderen Antibiotika wurden käuflich erworben. Zur Bestimmung der MIC wurden Kulturen des Bakteriums *C. glutamicum* in 800 µL LB-Medium mit einer Startzelldichte OD_{580 nm} = 0,05 beimpft und über 20 h in Round Well Plates bei 30 °C und 900 UpM schüttelnd kultiviert. Dabei wurden die Antibiotika im Bereich von 0,01 bis 100 µg mL⁻¹ zugegeben, wobei die für jedes Antibiotikum verwendeten Konzentrationen spezifisch abgestimmt wurden. Dabei wurde das Zellwachstum nach der Inkubation unter Einfluss von Antibiotika ohne und mit zusätzlicher Zugabe von 5 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin-Rohextrakt vergleichend evaluiert. Es ist zu beachten, dass Effekte etwaiger Verunreinigungen des Rohextraktes nicht ausgeschlossen werden können.

Antibiotikum	Wirkv	erstärkung	Antibiotikaklasse	Wirkort	
	MIC alleine	MIC + 5 μg mL ⁻¹ N			
Ampicillin	5 μg mL ⁻¹	5 μg mL ⁻¹	β-Lactam- Antibiotika	Zellwandsynthese	
Chloramphenicol	15 μg mL ⁻¹	15 μg mL ⁻¹	Amphenicole	Proteinbiosynthese	
Tetracyclin	5 μg mL ⁻¹	5 μg mL ⁻¹	Tetracycline	Proteinbiosynthese	
Gentamicin	0,2 μg mL⁻¹	0,01 μg mL ⁻¹	Aminoglykoside	Proteinbiosynthese	
Kanamycin	0,5 μg mL⁻¹	0,02 μg mL ⁻¹	Aminoglykoside	Proteinbiosynthese	
Spectinomycin	> 100 µg mL ⁻¹	20 μg mL ⁻¹	Aminoglykoside	Proteinbiosynthese	
Streptomycin	10 μg mL ⁻¹	0,2 μg mL ⁻¹	Aminoglykoside	Proteinbiosynthese	

Trotz der Unterschiede im exakten experimentellen Vorgehen, die einen starken Einfluss auf MIC-Ergebnisse haben können, lagen die für Streptomycin detektierten alleinigen und bei Kombination mit N-Myristoyltyrosin erhaltenen MIC-Werte der Bachelorarbeit in einem ähnlichen Bereich wie die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte (Abbildung 32). Anhand der Zusammenfassung der übrigen in der Bachelorarbeit erhobenen Daten ist zu erkennen, dass verschiedene verstärkte kombinatorische antibakterielle Wirkungen aufgezeigt wurden. Während die Wirkung von Ampicillin, Chloramphenicol und Tetracyclin nicht verstärkt wurde, erbrachte die Zugabe von N-Myristoyltyrosin insbesondere bei Gentamicin, Kanamycin und Spectinomycin eine deutlich gesteigerte Wirkung. Die detaillierte Untersuchung der antibakteriellen Wirkung der Kombination N-Myristoyltyrosin und Streptomycin sowie der obige Datensatz (Tabelle 14) deuteten zusammengenommen daraufhin, dass vor allem bei N-Myristoyltyrosin in Kombination mit Aminoglykosid-Antibiotika verstärkte antibakterielle Wirkungen auftreten. Aufgrund des limitierten Datensatzes kann dies jedoch nicht abschließend geklärt werden. Allerdings wurden und werden Aminoglykosid-Antibiotika in klinischen Anwendungen und Studien oftmals in Kombinationen getestet und sind teils Bestandteile etablierter Kombinationstherapien. Ein bedeutendes und in dieser Arbeit oft aufgegriffenes Beispiel eines Aminoglykosid-Antibiotikums ist das hier zusammen mit N-Myristoyltyrosin genauer untersuchte Antituberkulotikum Streptomycin. Dieses ist, wie bereits neben dem zunächst alleinigen Einsatz ebenfalls für die Applikation erwähnt, in Kombinationstherapien zur Behandlung von *M. tuberculosis*-Infektionen bekannt geworden (Kerantzas & Jacobs, 2017; Murray et al., 2015; Sotgiu et al., 2015). Im Allgemeinen sind synergistische Effekte bei Kombinationen von Aminoglykosid-Antibiotika und Zellwand-aktiven antimikrobiellen Substanzen, wie β -Lactam-Antibiotika, besonders gut beschrieben (Eliopoulos & Eliopoulos, 1988; Hooton et al., 1984; Krause et al., 2016). Einige Beispiele dieses Kombinationstyps sind in einem Übersichtsartikel der 1980er Jahren dargelegt (Eliopoulos & Eliopoulos, 1988): Dort wird unter anderem beschrieben, dass bei der Anwendung der Kombination aus dem Aminoglykosid Streptomycin und dem Zellwand-aktiven Penicillin gegen Streptococcus faecalis (heute E. faecalis) eine vermehrte Aufnahme von Streptomycin verzeichnet wurde.

Generell beruht die molekulare Wirkweise von Aminoglykosid-Antibiotika hauptsächlich auf der Inhibierung der Proteinbiosynthese (z. B. Gentamicin: vgl. Kapitel 1.2, Abbildung 2), wobei die Stoffe dazu an die prokaryotische 16S-rRNA der 30S-Untereinheit der Ribosomen binden (Jana & Deb, 2006; Kotra *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2016). Der antibakterielle Angriffspunkt von Aminoglykosid-Antibiotika liegt demnach in der bakteriellen Zelle, sodass der erste Schritt das Eindringen der bioaktiven Substanz in das Innere des Bakteriums ist. Das Zerstören der Stabilität der bakteriellen Membranen während des Eindringens in die Zelle trägt ebenfalls zur antibakteriellen Aktivität bei, wobei dieser Effekt jedoch nicht den primären Mechanismus darstellt und dementsprechend nicht alleine für die antibakterielle Wirkung verantwortlich ist (Jana & Deb, 2006; Serio *et al.*, 2018).

Bei dem Prozess des Eindringens von Aminoglykosiden handelt es sich um einen spezifischen komplexen Hergang, welcher sich in folgende Schritte gliedert (Allison & Lambert, 2014; Jana & Deb, 2006; Krause et al., 2016): Zunächst erfolgt die Anlagerung des Antibiotikums an negativ geladene Bestandteile der bakteriellen Membran (z. B. Phospholipide, Lipopolysaccharide, Teichonsäuren), welche aufgrund der kationischen Eigenschaften der Aminoglykosid-Antibiotika begünstigt ist, sodass es zu einer elektrostatischen Bindung kommt. Darauf folgt eine Verdrängung von Magnesiumionen, die für die Vernetzung und Stabilisierung von Lipiden in der bakteriellen Membran verantwortlich sind. Der Verlust dieser Kationen resultiert in der Zerstörung der äußeren Membran und damit einhergehend in einer gesteigerten Permeabilität. Somit ist die erste Barriere für die Aufnahme des Antibiotikums in die Zelle überwunden. Als Nächstes schließt sich das Durchqueren der Cytoplasmamembran an. Dieser Prozess benötigt Energie aus dem Stoffwechsel des Bakteriums und ist damit abhängig von einem Elektronen-Transport, sodass in der Zelle die aerobe Zellatmung stattfinden muss, welche wiederum Sauerstoff-abhängig ist. Dies erklärt, weshalb Aminoglykoside in anaeroben Umgebungen eine geringere Wirkung zeigen. Sind die ersten Moleküle des Aminoglykosid-Antibiotikums einmal in das Innere der Zelle gelangt, so kommt es zu den ersten Fehlern während der Translation von Proteinen. Werden diese wiederum in die Cytoplasmamembran eingelagert, wird die Membran geschädigt und weitere Aminoglykoside können erleichtert in das Bakterium eindringen. Zusammengenommen ist der Eintritt von Aminoglykosiden in die bakterielle Zelle wie bereits erwähnt ein komplexer, langsamer und energieabhängiger Prozess, welcher durch diverse Faktoren, wie etwa die vorhandene Sauerstoffmenge, negativ beeinflusst werden kann. Im Umkehrschluss kann darauf geschlossen werden, dass der Eintritt durch die Zugabe von Substanzen, welche die Zellhülle für Aminoglykoside durchlässiger machen, gefördert werden könnte. Die hier gezeigten Ergebnisse passen zu dieser Hypothese. Folglich könnte die Zugabe des Biotensids N-Myristoyltyrosin den Eintritt der polykationischen Aminoglykoside begünstigen. Dabei ist die verstärkende Wirkung des Biotensids spezifisch für diese Antibiotikagruppe, was im Zusammenhang mit eben dem genannten spezifischen Eintrittsmechanismus stehen könnte. Dies würde des Weiteren die fehlende verstärkte Wirkung von N-Myristoyltyrosin und Antibiotika anderer Klassen wie Tetracyclin und Chloramphenicol trotz derselben molekularen Wirkmechanismen (Hemmung der Proteinbiosynthese) erklären. Denn obwohl der Wirkmechanismus des Naturstoffes N-Myristoyltyrosin nicht untersucht ist, liegt es nahe, dass dieses Biotensid ebenfalls einen Einfluss auf die bakterielle Membran hat (vgl. Kapitel 3.1.2.3). Des Weiteren würden sich die hier beobachteten Effekte damit in die bekannten kombinatorischen Wirkungen zwischen Aminoglykosid-Antibiotika und Zellwand-aktiven Verbindungen einreihen.

Aminoglykosid-Antibiotika sind sowohl in der medizinischen Therapie als auch in der wissenschaftlichen Forschung immer noch von großer Bedeutung. So wurde und wird die Derivatisierung und Generierung von Aminoglykosid-Antibiotika zur Gewinnung neuer bioaktiver Verbindungen viel und divers etwa mittels synthetischer und chemoenzymatischer Methoden erforscht (Chandrika & Garneau-Tsodikova, 2018). Ein Beispiel eines neuen, in klinischen Studien untersuchten und im Juni 2018 von der *Food and Drug Administration* (FDA) genehmigten Aminoglykosid-Antibiotikums ist die als Plazomicin bezeichnete Verbindung (CDER, 2018; Eljaaly *et al.*, 2019; Serio *et al.*, 2018). Dementsprechend sind ebenso weiterführende Untersuchungen, wie die hier vorliegenden Evaluierungen bezüglich kombinatorischer Wirkungen neuer Verbindungen (*N*-Myristoyltyrosin) und etablierten Antibiotika (z. B. Aminoglykoside), ein relevanter und wertvoller Beitrag für zukünftige Behandlungsansätze von Infektionen oder Desinfektionsstrategien.

3.1.4.2 N-Myristoyltyrosin und pflanzliche Triterpene

In den bisherigen Untersuchungen dieser Arbeit lag der Fokus überwiegend auf aus Bakterien gewonnenen Sekundärmetaboliten. In dem Feld der Erforschung antibakterieller Verbindungen sind jedoch ebenso Metabolite pflanzlicher Herkunft sehr oft involviert (Compean & Ynalvez, 2014; Gokhale & Wadhwani, 2015). Eine Gruppe dieser Naturstoffe sind die Triterpene, die teils antibakterielle Eigenschaften aufweisen (Awanchiri et al., 2009; Brahmachari et al., 2013; Mokoka et al., 2013). Um zu untersuchen, ob das Biotensid N-Myristoyltyrosin mit pflanzlichen bioaktiven Stoffen kombinatorische antibakterielle Effekte besitzt, wurden die zwei intensiv erforschten Triterpene Ursol- und Oleanolsäure (Abbildung 33) hinzugezogen. Diese kommen in vielen Pflanzen (z. B. Heilpflanzen) vor und sind Bestandteil unserer täglichen Nahrung (z. B. Äpfel) (Babalola & Shode, 2013; Jäger et al., 2009; Liu, 1995). In zahlreichen Studien wurden die beiden Verbindungen immer wieder mit einer Reihe pharmazeutisch nützlicher Bioaktivitäten, wie etwa hepatoprotektiven Aktivitäten, Wirksamkeiten gegen die Tumorentwicklung und eben antimikrobiellen Wirkungen in Zusammenhang gebracht (Babalola & Shode, 2013; Jesus et al., 2015; Liu, 2005, 1995; Pollier & Goossens, 2012; Seo et al., 2018). Ursol- und Oleanolsäure wirken beispielsweise gegen das in den vorherigen Experimenten verwendete Bakterium S. aureus ATCC 25923 mit MIC-Werten von 8 µg mL⁻¹ Ursolsäure und 64 µg mL⁻¹ Oleanolsäure antibiotisch (Fontanay *et al.*, 2008). Das ebenfalls bekannte Triterpen Betulinsäure zeigte gegen S. aureus in dieser Studie bis zu einer Konzentration von 256 µg mL⁻¹ keinen antibakteriellen Effekt (Fontanay *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurde in den nachfolgenden Experimenten N-Myristoyltyrosin zusammen mit Ursol- beziehungsweise Oleanolsäure hinsichtlich kombinatorischer antibakterieller Wirkungen gegen S. aureus ATCC 25923 evaluiert.



Abbildung 33: Die Triterpene Oleanol- und Ursolsäure.

(A) Oleanol- und (B) Ursolsäure kommen in zahlreichen Pflanzen einschließlich verschiedener Heilpflanzen als bioaktive Bestandteile vor (Liu, 1995). Die Verbindungen gehören zu der Klasse der zyklischen Triterpene und weisen eine pentazyklische Struktur auf. Der A-, B-, C-, D- und E-Ring sind gekennzeichnet. Oleanol- und Ursolsäure sind Positionsisomere, welche sich in einer Methylgruppe am E-Ring unterscheiden.

Als Testsystem wurde weiterhin das Mikrodilutionsverfahren (vgl. Kapitel 2.7.2.2) verwendet. Die Auswahl der Konzentrationen für die Triterpene erfolgte anhand einer Orientierung an den aus der Literatur bekannten, soeben genannten MIC-Werten. Für *N*-Myristoyltyrosin wurde der in den vorangegangenen Experimenten als geeignet befundene Konzentrationsbereich gegen *S. aureus* (vgl. Abbildung 30; Y-Achsen) eingesetzt. Es wurde kommerziell erhältliche Ursol- sowie Oleanolsäure mit einer Reinheit von \geq 90 % beziehungsweise \geq 97 % bezogen und verwendet. Die Stoffe wurden im Co-Solvens DMSO gelöst und den Kulturen so zugegeben, dass eine DMSO-Endkonzentration von 3 % vorhanden war. Zellkulturen, denen ausschließlich 3 % DMSO zugegeben wurde, dienten als Kontrolle.

Wie entsprechend der Daten aus der Literatur zu erwarten war, wirken Oleanol- und Ursolsäure jeweils antibakteriell gegen *S. aureus*. Dabei wurde in dem hier verwendeten Testsystem für Oleanolsäure ab 32 µg mL⁻¹ kein Wachstum mehr verzeichnet (Abbildung 34 A). Bei einer Konzentration von 128 µg mL⁻¹ Oleanolsäure deutete sich jedoch ein erneutes leichtes Wachstum an, wie die steigende optische Dichte zeigt. Dementsprechend kann der erstgenannte Wert nicht als MIC interpretiert werden. Für Ursolsäure konnte eine MIC von 8 µg mL⁻¹ (Abbildung 34 B) ermittelt werden. Die MIC des Biotensids *N*-Myristoyltyrosin lag deckungsgleich mit den Daten der vorherigen Experimente bei einer Konzentration von 128 µg mL⁻¹.


Abbildung 34: Kombinierte antibakterielle Wirkungen des Biotensids *N*-Myristoyltyrosin und Oleanol- bzw. Ursolsäure gegen *S. aureus*.

Zur Bestimmung kombinatorischer Aktivitäten mittels MIC-Werten wurden Flüssigkulturen des Bakteriums *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 im Mikrodilutionsmaßstab mit einem Kulturvolumen von 100 µL verwendet. Oleanolsäure, Ursolsäure und *N*-Myristoyltyrosin wurden jeweils in Verdünnungsreihen mit einem Verdünnungsfaktor von zwei gegeneinander entsprechend einer *Checkerboard*-Matrix aufgetragen. Als Co-Solvens diente DMSO, welches demnach ebenfalls in der Kontrolle (0 µg mL⁻¹) eingesetzt wurde. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und ohne Schütteln für 20 Stunden. Anschließend wurde die optische Dichte jeder Kultur zur Bestimmung des Zellwachstums bei einer Wellenlänge von λ = 750 nm mittels eines Multimodus-Mikroplatten-Readers gemessen. Die Messwerte des zur Kultivierung verwendeten reinen Mediums (MH-Medium) wurden von den gemessenen Absorptionen der Kulturen subtrahiert. Zudem erfolgte durch die Anwendung eines Korrekturfaktors eine Umrechnung auf theoretisch mit einem Spektralphotometer der Serie GENESYS 10S gemessene Werte, welche in der obigen Abbildung dargestellt sind. Die Farbskala repräsentiert die Stärke des Wachstums der Kulturen anhand verschiedener Schattierungen. Grau: OD_{750 nm} ≤ 0,06 (kein Wachstum); hellrot: OD_{750 nm} ≤ 0,70 (beeinträchtigtes Zellwachstum); rot: OD_{750 nm} > 0,70 (starkes Zellwachstum). Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten und die entsprechenden Standardabweichungen. (A) Kombinierte antibakterielle Aktivitäten von *N*-Myristoyltyrosin und Ursolsäure.

Durch den kombinierten Einsatz der Triterpene mit dem Biotensid wurden die jeweiligen antibakteriellen Effekte der Verbindungen gegen S. aureus modifiziert. Demgemäß wurde die alleinige antibakterielle Wirksamkeit von Oleanolsäure bei 32 µg mL⁻¹ durch Zugabe der niedrigsten *N*-Myristoyltyrosin-Konzentration von 2 µg mL⁻¹ herabgesetzt, wie das neu aufkommende geringe Wachstum der Zellen (OD_{750 nm} = 0,14) verdeutlicht. Dieser Effekt wurde durch den Einsatz der doppelten Menge des Biotensids von 4 µg mL⁻¹ weiter gesteigert, sodass eine OD_{750 nm} von 1,46 gemessen werden konnte. Bei 64 und 128 μg mL $^{-1}$ Oleanolsäure wurde das Wachstum mit steigender N-Myristoyltyrosin-Konzentration ebenfalls verstärkt. Insgesamt wurde deutlich, dass die separate MIC der Oleanolsäure durch das Beifügen von N-Myristoyltyrosin hochgesetzt wurde. Interessanterweise wurden bei sehr hohen Oleanolsäure- (128 µg mL⁻¹) und N-Myristoyltyrosin-Konzentrationen (8 - 64 µg mL⁻¹) Zelldichten, die ungefähr sechs- bis siebenmal höher als die Zelldichte der Kontrolle waren, beobachtet. Auch die alleinige antibakterielle Wirkung von *N*-Myristoyltyrosin bei 128 μ g mL⁻¹ wurde zusammen mit derselben Konzentration an Oleanolsäure gehemmt. Dort war ein Wachstum entsprechend einer OD_{750 nm} = 0,81 sichtbar. Damit war diese hemmende antibakterielle Wirkung deutlich erkennbar, jedoch schwächer als die vorher beschriebene gegensätzliche Wirkung. Im Gegensatz zu allen anderen beobachteten kombinatorischen Effekten scheint es sich um einen antagonistischen Effekt zwischen dem Biotensid N-Myristoyltyrosin und dem Triterpen Oleanolsäure zu handeln (Abbildung 34 A).

Ein ähnliches bzw. noch deutlicheres Inhibitionsprofil, welches auf antagonistische antibakterielle Wirkungen hindeutete, war bei der gemeinsamen Applikation von *N*-Myristoyltyrosin und Ursolsäure sichtbar (Abbildung 34 B). Dort wurde die alleinige MIC des Biotensids zusammen mit der höchsten Ursolsäure-Konzentration von 128 µg mL⁻¹ ebenfalls aufgehoben. Mit einer optischen Dichte von 0,65 war das Zellwachstum jedoch stark beeinträchtigt. Die separate MIC von Ursolsäure (8 µg mL⁻¹) verschob sich bereits mit der Zugabe von 2 µg mL⁻¹ *N*-Myristoyltyrosin auf 16 µg mL⁻¹. Mit steigender Ursolsäure-Konzentration wurde die benötigte Menge an *N*-Myristoyltyrosin zum Aufheben des antibakteriellen Effekts von Ursolsäure ebenfalls höher (Abbildung 34 B, stufenförmiges Schema). In Kulturen mit Konzentrationen von *N*-Myristoyltyrosin und Ursolsäure, welche auf eine antagonistische gemeinsame Wirkung hindeuteten, war häufig ein verstärktes Wachstum zu erkennen. Dieser anscheinend wachstumsfördernde Effekt war, wie bereits beschrieben, gleichermaßen für die Kombination von *N*-Myristoyltyrosin und Oleanolsäure zu beobachten.

Zusammengenommen wirken die beiden Kombinationen aus dem Biotensid *N*-Myristoyltyrosin und dem jeweiligen Triterpen antagonistisch gegen das humane bakterielle Pathogen *S. aureus*. Für die sehr intensiv und vielseitig erforschten Naturstoffe Oleanol- und Ursolsäure wurden jeweils mehrfach separate antibakterielle Aktivitäten beschrieben. Dabei hemmten diese Verbindungen vor allem das Wachstum Gram-positiver Bakterien mitunter einer Reihe von Humanpathogenen, wie L. monocytogenes, E. faecium, E. faecalis, S. aureus und M. tuberculosis (Fontanay et al., 2008; Giménez-Rota et al., 2019; Jiménez-Arellanes et al., 2013; Kim et al., 2015). Im Vergleich besitzt Ursolsäure überwiegend eine stärkere antibakterielle Wirkung, wie Studien mit beiden Verbindungen zeigen. So wurden für zwei unterschiedliche S. aureus-Stämme MIC-Werte von jeweils 8 µg mL⁻¹ Ursolsäure und von 32 bzw. 64 µg mL⁻¹ Oleanolsäure ermittelt (Fontanay et al., 2008). Für vier klinische *S. aureus*-Isolate wurden MIC-Werte von 8 - 16 μg mL⁻¹ für Ursolsäure und 64 - 128 μg mL⁻¹ für Oleanolsäure festgelegt (Catteau et al., 2017). Die antimykobakteriellen Aktivitäten von Ursolsäure gegen diverse M. tuberculosis-Stämme waren insgesamt ebenfalls leicht stärker als die Effekte von Oleanolsäure (Jiménez-Arellanes et al., 2013). Gleiches gilt für die hier beobachteten antibakteriellen Wirkungen gegen S. aureus. Bei Anwendung von Ursolsäure war bei 8 µg mL⁻¹ kein Wachstum mehr zu verzeichnen, wohingegen dafür die 4-fache Menge von Oleanolsäure (32 µg mL⁻¹) erforderlich war (Abbildung 34). Bei letzterem Wert ist des Weiteren zu beachten, dass der Anstieg des Messwertes bei dem separaten Einsatz von 128 µg mL⁻¹ Oleanolsäure auf ein bakterielles Zellwachstum hindeutet. Laut Definition kann das ausbleibende Wachstum bei 32 µg mL⁻¹ damit nicht als MIC betrachtet werden. Für Applikationen im medizinischen Bereich muss zusätzlich zu den determinierten MIC-Werten die Toxizität der eingesetzten Verbindungen auf eukaryotische Zellen beachtet werden. In einer diesbezüglichen Studie beeinflusste Oleanolsäure humane Epithelzellen (HEp-2-Zellen) bis einschließlich 64 μ g mL⁻¹ nicht negativ, ab 128 μ g mL⁻¹ sank die Vitalität der eukaryotischen Zellen hingegen (Kim et al., 2015). Dies bedeutet, dass unter Berücksichtigung des toxischen Werts für eukaryotische Zellen, der klinische Einsatz einer Oleanolsäure-Konzentration über 64 µg mL⁻¹ nicht in Betracht gezogen werden kann. Somit ist der hier vorliegende, determinierte, wachstumsinhibierende Wert von 32 µg mL⁻¹ Oleanolsäure für eine therapeutische Anwendung wiederum interessant. Würde die Verdünnungsreihe aufgrund der eben aufgeführten Darlegung ab der toxischen Konzentration von Oleanolsäure demnach verworfen werden, ist der Wert von 32 µg mL⁻¹ Oleanolsäure im ferneren Sinn eine gültige MIC. Dies würde ebenfalls den Daten der Literatur entsprechen, wonach in einigen Studien für Oleanolsäure teils MIC-Werte von 35 μg mL⁻¹ (Brahmachari *et al.*, 2013) bzw. 32 μg mL⁻¹ (Catteau *et al.*, 2017; Fontanay *et al.*, 2008) gegen S. aureus-Stämme festgelegt wurden. Zusammenfassend liegen die hier gegen S. aureus ermittelten MIC-Werte von Ursol- und Oleanolsäure im selben Bereich wie die in der Literatur beschriebenen minimalen Hemmkonzentrationen gegen dieses bakterielle Humanpathogen.

Neben den ausführlichen MIC-Bestimmungen von Oleanol- und Ursolsäure wurden in einigen Ansätzen die molekularen Wirkweisen beider Naturstoffe untersucht. In verschiedenen Studien wird postuliert, dass zumindest ein Teil des molekularen Angriffspunkts beider pentazyklischen Triterpene die bakterielle Membranintegrität ist (Kim *et al.*, 2015; Kurek *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016). Des Weiteren sind abgesehen von separaten antibakteriellen Effekten auch kombinierte Wirkungen der

Substanzen in der Literatur beschrieben. Oleanolsäure zeigte in Kombination mit den Tuberkulostatika Isoniazid, Rifampicin bzw. Ethambutol synergistische Wirkungen gegen M. tuberculosis (Ge et al., 2010). Ebenso besitzen die beiden Triterpene synergistische Effekte zusammen mit den β-Lactam-Antibiotika Ampicillin und Oxacillin gegen S. aureus (Catteau et al., 2017). Neben diesen Beispielen von synergistischen Effekten zwischen Ursol-/Oleanolsäure und anderen Verbindungen wurde ebenfalls ein antagonistischer Effekt zwischen Ursolsäure und α -Tocopherol beschrieben (Broniatowski *et al.*, 2015). Dieser wurde mit Hilfe einer künstlichen bakteriellen Membran nachgewiesen. Dabei ließen die Ergebnisse die Vermutung zu, dass der antagonistische Effekt mit den unterschiedlichen, jeweiligen Interaktionen von Ursolsäure und α -Tocopherol mit Teilen der bakteriellen Membran in Verbindung gebracht werden kann. Die Autoren beschreiben einen Teil des antagonistischen Effekts folgendermaßen: Während Ursolsäure für eine Kondensation der bakteriellen Membran sorgt, resultiert die Interaktion von α-Tocopherol mit dieser nicht in dem genannten Effekt. Da die antibakterielle Wirkung von Ursolsäure laut Literatur jedoch mit der Veränderung der Membranfluidität in Zusammenhang gebracht wird, ist der Verlust dieser Wirkung durch die Anwesenheit von α -Tocopherol ein Erklärungsansatz. Die Verbindung α-Tocopherol ist dem Biotensid *N*-Myristoyltyrosin grundsätzlich strukturell sehr ähnlich. Daher ist es denkbar, dass die in dieser Arbeit beobachteten antagonistischen Effekte ebenfalls auf unterschiedliche Interaktionen mit bzw. Effekte auf bakterielle(n) Membranen von *N*-Myristoyltyrosin und Ursol-/bzw. Oleanolsäure zurückzuführen sein könnten.

Im Allgemeinen bieten Stoffkombinationen mit gegensätzlichen gemeinsamen Wirkungen wie antagonistischen oder sogar suppressiven Eigenschaften ein interessantes Potenzial zur Bekämpfung resistenter Bakterien. Die Kategorie Suppression kann als eine Unterkategorie des Antagonismus verstanden werden. Die für diese Arbeit verwendete Definition von Antagonismus nach den EUCAST-Richtlinien schließt die Suppression mit ein (vgl. Kapitel 1.3). Suppression beschreibt hyperantagonistische Effekte, also solche bei denen die kombinierte Aktivität zweier Substanzen zusammen geringer als die alleinige Wirkung von mindestens einer der beiden Verbindungen oder sogar kleiner als beide einzelne Effekte ist (Chait *et al.*, 2007; Singh & Yeh, 2017). In Bezug auf Untersuchungen synergistischer Wirkweisen liegen vergleichsweise wenig Daten zu antagonistischen antibakteriellen Wirkungen vor. In der Literatur wird die Anwendung von antagonistisch wirkenden Kombinationen antibakterieller Verbindungen mit einer gehemmten bzw. verlangsamten evolutiven Entstehung von Resistenzen in Verbindung gebracht (Hegreness *et al.*, 2008; Michel *et al.*, 2008; Ocampo *et al.*, 2014; Yeh *et al.*, 2009).

Ein Übersichtsartikel und eine spezifische Studie beschreiben die Vorteile antagonistischer bzw. suppressiver Wechselwirkungen etwa wie folgt (Chait *et al.*, 2007; Singh & Yeh, 2017): Der Einsatz suppressiv wirkender Kombinationen antibiotischer Verbindungen eröffnet die Möglichkeit, dass

resistente Bakterien durch Antibiotika-sensitive Stämme über die Zeit verdrängt werden. Damit wird folglich der weiteren Entstehung und Etablierung von antibiotikaresistenten Keimen entgegengewirkt. Hinter diesem Prozess steht folgender theoretischer Hintergrund. Zunächst muss bedacht werden, dass bei einem parallelen Einsatz von zwei Verbindungen nicht jedes Verhältnis beider Substanzen zwangsläufig gleichstarke synergistische oder antagonistische Effekte hervorruft. Vielmehr werden mittels antibiotischen Tests in Checkerboard-Anordnungen die spezifischen Konzentrationskombinationen evaluiert, die eben die genannten gemeinsamen Wirkungen aufzeigen. Als Ausgangssituation werden zwei Antibiotika (hier: Substanz A und Substanz B) gemeinsam gegen eine bakterielle Population eingesetzt. Alle Bakterien dieser Population sind sensitiv gegen Substanz A, wobei zusätzlich ein Teil der Bakterien resistent gegen Substanz B ist. Entsprechend sind die resistenten Bakterien den sensitiven Bakterien in Bezug auf einen alleinigen Einsatz von Substanz B überlegen, was die bekannte Situation von Antibiotikaresistenzen darstellt. Nun wird davon ausgegangen, dass die beiden antibiotischen Substanzen gegeneinander mit jeweils steigenden Konzentrationen entsprechend einer Checkerboard-Anordnung aufgetragen werden. Eine subletale Konzentration der Substanz A begrenzt das Wachstum der beiden für diese Substanz sensitiven Stämme zunächst im gleichen Maß. Ab dieser experimentell definierbaren Konzentration werden die Bakterien im Wachstum gehemmt, aber noch nicht gänzlich abgetötet. Wird diese Konzentration nun beibehalten und die Konzentration der anderen Substanz B schrittweise hochgesetzt, so wird irgendwann der kombinierte Konzentrationsbereich der Substanzen erreicht, in dem die beiden Verbindungen antagonistisch bzw. suppressiv wirken. Ab dieser Region ist die zuvor hemmende Wirkung von Substanz A demnach aufgehoben, sodass die Bakterien verstärkt wachsen können. Genau dies geschieht im Fall der sensitiven Wildtyp-Bakterien. An dieser Stelle wird jedoch der Nachteil der resistenten Bakterien deutlich. Der steigenden Stoffkonzentration B wirkt das resistente Bakterium durch den vorhandenen Resistenzmechanismus (z. B. Herauspumpen, Abbau) stetig entgegen, sodass Stoff B nicht antagonistisch mit Stoff A wirken kann. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass die zuvor den resistenten Stamm hemmende Konzentration von Stoff A trotz Zugabe von Stoff B wirksam bleibt. Erst ab einem Schwellenwert der Stoffkonzentration B, ab der der resistente Stamm nicht mehr die gesamte vorliegende Menge von Substanz B beseitigen kann, können die beiden Verbindungen interagieren und ihre suppressive Wirkung entfalten. Demnach verschiebt sich der Bereich, in dem der resistente Stamm von der inhibierenden Wirkung von Substanz A verschont wird, auf einen Bereich, in dem eine hohe Konzentration der Substanz B vorliegt. Dadurch bedingt entsteht zwangsläufig eine Region, die Nachteile für die resistenten Bakterien, jedoch Vorteile für die sensitiven Stämme bietet. In diesem Bereich wachsen dementsprechend nur sensitive Bakterien. Werden Stoffkombinationen, welche eben diese Region abdecken, eingesetzt, so überwachsen sensitive Bakterien zwangsläufig resistente Bakterien.

Infolgedessen werden die resistenten Mikroorganismen ausgemerzt und es entstehen Populationen mit sensitiven Bakterien. Die anfälligen Bakterien können schlussendlich wieder mit herkömmlichen Antibiotika erfolgreich bekämpft werden. Unter diesem Gesichtspunkt leisten die obigen Erkenntnisse, dass die Kombinationen des Biotensids *N*-Myristoyltyrosin mit den pflanzlichen pentazyklischen Triterpenen Oleanol- und Ursolsäure zu antagonistischen antibakteriellen Effekten gegen *S. aureus* führen, ebenfalls einen interessanten Beitrag zur Erforschung alternativer antibakterieller Strategien.

Um eine Evaluierung der getesteten *N*-Myristoyltyrosin-Kombinationen unter Betrachtung einiger chemischer Eigenschaften der gemeinsam eingesetzten Verbindungen durchzuführen, wurden abschließend diverse Parameter der Verbindungen vergleichend zusammengefasst (Tabelle 15). Dabei wurden zum einen die Molekulargewichte und zum anderen die *Polar Surface Area* (Summe der Oberflächen der polaren Atome eines Moleküls; Maß für das Durchdringen biologischer Membranen, niedriger Wert: gute Passierbarkeit, hoher Wert: schlechte Passierbarkeit) sowie der logP-Wert (Maß für die Hydrophilie einer Verbindung; negativer Wert: polare, hydrophile Substanz, positiver Wert: unpolare, lipophile Substanz) angegeben.

Tabelle 15: Chemische Eigenschaften der in Kombination mit *N*-Myristoyltyrosin eingesetzten antibakteriellen Verbindungen.

Die Molekulargewichte sowie die PSA- und die logP-Werte wurden aus der Datenbank ChemSpider bezogen. Die dort aufgeführten PSA- und logP-Werte wurden durch die Firma ACD/Labs bioinformatisch vorhergesagt. Die Molekulargewichte stellen die jeweiligen gerundeten monoisotopischen Massen der Verbindungen dar. ChemSpider: Datenbank chemischer Verbindungen; PSA: *Polar Surface Area*; logP: *n*-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient; ACD/Labs: Advanced Chemistry Development, Inc. (ACD/Labs). Vergleichende Einordung der hier vorliegenden Verbindungen untereinander: Grüne Schrift: kleineres Molekül; bessere Passierbarkeit biologischer Membranen; unpolare, lipophile Verbindung; blaue Schrift: größeres Molekül; schlechtere Passierbarkeit biologischer Membranen; polare, hydrophile Verbindung.

Verbindung	Molekular- gewicht [in Da]	Polar Surface Area [Å2]	logP	kombinatorische Wirkung	
Prodigiosin	323	53	+3,90	Ja (verstärkt)	
Ampicillin	349	138	+1,35	Nein	
Chloramphenicol	323	115	+1,02	Nein	
Tetracyclin	444	183	-0,62	Nein	
Gentamicin	463	200	-2,23	Ja (verstärkt)	
Kanamycin	484	283	-2,58	Ja (verstärkt)	
Spectinomycin	332	130	+1,27	Ja (verstärkt)	
Streptomycin	581	331	-2,53	Ja (verstärkt)	
Oleanolsäure	456	58	+9,06	Ja (antagonistisch)	
Ursolsäure	456	58	+9,01	Ja (antagonistisch)	

Werden diese chemischen Eigenschaften berücksichtigt, so ergibt sich keine Korrelation zwischen der Wirkung der verschiedenen zusammen mit *N*-Myristoyltyrosin getesteten Verbindungen und den aufgeführten Parametern. Damit scheint die Größe und die Hydrophobizität der in Kombination eingesetzten Verbindungen keinen Einfluss auf den Ausgang der kombinatorischen antibakteriellen Wirkung zu haben. *N*-Myristoyltyrosin scheint die antibakteriellen Wirkungen in Kombination individuell zu beeinflussen. Die obigen Ergebnisse deuten zusammengefasst auf Folgendes hin: Im Fall des hydrophoben Prodigiosins könnte eine verbesserte Löslichkeit vorliegen. Dieser Effekt scheint dabei aber wiederum spezifisch zu sein, da es bei den ähnlich hydrophoben Triterpenen nicht zu analogen Effekten kam. Bei Aminoglykosiden könnte der wirkverstärkende Effekt auf einen erleichterten Eintritt des Antibiotikums in die Zelle zurückzuführen sein. Die antagonistische Wirkung zwischen *N*-Myristoyltyrosin und Ursol-/Oleanolsäure könnte in unterschiedlichen Interaktionen mit der bakteriellen Membran, welche etwa zu gegenläufigen Effekten auf die Membranfluidität führen könnten, begründet liegen.

Zusammenfassung:

Abgeleitete Stoffkombinationen zweiten Grades mit *N*-Myristoyltyrosin als fester Kombinationskomponente

N-MYRISTOYLTYROSIN MODIFIZIERT WIRKSTÄRKEN ANTIBAKTERIELLER VERBINDUNGEN:

N-Myristoyltyrosin und etablierte Antibiotika (Kapitel 3.1.4.1)

Gemeinsam angewendete Kombinationen aus *N*-Myristoyltyrosin und klinisch etablierten Antibiotika zeigten vor allem mit Aminoglykosid-Antibiotika, wie dem Antituberkulotikum Streptomycin, verstärkte kombinatorische antibakterielle Effekte gegen *C. glutamicum*.

N-Myristoyltyrosin und Triterpene (Kapitel 3.1.4.2)

Die kombinierte Applikation von *N*-Myristoyltyrosin und Ursol- bzw. Oleanolsäure resultierte jeweils in antagonistischen kombinatorischen antibakteriellen Wirkungen gegen *S. aureus*.

DIE WIRKWEISE VON *N*-MYRISTOYLTYROSIN IN KOMBINIERTER ANWENDUNG VARIIERT JE NACH EINGESETZTER KOMBINATIONSKOMPONENTE STARK UND KANN FOLGENDERMAßEN CHARAKTERISIERT WERDEN:

- solubilisiert vermutlich mit gewisser Spezifität hydrophobe Verbindungen wie Prodigiosin und kann deren Wirkung fördern
- fördert nicht ausschließlich die Löslichkeit hydrophober Verbindungen, sondern unterstützt vermutlich ebenfalls den komplexen Eintritt von polykationischen Aminoglykosid-Antibiotika in bakterielle Zellen durch eine eventuelle Steigerung der Permeabilität der bakteriellen Zellhülle
- kann antagonistische Effekte mit spezifischen Verbindungen hervorrufen

Kapitel II

Erstellung einer alternativen Plattform für die heterologe Produktion von Triterpenen

3.2 Kapitel II

Terpene sind mit über 80.000 strukturell unterschiedlichen Verbindungen eine der größten Gruppen natürlicher Sekundärmetabolite (Christianson, 2017; Pemberton et al., 2017). Sie besitzen oftmals diverse Bioaktivitäten und damit ein großes pharmazeutisches Potenzial (Wong et al., 2017). Die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen gemeinsamer antibiotischer Effekte zwischen dem Biotensid *N*-Myristoyltyrosin und den zyklischen Triterpenen Oleanol- bzw. Ursolsäure verdeutlichen beispielsweise den Wert dieser Sekundärmetabolitklasse für mögliche kombinierte Applikationen bei der Behandlung bakterieller Infektionen. In Pflanzen haben Triterpenverbindungen essentielle Funktionen in der physiologischen Entwicklung, die aber in weiten Teilen noch unverstanden sind (Moses et al., 2014). Um solche Eigenschaften von Naturstoffen untersuchen zu können, ist generell eine schnelle und leichte Produktion dieser Verbindungen von Vorteil, sodass insgesamt eine gute Zugänglichkeit zu den Testsubstanzen gewährleistet ist. Zur Gewinnung von Sekundärmetaboliten ist, neben der möglichen teils aufwendigen Extraktion von Substanzen aus den entsprechenden Herkunftsorganismen wie Pflanzen, die heterologe Produktion in Mikroorganismen ein alternativer Weg. Diese Herangehensweise kann vorteilhaft sein, um standardisierte und skalierbare Herstellungsverfahren zu entwickeln (Marienhagen & Bott, 2013; Moser & Pichler, 2019; Schempp et al., 2018; Wong et al., 2017). Bei der heterologen Synthese in Mikroorganismen entfällt die enorme Komplexität pflanzlicher Stoffgemische in Extrakten, sodass die Isolierung der Zielsubstanz begünstigt ist. In den letzten Jahren wurde die heterologe Terpenproduktion in Mikroorganismen vor allem mit eukaryotischen Wirten wie etwa Saccharomyces cerevisiae intensiv erforscht (Moser & Pichler, 2019; Schempp et al., 2018). Allerdings kann auch in dem etablierten System S. cerevisiae eine Umsetzung von rekombinant gebildeten Triterpenen durch den Wirtsmetabolismus nicht immer ausgeschlossen werden (Castillo et al., 2013), sodass die Produktion einzelner Zielverbindungen oder die Untersuchung von Enzymfunktionen erschwert sein kann.

Um daher in diesem Forschungsbereich einen Beitrag zu leisten, soll im nachfolgenden Kapitel II eine alternative Plattform für die heterologe Produktion von Triterpenen, insbesondere zyklischer Triterpene, erstellt werden. Damit im Speziellen ein alternativer prokaryotischer Produktionswirt etabliert wird, wurde das fakultativ phototrophe und anaerobe, Gram-negative Bakterium *Rhodobacter capsulatus* ausgewählt.

3.2.1 Etablierung von *R. capsulatus* als Expressionswirt der heterologen Triterpenproduktion

Um einen weiteren Weg zur fortlaufenden Erschließung und Charakterisierung von Triterpenen zu ebnen, soll hier das phototrophe, fakultativ anaerobe und Gram-negative Bakterium R. capsulatus, welches zu der α -Untergruppe der Proteobakterien gehört, als alternativer prokaryotischer Produktionswirt für die heterologe Triterpenproduktion etabliert werden. Dazu wurden in Kooperation mit Partnern der CEPLAS-Forschungsinitiative (Cluster of Excellence on Plant Science) Gene des Triterpenbiosynthesewegs aus der Modellpflanze Arabidopsis thaliana als Modellgene festgelegt (AG Kopriva und MS Plattform, Universität zu Köln; AG Axmann und AG Urlacher, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Die kodierenden Enzyme aus A. thaliana können die Metabolite des intrinsischen Stoffwechsels von R. capsulatus umsetzen, sodass sie geeignete Kandidaten für die geplante Fragestellung sind. Das Bakterium R. capsulatus bietet folgende Vorzüge, die in der Einleitung ausführlich dargelegt sind (vgl. Kapitel 1.10) und hier noch einmal kurz zusammengefasst werden: R. capsulatus wurde vor allem in den letzten Jahren in Hinblick auf die biotechnologische Anwendbarkeit zur heterologen Produktion verschiedener Sekundärmetabolite untersucht (Heck & Drepper, 2017). Im Zuge dessen wurden viele Voraussetzungen zur biotechnologischen Arbeit, wie beispielsweise eine Toolbox verschiedener Expressionsplasmide und damit Werkzeug für die genetische Manipulation, entwickelt (Heck & Drepper, 2017; Katzke et al., 2010). Des Weiteren konnte die heterologe Produktion verschiedener Terpenklassen in R. capsulatus bzw. dem nahe verwandten R. sphaeroides schon etwa anhand der Biosynthese des Diterpens Casben, des Sesquiterpens Valencen und des Tetraterpens β -Carotin gezeigt werden (Beekwilder *et al.*, 2014; Linke, 2017; Loeschcke et al., 2013; Troost, 2017). Ebenso wurde das lineare Triterpen Squalen, welches ein Vorstufenmolekül zyklischer Triterpene ist, in einer Studie in R. capsulatus produziert (Khan et al., 2015). Dadurch wurde bereits ein erster nützlicher Schritt in Richtung einer heterologen Produktion zyklischer Triterpene in R. capsulatus gemacht. Grundsätzlich sind demnach günstige Bedingungen für die genannte Fragestellung gegeben.

3.2.1.1 Modularer Aufbau des Triterpenbiosynthesewegs

Triterpene sind wie alle Terpene aus C₅-Isopreneinheiten aufgebaut. Sie bestehen aus einem C₃₀-Grundgerüst und damit aus sechs dieser Isopreneinheiten. Das Bakterium *R. capsulatus* besitzt einen intrinsischen Isoprenoidbiosyntheseweg (ausführlich in Kapitel 1.9 dargelegt), welcher unter anderem für die Synthese der Tetraterpene Spheroiden und Spheroidenon benötigt wird (Armstrong, 1997). Kurz zusammengefasst erfolgt die native Terpensynthese ausgehend von den C₅-Einheiten Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP), welche in *R. capsulatus*

über den wirtseigenen Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) generiert werden (Abbildung 35 A). Durch das Enzym IspA, welches die Funktionen einer Geranylpyrophosphat-Synthase und einer Farnesylpyrophosphat-Synthase übernehmen kann, werden IPP und DMAPP zunächst zur C10-Verbindung Geranylpyrophosphat (GPP) umgesetzt. Dieses wird anschließend wieder zusammen mit einem IPP zu der C₁₅-Verbindung Farnesylpyrophosphat (FPP) verlängert. Das Enzym CrtE bildet aus letzterer und IPP die Verbindung Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), welche von weiteren Enzymen schlussendlich zu Spheroiden und Spheroidenon umgesetzt wird (Armstrong, 1997). Das entstandene Intermediat FPP wiederum ist die Verbindung, welche direkt für die heterologe Triterpenproduktion aus dem Isoprenoidbiosyntheseweg von *R. capsulatus* abgezweigt werden kann. Für die Arbeit wurde der Triterpenbiosyntheseweg aus A. thaliana in folgende Module unterteilt: Im ersten Modul, dem sogenannten Vorstufenmodul, werden zwei Moleküle der C15-Verbindung FPP durch eine Squalensynthase, die in A. thaliana durch das Gen SQS1 (At4g34640) kodiert ist (Busquets et al., 2008), via Kondensation in das lineare Triterpenmolekül Squalen (C_{30}) umgesetzt. Dieses wird weiter durch eine Squalenepoxidase zu 2,3-Oxidosqualen (C₃₀) epoxidiert (Abbildung 35 A, grauer Kasten). In A. thaliana ist dieses Enzym durch die Squalenepoxidase SQE1 (At1g58440) kodiert (Rasbery et al., 2007). Anschließend folgt das Zyklisierungsmodul, in dem verschiedene Oxidosqualenzyklasen (engl.: oxidosqualene cyclases, OSC) 2,3-Oxidosqualen in das für die jeweilige OSC spezifische Triterpen umsetzen (Abbildung 35 A, blauer Kasten). Teils können auch mehrere Produkte von einer OSC synthetisiert werden (Thimmappa et al., 2014). Oftmals handelt es sich jedoch um ein Hauptprodukt, welches hergestellt wird und das namensgebend für das Enzym ist. Die Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen kann auf verschiedene Weisen erfolgen (Thimmappa et al., 2014). So kann zum einen ein tetrazyklisches Sterol- oder zum anderen ein pentazyklisches Triterpengerüst gebildet werden (vgl. Abbildung 9). Bei der Bildung eines Sterolgerüsts verläuft die Zyklisierung über eine Chair-Boat-Chair-(CBC)-Konformation des Substrats ab. Ein Beispiel für eine OSC, welche diesen Mechanismus aufweist, ist die für diese Arbeit ausgewählte Cycloartenolsynthase CAS1 (At2g07050) (Corey et al., 1993). Die Bildung eines pentazyklischen Triterpengerüsts hingegen findet über eine Chair-Chair-Chair-(CCC)-Konformation statt, wie es etwa bei der hier verwendeten Lupeolsynthase LUP1 (At1g78970) (Herrera et al., 1998) der Fall ist. In einer vorangegangenen Publikation (Khan et al., 2015) sowie in einer Bachelor- und einer Masterarbeit, die jeweils im IMET (HHUD) angefertigt wurden (Gora, 2015; Weber, 2016), konnte bereits gezeigt werden, dass die Vorstufen Squalen und 2,3-Oxidosqualen grundsätzlich in *R. capsulatus* durch heterologe Enzyme gebildet werden können. Daher lag hier der Fokus auf dem OSC-Modul zur Generierung zyklischer Triterpenprodukte.



Abbildung 35: Strategie zur Implementierung des Triterpenbiosynthesewegs aus A. thaliana in R. capsulatus.

(A) Die C_5 -Verbindungen Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) des Bakteriums R. capsulatus werden über den Methylerythritolphosphatweg (MEP-Weg) generiert und fließen in den intrinsischen Terpenbiosyntheseweg ein. Dort werden IPP und DMAPP mittels der Enzyme Idi (IPP-Isomerase), IspA (Farnesylpyrophosphat-Synthase) und CrtE (Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase) zunächst zu Geranylpyrophosphat (GPP), dann zu Farnesylpyrophosphat (FPP) und schließlich zu Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) umgesetzt. Schlussendlich werden die Tetraterpene Spheroiden und Spheroidenon über weitere Crt-Enzyme generiert. Dementsprechend wird die C15-Verbindung FPP, welche für die heterologe Triterpenbiosynthese benötigt wird, im intrinsischen Terpenbiosyntheseweg von R. capsulatus bereitgestellt. Zur Implementierung des Triterpenbiosynthesewegs aus A. thaliana wurde dieser in zwei Module, welche nacheinander in das Bakterium eingebracht werden sollten, unterteilt. Modul I ist das Vorstufenmodul (graues Kästchen), in dem die Kondensation zweier FPP-Moleküle (C15) zu dem linearen Squalenmolekül (C30) durch eine Squalensynthase (SQS) stattfindet. Squalen wird daraufhin mittels einer Squalenepoxidase (SQE) zu 2,3-Oxidosqualen oxidiert. Darauf folgt das Zyklisierungsmodul (blaues Kästchen), indem die Verbindung 2,3-Oxidosqualen durch eine Oxidosqualenzyklase (OSC; hier: Cycloartenolsynthase) zyklisiert wird. (B) Die zur heterologen Produktion von Triterpenen nötigen Expressionsvektoren wurden mittels des Plasmids pRhon5Hi-2, welches die native Promotorregion der nifHDK-Gene des Molybdän-anhängigen Nitrogenase-Komplexes sowie den ersten Teil des nifH-Gens aus R. capsulatus trägt, konstruiert (Troost et al., 2019). RBS: Ribosomenbindestelle. Modifiziert nach Hage-Hülsmann et al., 2019.

Entsprechend der eben beschriebenen Gliederung in das Vorstufen- und das Zyklisierungsmodul wurden Expressionsvektoren auf Grundlage des pRhon5Hi-2 generiert (Abbildung 35 B). Dieser basiert wiederum auf dem Plasmid pRhotHi-2 (Katzke *et al.*, 2010) und besitzt statt des T7-Promotors den sogenannten P_{nif}-Promotor, welcher aus der nativen *R. capsulatus nifHDK*-Promotorregion des Molybdän-abhängigen Nitrogenase-Komplexes und einem ersten Teil des nifH-Gens des Bakteriums besteht (Troost et al., 2019). Der Promotor (NCBI Genbank Accession MG208548) wurde in vorangegangenen Arbeiten von Dr. Armagan Yakup Özgür mittels Nhel/Xbal an die entsprechende Stelle auf dem Vektor pRhotHi-2 eingebracht (Özgür, 2015). Dadurch wird eine strikt regulierte und starke Expression der stromabwärts gelegenen Gene ermöglicht. Die Induktion der Genexpression erfolgt bei Sauerstofflimitation und in Abhängigkeit der Stickstoffquelle. So bewirkt die Bereitstellung von Ammonium in der Expressionskultur eine Inhibierung und die Verwendung von Serin als alternativer Stickstoffquelle eine Aktivierung. Es wurden die Plasmide (i) pRhon5Hi-2-SQS1, (ii) pRhon5-Hi-2-SQS1-SQE1 [im Vorfeld von Dr. Anita Loeschcke, IMET] und (iii) verschiedene Expressionsvektoren mit unterschiedlichen OSC-Varianten mit der Struktur pRhon5Hi-2-OSC-SQS1-SQE1 [in dieser Arbeit] konstruiert. Für die Expression in R. capsulatus wurde der DNA-Codon-Gebrauch der verwendeten Gene optimiert. Diese wurden via Gensynthese synthetisch hergestellt (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland). Die synthetisierte DNA diente als Template zur Amplifikation der Gene CAS1 bzw. LUP1 mittels PCR. Mit Hilfe der eingesetzten Primer (vgl. Kapitel 2.4, Tabelle 5) wurden Ndel-Schnittstellen an beide Enden der jeweiligen Fragmente angefügt. Diese konnten dazu verwendet werden die Gene in den Expressionsvektor pRhon5Hi-2-SQS1-SQE1 vor das Gen SQS1 zu klonieren. In diesem Vektor befindet sich die Ndel-Schnittstelle unmittelbar am 5'-Ende des Gens SQS1, sodass dieses durch das Einbringen eines Inserts an dieser Stelle von der im Vektor stromaufwärts davon liegenden Ribosomenbindestelle (RBS) getrennt wird. Daher wurde den OSC-PCR-Produkten außerdem die 5'-UTR inklusive der RBS des R. capsulatus nifK-Gens mithilfe des jeweiligen Primers am 3'-Ende angehangen, sodass diese in den generierten Expressionsplasmiden mit dem Aufbau pRhon5Hi-2-OSC-SQS1-SQE1 vor dem Gen SQS1 platziert wurde. Die korrekte Sequenzabfolge der entstandenen Expressionsplasmide wurde mittels Sequenzierung der relevanten Gene überprüft. Somit standen die Vektoren pRhon5Hi-2-SQS1, pRhon5-Hi-2-SQS1-SQE1, pRhon5Hi-2-CAS1-SQS1-SQE1 und pRhon5Hi-2-LUP1-SQS1-SQE1 für Expressionsstudien zur Verfügung.

3.2.1.2 Heterologe Biosynthese zyklischer Triterpene in R. capsulatus

Um zu überprüfen, ob *R. capsulatus* grundsätzlich als Wirt für die heterologe Biosynthese zyklischer Triterpene aus Pflanzen geeignet ist, wurden die zuvor konstruierten Expressionsvektoren, die die Gene des Triterpenbiosynthesewegs aus *A. thaliana* enthielten, in das Bakterium eingebracht.

Als Erstes wurde die Aktivierung des Vorstufenmoduls in dem R. capsulatus Wildtypstamm SB1003 (Strnad et al., 2010) durchgeführt. Die Verwendung der Plasmide pRhon5Hi-2-SQS1 und pRhon5Hi-2-SQS1-SQE1 erlaubte dabei die weitere Unterteilung des Vorstufenmoduls. Somit konnte die Bildung der beiden Produkte dieses Moduls, nämlich Squalen und 2,3-Oxidosqualen, separat analysiert werden. Anschließend wurde das Zyklisierungsmodul hinzugefügt. Nach dem Einbringen der Plasmide pRhon5Hi-2-CAS1-SQS1-SQE1 und pRhon5Hi-2-LUP1-SQS1-SQE1 in *R. capsulatus* SB1003 via Konjugation erfolgte die Expression der Zielgene unter mikroaeroben Kultivierungsbedingungen im Dunkeln (vgl. Kapitel 2.9.1). Die Auswahl dieser Kultivierungsform rührte daher, dass die enzymatische Reaktion der Squalenepoxidase molekularen Sauerstoff benötigt. Die mikroaeroben Bedingungen wurden auf Basis der vorangegangenen Arbeiten von Dr. Katrin Troost durch ein im Verhältnis zum Fassungsvolumen des verwendeten Schüttelkolbens relativ hohes Füllvolumen an Kultivierungsmedium eingestellt (Troost et al., 2019). Zunächst wurden Vorkulturen in RCV-Medium mit 0,1 % Ammonium und einem Füllvolumen von 35 % bei 30 °C schüttelnd angezogen. Daraus wurden Expressionskulturen in 60 mL RCV-Medium mit 0,1 % Serin in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben mit einer anfänglichen optischen Dichte von 0,05 bei λ = 660 nm inokuliert und unter denselben Bedingungen für 52 h inkubiert. Um die Akkumulation der Triterpen-Intermediate und -Produkte zu analysieren, wurden Zellpellets nach der Kultivierung entsprechend einer OD_{660 nm} = 15 in 1 mL mittels Zentrifugation geerntet und bei -20 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine Lyse der Zellen mit Aceton und daraufhin eine Zwei-Phasen-Extraktion mit NaCl-Lösung und n-Hexan, in das die hydrophoben Bestandteile durch Vortexen überführt wurden (vgl. Kapitel 2.9.3.1). Nach dem Eindampfen der organischen Phase wurde das Extrakt in einem Chloroform-Methanol-Gemisch resuspendiert. Die so erzeugten Terpen-haltigen R. capsulatus-Extrakte wurden massenspektrometrisch mittels LC-MS/MS-Messungen aufgetrennt und analysiert (vgl. Kapitel 2.9.3.2), um festzustellen, ob gebildete Triterpene vor dem Hintergrund der R. capsulatus-Extrakte nachweisbar sind. Die Analysen wurden in der an das CEPLAS-Projekt angegliederten MS Plattform der Universität zu Köln durch Dr. Sabine Metzger, Dr. Vera Wewer und Felix Buechel durchgeführt. Im Rahmen dessen wurde die nachfolgend verwendete Trenn- und Detektionsmethode eigens etabliert. Kommerziell erhältliches Squalen, 2,3-Oxidosqualen, Cycloartenol und Lupeol wurden als Referenzsubstanzen in den Analysen zur Identifikation der erwarteten Produkte der heterologen Biosynthese und zur Erstellung von Kalibrierungsreihen mitgeführt. Nach der chromatographischen Trennung im reversed-phase-Verfahren erfolgte die Ionisierung der Analyten mittels Elektrospray-Ionisation (engl.: *electrospray ionization*, ESI) im Positivmodus, bei der verschiedene typische Addukte erwartet wurden. Neben dem Addukt [M+H]⁺, also protonierten Molekülen, deren monoisotopische Masse (M) durch das addierte Proton erhöht wird (+1), und die dabei außerdem ionisiert werden, sind hier unter anderem Natriumaddukte [M+Na]⁺ häufig sowie Protonaddukte, von denen bei der Ionisierung Wasser abgespalten wird [M+H-H₂O]⁺. Die Summenformeln der untersuchten Triterpene und einige zu diesen gehörende, berechnete m/z-Werte, bei denen es sich um Masse-zu-Ladungsverhältnisse der ionisierten Moleküle handelt, sind nachfolgend aufgelistet (Tabelle 16).

Tabelle 16: Summenformeln mit einigen ausgewählten berechneten m/z-Werten der im Zuge der heterologen Produktion detektierten Triterpene.

M: monoisotopische Masse; m: Masse; z: Ladungszahl; m/z: Masse-zu-Ladungsverhältnis. Modifiziert nach Loeschcke *et al.*, 2017.

Triterpene	Summen- formel	[M+H] [⁺] (m/z)	[M+Na] [⁺] (m/z)	[M+H-H₂O] ⁺ (m/z)
Squalen	$C_{30}H_{50}$	411,399	433,380	-
2,3-Oxidosqualen	C ₃₀ H ₅₀ O	427,393	449,375	409,383
Cycloartenol	C ₃₀ H ₅₀ O	427,393	449,375	409,383
Lupeol	$C_{30}H_{50}O$	427,393	449,375	409,383

Die Daten der LC-MS-Analysen wurden folglich hinsichtlich solcher Signale überprüft und zunächst in Form von extrahierten Ionenchromatogrammen (engl.: *extracted ion chromatograms*, EIC) dargestellt. Entsprechend jeder Substanz wurden die Chromatogramme aus Signalen verschiedener m/z-Verhältnisse generiert und spezifische Signale bei unterschiedlichen Retentionszeiten (engl.: *retention time*, RT) detektiert, die in Proben des Wildtyps (Daten nicht gezeigt) nicht vorkamen. Dazu wurden zuvor die Retentionszeiten und die MS- bzw. die MS/MS-Spektren von kommerziellen Standards determiniert. Squalen wurde anhand der Masse 411,399 (RT: 14,9 Min) ausgewertet. Die EIC für den spezifischen Nachweis von 2,3-Oxidosqualen (RT: 11,8 Min) und Cycloartenol (RT: 10,9 Min) wurden beide mittels des Signals der Masse von 427,393 erstellt. Die Detektion des Triterpens Lupeol erfolgte bei der Masse 409,383 (RT: 10,1 Min). Im Gegensatz zu den übrigen Verbindungen, die als Protonaddukte [M+H]⁺ detektiert wurden, entspricht die Masse 409,383 im Zuge der Analyse von Lupeol dem [M+H-H₂O]⁺-Ion. In der Messung von Extrakten der Stämme, die *SQS1* bzw. *SQS1-SQE1* exprimierten, konnten Signale, deren Retentionszeiten mit den linearen Triterpen-Verbindungen Squalen bzw. 2,3-Oxidosqualen übereinstimmen, detektiert werden (Abbildung 36).



Abbildung 36: LC-MS-Analysen der Aktivierung von *A. thaliana*-Triterpenbiosynthesewegen in *R. capsulatus*. - Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite -

Abbildung 36: LC-MS-Analysen der Aktivierung von A. thaliana-Triterpenbiosynthesewegen in R. capsulatus.

Die Expressionskulturen von *R. capsulatus*-SB1003-Stämmen, welche die Gene des Triterpenbiosynthesewegs aus *A. thaliana* exprimierten (SQS1: Squalensynthase, SQE1: Squalenepoxidase, LUP1: Lupeolsynthase, CAS1: Cycloartenolsynthase) wurden unter mikroaeroben Bedingungen für 52 h bei 30 °C im Dunkeln und unter konstantem Schütteln mit 130 UpM angezogen. Anschließend wurden Proben entsprechend einer OD_{660 nm} = 15 in 1 mL genommen und die Zellpellets mittels einer Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert. Die Detektion der Produkte in den Zellextrakten erfolgte durch LC-MS-Analysen, im Zuge derer die Analyten nach chromatographischer Trennung über eine *reversed-phase*-Säule mittels ESI-MS (engl.: *electrospray ionization*) nachgewiesen wurden. Hier gezeigt sind (A) extrahierte lonenchromatogramme (engl.: *extracted ion chromatograms*, EIC) erwarteter Signale sowie (B) ESI-MS-Spektren zu den detektierten Peaks. Als Referenzen wurden kommerziell erhältliches Squalen, 2,3-Oxidosqualen, Cycloartenol und Lupeol benutzt. In den ESI-MS-Spektren der Proben (rechts) sind die aufgrund der erhaltenen spezifischen, dominanten m/z-Signale der Referenzen (links) erwarteten Massen mit blauen Zahlen kenntlich gemacht. Gezeigt sind repräsentative EIC und MS-Spektren aus Messungen von drei unabhängigen Kultivierungen. Modifiziert nach Loeschcke *et al.*, 2017.

Ebenso konnten mit Cycloartenol und Lupeol übereinstimmende Signale in den entsprechenden Proben von Stämmen, die CAS1-SQS1-SQE1 bzw. LUP1-SQS1-SQE1 exprimierten, nachgewiesen werden. Im Zuge der heterologen Lupeolproduktion in *R. capsulatus* konnte außerdem ein weiteres Signal, welches hier als LupX bezeichnet wird, detektiert werden. Dieses war bei einer im Vergleich zu Lupeol kürzeren Retentionszeit zu erkennen. Um zu prüfen, ob die in den EIC detektierten Signale die charakteristischen Massenspektren aufweisen, wurden die MS-Spektren der Referenzsubstanzen mit den Signalen der Proben eingehend verglichen (Abbildung 36 B). Die m/z-Verhältnisse verschiedener Ionen-Addukte wie [M+H]⁺, [M+Na]⁺ und [M+H-H₂O]⁺ konnten in den Messungen der kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen Squalen, 2,3-Oxidosqualen, Cycloartenol und Lupeol teils detektiert werden (Abbildung 36 B links). Während der LC-MS-Analysen der R. capsulatus-Proben (Abbildung 36 B rechts) konnten die Protonaddukte [M+H]⁺ sowie die Natriumaddukte [M+Na]⁺ für alle heterolog produzierten Triterpene nachgewiesen werden. Ebenso wurde der Wasserverlust aufgrund des Zerfalls während der Elektrospray-Ionisation für die oxygenierten Triterpene teilweise beobachtet, wobei dieser besonders für Lupeol erkennbar war. Daher wurde bei der Auswertung des Massenspektrums der R. capsulatus-Probe LUP1-SQS1-SQE1 der m/z-Wert von 409,383 als repräsentatives Signal von Lupeol verwendet. Es ist das dominante Signal für die Verbindung Lupeol, das, wie bereits erwähnt, dem [M+H-H₂O]⁺-Ion entspricht und welches eben durch einen H₂O-Verlust aufgrund des Zerfalls in der Ionisierungsquelle während der Elektrospray-Ionisation entsteht. Anhand dieses Signals wurde damit die Lupeolproduktion auf Ebene der MS-Spektren ebenfalls bestätigt.

Das zuvor beobachtete Signal des hier als LupX bezeichneten Produkts wurde in einer separaten Messung eingehender analysiert (Abbildung 37). Es zeigte hier wiederum eine gegenüber Lupeol (RT: 12,2 Min) verkürzte Retentionszeit von 9,1 Minuten sowie einen m/z-Wert von 427,395 und weitere Signale wie etwa m/z = 409,386 und 467,386. Diese Signale könnten auf Ionisierungsprodukte einer Verbindung mit der Summenformel $C_{30}H_{52}O_2$ zurückgeführt werden, die [M+H-H₂O]⁺ (m/z = 427,395), [M+H-(H₂O)²]⁺ (m/z = 409,386) und [M+Na]⁺ (m/z = 467,386) entsprechen. Ein Protonaddukt [M+H]⁺, das dieser Verbindung entsprechen würde und einen m/z-Wert von 445,404 hätte, wurde nicht detektiert. Dies könnte auf einen Zerfall der Verbindung in der Ionisierungsquelle zurückzuführen sein, der hier wie soeben beschrieben für Lupeol deutlich zu beobachten war. Zusammen mit der gegenüber Lupeol verkürzten Retentionszeit deuten die detektierten Massen auf ein hydroxyliertes Lupeol-Derivat hin. Da dies aber nicht zweifelsfrei festgestellt werden konnte, wird das Produkt weiterhin mit LupX bezeichnet.



Abbildung 37: LC-MS-Analyse des im Rahmen der heterologen Triterpenbiosynthese in *R. capsulatus* zusätzlich vorkommenden, als LupX bezeichneten Produkts.

Die Expressionskulturen des *R. capsulatus*-SB1003-Stammes, welcher die Gene des Triterpenbiosynthesewegs aus *A. thaliana* exprimierte (SQS1: Squalensynthase, SQE1: Squalenepoxidase, LUP1: Lupeolsynthase), wurden unter mikroaeroben Bedingungen für 52 h bei 30 °C im Dunkeln und unter konstantem Schütteln mit 130 UpM angezogen. Anschließend wurden Proben entsprechend einer OD_{660 nm} = 15 in 1 mL genommen und die Zellpellets mittels einer Flüssig-Flüssig-Extraktion extrahiert. Die Detektion der Produkte in den Zellextrakten erfolgte durch LC-MS-Analysen, im Zuge derer die Analyten nach chromatographischer Trennung über eine *reversed-phase*-Säule mittels ESI-MS (engl.: *electrospray ionization*) nachgewiesen wurden. Hier gezeigt ist ein ESI-MS-Spektrum des unerwarteten, als LupX bezeichneten Produkts. Als Referenz wurde kommerziell erhältliches Lupeol benutzt. Gezeigt sind repräsentative ESI-MS-Spektren aus einer Dreifachbestimmung (Lupeolreferenz) bzw. Messungen von drei unabhängigen Kultivierungen (LupX). Da es sich hier um LC-MS-Daten handelt, welche nicht im Rahmen des zuvor gezeigten Messdurchlaufs (vgl. Abbildung 36) generiert wurden, liegen sowohl für die Lupeolreferenz als auch für das Produkt LupX andere Retentionszeiten vor. Die beiden Verbindungen zeigen hier ebenfalls die zuvor beobachteten, unterschiedlichen Retentionszeiten, wobei Lupeol zuerst eluiert. Modifiziert nach Loeschcke *et al.*, 2017.

Insgesamt wiesen die MS-Spektren der in den Zellextrakten gefundenen Signale somit eine hohe Übereinstimmung mit den Referenzmessungen auf. Wie die Messergebnisse verdeutlichen, sind die Massen von Triterpenen nahezu identisch. Daher wurden zur weiteren Verifizierung zudem MS/MS-Spektren aufgenommen und die charakteristischen Fragmentierungsmuster geprüft (Abbildung 38). Dazu wurden die [M+H]⁺-Ionen der jeweiligen Substanzen (mit Rauten markiert) für die Fragmentierung mit 20 eV gewählt. Die Referenz-MS/MS-Spektren von Squalen, 2,3-Oxidosqualen, Cycloartenol und Lupeol (schwarz), sind jeweils über den entsprechenden MS/MS-Spektren der *R. capsulatus*-Zellextrakte (rot) zu sehen. Im Allgemeinen sind neben den grundsätzlich gleichen Massen verschiedener Triterpene ebenfalls die Fragmente in MS/MS-Analysen praktisch identisch. So zeigen mittels MS/MS-Analysen gemessene Triterpene ein charakteristisches Fragmentierungsmuster mit Signalen bei etwa m/z = 95,09, 109,10, 123,12, 137,13, 149,13, 163,15, 191,18, 205,19 und 217,19 auf. Diese Massen sind ebenfalls bei MS/MS-Spektren der Massenspektrometrie-Datenbank METLIN zu finden (https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=advanced_search).





Innerhalb der zuvor beschriebenen Messungen (vgl. Abbildung 36) der *R. capsulatus*-SB1003-Zellextrakte der verschiedenen Expressionskulturen wurden von denselben Extrakten MS/MS-Analysen durchgeführt (rot). Im Vergleich wurden jeweils Messungen mit den Referenzsubstanzen Squalen, 2,3-Oxidosqualen, Cycloartenol (A) und Lupeol (B) durchgeführt (schwarz). Wie bereits zuvor in dem EIC zu sehen (vgl. Abbildung 36), konnte neben dem heterolog produzierten Lupeol ein weiteres Triterpenprodukt, welches als LupX benannt wurde, detektiert werden. Bei den mit einer Raute markierten m/z-Werten handelt es sich bei allen Substanzen außer LupX um die jeweiligen [M+H]⁺-Ionen. Diese wurde für die Fragmentierung mit 20 eV verwendet. In der Lupeolreferenz wurden ebenfalls die [M+H]⁺-Ionen fragmentiert (siehe Markierung mit Raute). Das Signal bei m/z von 427,4 bei der Retentionszeit von 6,7 Minuten entspricht vermutlich dem [M+H-H₂0]⁺-Ion der als LupX bezeichneten Triterpenverbindung. Eine Übersicht über die Summenformeln der Triterpene und die dazu gehörigen berechneten m/z-Massen sind separat aufgeführt (vgl. Tabelle 16). Modifiziert nach Loeschcke *et al.*, 2017.

Der Vergleich der hier gemessenen MS/MS-Spektren der Referenzsubstanzen Squalen, 2,3-Oxidosqualen, Cycloartenol und Lupeol (schwarz) bestätigt ebenso, dass die Triterpene sehr ähnlich fragmentieren, sodass immer wieder dieselben Fragmentmassen auftauchten. Dies erschwert im Allgemeinen eine eindeutige Identifizierung der Verbindungen. Die Messungen zeigten jedoch ebenfalls eine gewisse Reproduzierbarkeit der Verteilung der Intensitäten der einzelnen Fragmente, welche für das jeweilige Triterpen charakteristisch ist. Dabei ist das spezifische Verteilungsmuster der Signalintensitäten einer Verbindung anhand des gesamten Musters besser erkennbar als mittels einzelner Massen. In den vorliegenden Daten stimmen die charakteristischen Muster der Standards (schwarz) mit den entsprechenden MS/MS-Spektren der Zellextrakte (rot) überein. Im Fall von Squalen wurde eine Reihe Signale mit niedrigeren m/z-Werten detektiert. Für die Verbindung 2,3-Oxidosqualen sind prominente Signale bei m/z = 191,18 und 409,38 erkennbar. Diese sind ebenso bei Cycloartenol zu finden, wobei sie von weiteren deutlichen, charakteristischen Signalen bei etwa m/z = 121,10 und 149,13 sowie 205,19 begleitet werden. Die Fragmentierung von Lupeol, die hier nur anhand der Lupeolreferenz gezeigt ist, resultierte in den dominanten Signalen bei m/z = 191,18 und 409,39 und wies zusätzlich erhöhte Signale bei beispielsweise m/z = 205,20 und 219,21 auf. Für Lupeol aus der R. capsulatus-Probe konnte aufgrund der sehr niedrigen Signalintensität der Peaks kein MS/MS-Spektrum erhalten werden. Für das zusätzliche, als LupX bezeichnete Produkt der LUP1 wurde ebenso ein MS/MS-Spektrum aufgenommen. Das Fragmentierungsmuster der Verbindung LupX (Abbildung 38 B) wurde mit den Werten der Lupeolreferenz verglichen. Dazu wurden jeweils die Ionen mit dem m/z-Wert von 427,39 (Raute) zur Fragmentierung gewählt, was dem [M+H]⁺-Ion von Lupeol und dem putativen [M+H-H₂O]⁺-Ion von LupX entspricht. Dabei ist das Lupeol-Signal in der LC-MS-Analyse bei einer Retentionszeit von 10,1 Minuten zu finden und das LupX-Signal bei 6,7 Minuten und somit im Vergleich zu dieser, wie bereits beschrieben, verkürzt. Insgesamt ist ein sehr ähnliches Muster an m/z-Signalen beider Fragmentierungen festzustellen, die prominente Signale etwa bei m/z = 191,18 und 205,19 sowie bei m/z = 219,21 und 409,38 aufweisen. Dies bekräftigt, dass es sich bei LupX um eine Verbindung handeln könnte, die Lupeol strukturell sehr ähnlich ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sowohl das Vorstufen- als auch das Zyklisierungsmodul in *R. capsulatus* SB1003 eingebracht und aktiviert werden konnten. Eine anschließende Auswertung anhand von Kalibrierungsreihen der Referenzsubstanzen ermöglichte eine Quantifizierung der extrahierten Produktmengen, die durch Berücksichtigung des extrahierten Kulturvolumens einerseits als Titer in mg L⁻¹ und andererseits durch Berücksichtigung der extrahierten Zellmasse als spezifische Ausbeute in mg gDCW⁻¹ bestimmt wurden (Tabelle 17). Mittels der heterologen Biosynthese in *R. capsulatus* konnten 8,24 mg L⁻¹ Squalen produziert werden. Der Titer des Triterpens 2,3-Oxidosqualen war mit 0,28 mg L⁻¹ im äquivalenten Bereich zu der

produzierten Menge an 2,3-Oxidosqualen. Lupeol konnte nur in geringen Mengen, die keine Quantifizierung erlaubten, detektiert werden. Ebenso konnte das weitere Triterpen LupX nicht quantifiziert werden. Im Zuge der Analysen der Produkte wurde ebenfalls die Umsetzung der für das jeweilige Produkt spezifischen Vorstufenverbindung betrachtet (Tabelle 17). Bei dem Vergleich der Ausbeute von Squalen (rund 8,24 mg L⁻¹) und 2,3-Oxidosqualen (rund 0,34 mg L⁻¹) scheint es, als seien ungefähr 8 mg L⁻¹ Squalen nicht umgesetzt worden. In den Proben mit 2,3-Oxidosqualen war jedoch kaum Squalen vorhanden (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass die Umsetzung von Squalen zu 2,3-Oxidosqualen effektiv durch die Squalenepoxidase durchgeführt wurde. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass 2,3-Oxidosqualen z. B. weiter umgesetzt oder abgebaut wurde. Das Enzym SQE1 scheint somit keinen limitierenden Faktor in dem Biosyntheseweg zur Triterpenproduktion darzustellen. Ebenso wird die weitere Umsetzung von 2,3-Oxidosqualen zu Cycloartenol effektiv von der Cycloartenolsynthase CAS1 ausgeführt, wie die Ausbeuten im äquivalenten Größenbereich zeigen.

Tabelle 17: Mengenangaben der heterolog produzierten Triterpene in R. capsulatus SB1003.

Anhand der LC-MS-Analysen (vgl. Abbildung 36) wurde mithilfe der Kalibrierungsgeraden von kommerziellen Referenzen die Produktlevel der heterolog produzierten Triterpene in *R. capsulatus* SB1003 determiniert. Die Triterpenmengen sind als Produktionstiter in mg L⁻¹ und spezifische Ausbeute in mg gDCW⁻¹ angegeben. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit entsprechenden Standardabweichungen. Modifiziert nach Loeschcke *et al.*, 2017.

Substanz	Titer [mg L ⁻¹]	Spezifische Ausbeute [mg gDCW ⁻¹]	Umsetzung der Vorstufenverbindung	
Squalen	8,24 ± 3,06	9,44 ± 3,17		
2,3-Oxidosqualen	0,28 ± 0,02	0,32 ± 0,03	quantitativ	
Cycloartenol	0,34 ± 0,06	0,40 ± 0,08	quantitativ	
Lupeol	nicht-quantifizierbare Menge		schlecht	
LupX	nicht-quantif			

Die Daten belegen insgesamt die Eignung von *R. capsulatus* SB1003 als Expressionswirt für die funktionelle heterologe Expression pflanzlicher Biosynthesegene zur Bildung zyklischer Triterpene. Mit der Generierung von Cycloartenol konnte die Etablierung eines Triterpens mit einem Sterolgerüst, welche über die CBC-Konformation des Substrats 2,3-Oxidosqualen abläuft, gezeigt werden. Anhand der Produktion von Lupeol ist zu erkennen, dass auch die Triterpenbiosynthese über die CCC-Konformation in *R. capsulatus* integriert werden konnte.

Für die aus *A. thaliana* stammende CAS1 wurde nur das Produkt Cycloartenol detektiert (vgl. Abbildung 36). Damit entsprechen die erhaltenen Ergebnisse den Literaturdaten der hier verwendeten CAS1, in denen bei der Expression von eben dieser Synthase in Hefe ebenfalls nur

Cycloartenol nachgewiesen wurde (Corey *et al.*, 1993). Im Allgemeinen ist in Hefe-Expressionsstudien zur Charakterisierung von Cycloartenolsynthasen aus unterschiedlichen Pflanzen Cycloartenol immer als das alleinige (Haupt-)Produkt der jeweiligen Synthase beschrieben, wie die Expression von entsprechenden Genen aus (i) dem Echten Süßholz (*Glycyrrhiza glabra*) (Hayashi *et al.*, 2000), (ii) der Speise- bzw. Gartenerbse (*Pisum sativum*) (Morita *et al.*, 1997) und (iii) dem in Asien bekannten Heilkraut *Polygala tenuifolia* (Jin *et al.*, 2017) zeigen. Das Vorkommen von OSC mit nur einem Produkt ist nicht unüblich, jedoch existieren ebenfalls OSC mit einem breiten Produktspektrum (Thimmappa *et al.*, 2014).

Die hier eingesetzte, aus *A. thaliana* stammende Lupeolsynthase LUP1 gehört der letztgenannten Gruppe der OSC an, welche mehrere Produkte generieren kann (Herrera *et al.*, 1998; Thimmappa *et al.*, 2014). Dabei wurde bereits in der ersten Charakterisierung der Synthase beschrieben, dass diese neben Lupeol und β -Amyrin weitere nicht identifizierte Triterpen-Alkohole herstellt (Herrera *et al.*, 1998). Zwei Jahre später wurden die Nebenprodukte detaillierter untersucht und eine Verbindung als 3,20-Dihydroxylupan (Lupanediol) identifiziert (Segura *et al.*, 2000). Im Zuge dessen wurde postuliert, dass Lupanediol durch den Prozess des Quenchens des Carbokations mit Wasser geformt werden kann (Segura *et al.*, 2000). Dies bedeutet, dass LUP1 die Reaktion von 2,3-Oxidosqualen zu einem zyklischen Triterpen zum einen durch die Deprotonierung des Carbokations und zum anderen durch das Quenchen des finalen Carbokations mit einem Wassermolekül beenden kann, wodurch Lupeol beziehungsweise Lupanediol entstehen kann (Kushiro *et al.*, 2006). Lupanediol besitzt damit eine Summenformel von C₃₀H₅₂O₂, sodass diese Verbindung von der chemischen Zusammensetzung her mit dem hier nachgewiesenen LupX übereinstimmen würde.

Zusammenfassend war die erstmalige Aktivierung eines heterologen Triterpenbiosynthesewegs aus *A. thaliana* im phototrophen prokaryotischen Expressionswirt *R. capsulatus* erfolgreich. Darüber hinaus wurde in Zusammenarbeit mit der CEPLAS-MS-Plattform eine Analysemethodik aufgezeigt, mithilfe derer die jeweiligen Signale der im Wirt gebildeten Verbindungen nachgewiesen und als Produkte einzelner Enzyme zugeordnet werden konnten. So konnten die Voraussetzungen für weiterführende Untersuchungen geschaffen werden.

3.2.1.3 Effekte der heterologen Triterpenproduktion auf die Zellfitness von R. capsulatus

Nachdem die heterologe Triterpenbiosynthese mittels relevanter Gene aus *A. thaliana* in *R. capsulatus* erfolgreich eingebracht wurde, stellte sich im Rahmen der Etablierung des Bakteriums als neue Plattform zur Triterpenproduktion die Frage nach der allgemeinen Fitness sowie Stabilität des Expressionswirts unter Expression. Um daher zu überprüfen, ob die heterologe

Triterpenproduktion in *R. capsulatus* SB1003 eine Auswirkung auf die Zellfitness und den intrinsischen Isoprenoid-Haushalt der *R. capsulatus*-Zellen hat, wurden während der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Expressionsexperimente das Wachstum der Zellen anhand von parallel zur Kultivierung aufgezeichneten Wachstumskurven und die intrinsischen Carotinoidlevel evaluiert (Abbildung 39).



Abbildung 39: Wachstum und Carotinoidbildung von R. capsulatus während der heterologen Triterpenproduktion.

Die physiologischen Parameter wurden während der Expression der Triterpenbiosynthesegene aus *A. thaliana* in *R. capsulatus* SB1003 aufgezeichnet. Die Daten wurden anhand der oben zur Analyse eingesetzten Kulturen (vgl. Abbildung 36 und Abbildung 38) erhoben. (A) Die Wachstumskurven wurden mittels Messungen der optischen Dichte bei 660 nm in regelmäßigen Abständen während der Kultivierung aufgenommen. Es sind jeweils gemittelte Werte einer Dreifachbestimmung mit den zugehörigen Standardabweichungen gezeigt. (B) Nach einer Inkubationsperiode von 52 h wurden Absorptionsspektren der *R. capsulatus*-Zellen aufgezeichnet. Dazu wurde die Absorption von 300 bis 900 nm in 1 nm-Intervallen von Zellen entsprechend einer OD_{660 nm} = 1 in 1 mL Wasser gemessen. Die Werte wurden auf eine OD_{660 nm} = 1 normalisiert. Typische Absorptionsmaxima von Bakteriochlorophyll (BChl) sowie den Carotinoiden (Car) sind markiert. (C) Die Daten des Carotinoidlevels nach 24 bzw. 52 h Kultivierung wurden aus den Absorptionsspektren extrahiert und stellen die Absorption bei der Wellenlänge $\lambda = 500$ nm dar. Die gezeigten Daten repräsentieren Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit den entsprechend dazugehörigen Standardabweichungen. SQS1: Squalensynthase, SQE1: Squalenepoxidase, LUP1: Lupeolsynthase und CAS1: Cycloartenolsynthase, EVC: Leervektor (engl.: *empty vector control*). Modifiziert nach Loeschcke *et al.*, 2017.

Als Kontrolle wurden Kulturen des Stammes SB1003 mit dem Plasmid pRhon5Hi-2 verwendet. Dieses Plasmid ist das Grundgerüst aller hier verwendeter Expressionsplasmide, sodass es als Leervektor und die Kontrolle entsprechend als EVC (engl.: empty vector control) bezeichnet wurde. Die optischen Dichten der Kulturen, in denen SQS1, SQS1-SQE1, LUP1-SQS1-SQE1 oder CAS1-SQS1-SQE1 exprimiert wurden, bzw. der EVC-Referenz, wurden zur Verfolgung des Wachstums der Zellen über den gesamten Inkubationszeitraum von 52 h aufgezeichnet. Dazu wurden Messungen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von λ = 660 nm in Intervallen von 8 bzw. 16 h durchgeführt (Abbildung 39 A). Sowohl die Kulturen der Zellen, welche die Biosynthese der Verbindungen des Vorstufenmoduls durchführten, als auch die Kulturen, welche zudem die Gene des Zyklisierungsmoduls exprimierten, erreichten nahezu gleiche Zelldichten von rund 1,50 ± 0,08 am Ende der Inkubation. Der Verlauf der Wachstumskurven der EVC und der Kulturen, die entweder SQS1 alleine oder die Kombination aus SQS1 und SQE1 exprimierten, waren beinahe identisch. Damit scheint das Einbringen der Gene des Vorstufenmoduls keinerlei negativen Einfluss auf das Wachstum der Zellen während der Expression der Gene zu haben. Bei der Koexpression der Oxidosqualenzyklasen CAS1 bzw. LUP1 waren dagegen geringfügige Abweichungen im Verlauf der Wuchskurven im Vergleich zu der EVC zu erkennen. Zusammengenommen scheint das Wachstum von R. capsulatus durch die heterologe Triterpenbiosynthese jedoch nicht deutlich beeinflusst zu sein. Da für Squalen bislang die höchsten Ausbeuten erzielt wurden, wurden des Weiteren nur Absorptionsspektren von Zellproben der Stämme, welche die Vorstufen Squalen und 2,3-Oxidosqualen herstellen, gemessen (Abbildung 39 B). Es wurden Ganz-Zell-Spektren von 300 - 900 nm mit 1 nm-Intervallen aufgezeichnet. Die Messungen zeigten keine Auffälligkeiten und entsprachen qualitativ typischen Ganz-Zell-Absorptionsspektren R. capsulatus von mit Absorptionsmaxima bei ungefähr 380, 590, 800 und 860 nm aufgrund des Bakteriochlorophylls a sowie zwischen 450-570 nm bedingt durch die Carotinoide, welche den Daten der Literatur entsprechen (Bergmann, 2011; Chi et al., 2015; Hemschemeier et al., 2000). Zusätzlich wurde überprüft, ob die Bildung der linearen Triterpene Squalen und 2,3-Oxidosqualen sowie der damit verbundene Verbrauch der Verbindung FPP einen Einfluss auf die Mengen der intrinsischen Tetraterpene von *R. capsulatus* hat. Dazu wurde die Carotinoid-spezifische Absorption bei λ = 500 nm separat betrachtet (Abbildung 39 C). Wie anhand des Balkendiagramms zu erkennen ist, gab es weder bei der Probennahme nach 24 h noch zum Ende des Experiments nach 52 h signifikante Unterschiede zwischen den Carotinoidmengen der verschiedenen Stämme. Damit ist davon auszugehen, dass das Einbringen des heterologen pflanzlichen Triterpenbiosynthesewegs sowie der damit einhergehende Verbrauch des intrinsischen FPP, unter den getesteten Bedingungen keinen Einfluss auf die wirtseigene, native Terpenbiosynthese hat.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Bakterium einen robusten und vielversprechenden Kandidaten für die heterologe Triterpenbiosynthese darstellt. Ein Grund für die unbeeinflusste Zellvitalität könnten die verhältnismäßig niedrigen bzw. moderaten Produktlevel sein, die weder auf einen starken Verbrauch wirtseigener Ressourcen noch eine hohe Konzentration der neuen Terpenverbindungen in den Wirtszellen hindeuten. Außerdem könnte die Einlagerung der Vorstufenverbindungen und Produkte in die intracytoplasmatische Membran (ICM) des Bakteriums in einem unbeeinträchtigten Zellmetabolismus resultieren. In die Membran integrierte oder angelagerte Verbindungen wären vom Rest der Zelle separiert und möglichen Schädigungen durch eventuelle Interaktion mit anderen zellulären Komponenten wäre vorgebeugt. Unter den hier gewählten mikroaeroben Kultivierungsbedingungen ist die ICM zwar nicht vollständig ausgeprägt, aber Dr. Katrin Troost konnte in vorangegangenen Arbeiten zeigen, dass die genutzte Füllhöhe ein Optimum der Carotinoidproduktion und somit der ICM-Entstehung unter mikroaeroben Bedingungen darstellt. Dies konnte anhand der Pigmentierung der Zellen nachvollzogen werden, die mit der ICM-Bildung korreliert. Die rein anaerobe Kultivierung führt zur stärksten Pigmentierung, während unter aeroben Bedingungen die O2-vermittelte Repression der Photosynthesegene und eine verminderte Ausbildung der ICM vorliegt. Die Füllhöhe von 60 mL in einem 100 mL-Erlenmeyerkolben kann allerdings ca. 2/3 der Intensität der Pigmentierung im Vergleich zu anaeroben Bedingungen sicherstellen (Troost et al., 2019).

Indem die heterologe Triterpenproduktion im phototrophen prokaryotischen Expressionswirt *R. capsulatus* ohne negative Einflüsse auf die hier betrachteten Aspekte der Zellfitness etabliert werden konnte, konnten auf der Basis im Folgenden Strategien zur Optimierung der Triterpenausbeuten in *R. capsulatus* entworfen werden.

Zusammenfassung:

Etablierung der heterologen Biosynthese zyklischer Triterpene in R. capsulatus

R. CAPSULATUS WURDE ALS NEUE **PLATTFORM ZUR HETEROLOGEN TRITERPENPRODUKTION** ETABLIERT:

Heterologe Biosynthese zyklischer Triterpene in R. capsulatus (Kapitel 3.2.1.2)

Durch Expression von Biosynthesegenen der Modellpflanze *A. thaliana* wurde erstmals neben der Bildung von linearen Triterpenvorstufen (Squalen und 2,3-Oxidosqualen) die Biosynthese zyklischer Triterpene in *R. capsulatus* gezeigt.

Anhand der Expression der Cycloartenol- bzw. Lupeolsynthase (CAS1 und LUP1) konnte die Herstellung eines Triterpens einerseits mit einem Sterolgerüst und andererseits mit einem pentazyklischen Triterpengerüst demonstriert werden. Die zur Analyse der Produkte angewendeten, sensiblen LC-MS-Messungen ermöglichten die Detektion eines weiteren Triterpenprodukts im Zuge der *LUP1*-Expression, bei welchem es sich vermutlich um ein hydroxyliertes Lupeol-Derivat handeln könnte.

Effekt der heterologen Triterpenproduktion auf die Zellfitness von *R. capsulatus* (Kapitel 3.2.1.3)

Die in *R. capsulatus* durchgeführte heterologe Produktion der linearen Triterpene Squalen und 2,3-Oxidosqualen sowie der exemplarisch herausgegriffenen Triterpene Cycloartenol und Lupeol mit Titern von 0,3 - 8,2 mg L⁻¹ hatte keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum oder die Carotinoidbildung des Bakteriums. Damit konnte der phototrophe Mikroorganismus *R. capsulatus* in einem ersten Schritt als vielversprechender Expressionswirt zyklischer Triterpene identifiziert werden.

PUBLIKATION(EN):

Die Ergebnisse der Kapitel 3.2.1.1, 3.2.1.2 und 3.2.1.3 sind in der Publikation "The photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 as new hosts for cyclic plant triterpene biosynthesis." Anita Loeschcke*, Dennis Dienst*, Vera Wewer*, **Jennifer Hage-Hülsmann**, Maximilian Dietsch, Sarah Kranz-Finger, Vanessa Hüren, Sabine Metzger, Vlada B. Urlacher, Tamara Gigolashvili, Stanislav Kopriva, Ilka M. Axmann, Thomas Drepper, Karl-Erich Jaeger (2017). PLoS One 12(12): e0189816. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189816 [*: *equally contributed*] veröffentlicht.

3.2.2 Optimierung der Triterpenproduktion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die heterologe Produktion von Triterpenen prinzipiell im bakteriellen Expressionswirt *R. capsulatus* SB1003 möglich und analytisch erfassbar ist, wurde untersucht, ob die Produkttiter erhöht werden können. Um dies zu realisieren, wurden für jedes Modul verschiedene Optimierungsstrategien ausgewählt. Dabei handelte es sich um die nachfolgend erläuterten Ansätze, von denen einige in anderen Studien bereits positive Effekte auf Terpenproduktionen erbracht haben (Beekwilder *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2015; Troost, 2017; Troost *et al.*, 2019):

Strategie 1: "Erhöhung des Zuflusses von Isoprenoid-Vorstufenverbindungen". Zur Optimierung und Steigerung der intrinsischen Isoprenoidbiosynthese in *R. capsulatus* wurden zusätzliche Biosynthesegene koexprimiert. Zum einen wurden die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase (Dxs) und die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase (Idi) aus dem MEP-Weg von R. sphaeroides sowie die FPP-Synthase IspA aus dem Isoprenoidweg von R. capsulatus zusätzlich zu den wirtseigenen Kopien äquivalenter Gene Plasmid-basiert koexprimiert. Ziel dabei war die Erhöhung der Mengen der Vorstufenverbindungen IPP und DMAPP sowie FPP. Ein Beispiel für den Einsatz dieser Strategie erfolgte im Rahmen der Synthese von Sesquiterpenen in *R. capsulatus* in den Arbeiten von Dr. Katrin Troost (Troost, 2017; Troost et al., 2019). Zum anderen wurde neben dem bisher verwendeten Stamm R. capsulatus SB1003 der durch Metabolic Engineering veränderte Stamm SB1003-MVA (Troost et al., 2019) für die heterologe Triterpensynthese verwendet. Dieser Stamm besitzt ein ins Genom integriertes MVA-Gencluster (Gene: mvaA, idi, hcs, mvk, pmk und mvd) aus dem Bakterium Paracoccus zeaxanthinifaciens ATCC 21588 (Hümbelin et al., 2002). Die Integration des MVA-Genclusters soll ebenfalls dafür sorgen, dass höhere Level der Verbindungen IPP und DMAPP vorhanden sind. Modifikationen entsprechend der Strategie 1 sollten demnach dem intrinsischen Terpenbiosyntheseweg von R. capsulatus bzw. einem rekombinanten Syntheseweg mehr Vorstufenverbindungen bereitstellen. Da vorangegangene Arbeiten von Dr. Katrin Troost zeigten, dass der Erfolg dieser Ansätze stark von der jeweils genutzten Terpensynthase abhängen kann, galt es nun, die Anwendbarkeit für die hier neu etablierte heterologe Triterpenbiosynthese zu evaluieren.

<u>Strategie 2:</u> "Senkung des Abflusses von Isoprenoid-Vorstufenverbindungen". Zur Optimierung der Isoprenoidbereitstellung für die heterologe Terpenbiosynthese in *R. capsulatus* wurde der genetisch veränderte Stamm SB1003- Δ *crtE* genutzt. Der von Dr. Katrin Troost erstellte Stamm SB1003- Δ *crtE* besitzt im Gen *crtE* eine Disruption (Troost, 2017), welche durch das Einbringen einer Ω -Spc-Kassette, die das Gen *aadA* enthielt und eine Spectinomycin-3"-Adenylyltransferase kodiert, erzeugt wurde. Durch die Gendisruption ist der intrinsische Carotinoidbiosyntheseweg unterbrochen. Damit ist die Route dieses intrinsischen FPP-Verbrauchs gestoppt, sodass die Verbindung vermehrt in die heterologe Terpenbiosynthese einfließen könnte. Aufgrund der nicht vorhandenen Biosynthese der Carotinoide ist der Stamm SB1003- Δ *crtE* grünlich gefärbt.

<u>Strategie 3:</u> "Verwendung von alternativen Enzymen aus verschiedenen Organismen". Im Rahmen dieses Ansatzes wurden Synthasen mit gleicher Funktion aus unterschiedlichen Organismen vergleichend betrachtet. Da sich funktional gleiche Enzyme biochemisch in Eigenschaften wie etwa der Aktivität, Stabilität oder Inhibierbarkeit unterscheiden können, kann der Einsatz verschiedener Synthasen eine Steigerung der Titer gegenüber dem bisherigen Biosynthesemodell, welches nur auf Enzymen aus *A. thaliana* basiert, zur Folge haben. Die Anwendung dieser Strategie erzielte bereits in

verschiedenen Studien entscheidende Unterschiede in den Produktionsleveln (Beekwilder *et al.,* 2014; Troost, 2017; Troost *et al.*, 2019).

3.2.2.1 Optimierung der Squalenproduktion

Zuvor wurde während der heterologen Triterpenproduktion in *R. capsulatus* im Vorstufenmodul das lineare Triterpen Squalen mit den vielversprechendsten Produktleveln gebildet (vgl. Tabelle 17), sodass *R. capsulatus* für die Herstellung dieser Verbindung besonders geeignet zu sein scheint. Daher wurde die Masterarbeit "Optimierung der heterologen Squalen-Produktion in *Rhodobacter capsulatus* durch *metabolic engineering* und optogenetische Verfahren" von Oliver Klaus durchgeführt (Klaus, 2017). In der Studie wurden verschiedene Squalensynthasen aus den Organismen *Thermosynechococcus elongatus* (Cyanobakterium), *Botryococcus braunii* (planktonische Mikroalge), *Homo sapiens* (der Mensch) und *Methylococcus capsulatus* (Proteobakterium) zusammen mit dem Enzym aus *Arabidopsis thaliana* (Pflanze) komparativ evaluiert. Neben der Verwendung dieser unterschiedlichen Squalensynthasen (vgl. Kapitel 3.2.2, <u>Strategie 3</u>), wurden die bekannten *Metabolic-Engineering*-Strategien zur Steigerung des Zuflusses von Isoprenoid-Vorstufenverbindungen zur Optimierung der Terpenproduktion in *R. capsulatus* SB1003 als auch in dem genetisch veränderten Stamm SB1003-MVA.

Da das Vorstufenmodul nur bis zu dem Produkt Squalen betrachtet wurde, war eine mikroaerobe Kultivierung, welche zuvor verwendet wurde, und dazu diente, den nötigen molekularen Sauerstoff für die Epoxidierung von Squalen bereitzustellen, nicht mehr erforderlich. Aus diesem Grund wurde für diese Experimente die anaerobe Kultivierung bevorzugt, die grundsätzlich zur Entstehung höherer Mengen intrinsischer Carotinoide führt (Troost *et al.*, 2019). Die damit verbundene gesteigerte Bildung der entsprechenden Vorstufenverbindungen könnte sich positiv auf die heterologe Terpenproduktion auswirken. Um zu überprüfen, ob die anaerobe Kultivierung sowie die oben genannten Strategien einen Einfluss auf die Squalenproduktion haben, wurden Kulturen von *R. capsulatus* SB1003 sowie SB1003-MVA mit pRhon5Hi-2-basierten Expressionsvektoren, die die Gene der Squalensynthasen sowie zusätzlich *ispA* bzw. *ispA-dxs-idi* enthielten, zur Expression für 48 h in RCV-Medium mit 0,1% Serin unter anaeroben Bedingungen bei 30 °C unter Glühbirnenlicht kultiviert. Nach anschließender Zellextraktion wurde die Squalenbildung der Stämme mittels HPLC-Trennung und UV-Detektion anhand einer Kalibrierung bestimmt und die Produkttiter hier zusammengefasst (Tabelle 18).

Die Squalenbildung durch die Expression der *SQS1* aus *A. thaliana* in *R. capsulatus* SB1003 unter anaeroben Bedingungen belief sich auf einen Titer von ungefähr 65 mg L⁻¹ (Tabelle 18), was einer rund 8-fachen Erhöhung gegenüber dem zuvor unter mikroaerober Anzucht erzielten Titer von ca. 8 mg L⁻¹ (vgl. Tabelle 17) entsprach. Die Verwendung der Synthasen *Bb*SQS, *Te*SQS und *Hs*SQS in SB1003 erbrachte im Vergleich zu den mit der *At*SQS erzielten Ausbeuten niedrigere Produktlevel. Gegensätzlich dazu wurde eine Produktsteigerung auf ca. 70 mg L⁻¹ bei der Applikation der aus *M. capsulatus* stammenden SQS erzielt. Damit zeigten die verschiedenen SQS bereits ohne *Metabolic-Engineering*-Eingriffe unterschiedliche enzymspezifische Squalen-Produktionslevel. Die Spanne der erzielten Titer war dabei groß, wie anhand der minimalen (*Te*SQS: ca. 15 mg L⁻¹) und maximalen (*Mc*SQS: ca. 70 mg L⁻¹) Ausbeuten abzulesen ist. Die Ergebnisse reihten sich damit in die Beobachtungen der Literatur ein. Dort sind beispielshalber Differenzen in der Produktivität von funktional gleichen Valencensynthasen aus unterschiedlichen Organismen im selben Expressionswirt beschrieben (Beekwilder *et al.*, 2014; Troost *et al.*, 2019).

Tabelle 18: Produktionstiter von Squalen in *R. capsulatus* bei heterologer Expression verschiedener Squalensynthasen und Vorstufenbiosynthesegene.

Dargestellt ist eine Zusammenfassung der in der Masterarbeit "Optimierung der heterologen Squalen-Produktion in *R. capsulatus* durch *metabolic engineering* und optogenetische Verfahren" von Oliver Klaus generierten Daten. Die Stämme SB1003 und SB1003-MVA [ins bakterielle Chromosom integriertes MVA-Gencluster aus *P. zeaxanthinifaciens: mvaA, idi, hcs, mvk, pmk* und *mvd*] wurden zur Plasmid-basierten Expression der Gene *ispA, idi, dxs* [aus *R. capsulatus* SB1003 bzw. *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, vgl. Troost *et al.*, 2019] und fünf verschiedener Squalensynthasen aus unterschiedlichen Ursprungsorganismen [*A. thaliana* (*At*), *B. braunii* (*Bb*), *T. elongatus* (*Te*), *H. sapiens* (*Hs*) und *M. capsulatus* (*Mc*)] verwendet. Die produzierten Squalenmengen wurden nach 48 h anaerober Kultivierung bei 30 °C unter Glühbirnenlicht in RCV-Medium mit 0,1% Serin durch Extraktion und mittels HPLC-Analyse anhand einer entsprechenden Eichgerade bestimmt und sind in mg L⁻¹ angegeben. Bei den gezeigten Daten handelt es sich um Dreifachbestimmungen mit den entsprechenden Standardabweichungen. Die Werte, die bei Koexpression von Vorstufenbiosynthesegenen gegenüber der Expression der jeweiligen Squalensynthase deutlich erhöht sind, sind in grün hervorgehoben. Die rot gekennzeichneten Felder heben den niedrigsten Titer der jeweiligen Synthase hervor.

	Gen- kombinationen	Herkunftsorganismus der Squalensynthase				
<i>R. capsulatus</i> Stamm		At	Bb	Те	Hs	Мс
••••		Squalenausbeuten in mg L ⁻¹				
SB1003	SQS	64,55 ± 10,1	21,49 ± 2,13	15,16 ± 1,21	42,88 ± 3,61	70,69 ± 4,07
	SQS + ispA	53,53 ± 3,6	20,26 ± 1,24	8,77 ± 0,47	60,46 ± 0,47	90,90 ± 5,28
	SQS + ispA-dxs-idi	14,05 ± 1,00	5,32 ± 0,30	7,53 ± 0,70	33,84 ± 2,82	27,48 ±,4,24
SB1003-MVA	sQs	45,84 ± 0,8	15,16 ± 1,19	22,55 ± 1,47	34,64 ± 0,85	70,65 ± 5,98
	SQS + ispA	40,41 ± 0,2	19,12 ± 1,71	16,39 ± 1,21	55,29 ± 1,48	51,58 ± 8,09
	SQS + ispA-dxs-idi	12,25 ± 2,6	18,90 ± 1,06	15,17 ± 2,6	43,44 ± 8,16	19,52 ± 2,58

Im Zuge der ebenso durchgeführten genetischen Manipulationen des Vorstufen- bzw. des Isoprenoidbiosynthesewegs von *R. capsulatus* SB1003 ist der Einfluss jeglicher Modifikation in den Squalentitern wiederzufinden. Gleiche Modifikationen wie etwa das zusätzliche Einbringen des Gens *ispA*, in Kombination mit jeweils einer Squalensynthase hatten teils unterschiedliche Auswirkungen. Im Fall der SQS1 aus *A. thaliana* sowie der Squalensynthase aus *B. braunii* erbrachte die Koexpression von Vorstufenbiosynthesegenen keine Steigerung des Produktlevels. Stattdessen wurden zum Teil deutlich niedrigere Titer ermittelt. Für die *Te*SQS war die Verwendung von SB1003-MVA die ausschlaggebende Optimierungsstrategie, durch die ein Titer von fast 23 mg L⁻¹ erreicht wurde. Bei dem Einsatz der *Hs*SQS konnten bei Koexpression mit *ispA* maximale Titer von 60 bzw. 55 mg L⁻¹ in SB1003 bzw. SB1003-MVA gemessen werden. Im Fall der *Mc*SQS sorgte die Koexpression von *ispA* ebenfalls für eine deutliche Steigerung auf 90 mg L⁻¹, wobei diese nur in SB1003 zu verzeichnen war. Die Koexpression der jeweiligen Synthasen mit *ispA-dxs-idi* führte für alle Synthasen und in beiden *R. capsulatus*-Stämmen zu zum Teil enormen Einbußen der Ausbeuten.

Generell waren die in der Masterarbeit generierten Mengen an Squalen gegenüber dem Titer, der im Rahmen der initialen Etablierung des Triterpenbiosynthesewegs (vgl. Kapitel 3.2.1.2, Tabelle 17) determiniert wurde, teils rund 10-fach höher. Daher könnten hier anderes als bei dem zuvor niedrigeren Titer Effekte auf den Zellstoffwechsel vorliegen, sodass das Zellwachstum und die Pigmentbildung beeinflusst sein könnten. Aus diesem Grund wurde zum einen das Wachstum von *R. capsulatus* mittels der finalen Zelldichten der Kulturen analysiert. Dabei wurden im äquivalenten Bereich liegende OD_{660 nm}-Werte von ca. 2,7 für Squalen produzierende und nicht-produzierende Stämme gemessen (Daten nicht gezeigt). Somit war kein negativer Effekt der heterologen Biosynthese von Squalen auf das Wachstum des Expressionswirts zu beobachten. Zum anderen wurden die intrinsischen Carotinoidlevel anhand der spezifischen Absorption gemessen (Daten nicht gezeigt), wobei ebenso kein produktionsabhängiger Effekt erkennbar war.

Insgesamt konnte die Optimierung der Squalensynthese im Vorstufenmodul des Triterpenbiosynthesewegs mittels der genutzten anaeroben, photoheterotrophen Kultivierung sowie der ausgewählten genetischen Veränderungen und der vergleichenden Applikation von fünf Squalensynthasen aus unterschiedlichen Herkunftsorganismen erfolgreich durchgeführt werden. Interessanterweise resultierte die Änderung der Kultivierungsbedingungen von mikroaerober zu anaerober photoheterotropher Anzucht bei Expression der SQS1 aus A. thaliana im R. capsulatus-Wildtyp in einer ca. 8-fachen Steigerung des Squalenlevels. Dies überstieg deutlich den zuvor in einer anderen Arbeit determinierten ungefähr 1,5-fachen Anstieg des intrinsischen Carotinoidlevels, den diese Änderung bewirkt (Troost *et al.*, 2019). Dies kann unter anderem darauf zurückzuführen sein, dass die anaeroben, photoheterotrophen Bedingungen nicht nur zur Steigerung der nativen Terpensynthese in *R. capsulatus* führen, sondern zudem die De-Repression des P_{nif}-Promoters fördern. Schließlich wird der Pnif-Promoter neben der Stickstoffquelle maßgeblich durch Sauerstoff reguliert, weshalb aerobe bzw. mikroaerobe Kultivierungen vergleichsweise in einer geringeren Expression der Zielgene unter der Kontrolle dieses Promoters resultieren. So wurde in vorangegangenen Experimenten gezeigt, dass bei Nutzung der mikroaeroben Kultivierung mit der hier angewendeten Füllhöhe von 60 mL in 100 mL-Kolben eine ca. 2-fache Reduktion der Expressionsstärke gegenüber der anaeroben Kultivierung vorliegt (Troost et al., 2019). Die rein anaerobe Kultivierung hebt diese Inhibition ganz auf, sodass dadurch die Expression der SQS1 vermutlich verstärkt wird. Schließlich wird unter phototrophen Wachstumsbedingungen durch die Photosynthese ATP erzeugt, das für ATP-abhängige zelluläre Prozesse in Rhodobacter genutzt werden kann. Dies bedeutet wiederum, dass die in den Kulturen vorhandene Kohlenstoffguelle Malat auch zur effektiven Nutzung in anabolen Prozessen (z. B. Proteinbiosynthese, Isoprenoidbiosynthese) zur Verfügung steht und weniger zur Energiegewinnung (ATP-Bildung) metabolisiert werden muss. So führte beispielsweise die phototrophe Anzucht eines R. capsulatus YFP-Expressionsstammes bereits zu einer deutlich erhöhten Proteinausbeute im Vergleich zur nicht phototrophen Anzucht desselben Stammes, wobei in diesem Fall Promotoren für die Expression des Zielgens verwendet wurden, deren Expressionsstärke durch die Anzuchtsbedingungen nicht beeinflusst werden (Katzke et al., 2010). Damit weist die anaerobe phototrophe Anzucht mehrere Vorteile auf, welche den rund 8-fachen Anstieg des Squalentiters aufgrund veränderter Kultivierungsbedingungen erklären können. Dass Kultivierungsbedingungen im Allgemeinen einen enormen Einfluss auf heterologe Produktionslevel von Terpenen haben können, zeigen ebenso Optimierungsstudien. Beispielshalber wurden in vergleichenden andere Evaluierungen Kultivierungsbedingungen durch Einsatz Nährmedien mit unterschiedlichen den von Kohlenstoffquellen variiert, wodurch teils signifikante Unterschiede in den Terpenausbeuten zu verzeichnen waren (Khan et al., 2015; Orsi et al., 2019).

Neben der Veränderung der Bedingungen der Anzucht war in den vorliegenden Daten der positive Effekt des *Metabolic Engineerings* auf die Level der heterolog hergestellten Terpene zu beobachten. Dieser ist im Allgemeinen bekannt und in zahlreichen Studien für diverse pro- und eukaryotische Terpenproduktionswirte beschrieben (Moser & Pichler, 2019). Dabei können Feedback- und Forward-hemmende Effekte sowie die Toxizität von akkumulierenden Intermediaten eines Biosynthesewegs (z. B. IPP und FPP) einen negativen Einfluss auf die Produktivität haben (Dahl *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2017). Dementsprechend kann die Feinregulation des Isoprenoidbiosynthesewegs den Erfolg der Ausbeute ausschlaggebend beeinflussen (Dahl *et al.*, 2013; Pitera *et al.*, 2007). Für das Intermediat FPP wurden beispielshalber inhibitorische Effekte auf die humane FPP-Synthase nachgewiesen (Park *et al.*, 2017). Dieses Intermediat könnte durch die hier eingesetzten Strategien zur verbesserten Squalenbildung ebenfalls akkumulieren und Einfluss auf die

wirtseigene FPP-Synthase IspA in R. capsulatus nehmen, worauf ebenso die obigen Ergebnisse hindeuten. Schließlich wurden bei der Expression von allen Synthasen die maximalen Squalenausbeuten nie im Fall der Stämme mit den meisten Modifikationen (ispA-dxs-idi) erreicht. Ganz im Gegenteil lag der jeweils niedrigste Titer für alle Squalensynthasen bei dem parallelen Einsatz von ispA-dxs-idi vor (Tabelle 18, rot hinterlegte Felder). Des Weiteren war die Metabolic-Engineering-Strategie nicht in Kombination mit jeder Synthase förderlich. Bei der Anwendung der AtSQS und der BbSQS lagen die besten Ausbeuten ohne weitere Metabolic-Engineering-Maßnahmen vor. Ob andere Methoden der Modifikation zur gesteigerten Produktivität dieser beiden Synthasen führen könnten, ist nicht ausgeschlossen. Beispielsweise ist das Protein-Engineering, also die Modifikation der eingesetzten Terpensynthase, eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Terpenproduktion (Abdallah et al., 2018; Edgar et al., 2017; Leonard et al., 2010). Im Allgemeinen ist es üblich einzelne Strategien miteinander zu kombinieren, wodurch maximale Terpenausbeuten erzielt werden können. Dies bestätigen sowohl die obigen Ergebnisse der Masterarbeit als auch die Daten der Dissertation von Dr. Katrin Troost (Troost, 2017). Aus diesen geht deutlich der Wert der modularen und kombinierten Modifikation, also der individuellen Anpassung und Optimierung des Isoprenoidbiosynthesewegs, zur Produktion verschiedener Terpene zum Erreichen maximaler Titer in *R. capsulatus* hervor.

Zusammenfassend konnte damit für den spezifischen Fall der Biosynthese von Squalen in *R. capsulatus* durch die Kombination unterschiedlicher Maßnahmen, die die Anzuchtsbedingungen sowie das genetische Stamm-Setup umfassten, eine signifikante Steigerung der Produktbildung erreicht werden. Die zur Optimierung angewendeten Strategien, nämlich (i) die Steigerung des Zuflusses der Isoprenoid-Vorstufenverbindungen (<u>Strategie 1</u>) und (ii) die Verwendung verschiedener Squalensynthasen (<u>Strategie 3</u>), führten in den spezifischen Kombinationen jeweils zum Erfolg. Der maximale Squalentiter von rund 90 mg L⁻¹ wurde durch die Plasmid-basierte Koexpression der Gene *Mc*SQS und *ispA* in *R. capsulatus* SB1003 erreicht. Daher sollten anschließend ebenfalls Ansätze zur Verbesserung der Ausbeuten eines zyklischen Triterpens entworfen werden.

3.2.2.2 Optimierung der Cycloartenolproduktion

Im Zuge der heterologen Biosynthese von Triterpenen in *R. capsulatus* (vgl. Kapitel 3.2.1.2) wurde zuvor durch die Expression der Genkombinationen *LUP1-SQS1-SQE1* bzw. *CAS1-SQS1-SQE1* gezeigt, dass auch das Zyklisierungsmodul aktiviert werden kann. Während für das Produkt Lupeol nicht quantifizierbare, geringe Mengen detektiert wurden, konnte ein Titer von 0,34 mg L⁻¹ Cycloartenol determiniert werden (vgl. Tabelle 17). Dies deutet daraufhin, dass *R. capsulatus* für die Biosynthese von letzterem Triterpen geeigneter zu sein scheint. Aus diesem Grund wurde die Optimierung zur

Erhöhung der Produktionslevel im Zyklisierungsmodul anhand der Cycloartenolbildung durchgeführt. Dazu wurden Ansätze aus den drei oben vorgestellten Optimierungsstrategien (vgl. Kapitel 3.2.2) verfolgt. Um zu überprüfen, ob ein gesteigerter Zufluss von Isoprenoid-Vorstufenverbindungen zu einer höheren Ausbeute führt, wurde der zuvor eingesetzte Stamm SB1003-MVA hinzugezogen (Strategie 1). Um des Weiteren zu untersuchen, ob eine verminderte Umsetzung von Isoprenoid-Vorstufenverbindungen durch die intrinsische Carotinoidbiosynthese in R. capsulatus zu einer höheren Produktion führt, wurde zudem der bislang nicht verwendete genetisch veränderte Stamm SB1003- Δ crtE einbezogen (Strategie 2). Wie bereits beschrieben, soll dieser der gesteigerten Bereitstellung von Vorstufenverbindungen des Terpenbiosynthesewegs dienen. Das Gen crtE, dessen Produkt im Wildtyp SB1003 zur Umsetzung von FPP zu GGPP dient, wurde dazu deletiert. Aufgrund dessen ist SB1003-AcrtE nicht fähig das Zwischenstufenprodukt FPP in den intrinsischen Terpenbiosyntheseweg zu schleusen. Folglich soll FPP vermehrt für die Produktion von Cycloartenol Verfügung stehen. Ebenso wurden Cycloartenolsynthasen aus unterschiedlichen zur Herkunftsorganismen vergleichend evaluiert (Strategie 3). Die komparative Biosynthese von Cycloartenol erfolgte demnach in SB1003, SB1003-MVA sowie SB1003-Δ*crtE*. Das durch die crtE-Deletion bedingte Fehlen der intrinsischen Terpenproduktion hat zur Folge, dass Carotinoide zur Photosynthese und Photoprotektion des Bakteriums fehlen und eine Kultivierung ausschließlich unter nicht-phototrophen, mikroaeroben Bedingungen erfolgen kann. Somit bietet sich dieser Stamm insbesondere für die Implementierung der Synthese zyklischer Triterpene an, bei der ohnehin molekularer Sauersoff zur Verfügung stehen muss. Dementsprechend wurde die Optimierung der Cycloartenolproduktion unter mikroaerober Anzucht durchgeführt. Die Regulation der heterologen Expression erfolgte weiterhin P_{nif}-basiert.

Um zunächst zu überprüfen, ob als Voraussetzung für die nachfolgend angestrebte Bildung von Cycloartenol das Vorstufenmodul in dem hier zum ersten Mal für die Triterpenproduktion verwendeten Stamm SB1003- $\Delta crtE$ implementiert werden kann, wurden zunächst *SQS1* sowie *SQS1*-*SQE1* aus *A. thaliana* in diesem zur Expression gebracht. Dazu wurden die zuvor konstruierten Plasmide pRhon5Hi-2-SQS1 und pRhon5-Hi-2-SQS1-SQE1 eingesetzt. Mittels LC-MS-Analysen von Zellextrakten (vgl. Kapitel 2.9.3.2) konnte die Akkumulation der Triterpene Squalen (Abbildung 40 A) und 2,3-Oxidosqualen (Abbildung 40 B) in allen drei Stämmen nachgewiesen werden. Hierbei lag die Signalstärke bei Verwendung von SB1003- $\Delta crtE$ im selben Bereich wie die der anderen Stämme bzw. sogar etwas höher. Demzufolge konnte das gesamte Vorstufenmodul und die damit einhergehende Generierung von Squalen und 2,3-Oxidosqualen in *R. capsulatus* SB1003- $\Delta crtE$ etabliert werden.



Abbildung 40: Heterologe Produktion von Squalen und 2,3-Oxidosqualen in verschiedenen *R. capsulatus*-Stämmen. Die Expressionskulturen von *R. capsulatus* SB1003, SB1003-MVA und SB1003-Δ*crtE*, welche jeweils SQS1 bzw. SQS1-SQE1 exprimierten, wurden unter mikroaeroben Bedingungen für 2 Tage bei 30 °C im Dunkeln und unter konstantem Schütteln mit 130 UpM angezogen. Anschließend wurden Zellpellets entsprechend einer OD_{660 nm} = 15 geerntet und die entstandenen Produkte mittels einer Flüssig-Flüssig-Extraktion aus den Zellen extrahiert. Die Detektion der Produkte in den Zellextrakten erfolgte über LC-MS-Analysen, wobei die Analyten nach Trennung im *reversed-phase*-Verfahren durch das Verfahren der ESI ionisiert wurden. Gezeigt sind exemplarisch herausgegriffene, repräsentative extrahierte Ionenchromatogramme (engl.: *extracted ion chromatograms*, EIC) aus drei Messungen von unabhängigen Kultivierungen einer Dreifachbestimmung. Kommerziell erhältliches Squalen und 2,3-Oxidosqualen dienten als Referenz. (A) Zur Generierung des EIC von Squalen in den entsprechenden Zellextrakten wurden die Signale der m/z-Verhältnisse von 411,399 und 433,381 der MS-Analyse summiert. (B) Der Nachweis der Verbindung 2,3-Oxidosqualen in den entsprechenden Zellextrakten erfolgte anhand von EIC aus der Summe der Signale der m/z-Verhältnisse von 409,383 und 427,393 der MS-Analyse. In der LC-Analyse liegen die Retentionszeiten der Verbindungen Squalen und 2,3-Oxidosqualen im selben Bereich wie die zuvor beobachteten Zeiten (vgl. Abbildung 36). Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2019.

Als Nächstes wurde das Zyklisierungsmodul durch die zusätzliche Koexpression von drei Cycloartenolsynthasen aus unterschiedlichen Herkunftsorganismen zu SQS-SQE implementiert. Dabei diente die bereits in SB1003 eingebrachte CAS1 aus *A. thaliana* als Referenz. Um neben der *Rhodobacter*-stammspezifischen auch die enzymspezifische Produktivität vergleichen zu können, wurden zwei Cycloartenolsynthasegene des Myxobakteriums *Stigmatella aurantiaca*, welche aus den zwei Stämmen Sg a15 (Bode *et al.*, 2003) bzw. DW4/3-1 (Huntley *et al.*, 2011) stammen, zusätzlich verwendet. Enzyme dieses Typs gehören zu den wenigen bekannten OSC, die auch in Bakterien vorkommen. Die Cycloartenolsynthasen wurden im Folgenden als *At*-CAS, *Sa*Sg-CAS und *Sa*DW-CAS bezeichnet. Alle Synthasen wurden in den Vektor pRhon5Hi-2-SQS1-SQE1 (Loeschcke *et al.*, 2017) eingebracht (Abbildung 41). Es wurde der Codon-Gebrauch der Gene zur Expression in *R. capsulatus*

optimiert und diese Sequenzen als synthetische DNA inklusive der für die Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen von der Firma Eurofins Genomics bezogen. Um in diesem Fall die Gene mit gerichteter Orientierung einklonieren zu können, wurden die 5'-Sequenzen stromaufwärts des Gens *SQS1* des Vektors pRhon5Hi-2-SQS1-SQE1 bis zu einer *Sal*I-Schnittstelle angefügt. An das 3'-Ende der jeweiligen Cycloartenolsynthase wurde außerdem ein Hexahistidin-Tag und wie zuvor die *nifK*-Ribosomenbindestelle für SQS1 (vgl. Kapitel 3.2.1.1) sowie eine *Nde*I-Schnittstelle angefügt. Folglich konnten die Vektoren durch enzymatische Hydrolyse mittels der Restriktionsendonukleasen *Sal*I und *Nde*I sowie einer anschließenden Ligation generiert werden. Die Richtigkeit der eingebrachten Sequenzen wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.



Abbildung 41: Klonierungsstrategie zur Expression verschiedener Cycloartenolsynthasegene.

Zur komparativen Evaluierung der Produktivität diverser Cycloartenolsynthasen (CAS) aus unterschiedlichen Herkunftsorganismen wurden diese in den Expressionsplasmiden vor das Squalensynthasegen (SQS1) aus *A. thaliana* eingebaut. Letzterem folgt in Richtung des 3'-Endes die Squalenepoxidase (SQE1) aus *A. thaliana*. Allen Genen vorgeschaltet ist der P_{nif}-Promotor. Die verschiedenen CAS-Gene sind mit einem C-terminalen Hexahistidin-Tag versehen. Jedes Gen ist mit einer spezifischen Ribosomenbindestelle (RBS) ausgestattet.

Dadurch entstanden die Expressionsvektoren pRhon5Hi-2-AtCAS1-6H-SQS1-SQE1, pRhon5Hi-2-SaSgCAS-6H-SQS1-SQE1 und pRhon5Hi-2-SaDWCAS-6H-SQS1-SQE1, welche in die drei *R. capsulatus*-Stämme mittels Konjugation eingebracht wurden. Die Expressionskulturen wurden weiterhin mit einer Startzelldichte von 0,05 bei λ = 660 nm inokuliert und unter mikroaeroben Bedingungen (30 °C, 130 UpM, im Dunkeln) in RCV-Medium mit 0,1 % Serin für 2 Tage angezogen (vgl. Kapitel 2.9.1). Danach wurden Zellpellets entsprechend einer OD_{660 nm} = 15 in 1 mL geerntet und anschließend die Terpenextraktion (vgl. Kapitel 2.9.3.1) durchgeführt. Zur Überprüfung der funktionalen Expression der Cycloartenolsynthasen wurde die Produktion des Triterpens Cycloartenol mit Hilfe von LC-MS-Analysen (vgl. Kapitel 2.9.3.2) der aus den Kulturen generierten Zellextrakte nachvollzogen
und die Titer in μ g L⁻¹ berechnet (Abbildung 42). Detaillierte Angaben zu den Titern (mg L⁻¹) sowie Umrechnungen in spezifische Ausbeuten (mg gDCW⁻¹) und spezifische Produktivitäten (μ g gDCW⁻¹ h⁻¹) sind dem Anhang beigefügt (vgl. Anhang-Tabelle 10).



Abbildung 42: Heterologe Cycloartenolproduktion in verschiedenen *R. capsulatus*-Stämmen mittels unterschiedlicher Cycloartenolsynthasen.

Die *R. capsulatus*-Stämme SB1003, SB1003-MVA und SB1003-Δ*crtE* wurden benutzt, um jeweils das Cycloartenolsynthasegen *CAS1* (At2g07050) aus *A. thaliana* (Corey *et al.*, 1993) und die Cycloartenolsynthasegene der *Stigmatella aurantiaca*-Stämme Sg a15 (Bode *et al.*, 2003) und DW4/3-1 (Huntley *et al.*, 2011) (kurz *At*-CAS, *Sa*Sg-CAS und *Sa*DW-CAS) heterolog zu exprimieren. Die Kultivierung sowie die Ernte der Zellpellets und die anschließende Extraktion der erwarteten Produkte erfolgte entsprechend der obigen ausführlichen Beschreibung in Abbildung 40. Die Produktbildung wurde mittels LC-MS-Analysen verfolgt und eine Quantifizierung anhand von Kalibrierungsreihen durchgeführt. Die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen und die dazugehörigen Standardabweichungen der erhaltenen Cycloartenolausbeuten sind in μg L⁻¹ dargestellt. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2019.

Im Wildtyp SB1003 resultierte die Expression der drei Cycloartenolsynthasen in ähnlichen Titern von ungefähr je 350 μg L⁻¹. In dem genetisch veränderten Stamm SB1003-MVA waren ebenfalls keine starken Unterschiede in der Cycloartenolproduktion entsprechend der eingebrachten Synthasen erkennbar, sodass im Mittel ca. 540 μg L⁻¹ hergestellt wurden. Interessanterweise ließen sich anhand dieser durchschnittlichen Produktionstiter deutliche stammspezifische Varianzen zwischen den Ausbeuten erkennen. Daraus geht hervor, dass die Implementierung des MVA-Wegs in SB1003 im Fall der heterologen Cycloartenolproduktion für eine Steigerung des Titers um rund 200 μg L⁻¹ sorgte. Die außerdem durchgeführte Expression der CAS-Gene in SB1003-Δ*crtE* erbrachte eine weitere Erhöhung der Ausbeuten. So wurden bei Verwendung der *At*-CAS1, *Sa*Sg-CAS und *Sa*DW-CAS ungefähr 1130 μg L⁻¹, 900 μg L⁻¹ bzw. 840 μg L⁻¹ Cycloartenol produziert. Damit waren in SB1003-Δ*crtE* zudem leichte enzymspezifische Differenzen zwischen den Titern erkennbar. Diese können etwa auf Varianzen in der Expression, Stabilität oder Aktivität der Enzyme zurückzuführen sein. Nichtsdestotrotz scheint dies hier ein weniger ausgeprägter Effekt zu sein, obwohl anderswo durchaus starke Abhängigkeiten der Titer von der verwendeten Terpensynthase, etwa im Fall der heterologen Biosynthese von Valencen in *R. sphaeroides* bzw. *R. capsulatus*, nachgewiesen wurden

Ergebnisse und Diskussion

(Beekwilder *et al.*, 2014; Troost *et al.*, 2019). Zusammengenommen liegen für die Kombinationen der drei CAS mit den unterschiedlichen *R. capsulatus*-Stämmen jedoch hauptsächlich signifikante stammspezifische Differenzen in den Cycloartenoltitern vor.

Die dabei höheren Produktionsausbeuten, die mit SB1003-AcrtE erzielt wurden, können durch verschiedene Hypothesen erklärt werden. Zum einen kann eine Senkung des intrinsischen FPP-Verbrauchs durch die Deletion des Gens crtE aus dem Carotinoidbiosyntheseweg für den Expressionswirt R. capsulatus insgesamt milder sein als ein Zuschalten mehrerer heterologer Gene zur vermehrten Bereitstellung von Vorstufenverbindungen. Demnach könnte bei Gegenüberstellung beider genetisch veränderter Stämme (SB1003-MVA, SB1003-Δ*crtE*) die Modulation des Metabolismus durch die Gendeletion in SB1003-∆crtE das Bakterium weniger aus seinem physiologischen Gleichgewicht bringen. Zum anderen werden in SB1003- $\Delta crtE$ keine Ressourcen auf die Carotinoidsynthese verwendet. Außerdem ist es denkbar, dass das Wegfallen der Bildung intrinsischer Carotinoide Feedback-Regulationsmechanismen aufhebt, die im Wildtyp und in SB1003-MVA im Isoprenoidmetabolismus greifen könnten. Damit würden auch diese beiden Aspekte höhere Produktausbeuten in SB1003-Δ*crtE* begünstigen. Wird SB1003-MVA vergleichsweise betrachtet, so resultierte die genetische Modifikation in diesem Stamm wahrscheinlich in einem stark hochgesetzten Zufluss zu Isoprenoidvorstufen, was, wie bereits erwähnt, vermutlich eine höhere metabolische Belastung als in SB1003-AcrtE mit sich bringt. Des Weiteren kann eine vermehrte Bildung an FPP vorliegen, welche negative Nebeneffekte hervorrufen kann. So besteht die Möglichkeit, dass es zu eventuellen Inhibierungen der FPP-Synthase durch einen Überschuss an deren Substrat IPP sowie möglicherweise Feedback-Inhibierungen durch akkumulierendes FPP, wie es z. B. für die humane FPP-Synthase beschrieben ist, kommen kann (Park et al., 2017). Da im Zusammenhang mit der Optimierung der Squalenproduktion Hinweise gewonnen wurden, dass die Expression des Gens SQS1 aus A. thaliana bei besonders erhöhten Substratleveln nicht zu einer Steigerung des Squalentiters führte, sondern die Metabolic-Engineering-Maßnahmen einen negativen Effekt auf die Ausbeuten hatten, scheint dies naheliegend (vgl. Tabelle 18). Die genannten Punkte sprechen demnach dafür, dass ein besserer Intermediat-Flux in SB1003-ΔcrtE und möglicherweise eine im Allgemeinen unbeeinflusste Vitalität dieses Expressionswirts vorliegen. Schlussendlich führt die Verwendung von SB1003- $\Delta crtE$ bei allen drei Cycloartenolsynthasen zu den höchsten Ausbeuten.

Neben der Bestimmung der Cycloartenoltiter wurde ebenfalls der Umsatz der Verbindungen Squalen und 2,3-Oxidosqualen in den CAS-exprimierenden Proben analysiert. In allen drei Stämmen und bei jeder Cycloartenolsynthase wurden Spuren von Squalen detektiert. Ebenso konnten kleine Mengen von 2,3-Oxidosqualen in allen drei Stämmen während der Expression der Cycloartenolsynthasen *At*-CAS und *Sa*DW-CAS gemessen werden. Interessanterweise wiesen die Proben, welche die *Sa*Sg-CAS exprimierten, höhere Mengen an 2,3-Oxidosqualen auf, wie ein Vergleich der entsprechenden Signale in den LC-MS-Chromatogrammen zeigte (Abbildung 43). Dieser anscheinend schlechtere Umsatz von 2,3-Oxidosqualen zu Cycloartenol mittels der *Sa*Sg-CAS, hatte anscheinend keinen Effekt auf die dabei erzielte Ausbeute, da diese im äquivalenten Größenbereich der mit den anderen beiden CAS erzielten Mengen lag. Damit ist die Verbindung 2,3-Oxidosqualen in diesem Fall nicht der limitierende Faktor für die Höhe der Cycloartenolausbeute.

Im Zuge der Expression der Cycloartenolsynthasen kam es des Weiteren zur Bildung eines zusätzlichen Produktes, welches hier als CasX bezeichnet wird (Abbildung 43). Dabei wurden bei der Expression von *At*-CAS und *Sa*DW-CAS nur Spuren von CasX nahe der Nachweisgrenze detektiert, welche als zusätzliches Seitenprodukt klassifiziert werden können. Das Enzym *Sa*Sg-CAS hingegen generierte vergleichsweise deutlich höhere Mengen an CasX, sodass alle weiteren Analysen dieses Produkts mit Proben des *Sa*Sg-CAS-Expressionsstamms durchgeführt wurden.



Abbildung 43: Detektion eines zusätzlichen Triterpenprodukts während der heterologen Cycloartenolbiosynthese mittels diverser Cycloartenolsynthasen in verschiedenen *R. capsulatus*-Stämmen. - Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite -





Im Zuge der zuvor beschriebenen Kultivierungen und Analysen zur komparativen heterologen Cycloartenolsynthase in verschiedenen *R. capsulatus*-Stämmen mittels diverser Cycloartenolsynthasen (vgl. Abbildung 42) konnte ein zusätzliches unerwartetes Triterpenprodukt detektiert werden. Die hier gezeigten Daten stammen aus denselben Kultivierungen, Extraktionen und Messungen, mithilfe derer die zuvor gezeigten Cycloartenolausbeuten berechnet wurden. Zur Detektion der Triterpenprodukte wurden LC-MS-Analysen verwendet. Gezeigt sind extrahierte Ionenchromatogramme (engl.: *extracted ion chromatograms*, EIC) aus drei Messungen von unabhängigen Kultivierungen aus Dreifachbestimmungen. Zur Detektion von 2,3-Oxidosqualen, Cycloartenol und CasX wurden EIC aus der Summe der Signale der m/z-Verhältnissen der MS-Analyse von 409,383 und 427,393 generiert. Kommerziell erhältliches Cycloartenol und 2,3-Oxidosqualen wurden für Referenzmessungen eingesetzt. Die Detektionen der Triterpenprodukte sind entsprechend der einzelnen Stämme gruppiert: (A) SB1003; (B) SB1003-MVA; (C) SB1003-Δ*crtE*. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2019.

Bei dem zusätzlich detektierten Triterpen könnte es sich um ein oxygeniertes, vielleicht hydroxyliertes, Derivat von Cycloartenol handeln. Dies kann daraus abgeleitet werden, dass das Produkt eine kürzere Retentionszeit von 6,6 Minuten im Vergleich zu Cycloartenol aufwies (Abbildung 44 A). Diese Verschiebung war ebenso für die Verbindung LupX im Verhältnis zu Lupeol zu beobachten, was in beiden Fällen auf eine erhöhte Polarität hinweist. Zudem zeigt das MS-Spektrum (Abbildung 44 B) verschiedene Signale, die mit typischen Addukt-Ionen wie [M+NH₄]⁺ und [M+Na]⁺ einer Verbindung mit der Summenformel C₃₀H₅₂O₂ übereinstimmen (Abbildung 44 C).



Abbildung 44: Detaillierte Analyse des Triterpenprodukts CasX. - Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite -

	Cycloartenol	CasX
Summenformel	C ₃₀ H ₅₀ O	C ₃₀ H ₅₂ O ₂
[M+H] ⁺ (m/z)	427,393	445,404
$[M+NH_4]^+(m/z)$	444,420	462,431
[M+Na] [⁺] (m/z)	449,375	467,386
[M+K] ⁺ (m/z)	465,349	483,360
[M+H-H ₂ O] ⁺ (m/z)	409,383	427,393
[M+H-2H ₂ O] ⁺ (m/z)	-	409,383

Abbildung 44: Detaillierte Analyse des Triterpenprodukts CasX.

Während der heterologen Expression der verschiedenen Cycloartenolsynthasegene (At-CAS, SaSg-CAS, SaDW-CAS) in R. capsulatus (SB1003, SB1003-MVA und SB1003- $\Delta crtE$) wurde neben Cycloartenol ein weiteres, als CasX bezeichnetes Triterpenprodukt detektiert (vgl. Abbildung 43). Da CasX am stärksten in Stämmen mit SaSg-CAS akkumulierte, wurden diese Kulturen zur detaillierten Analyse verwendet. Die zusätzlich erhobenen Daten sind hier gezeigt. (A) Exemplarisch herausgegriffene extrahierte Ionenchromatogramme (EIC) der kommerziell erhältlichen Cycloartenolreferenz und der R. capsulatus-Probe SB1003- $\Delta crtE$ -SaSg-CAS. Die EIC wurden durch das Summieren der Signale der m/z-Verhältnisse von 409,383 und 427,393 generiert. Die Retentionszeiten für Cycloartenol bzw. CasX betragen 10,5 bzw. 6,6 Minuten. (B) Zu den Verbindungen zugehörige ESI-MS-Spektren bei den genannten Retentionszeiten: Cycloartenolreferenz; Cycloartenol in Probe SB1003- $\Delta crtE$ -SaSg-CAS; CasX in Probe SB1003- $\Delta crtE$ -SaSg-CAS. (C) Summenformel von Cycloartenol sowie eine mögliche Summenformel des Produkts CasX und berechnete m/z-Verhältnisse von in den Messungen beobachteten Addukten und Fragmenten beider Verbindungen. Die Daten repräsentieren Ergebnisse von drei Messungen, welche mit unabhängigen Triplikaten von Kultivierungen durchgeführt wurden. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2019.

Wie ebenfalls für die Messungen der Proben mit LupX beschrieben, wurde das entsprechende Protonaddukt von CasX nicht detektiert. Dieses würde ein m/z-Verhältnis von 445,404 anstatt das für Cycloartenol bekannte m/z-Verhältnis von 427,393 aufweisen. Damit liegt ein Differenzwert von 18,011 vor, was darauf hindeutet, dass ein zusätzliches Sauerstoffatom sowie zwei zusätzliche Wasserstoffatome im CasX-Molekül vorkommen. Aufgrund dieser Daten ist deshalb anzunehmen, dass es sich bei dem als CasX bezeichneten Produkt um ein hydroxyliertes Cycloartenol-Derivat handeln könnte.

Die LC-MS-Analysen zeigten (vgl. Abbildung 43), dass das Triterpen CasX sowohl im *R. capsulatus*-Wildtyp SB1003 als auch in den beiden genetisch veränderten Stämmen SB1003-MVA und SB1003-Δ*crtE* gebildet wurde. Die Mengen an CasX variierten dabei, wie bereits beschrieben, deutlich je nach Cycloartenolsynthase. Das ließ die Vermutung zu, dass die CasX-Produktion und -Akkumulation von den heterologen CAS herrührte und eine spezifische Reaktion während der Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen erforderte und nicht auf eine durch ein intrinsisches, unspezifisches *R. capsulatus*-Enzym durchgeführte Derivatisierung von Cycloartenol zu CasX zurückzuführen ist. Der molekulare Mechanismus der Generierung von CasX könnte dabei, wie für LupX geschildert, das Quenchen des Carbokations mit einem Wassermolekül im Zuge der Zyklisierung von 2,3-Oxidosqualen sein (vgl. Kapitel 3.2.1.2). Generell werden die Entstehungen diverser oxygenierter Triterpene, wie beispielshalber das oben erwähnte Lupanediol (Ebizuka et al., 2003; Kushiro et al., 2006; Segura et al., 2000) durch diesen Prozess begründet, welcher anstelle einer Deprotonierung des Carbokations stattfindet. Weitere Beispiele sind die Produktion von Arabidiol in A. thaliana (Kolesnikova et al., 2007; Xiang et al., 2006) und Dammarenediol-II in der traditionellen asiatischen Heilpflanze Panax ginseng (Tansakul et al., 2006). Die zahlreichen Beispiele der OSC, die hydroxylierte Triterpene generieren, bestärken ebenfalls die obige Vermutung, dass eine von den Cycloartenolsynthasen abhängige Reaktion für die Bildung von CasX verantwortlich ist. Wie bereits beschrieben, waren die gebildeten Mengen an CasX von At-CAS, SaDW-CAS und SaSg-CAS unterschiedlich. Im Fall von At-CAS und SaDW-CAS waren sie so niedrig und im Bereich der Hintergrundsignale, dass ihnen nur deshalb Beachtung geschenkt wurde, weil die deutlicheren Signale bei Expression der SaSg-CAS gefunden wurden. Möglicherweise könnte dies darauf hinweisen, dass für einige als produktspezifisch geltende OSC bisher deshalb keine Nebenprodukte beschrieben wurden, weil diese in wesentlich geringeren Mengen gebildet werden und häufig analytisch nicht erfasst werden. Ebenso begründet dies die Tatsache, dass CasX nicht während der initialen Etablierung des Triterpenbiosynthesewegs in *R. capsulatus* (vgl. Kapitel 3.2.1.2) detektiert wurde. Die SaSg-CAS scheint die erste beschriebene Cycloartenolsynthase zu sein, die ein weiteres Produkt in signifikanten Mengen bildet. Die für CasX beobachteten Differenzen zwischen den mit den verschiedenen Enzymen erreichten Ausbeuten sind jedoch nicht im Hinblick auf die jeweils produzierten Cycloartenolmengen übertragbar. Letztere Beobachtung steht im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Ergebnissen der Optimierung der Squalenproduktion (vgl. Kapitel 3.2.2.1) und den in der Literatur dargelegten Ergebnissen für Valencensynthasen (Beekwilder et al., 2014; Troost et al., 2019). Obwohl also für das hier betrachtete Set an Terpensynthasen die Enzyme nicht der ausschlaggebende Faktor für die Produktausbeute sind, ist nicht ausgeschlossen, dass weitere Cycloartenolsynthasen andere Ergebnisse erbringen könnten.

Bei dem Vergleich ist jedoch zu beachten, dass zwei der hier exprimierten Cycloartenolsynthasen aus dem Bakterium *S. aurantiaca* stammen. Im Allgemeinen sind bakterielle OSC wesentlich weniger verbreitet und charakterisiert als pflanzliche Triterpensynthasen und demnach bislang in vergleichsweise wenigen Studien beschrieben und untersucht (Wei *et al.*, 2016). Ein Beispiel für eine detailliert erforschte bakterielle OSC stammt aus dem marinen Bakterium *Eudoraea adriatica*, welche über die CBC-Konformation die Triterpene Eudoraenol und Adriaticol generiert (Banta *et al.*, 2017). Das in der vorliegenden Arbeit im Fokus stehende Triterpen Cycloartenol wurde aus verschiedenen Bakterienspezies, wie beispielsweise diversen Stämmen der Myxobakterien, zu denen auch der Ursprungsorganismus der oben verwendeten bakteriellen Cycloartenolsynthasen *S. aurantiaca* gehört, isoliert (Bode *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2016). Eine Anwendung der *S. aurantiaca*-

Cycloartenolsynthasen zur heterologen Expression wurde hier erstmals gezeigt und somit die Annotationen der entsprechenden Gensequenzen als OSC bestätigt. Die Produktlevel lassen dabei ohne eine eingehende biochemische Charakterisierung keine Rückschlüsse auf die jeweilige Aktivität der Enzyme zu. Die erhobenen vergleichenden Daten geben allerdings Aufschluss über die Produktivitäten der bakteriellen Cycloartenolsynthasen im Zuge der heterologen Expression in *R. capsulatus*, welche der Produktivität der aus *A. thaliana* kommenden CAS entsprechen.

Schlussendlich war bei der Evaluierung von drei Ansätzen (vgl. Kapitel 3.2.2, <u>Strategie 1-3</u>) zur Optimierung der Cycloartenolproduktion im Zyklisierungsmodul das Unterbinden des Verbrauchs von Isoprenoid-Vorstufenverbindungen durch die intrinsische Carotinoidbiosynthese (<u>Strategie 2</u>) am erfolgreichsten.

Zusammenfassung:

Optimierung der Squalen- und Cycloartenolproduktion in R. capsulatus

IN DER HIER NEU ETABLIERTEN *RHODOBACTER*-PLATTFORM ZUR HETEROLOGEN TRITERPENPRODUKTION KONNTEN DIE PRODUKTAUSBEUTEN GESTEIGERT UND ENZYMFUNKTIONEN CHARAKTERISIERT WERDEN:

Optimierung der Squalenproduktion (Kapitel 3.2.2.1)

Die Koexpression einer Squalensynthase aus dem Proteobakterium *M. capsulatus* (*Mc*SQS) und des Gens *ispA* unter anaeroben Bedingungen in *R. capsulatus* SB1003 ermöglichten die Optimierung der Squalentiter auf bis zu 90 mg L⁻¹.

Optimierung der Cycloartenolproduktion (Kapitel 3.2.2.2)

Der Einsatz von *R. capsulatus* SB1003- Δ *crtE* resultierte in einer Steigerung des Titers auf bis zu 1130 µg L⁻¹ Cycloartenol (At-CAS). Dies zeigt, dass die Senkung des intrinsischen Abflusses von Isoprenoid-Vorstufenverbindungen in R. capsulatus die vielversprechendste Metabolic-Engineering-Strategie im Rahmen der Optimierung der Titer der heterologen Produktion von Cycloartenol darstellt. Des Weiteren wurden erstmals myxobakterielle CAS aus S. aurantiaca vergleichend in R. capsulatus exprimiert, wobei die Titer mit den durch die Expression der pflanzlichen At-CAS erreichten Ausbeuten vergleichbar waren. Außerdem wurde in den sensiblen LC-MS-Analysen entgegen der üblich bekannten Produktspezifität von Cycloartenolsynthasen ein zusätzliches, vermutlich oxygeniertes Cycloartenol-Derivat detektiert, welches vor allem im Fall der SaSg-CAS deutlich messbare Signale zeigte.

PUBLIKATION(EN):

Die Ergebnisse des Kapitels 3.2.2.1 sind in der Publikation "Production of C20, C30 and C40 terpenes in the engineered phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus."* Jennifer Hage-Hülsmann*, Oliver Klaus*, Karl Linke, Katrin Troost, Lukas Gora, Fabienne Hilgers, Astrid Wirtz, Beatrix Santiago-Schübel, Anita Loeschcke, Karl-Erich Jaeger, Thomas Drepper (2021). Journal of Biotechnology 338, 20-30. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.07.002 [**equally contributed*] veröffentlicht.

Die Ergebnisse des Kapitels 3.2.2.2 sind in der Publikation "Biosynthesis of cycloartenol by expression of plant and bacterial oxidosqualene cyclases in engineered *Rhodobacter capsulatus.*" **Jennifer Hage-Hülsmann**, Sabine Metzger, Vera Wewer, Felix Buechel, Katrin Troost, Stephan Thies, Anita Loeschcke, Karl-Erich Jaeger, Thomas Drepper (2019). Journal of Biotechnology: X 4, 100014. https://doi.org/10.1016/j.btecx.2020.100014 veröffentlicht.

Kapitel III

Abschließende Diskussion

und

Ausblick

3.3 Kapitel III

Zur Erschließung neuer kombinatorisch wirksamer antibakterieller Sekundärmetabolite wurden in dieser Arbeit zwei Forschungsansätze verfolgt. In dem ersten Ansatz wurde die Tauglichkeit der Ableitung unbekannter Stoffkombinationen von der natürlichen Sekundärmetabolit-Kombination des Bodenbakteriums *S. marcescens* bestehend aus Prodigiosin und Serrawettin W1 untersucht. Im Zuge der zweiten Strategie wurde überprüft, ob der phototrophe bakterielle Expressionswirt *R. capsulatus* als neue Plattform zur Gewinnung von (zyklischen) Triterpenen, von denen einige teils ebenfalls kombinatorische antibakterielle Effekte aufweisen können, etabliert werden kann. Damit sollte eine leichtere Zugänglichkeit zu diesen bioaktiven pflanzlichen Naturstoffen gesichert werden.

In der folgenden abschließenden Diskussion soll die erste Fragestellung der Arbeit, ob das Beispiel *S. marcescens* belegt, dass die Natur eine Inspirationsquelle kombinatorisch antibakteriell aktiver Stoffkombinationen ist, behandelt werden. Die zweite Frage nach der Machbarkeit und Etablierung der heterologen Biosynthese von zyklischen Triterpenen in der für diese Verbindungen neuen Expressionsplattform *R. capsulatus* wurde zusammen mit den obigen Daten bereits beantwortet und ausführlich diskutiert. Daher wird an dieser Stelle der allgemeine Wert der Ergebnisse des zweiten Kapitels für die Mikrobiologie und Biotechnologie zusammenfassend dargelegt.

3.3.1 Belegt das Beispiel *S. marcescens*, dass Mikroorganismen komplexer Ökosysteme, hier des Bodenhabitats, eine Inspirationsquelle für kombinatorisch antibakteriell aktive Stoffkombinationen sind?

Für die natürliche Stoffkombination des Tripyrrols Prodigiosin und des Biotensids Serrawettin W1 aus dem Bodenbakterium *S. marcescens* wurde ein gemeinsam verstärkter antibakterieller Effekt festgestellt. Hiervon inspiriert konnten erfolgreich weitere kombinatorisch antibakteriell wirksame Stoffkombinationen abgeleitet werden. Dabei war insbesondere eine verstärkte Wirkung von Prodigiosin in Kombination mit der tensidischen Verbindung *N*-Myristoyltyrosin bemerkenswert. Darüber hinaus resultierten parallele Einsätze des Biotensids mit diversen weiteren antibakteriellen Verbindungen in differentiellen Modulationen von deren antibiotischen Wirkungen.

Zu Beginn der Entdeckung von Antibiotika dienten hauptsächlich Mikroorganismen des Bodens als Quelle neuer bioaktiver Stoffe. Eine der bekanntesten Gattungen der Bakterien, aus der eine Vielzahl antibiotischer Verbindungen stammen, welche teils in medizinischen Therapien eingesetzt werden, sind die Streptomyceten (de Lima Procópio *et al.*, 2012; Watve *et al.*, 2001). Die entsprechenden, erfolgreichen Streptomyceten-Forschungsarbeiten wurden bereits zweimal mit dem Nobelpreis geehrt. Der erste Nobelpreis ging im Jahre 1952 an Selman A. Waksman für die Entdeckung von dem aus *Streptomyces griseus* stammenden Naturstoff Streptomycin, dem ersten wirksamen Antibiotikum gegen Tuberkulose (Woodruff, 2014). Im Jahr 2015 wurde der Nobelpreis ein weiteres Mal für die Entdeckung des aus *Streptomyces avermectinius* stammenden antiparasitären Naturstoffs Avermectin und dessen Derivate wie Ivermectin verliehen (Owens, 2015). Erst kürzlich wurde der damalige und heutige Wert von *Streptomyces* mit der Ernennung zur "Mikrobe des Jahres 2016" durch die Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM) betont (VAAM, 2016).

Insgesamt ist sicher, dass die Natur ein riesiges Potenzial zur Entdeckung neuer Substanzen mit pharmazeutisch relevanten Eigenschaften besitzt. Neben der Erschließung einzelner Verbindungen könnte die Natur ebenfalls ein Vorbild zur Entdeckung funktional miteinander verknüpfter bioaktiver Naturstoffe sein. Um dies zu überprüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Beispiel *S. marcescens* herausgegriffen. Anhand dessen wurde evaluiert, inwiefern die natürliche Sekundärmetabolit-Kombination bestehend aus Prodigiosin und Serrawettin W1 dieses Bodenbakteriums und damit indirekt das Bodenhabitat bzw. die Natur an sich als Inspirationsquelle für kombinatorisch antibakteriell aktive Stoffkombinationen dienen kann.

Das Bodenhabitat ist einer der komplexesten Lebensräume der Erde mit einer enormen Diversität an Mikroorganismen (Schloss & Handelsman, 2006). Im Boden lebende Bakterien, wie der hier als Ausgangspunkt verwendete Mikroorganismus *S. marcescens*, können eine Vielzahl von biologisch aktiven Naturstoffen zugleich herstellen. Diesbezüglich sind für diverse Bakterien, wie etwa Vertreter

des Genus *Streptomyces*, bereits die genetischen Voraussetzungen für die Produktion verschiedener bioaktiver Substanzen bekannt (Challis & Hopwood, 2003). Ebenso sind die Pseudomonaden, zu denen das für viele nosokomiale Infektionen verantwortliche, opportunistische Humanpathogen *P. aeruginosa* gehört, im Boden vorhanden (Green *et al.*, 1974; Jenny & Kingsbury, 2018; Klockgether & Tümmler, 2017). Das Bakterium *P. aeruginosa* ist beispielshalber ein natürlicher Produzent von Rhamnolipiden, die als Vertreter der Biotenside in der vorliegenden Arbeit hinzugezogen wurden (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Die bakterielle Gattung *Bacillus*, zu der die Spezies *B. subtilis* zählt, ist ein weiteres Beispiel für einen Bodenbewohner, der verschiedene bioaktive Sekundärmetabolite, wie etwa zyklische Lipopeptide (z. B. Surfactin), lineare Lipopeptide oder Makrolide, generiert (Kaspar *et al.*, 2019; Sansinenea & Ortiz, 2011).

Die biologische Funktion einer parallelen Produktion verschiedener bioaktiver Sekundärmetabolite kann im Allgemeinen in einer Steigerung der Effektivität der Bioaktivitäten der einzelnen Verbindungen liegen, wie Forschungsergebnisse einzelner Studien untermauern (Cain et al., 2003; Majik et al., 2014). Damit könnten in Kombination wirksamere Verbindungen den mikrobiellen Produzenten innerhalb ihres Lebensraums einen Selektionsvorteil verschaffen. Die Konkurrenten müssten dabei nicht gänzlich abgetötet werden. Das Hemmen des Wachstums anderer Mikroben bzw. ein Verzögern deren Wachstums würden den Produzenten des bioaktiven Naturstoff-Cocktails bereits einen Vorteil etwa bei der Besiedlung eines Habitats bieten. Diese Annahme einer von der Natur "beabsichtigten" effektiveren Wirkung von zwei koproduzierten Verbindungen wird von der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Verstärkung des antibakteriellen Effekts von Prodigiosin und Serrawettin W1 gegen C. glutamicum unterstützt. Des Weiteren ist die simultane Biosynthese von Prodigiosin und einem Biotensid nicht nur von dem hier untersuchten Stamm S. marcescens bekannt. Eine andere Studie beschreibt die Koexistenz von Prodigiosin und einem Biotensid in Serratia sp. ATCC 39006 (Williamson et al., 2008). In Serratia surfactantfaciens YD25^T wurde ebenso die parallele Biosynthese von Prodigiosin und dem Biotensid Serrawettin W2, einem strukturell anderen und vergleichsweise zu Serrawettin W1 etwas komplexeren zyklischen Lipopeptid, beschrieben (Su et al., 2016). Die Tatsache, dass das hydrophobe Pigment Prodigiosin in mehreren Mikroorganismen parallel mit einem Biotensid vorliegt und die zumindest für S. marcescens ausführlich beschriebene physiologische Koregulation (vgl. Kapitel 1.5), deutet auf ein generelles, allgemeingültiges Schema in der Natur hin. Diese Annahme wird zugleich von allen hier untersuchten Kombinationen aus Prodigiosin und strukturell diversen synthetischen und biologischen Tensiden bekräftigt.

Neben der parallelen Synthese von bioaktiven Sekundärmetaboliten in einem Organismus ist des Weiteren vorstellbar, dass in dichtbesiedelten Habitaten, wie eben dem Boden, kombinatorische Bioaktivitäten von Verbindungen aus unterschiedlichen Spezies, zu finden sind. Dementsprechend kann außerdem vermutet werden, dass Organismen des Bodenhabitats von Naturstoffen aus anderen Mikroben profitieren bzw. Sekundärmetabolit-basierte Interaktionen zwischen diesen stattfinden. So ist die Biosynthese des Pigments Prodigiosin in *S. marcescens* etwa durch die Anwesenheit der tensidischen Verbindung SDS beeinflussbar und steigt proportional mit der vorhandenen Menge des Tensids (Feng *et al.*, 1982). Um zu überprüfen, ob dieses Phänomen auf weitere in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Tenside übertragbar ist, wurden die synthetischen Tenside Triton X-100, Tween 20 sowie die Biotenside *N*-Myristoyltyrosin und die Rhamnolipide von Dr. Stephan Thies (IMET, HHUD) in einem Agardiffusionstest eingesetzt. Dazu wurde der natürliche Prodigiosinproduzent *S. marcescens* auf Festmedium ausgestrichen und Celluloseblättchen mit 50 µg der jeweiligen tensidischen Verbindungen beladen. Für die Tenside SDS, Triton X-100, die Rhamnolipide und *N*-Myristoyltyrosin konnte ein positiv verstärkender Effekt auf die intrinsische Biosynthese von Prodigiosin in *S. marcescens* nachgewiesen werden (Abbildung 45).



Abbildung 45: Gesteigerte Prodigiosinproduktion in S. marcescens in Anwesenheit von tensidischen Verbindungen.

Es wurde ein Agardiffusionstest mit *S. marcescens* durchgeführt. Die Celluloseblättchen wurden mit 50 µg der jeweiligen tensidischen Verbindung beladen und auf den nicht-bebrüteten, bakteriellen Ausstrich aufgelegt (A und B). Als Kontrolle wurde nur das verwendete Lösemittel aufgetragen (C). Nach einer anschließenden Inkubation bei 30 °C erfolgte die Fotodokumentation. Bei den gezeigten Bildern handelt es sich um repräsentative Ergebnisse von Dreifachbestimmungen. Um den Effekt der tensidischen Verbindungen auf die Prodigiosinproduktion in *S. marcescens* optisch hervorzuheben, wurde der Kontrast aller hier gezeigten Bilder angepasst. Das Experiment wurde von Dr. Stephan Thies aus dem IMET der HHUD durchgeführt und das Ergebnis freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Die molekulare Grundlage dieser Wirkung ist nicht bekannt. Allerdings wurde in einer Optimierungsstudie zur Separation und Reinigung von Prodigiosin aus Zellkulturen Tween 80 zum Lösen von Prodigiosin aus der Zellhülle erfolgreich eingesetzt (Wang *et al.*, 2004). Wie die Autoren vermuten, sorgt das Tensid dabei für eine Art Extraktion von Prodigiosin aus der Membran von *S. marcescens* (Wang *et al.*, 2004), wodurch das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des Produkts verschoben wäre und Prodigiosin demnach gegebenenfalls nachproduziert werden würde. Dieser theoretische Mechanismus würde eine verstärkte Prodigiosinbiosynthese in Anwesenheit von tensidischen Verbindungen begründen. Denkbar ist auch ein regulatorischer Prozess auf molekularer Ebene, welcher die Prodigiosinproduktion in Antwort auf die Anwesenheit der Tenside fördert. Insgesamt scheint eine Abhängigkeit bzw. ein Einfluss von Tensiden auf die Produktion und antibakterielle Wirkung von Prodigiosin vorzuliegen. Daher kann die Hypothese aufgestellt werden, dass das Bodenbakterium von der Anwesenheit tensidischer Verbindungen im Boden profitieren könnte, indem es zu kombinierten antibakteriellen Effekten der Tenside und dem intrinsisch gebildeten Prodigiosin kommt.

Zusammengefasst belegt das Beispiel der antibiotischen Stoffkombination aus Prodigiosin und Serrawettin W1 des Bakteriums *S. marcescens* und der davon in dieser Arbeit abgeleiteten Kombinationen, dass das Bodenhabitat und damit die Natur eine Inspirationsquelle kombinatorisch antibakteriell aktiver Stoffkombinationen sind.

3.3.2 Welche Vorteile bietet der phototrophe Expressionswirt *R. capsulatus* zur Bereitstellung von Triterpenen durch die heterologe Biosynthese?

Die Installation der heterologen Biosynthese von zyklischen Triterpenen in *R. capsulatus* war erfolgreich, wie die Detektion der Produkte Lupeol und Cycloartenol belegte. Darüber hinaus konnten die Titer von Squalen und Cycloartenol unter Zuhilfenahme diverser Strategien optimiert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass das phototrophe Bakterium *R. capsulatus* zur Bereitstellung von Triterpenen durch die heterologe Biosynthese geeignet ist. Nachfolgend werden einige Vorzüge dieser Methode sowie eine vergleichende Einordnung des Expressionswirts zu anderen in der Literatur zur (Tri-)Terpenproduktion eingesetzten mikrobiellen Plattformen dargelegt.

Die Gewinnung pflanzlicher Verbindungen, wie zyklischer Triterpene, kann durch die Extraktion aus der Ursprungspflanze erfolgen, wobei diese Vorgehensweise diverse Nachteile mit sich bringen kann, wohingegen die alternative heterologe Produktion in Mikroorganismen vergleichsweise einige Vorteile besitzt (Cravens *et al.*, 2019; Kallscheuer *et al.*, 2019; Marienhagen & Bott, 2013; Moser & Pichler, 2019; Schempp *et al.*, 2018; Wong *et al.*, 2017): Zu den Nachteilen der Extraktion pflanzlicher Sekundärmetabolite in industriell relevanten Mengen zählen etwa die notwendige Verwendung von

Ackerland zur Anzucht der Pflanzen, sodass der ebenfalls für die landwirtschaftliche Nutzung zur Erzeugung von Nahrungsmitteln benötigte Boden nicht zur Verfügung steht. Damit einhergehend steigt der Verbrauch von Trinkwasser und es muss Zeit für die Kultivierung und Pflege der Pflanzen investiert werden. Folglich stehen die genannten Ressourcen im Wettbewerb zum Ernteertrag essentieller Lebensmittel, der wiederum ohnehin aufgrund von extremen Wettereinflüssen oder Schädlingsbefall herabgesetzt wird. Neben diesen Aspekten ist außerdem die zusätzliche Gewinnung pflanzlicher Intermediate der Biosynthesewege ausgewählter Naturstoffe oftmals nicht möglich. Damit wird die Vielfältigkeit der Entdeckung bioaktiver Substanzen sowie die mögliche Herstellung davon abgeleiteter Derivate zudem gemindert. Im Umkehrschluss liegen die Vorteile der heterologen mikrobiellen Produktion etwa in der Möglichkeit einer Optimierung und damit Erhöhung bzw. Skalierbarkeit der Ausbeuten der zu gewinnenden Verbindungen durch beispielsweise den Einsatz von Metabolic-Engineering-Strategien. Dies ist besonders für Sekundärmetabolite interessant, die natürlicherweise nur in geringen Mengen in ihrem Ursprungsorganismus vorkommen. Zum anderen werden die eben erwähnten zeitaufwändigen Kultivierungen großer Pflanzenmassen und die intensive Landnutzung vermieden. Ferner müssen keine vergleichsweise aufwändigen Isolierungen der Naturstoffe von anderen mitextrahierten pflanzlichen Verbindungen durchgeführt werden. Zusätzlich erlaubt diese Methode relativ leicht genetische Modifikationen und damit Generierungen artifizieller Biosynthesewege und Produkte mittels z. B. der Verwendung kombinierter Gene aus unterschiedlichen Organismen. Die Möglichkeit der Abwandlung der Biosynthesewege kann ebenso zur Gewinnung von Intermediaten dienen. Grundsätzlich kann somit durch das Prinzip der heterologen Produktion eine Vielfalt an strukturell diversen Naturstoffen zugänglicher gemacht werden.

Die in dieser Arbeit betrachtete Stoffklasse der Terpene ist im Allgemeinen von großem kommerziellen Interesse, weshalb ihre Produktion intensiv untersucht ist. Zahlreiche Studien konnten vielversprechende Ergebnisse bezüglich der heterologen Biosynthese diverser Terpenklassen in eukaryotischen Systemen erzielen (Moser & Pichler, 2019). Diese zeigten unter anderem, dass die Expression von Terpenbiosynthesegenen in verschiedenen Mikroorganismen zu unterschiedlichen Resultaten führen, und demzufolge ein breites Spektrum von Expressionswirten den Zugang zu einer Vielzahl an wertvollen Produkten sicherstellen kann (Moser & Pichler, 2019). Während prokaryotische Systeme ebenfalls generell zur Terpenproduktion gut etabliert sind, wurde der Untergruppe der phototrophen Systeme hingegen bislang weniger Beachtung geschenkt (Moser & Pichler, 2019). Dabei scheinen insbesondere gut handhabbare phototrophe Proteobakterien und Cyanobakterien sehr geeignet für eine nachhaltige und umweltfreundliche Terpensynthese zu sein, da sie in der Lage sind über den Prozess der Photosynthese durch den Gebrauch der Strahlungsenergie des Sonnenlichts chemische Energie zu generieren, welche wiederum zum Aufbau von organischem Material, wie bioaktiven Metaboliten, verwendet werden kann (Tang *et al.*, 2011). Dass die mikrobielle Herstellung von Terpenen in phototrophen Organismen außerdem für die Industrie ein erfolgversprechender Ansatz ist, zeigt die gelungene Vermarktung des Expressionswirts *R. sphaeroides* zur industriellen Produktion der Sesquiterpene Valencen und Nootkaton der Firma Isobionics (inzwischen BASF).

Die in dieser Arbeit durchgeführte Evaluierung und erfolgreiche Etablierung der Triterpenproduktion in dem verwandten Bakterium R. capsulatus hilft demnach dabei, die Bandbreite an phototrophen Mikroorganismen für die Gewinnung dieser Naturstoffe zu erweitern. Angegliedert an die oben gezeigten Experimente wurde die Triterpenbiosynthese von Kooperationspartnern des Cluster of Excellence on Plant Sciences (CEPLAS) aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ilka Maria Axmann der HHUD ebenfalls in das Cyanobakterium Synechocystis sp. PCC 6803 implementiert (Loeschcke et al., 2017). Im Zuge dessen wurden die in *R. capsulatus* zuvor eingesetzten Enzyme SQE1, LUP1 und CAS1 aus A. thaliana in Synechocystis zur Expression gebracht. Eine Squalensynthase wurde nicht benötigt, da die Versuche mit einer Synechocystis-Mutante durchgeführt wurden, welche Squalen aus dem intrinsischen Stoffwechsel bereitstellt. Die Triterpenproduktion beider Arten wurde auf den Ebenen Cycloartenol/Lupeol verglichen. Squalen, 2,3-Oxidosqualen und Unter den dortigen Anzuchtsbedingungen konnte mittels der Synechocystis-Mutante ohne zusätzliche Modifikationen Squalen mit 5,08 \pm 0,59 mg L⁻¹ gewonnen werden. Im Vergleich zu dem mit *R. capsulatus* erlangten Titer von rund 8,24 mg L⁻¹ bei der nicht-optimierten Produktion war dieser geringer (vgl. Kapitel 3.2.1.2). Die Ausbeuten unter der Optimierung der Squalenproduktion in R. capsulatus überstiegen den in Synechocystis erreichten Wert demzufolge um ein Vielfaches (vgl. Kapitel 3.2.2.1). Um das Vorstufenmodul in Synechocystis zu vervollständigen, wurde das Gen SQE1 exprimiert, wodurch $1,13 \pm 0,55$ mg L⁻¹ 2,3-Oxidosqualen produziert werden konnten. Die Installation des Zyklisierungsmoduls in dem Cyanobakterium erfolgte über die zusätzliche Expression von LUP1 bzw. CAS1 und erbrachte 1,10 \pm 0,05 mg L⁻¹ Cycloartenol und 0,29 mg gDCW⁻¹ Lupeol. Im Vergleich zu den Ausbeuten von 2,3-Oxidosqualen (0,28 mg L⁻¹), Cycloartenol (0,34 mg L⁻¹) und Lupeol (nicht quantifizierbare, geringe Mengen) bei der heterologen, nicht-optimierten Biosynthese in R. capsulatus konnten damit in Synechocystis höhere Mengen erzielt werden. Wird ein Vergleich zu den bei der Optimierung der Cycloartenolproduktion in R. capsulatus erhaltenen Titern (vgl. Kapitel 3.2.2.2) gezogen, so lagen die jeweils maximalen Cycloartenoltiter in den beiden Expressionswirten in der gleichen Größenordnung (Synechocystis: 1,10 mg L⁻¹, R. capsulatus: 1,13 mg L⁻¹). Der in *R. capsulatus* bei der Umsetzung von Squalen zu 2,3-Oxidosqualen beobachtete scheinbare Verlust der Verbindung 2,3-Oxidosqualen (vgl. Kapitel 3.2.1.2, Tabelle 17) war auch in Synechocystis erkennbar. Dabei war dieser jedoch wesentlich geringer, wie das Verhältnis der Titer von Squalen zu 2,3-Oxidosqualen verdeutlichte. Ein derartiger Verlust wurde bereits in einer anderen

Studie beschrieben. So wurde im Zusammenhang mit der Expression der Genkombination *IDI-SQS-SQE* in *E. coli* ein ähnlicher Effekt beobachtet (Takemura *et al.*, 2017). Dort wurde Squalen detektiert, wohingegen 2,3-Oxidosqualen nicht nachgewiesen werden konnte. Die Autoren vermuteten, dass das Produkt instabil war bzw. aufgrund der Epoxy-Gruppe leicht abgebaut oder in eine andere Verbindung umgesetzt werden konnte. Dass 2,3-Oxidosqualen sehr wahrscheinlich produziert wurde, ging aus einer weiteren dort durchgeführten Koexpression der Kombination *IDI-SQS-SQE* mit einer Plasmid-basierten OSC hervor, welche zu der Bildung eines Triterpens führte. Aufgrund der Tatsache der erfolgreichen Triterpenproduktion musste die Verbindung 2,3-Oxidosqualen wenigstens zeitweise vorhanden sein. Die gemessenen Squalenmengen deuten folglich darauf hin, dass auch in diesen Experimenten anscheinend nicht die gesamte Menge des generierten Squalens umgesetzt wurde. Trotz der Tatsache des Verlusts der Verbindung 2,3-Oxidosqualen konnte in der vorliegenden Arbeit zusammenfassend die Biosynthese zyklischer Triterpene in den zwei phototrophen Mikroorganismen *R. capsulatus* und *Synechocystis* etabliert und das Spektrum geeigneter Expressionswirte damit erweitert werden.

Nachdem die Analyse von Triterpenbiosynthesewegen bzw. Charakterisierungen von OSC mittels heterologer Expression im Allgemeinen lange Zeit hauptsächlich in Hefesystemen durchgeführt wurde (Bröker et al., 2018; Fukushima et al., 2014; Han et al., 2019), fokussierten sich inzwischen erste Arbeiten auf die Ausweitung der Expressionssysteme für Triterpene auf bakterielle Wirte. Eine Studie beschrieb beispielsweise die Expression einer pflanzlichen OSC in E. coli zur Herstellung des Triterpens Dammarenediol-II (Li et al., 2016). Dabei war zur Biosynthese von 2,3-Oxidosqualen neben der Expression einer Squalensynthase und einer Squalenepoxidase die zusätzliche Koexpression einer NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (CPR) erforderlich, um über dieses Enzym den nötigen Elektronentransfer zur Squalenepoxidase bereitzustellen. Im Gegensatz zu dieser Studie war im Fall von R. capsulatus und Synechocystis die Expression des pflanzlichen Gens SQE einschließlich der Bildung des funktionalen Enzyms ohne die zusätzliche Expression einer Reduktase möglich. Dementsprechend stellen die beiden Expressionswirte wahrscheinlich eine native Reduktase bereit, welche die Aktivität der SQE effektiv unterstützt. Dabei wurde nur die aus A. thaliana stammende SQE evaluiert. Um zu überprüfen, ob SQE generell ohne eine zusätzliche Reduktase in R. capsulatus aktiv sind, wäre im Zusammenhang mit weiterführenden Studien eine vergleichende Expression verschiedener Squalenepoxidasen interessant. Dafür könnten etwa solche SQE, die in der Literatur bereits als in Bakterien aktiv beschrieben sind, hinzugezogen werden. In der oben genannten Studie zur Produktion von Dammarenediol-II stammt die SQE beispielsweise aus M. capsulatus. Sie wurde zusammen mit jeweils trunkierten Versionen (N-terminalen Transmembran-Domänen) einer CPR aus A. thaliana bzw. S. cerevisiae zur funktionalen Expression in E. coli gebracht (Li et al., 2016). In derselben Studie resultierte die jeweilige Expression zwei N-terminal trunkierter Varianten einer SQE aus *S. cerevisiae* in Kombination mit jeweils einer der genannten CPR in *E. coli* hingegen nicht in der Bildung von 2,3-Oxidosqualen. Eine weitere Squalenepoxidase, die zusammen mit der Cytochrom-P450-Reduktase *Aa*CPR aus der Pflanze *Artemisia annua* als Reduktasepartner in *E. coli* exprimiert wurde, stammt aus der Wanderratte (*Rattus norvegicus*) (Qiao *et al.*, 2019). Banta und Kollegen verwendeten eine SQE aus dem Sterol-produzierenden Bakterium *Methylomicrobium alcaliphilum* in Kombination mit einer bakteriellen OSC und produzierten damit die Triterpene Eudoraenol und Adriaticol in *E. coli* (Banta *et al.*, 2017). Dort wurde anders als für die beiden vorher genannten Studien beschrieben keine zusätzliche Reduktase koexprimiert. Diese Beispiele zeigen, dass es eine Reihe verschiedener SQE als potenzielle Kandidaten zur vergleichenden Evaluierung einer funktionalen Expression gibt. Ferner könnte ein komparativer Einsatz von SQE entsprechend der in der vorliegenden Arbeit verwendeten <u>Strategie 3</u> (vgl. Kapitel 3.2.2) eine Optimierung der Synthese von 2,3-Oxidosqualen in *R. capsulatus* ermöglichen. Falls die Anwendung verschiedener SQE in unterschiedlichen Ausbeuten resultieren würde, könnten weitere Kombinationen mit etwa den besten Bedingungen zur Cycloartenolproduktion erfolgen. Diese würden gegebenenfalls eine weitere Erhöhung der Triterpentiter ermöglichen.

Aktuell liegen die hier für R. capsulatus beschriebenen optimierten Titer für Squalen (max. Titer 90,90 mg L⁻¹) und Cycloartenol (max. Titer 1,13 mg L⁻¹) unter den in der Literatur zu findenden Werten für heterolog in Bakterien produzierte Triterpene: In E. coli konnten 8,63 mg L⁻¹ Dammarenediol-II hergestellt werden (Li et al., 2016). In einem weiteren E. coli-basierten System zur Gewinnung des linearen Triterpens Squalen konnten Titer von bis zu 230 mg L⁻¹ erreicht werden (Katabami et al., 2015). Mittels des Bakteriums C. glutamicum wurden rund 105 mg L⁻¹ Squalen produziert (Park et al., 2019). Der Triterpen-Alkohol Ambrein wurde ebenso durch die heterologe Biosynthese in *E. coli* mit einer Ausbeute von ungefähr 2,6 mg L⁻¹ gewonnen (Ke *et al.*, 2018). Des Weiteren stellten Takemura und Kollegen Cycloartenol und β-Amyrin in *E. coli* her, wobei keine Titer in mg L⁻¹ bestimmt wurden (Takemura *et al.*, 2017). Obwohl die in der vorliegenden Arbeit in R. capsulatus speziell für Triterpene erhaltenen Titer im Vergleich zu anderen bakteriellen Expressionssystemen geringer sind, kann das phototrophe Bakterium R. capsulatus bereits sehr gut zur Produktion von Terpenen eingesetzt werden. So werden insbesondere für andere Terpenklassen, außer zyklischer Triterpene, attraktive Titer im zweistelligen mg-Bereich erzielt. Die Sesquiterpene Patchoulol und Valencen konnten in *R. capsulatus* mit Titern von rund 24 bzw. 18 mg L⁻¹ heterolog produziert werden (Troost et al., 2019). Khan und Kollegen stellten das lineare Triterpen Botryococcen mit ungefähr 110 mg L⁻¹ in *R. capsulatus* her (Khan *et al.*, 2015).

Obwohl im Fall der zyklischen Triterpene die aktuellen Titer nicht geeignet sind, um eine Produktion und Aufarbeitung einer einzelnen Verbindung ökonomisch sinnvoll zu gestalten, kann es dennoch andere wertvolle theoretische Einsatzmöglichkeiten und Anwendungsbereiche der hier generierten Plattform zur heterologen Triterpenproduktion geben. Zum einen kann der Expressionswirt R. capsulatus nützlich zur Charakterisierung von Enzymen sein, wie die in dieser Arbeit gefundenen unerwarteten CAS-Aktivitäten belegen. Nach derzeitigem Wissensstand sind für diesen Mikroorganismus im Gegensatz zu Hefen keine Cytochrom-P450-Enzyme beschrieben, obwohl dies nicht ausgeschlossen werden kann, da entsprechende Enzyme in R. sphaeroides bekannt sind [URL: https://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html, (Nelson, 2009)]. Nichtsdestotrotz scheint eben die Charakterisierung von Enzymen in R. capsulatus gut möglich, worauf die hier vergleichend durchgeführte Installation funktional nahezu gleicher OSC in dem Bakterium hindeutet, da die heterologen Produkte anscheinend nicht von wirtseigenen Enzymen aus R. capsulatus weiter umgesetzt werden. In Hefen hingegen können beobachtete Produkte und damit Aktivitäten definitiv nicht immer eindeutig auf das jeweils untersuchte Enzym zurückgeführt werden (Castillo et al., 2013). Zum anderen ist die Gewinnung von kleinen Mengen neuer Verbindungen etwa in Form von Rohextrakten zur ersten Einschätzung ihrer Bioaktivität aufgrund der Möglichkeit einer leichten und schnellen Extraktion der produzierten Substanzen aus dem Bakterium vorstellbar. Diesbezüglich bringt *R. capsulatus* den Vorteil mit sich, dass das Bakterium keine systemische Toxizität in der Maus bewirkt (Peters et al., 2019). Damit ist das Testen von Rohextrakten aus Kulturen bzw. Zellen von R. capsulatus grundsätzlich möglich. Zugleich ist der Weg für eine heterologe Biosynthese weiterer Triterpene mit medizinisch relevanten pharmakodynamischen Eigenschaften geebnet. Schließlich wäre der Einsatz von R. capsulatus als Pflanzendünger denkbar, da R. capsulatus zudem ein Stickstofffixierer ist und somit als sogenanntes Plant Growth Promoting Bacterium dienen könnte (Gamal-Eldin & Elbanna, 2011). In geschlossenen hydroponischen Anlagen ist die Anwendung von Stämmen, welche zusätzlich ausgewählte Terpene mit Bioaktivitäten zur Wachstumsförderung von Pflanzen heterolog produzieren, damit vorstellbar.

Zusammenfassung

Durch antibiotikaresistente Bakterien verursachte Infektionen sind heutzutage ein stetig wachsendes lebensbedrohliches Problem des globalen Gesundheitssystems, für welches dringend Lösungen gefunden werden müssen. Kombinatorische Applikationen zweier Verbindungen zur Steigerung der Effektivität von Behandlungen stellen eine Lösungsstrategie dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde über einen mikrobiologisch-biotechnologischen Ansatz diesbezüglich ein Beitrag geleistet. Dazu wurde als Erstes geprüft, ob die Natur als Inspirationsquelle für kombinatorische antibakterielle Stoffkombinationen dienen kann. Als Zweites wurde untersucht, ob das phototrophe Bakterium *Rhodobacter capsulatus* als Expressionswirt etabliert werden kann, um Zugang zu bioaktiven Triterpenen durch heterologe Synthese zu erlangen.

Im Rahmen der Forschungsarbeiten zur ersten Fragestellung diente das Bodenbakterium Serratia marcescens als Ausgangspunkt, da dieses das hydrophobe antibakterielle Tripyrrol Prodigiosin und das Biotensid Serrawettin W1 bildet und native Prozesse zur Koproduktion sowie gemeinsam verstärkten Bioaktivität bereits postuliert wurden. Anhand von Corynebacterium glutamicum sowie einigen bakteriellen Modellstämmen als Vertreter der ESKAPE-Gruppe wurden in der vorliegenden Arbeit hiervon ausgehend antibakterielle Effekte dieser und ähnlicher Substanzen bzw. Substanzkombinationen untersucht. Es konnte eine konzentrationsabhängige, kombinatorisch verstärkte, antibiotische Aktivität von Prodigiosin und Serrawettin W1 nachgewiesen werden. Somit wurden weitere Stoffzusammensetzungen davon abgeleitet. Es zeigte sich, dass Prodigiosin (Bio)Tensiden (Triton X-100, zusammen mit diversen SDS, Tween 20, Rhamnolipide, Mannosylerythritollipide, N-Myristoyltyrosin) verstärkte antibakterielle Wirkungen besitzt. Die gleichzeitige Applikation mit N-Myristoyltyrosin verringerte die zur Inhibition des bakteriellen Wachstums benötigte Menge an Prodigiosin um drei Größenordnungen. Des Weiteren zeigten Analysen des antibakteriellen Effekts gegen C. glutamicum auf Einzelzellebene bei subletalen Konzentrationen beider Verbindungen heterogene Zellreaktionen, aber keine Resistenzentwicklungen, was insgesamt mit der Störung der Membranintegrität als einem der angenommenen Hauptmechanismen der antibiotischen Wirkung dieser Naturstoffe einhergehen kann. Während der Einsatz diverser Prodigiosin-Derivate keine verbesserte separate sowie mit N-Myristoyltyrosin kombinierte antibakterielle Aktivität zeigte, stellte sich heraus, dass N-Myristoyltyrosin Wirkstärken von anderen antibakteriellen Verbindungen deutlich und sehr unterschiedlich modifizieren kann. Neben der vermutlichen Solubilisierung von spezifischen hydrophoben Verbindungen wie eben Prodigiosin unterstützt das Biotensid anscheinend den komplexen Eintritt von Aminoglykosid-Antibiotika in bakterielle Zellen, was in einer verstärkten gemeinsamen antibiotischen Wirkung sichtbar wurde. Außerdem wies N-Myristoyltyrosin in Kombination mit spezifischen antibakteriellen Verbindungen, nämlich den Triterpenen Ursol- und Oleanolsäure, antagonistische Effekte auf. Zusammengenommen wurde damit gezeigt, dass die Natur als Inspirationsquelle für kombinatorische antibakterielle Stoffkombinationen dienen kann.

Im Rahmen der Bearbeitung der zweiten Fragestellung diente das phototrophe Bakterium Rhodobacter capsulatus als Ausgangspunkt zur Erstellung einer neuen Plattform zur Bereitstellung von Verbindungen aus der relevanten Naturstoffgruppe der Terpene. Dazu wurde sowohl die Bildung der linearen Triterpenvorstufen Squalen und 2,3-Oxidosqualen als auch die Biosynthese des pflanzlichen Sterols Cycloartenol sowie des pentazyklischen Lupeols erfolgreich durch Expression von Genen aus Arabidopsis thaliana realisiert. Im Zuge dessen wurden weder das Wachstum noch die intrinsischen Carotinoidlevel des Wirts R. capsulatus von der heterologen Triterpenbiosynthese negativ beeinflusst. Die komparative Evaluierung verschiedener Squalen- und Cycloartenolsynthasen aus unterschiedlichen Herkunftsorganismen sowie die Anwendung diverser Metabolic-Engineering-Strategien am Isoprenoidbiosyntheseweg des Wirts, der die C15-Triterpenvorstufenverbindung Farnesylpyrophosphat (FPP) bereitstellt, erbrachten höchst Fall-spezifische Ergebnisse. Während die Squalenproduktion stark von der jeweiligen Synthase abhing, war dies für die Cycloartenolsynthese nicht ausschlaggebend. Dementsprechend wurde der maximale Squalentiter von 90,90 mg L⁻¹ mit einer Squalensynthase aus Methylococcus capsulatus und Koexpression der ispA-kodierten FPP-Synthase und der höchste Cycloartenoltiter von 1,13 mg L⁻¹ mit der aus A. thaliana stammenden Cycloartenolsynthase bei Deletion der wirtseigenen FPP-umsetzenden Geranylgeranylpyrophosphat-Synthase erreicht. Insgesamt wurde die Notwendigkeit individueller Justierungen zur Produktionsoptimierung der heterologen Terpenbiosynthese in R. capsulatus deutlich. Ferner konnte für die Lupeolsynthase aus A. thaliana und eine der beiden eingesetzten myxobakteriellen Cycloartenolsynthasen jeweils die Bildung eines zusätzlichen Triterpenprodukts in vertiefenden massenspektrometrischen Analysen detektiert werden. Diese deuteten darauf hin, dass es sich um oxygenierte Derivate der jeweiligen Verbindungen Lupeol und Cycloartenol handeln könnte. Zusammengenommen wurde das phototrophe Bakterium R. capsulatus als Expressionswirt zur heterologen Herstellung von Triterpenen und zur Charakterisierung dazu relevanter Enzyme etabliert.

Insgesamt konnten somit im Rahmen dieser Arbeit zwei mikrobiologisch-biotechnologische Ansätze zur Erschließung von kombinatorisch antibakteriell wirksamen Sekundärmetaboliten aufgezeigt werden.

186

Summary

Nowadays infections caused by antibiotic resistant bacteria are a continuously growing, global, lifethreatening health issue for which solutions need to be found. Combinatorial applications of two compounds for increasing the effectiveness of medical treatments are one solution strategy. Within the scope of the present thesis, a contribution was made by applying a microbiological and biotechnological approach. Therefore, it was investigated if nature can serve as a source of inspiration for combinatorial antibacterial combinations of compounds. Moreover, it was evaluated if the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* could be established as expression host for improving the access to bioactive triterpenes by means of heterologous biosynthesis.

In order to address the first research question, the soil bacterium Serratia marcescens was chosen to be the starting point of research, since it forms the hydrophobic antibacterial tripyrrole prodigiosin and the biosurfactant serrawettin W1 and native processes of co-production as well as increased combined bioactivities are postulated. Using Corynebacterium glutamicum and some bacterial model strains of the ESKAPE-group, antibacterial effects of those two compounds as well as of similar compounds and combinations thereof were evaluated here. Prodigiosin and Serrawettin W1 showed concentration dependent, combinatorially increased, antibiotic activities. Thus, further combinations were derived of that natural composition. It was found, that prodigiosin possesses increased antibacterial combinatorial effects together with diverse (bio-)surfactants (Triton X-100, SDS, Tween 20, rhamnolipids, mannosylerythritollipids, *N*-myristoyltyrosine). The simultaneous application with N-myristoyltyrosine reduced the required amount of prodigiosin for inhibition of bacterial growth by three orders of magnitude. Furthermore, single cell analysis showed that sublethal concentrations of both compounds in combination evoked heterogeneous cell reactions of C. glutamicum. At the same time, no development of resistance was detected, altogether in accordance with the main antibiotic mechanism of both natural compounds, namely membrane disturbance. While the application of diverse derivatives of prodigiosin did not result in improved separate or combined antibacterial activities with N-myristoyltyrosine, the latter was able to modify the strength of antibacterial effects of diverse compounds in different ways. Besides the presumed solubilisation of specific hydrophobic compounds like prodigiosin, the biosurfactant seems to support the complex entrance of aminoglycoside antibiotics into bacterial cells, which was detected as an increased antibiotic effect. In addition, N-myristoyltyrosine showed antagonistic effects when applied in combination with specific antibacterial compounds, namely the triterpenes ursolic and oleanolic acid. In conclusion, nature was proven to be a valuable source of inspiration for combinatorial active antibacterial compositions of bioactive compounds.

In order to address the second research question, the phototrophic bacterium *R. capsulatus* was chosen to be the starting point of research for the generation of a novel platform to provide

compounds of the relevant natural product group of terpenes. For this purpose, the formation of the linear triterpene precursor squalene and 2,3-oxidosqualene as well as the biosynthesis of the plant sterol cycloartenol and the pentacyclic lupeol were successfully implemented by heterologous expression of the respective genes of Arabidopsis thaliana. The heterologous expression had neither a negative effect on the growth nor the intrinsic carotenoid level of the host R. capsulatus. A comparative evaluation of diverse squalene and cycloartenol synthases derived from different organisms as well as the application of several metabolic engineering strategies on the host's isoprenoid biosynthesis pathway, which provides C_{15} triterpene precursor farnesylpyrophosphate (FPP), resulted in remarkably case-specific effects. While squalene production was strongly dependent on the respective synthase, this did not hold true for the production of cycloartenol. Accordingly, the maximal squalene titer of 90.90 mg L⁻¹ was reached by applying a squalene synthase from Methylococcus capsulatus and co-expression of the ispA encoded FPP-synthase and the maximum cycloartenol titer of 1.13 mg L^{-1} by applying the *A. thaliana* cycloartenol synthase in combination with an R. capsulatus strain possessing a deletion in its native FPP converting geranylgeranylpyrophosphate synthase. Altogether, the necessity of an individual calibration for the purpose of optimizing product levels of the heterologous terpene biosynthesis in R. capsulatus became apparent. Moreover, for the A. thaliana lupeol synthase as well as for one of the two applied myxobacterial cycloartenol synthases the formation of an additional triterpene product was detected in detailed mass spectrometry analyses. The measurements led to the assumption, that those additional products are oxygenated derivatives of the compounds lupeol and cycloartenol, respectively. In conclusion, the phototrophic bacterium *R. capsulatus* was established as an expression host for the heterologous production of triterpenes and for the characterisation of relevant enzymes for this purpose.

Collectively, two microbiological and biotechnological approaches for the exploitation of combinatorial antibacterial secondary metabolites were demonstrated within the scope of the present thesis.

Literaturverzeichnis

- Abdallah, I.I., Merkerk, R. van, Klumpenaar, E., Quax, W.J., 2018. Catalysis of amorpha-4,11-diene synthase unraveled and improved by mutability landscape guided engineering. Scientific Reports 8, 9961. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28177-4
- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E., 2010. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. Applied Microbiology and Biotechnology 86, 1323–1336. https://doi.org/10.1007/s00253-010-2498-2
- Abe, R., Caaveiro, J.M.M., Kudou, M., Tsumoto, K., 2010. Solubilization of membrane proteins with novel *N*-acylamino acid detergents. Molecular Biosystems 6, 677–679. https://doi.org/10.1039/b925791h
- Abu-Ghunmi, L., Badawi, M., Fayyad, M., 2014. Fate of triton X-100 applications on water and soil environments: A review. Journal of Surfactants and Detergents 17, 833–838. https://doi.org/10.1007/s11743-014-1584-3
- Aha, B.S., 1999. Biologisch abbaubare Tenside aus nachwachsenden Rohstoffen *N*-Acylaminosäuren -Synthesen und Tensideigenschaften. Dissertation, Bergische Universität Wuppertal.
- Ahmed, A., Azim, A., Gurjar, M., Baronia, A.K., 2014. Current concepts in combination antibiotic therapy for critically ill patients. Indian Journal of Critical Care Medicine 18, 310–314. https://doi.org/10.4103/0972-5229.132495
- Ahmed, E., Arshad, M., Khan, M.Z., Amjad, M.S., Sadaf, H.M., Riaz, I., Sabir, S., Ahmad, N., Sabaoon, 2017. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 6, 205–214.
- Ahmed, Z., Saeed Khan, S., Khan, M., 2013. In vitro trials of some antimicrobial combinations against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. Saudi Journal of Biological Sciences 20, 79–83. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.10.005
- Akbari, S., Abdurahman, N.H., Yunus, R.M., Fayaz, F., Alara, O.R., 2018. Biosurfactants a new frontier for social and environmental safety: A mini review. Biotechnology Research and Innovation 2, 81–90. https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001
- Alekshun, M.N., Levy, S.B., 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell 128, 1037–1050. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004
- Aleksic, I., Petkovic, M., Jovanovic, M., Milivojevic, D., Vasiljevic, B., Nikodinovic-Runic, J., Senerovic,
 L., 2017. Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide
 derivatives. Frontiers in Microbiology 8, 2454. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02454
- Allison, D.G., Lambert, P.A., 2014. Modes of Action of Antibacterial Agents, in: Molecular Medical Microbiology: Second Edition. Elsevier Ltd, pp. 583–598. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00032-9
- Alnemri, A.R., Almaghrabi, R.H., Alonazi, N., Alfrayh, A.R., 2016. Misuse of antibiotic: A systemic review of Saudi published studies. Current Pediatric Research 20, 169–173.
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. Nature reviews. Microbiology 12, 465–478. https://doi.org/10.1038/nrmicro3270
- Antão, E.-M., Vincze, S., Hanke, R., Klimmek, L., Suchecka, K., Lübke-Becker, A., Wieler, L.H., 2018. Antibiotic resistance, the 3As and the road ahead. Gut Pathogens 10, 52. https://doi.org/10.1186/s13099-018-0280-7
- Arias, C.A., Murray, B.E., 2009. Antibiotic-resistant bugs in the 21st century A clinical superchallenge. The New England Journal of Medicine 360, 439–443. https://doi.org/10.1056/NEJMp0804651
- Arivizhivendhan, K. V., Mahesh, M., Boopathy, R., Swarnalatha, S., Regina Mary, R., Sekaran, G., 2018. Antioxidant and antimicrobial activity of bioactive prodigiosin produces from *Serratia marcescens* using agricultural waste as a substrate. Journal of Food Science and Technology 55, 2661–2670. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3188-9
- Armstrong, G.A., 1997. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: A colorful tale. Annual

Review of Microbiology 51, 629–659. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.51.1.629

- Arnold, T., Linke, D., 2008. The use of detergents to purify membrane proteins. Current Protocols in Protein Science 53, 4.8.1-4.8.30. https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0408s53
- Arnold, T., Linke, D., 2007. Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins. BioTechniques 43, 427–440. https://doi.org/10.2144/000112566
- Arutchelvi, J.I., Bhaduri, S., Uppara, P.V., Doble, M., 2008. Mannosylerythritol lipids: A review. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35, 1559–1570. https://doi.org/10.1007/s10295-008-0460-4
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M.I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M.H., Nisar, M.A., Alvi, R.F., Aslam, M.A., Qamar, M.U., Salamat, M.K.F., Baloch, Z., 2018. Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. Infection and Drug Resistance 11, 1645–1658. https://doi.org/10.2147/IDR.S173867
- Asok Kumar, K., Mazumdar, K., Dutta, N.K., Karak, P., Dastidar, S.G., Ray, R., 2004. Evaluation of synergism between the aminoglycoside antibiotic streptomycin and the cardiovascular agent amlodipine. Biological and Pharmaceutical Bulletin 27, 1116–1120. https://doi.org/10.1248/bpb.27.1116
- AstraZeneca GmbH, 2019. IMFINZI[®] 50mg/ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung. Gebrauchsinformation: Information für Patienten September, 1–5.
- Awanchiri, S.S., Trinh-Van-Dufat, H., Shirri, J.C., Dongfack, M.D.J., Nguenang, G.M., Boutefnouchet, S., Fomum, Z.T., Seguin, E., Verite, P., Tillequin, F., Wandji, J., 2009. Triterpenoids with antimicrobial activity from *Drypetes inaequalis*. Phytochemistry 70, 419–423. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.12.017
- Babalola, I.T., Shode, F.O., 2013. Ubiquitous ursolic acid: A potential pentacyclic triterpene natural product. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2, 214–222.
- Badshah, S.L., Ullah, A., Ahmad, N., Almarhoon, Z.M., Mabkhot, Y., 2018. Increasing the strength and production of artemisinin and its derivatives. Molecules 23, 100. https://doi.org/10.3390/molecules23010100
- Banta, A.B., Wei, J.H., Gill, C.C.C., Giner, J.-L., Welander, P. V., 2017. Synthesis of arborane triterpenols by a bacterial oxidosqualene cyclase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 114, 245–250. https://doi.org/10.1073/pnas.1617231114
- Barber, M., Rozwadowska-Dowzenko, M., 1948. Infection by penicillin-resistant staphylococci. The Lancet 2, 641–644. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(48)92166-7
- Barlam, T.F., Gupta, K., 2015. Antibiotic resistance spreads internationally across borders. The Journal of Law, Medicine & Ethics 43, 12–16. https://doi.org/10.1111/jlme.12268
- Barriere, S.L., 2015. Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance. Expert Opinion on Pharmacotherapy 16, 151–153. https://doi.org/10.1517/14656566.2015.983077
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology 45, 493–496. https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493
- Baumgart, M., Schubert, K., Bramkamp, M., Frunzke, J., 2016. Impact of LytR-CpsA-Psr proteins on cell wall biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. Journal of Bacteriology 198, 3045–3059. https://doi.org/10.1128/JB.00406-16
- Beekwilder, J., van Houwelingen, A., Cankar, K., van Dijk, A.D.J., de Jong, R.M., Stoopen, G., Bouwmeester, H., Achkar, J., Sonke, T., Bosch, D., 2014. Valencene synthase from the heartwood of Nootka cypress (*Callitropsis nootkatensis*) for biotechnological production of valencene. Plant Biotechnology Journal 12, 174–182. https://doi.org/10.1111/pbi.12124
- Belete, T.M., 2019. Novel targets to develop new antibacterial agents and novel alternatives to antibacterial agents. Human Microbiome Journal 11, 100052. https://doi.org/10.1016/j.humic.2019.01.001
- Bennett, J.W., 2015. What is an Antibiotic?, in: Sánchez, S., Demain, A.L. (Eds.), Antibiotics: Current Innovations and Future Trends. Caister Academic Press, pp. 1–18.

https://doi.org/https://doi.org/10.21775/9781908230546

- Bentley, R., Bennett, J.W., 2003. What is an antibiotic? Revisited. Advances in Applied Microbiology 52, 303–331. https://doi.org/10.1016/S0065-2164(03)01012-8
- Bérdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites. The Journal of Antibiotics 58, 1–26. https://doi.org/10.1038/ja.2005.1
- Berenbaum, M.R., 1995. The chemistry of defense: Theory and practice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92, 2–8. https://doi.org/10.1073/pnas.92.1.2
- Bergmann, R., 2011. Optimierung eines Expressionssystems für die Synthese von Redox- und Membranproteinen in *Rhodobacter capsulatus*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Bernal, P., Molina-Santiago, C., Daddaoua, A., Llamas, M.A., 2013. Antibiotic adjuvants: Identification and clinical use. Microbial Biotechnology 6, 445–449. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12044
- Beuker, J., Barth, T., Steier, A., Wittgens, A., Rosenau, F., Henkel, M., Hausmann, R., 2016. High titer heterologous rhamnolipid production. AMB Express 6, 124. https://doi.org/10.1186/s13568-016-0298-5
- Bhadoriya, S.S., Madoriya, N., Shukla, K., MS, P., 2013. Biosurfactants: A new pharmaceutical additive for solubility enhancement and pharmaceutical development. Biochemistry & Pharmacology: Open Access 2, 113. https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000113
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J. V, 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature Reviews Microbiology 13, 42–51. https://doi.org/10.1038/nrmicro3380
- Bnyan, R., Khan, I., Ehtezazi, T., Saleem, I., Gordon, S., O'Neill, F., Roberts, M., 2018. Surfactant effects on lipid-based vesicles properties. Journal of Pharmaceutical Sciences 107, 1237–1246. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.01.005
- Bode, H.B., Zeggel, B., Silakowski, B., Wenzel, S.C., Reichenbach, H., Müller, R., 2003. Steroid biosynthesis in prokaryotes: Identification of myxobacterial steroids and cloning of the first bacterial 2,3(S)-oxidosqualene cyclase from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. Molecular Microbiology 47, 471–481. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03309.x
- Bogacz-Radomska, L., Harasym, J., 2018. β-Carotene Properties and production methods. Food Quality and Safety 2, 69–74. https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy004
- Bonapace, C.R., Bosso, J.A., Friedrich, L. V., White, R.L., 2002. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 44, 363–366. https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00473-X
- Boucher, Y., Doolittle, W.F., 2000. The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. Molecular Microbiology 37, 703–716. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02004.x
- Brady, S.F., Chao, C.J., Clardy, J., 2004. Long-chain *N*-acyltyrosine synthases from environmental DNA. Applied and Environmental Microbiology 70, 6865–6870. https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6865-6870.2004
- Brady, S.F., Clardy, J., 2000. Long-chain *N*-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental DNA. Journal of the American Chemical Society 122, 12903–12904. https://doi.org/10.1021/ja002990u
- Brahmachari, G., Mandal, N.C., Roy, R., Ghosh, R., Barman, S., Sarkar, S., Jash, S.K., Mondal, S., 2013. A new pentacyclic triterpene with potent antibacterial activity from *Limnophila indica* Linn. (Druce). Fitoterapia 90, 104–111. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.07.012
- Brass, H.U.C., Klein, A.S., Nyholt, S., Classen, T., Pietruszka, J., 2019. Condensing enzymes from *Pseudoalteromonadaceae* for prodiginine synthesis. Advanced Synthesis & Catalysis 361, 2659– 2667. https://doi.org/10.1002/adsc.201900183
- Bröker, J.N., Müller, B., van Deenen, N., Prüfer, D., Schulze Gronover, C., 2018. Upregulating the mevalonate pathway and repressing sterol synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* enhances the production of triterpenes. Applied Microbiology and Biotechnology 102, 6923–6934.

https://doi.org/10.1007/s00253-018-9154-7

- Broniatowski, M., Flasiński, M., Hąc-Wydro, K., 2015. Antagonistic effects of α-tocopherol and ursolic acid on model bacterial membranes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1848, 2154–2162. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.05.009
- Brooks, B.D., Brooks, A.E., 2014. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. Advanced Drug Delivery Reviews 78, 14–27. https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.027
- Bryan, J., 2011. Still going strong at 30: Co-amoxiclav. The Pharmaceutical Journal 286, p762.
- Burkovski, A., 2003. Ammonium assimilation and nitrogen control in *Corynebacterium glutamicum* and its relatives: An example for new regulatory mechanisms in actinomycetes. FEMS Microbiology Reviews 27, 617–628. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00067-6
- Busquets, A., Keim, V., Closa, M., del Arco, A., Boronat, A., Arró, M., Ferrer, A., 2008. *Arabidopsis thaliana* contains a single gene encoding squalene synthase. Plant Molecular Biology 67, 25–36. https://doi.org/10.1007/s11103-008-9299-3
- Busschaert, N., Gale, P.A., 2013. Small-molecule lipid-bilayer anion transporters for biological applications. Angewandte Chemie - International Edition 52, 1374–1382. https://doi.org/10.1002/anie.201207535
- Cahill, J., Young, R., 2019. Phage lysis: Multiple genes for multiple barriers, 1st ed, Advances in Virus Research. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.09.003
- Cai, Y., Wang, R., Pei, F., Liang, B.-B., 2007. Antibacterial activity of allicin alone and in combination with β-lactams against *Staphylococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Antibiotics 60, 335–338. https://doi.org/10.1038/ja.2007.45
- Cain, C.C., Lee, D., Waldo III, R.H., Henry, A.T., Casida Jr, E.J., Wani, M.C., Wall, M.E., Oberlies, N.H., Falkinham III, J.O., 2003. Synergistic antimicrobial activity of metabolites produced by a nonobligate bacterial predator. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47, 2113–2117. https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2113–2117.2003
- Calvert, M.B., Jumde, V.R., Titz, A., 2018. Pathoblockers or antivirulence drugs as a new option for the treatment of bacterial infections. Beilstein Journal of Organic Chemistry 14, 2607–2617. https://doi.org/10.3762/bjoc.14.239
- Campbell, J., McBeth, C., Kalashnikov, M., Boardman, A.K., Sharon, A., Sauer-Budge, A.F., 2016. Microfluidic advances in phenotypic antibiotic susceptibility testing. Biomedical Microdevices 18, 103. https://doi.org/10.1007/s10544-016-0121-8
- Cantas, L., Shah, S.Q.A., Cavaco, L.M., Manaia, C.M., Walsh, F., Popowska, M., Garelick, H., Bürgmann, H., Sørum, H., 2013. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. Frontiers in Microbiology 4, 96. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00096
- Casamayor, M., DiDonato, K., Hennebert, M., Brazzi, L., Prosen, G., 2018. Administration of intravenous morphine for acute pain in the emergency department inflicts an economic burden in Europe. Drugs in Context 7, 212524. https://doi.org/10.7573/dic.212524
- Castillo, D. a., Kolesnikova, M.D., Matsuda, S.P.T., 2013. An effective strategy for exploring unknown metabolic pathways by genome mining. Journal of the American Chemical Society 135, 5885–5894. https://doi.org/10.1021/ja401535g
- Catteau, L., Reichmann, N.T., Olson, J., Pinho, M.G., Nizet, V., Van Bambeke, F., Quetin-Leclercq, J., 2017. Synergy between ursolic and oleanolic acids from *Vitellaria paradoxa* leaf extract and β-Lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: *In vitro* and *in vivo* activity and underlying mechanisms. Molecules 22, 2245. https://doi.org/10.3390/molecules22122245
- CDER, 2018. Approval letter: ZEMDRI 500 mg/10 mL per vial (50 mg/mL). Center for Drug Evaluation and Research. Application number: 210303Orig1s000.
- Cegelski, L., Marshall, G.R., Eldridge, G.R., Hultgren, S.J., 2008. The biology and future prospects of antivirulence therapies. Nature Reviews Microbiology 6, 17–27. https://doi.org/10.1038/nrmicro1818
- Chait, R., Craney, A., Kishony, R., 2007. Antibiotic interactions that select against resistance. Nature 446, 668–671. https://doi.org/10.1038/nature05685

- Challis, G.L., Hopwood, D.A., 2003. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 14555–14561. https://doi.org/10.1073/pnas.1934677100
- Chandrika, N.T., Garneau-Tsodikova, S., 2018. Comprehensive review of chemical strategies for the preparation of new aminoglycosides and their biological activities. Chemical Society Reviews 47, 1189–1249. https://doi.org/10.1039/c7cs00407a
- Chi, S.C., Mothersole, D.J., Dilbeck, P., Niedzwiedzki, D.M., Zhang, H., Qian, P., Vasilev, C., Grayson, K.J., Jackson, P.J., Martin, E.C., Li, Y., Holten, D., Hunter, C.N., 2015. Assembly of functional photosystem complexes in *Rhodobacter sphaeroides* incorporating carotenoids from the spirilloxanthin pathway. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics 1847, 189–201. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2014.10.004
- Chong, H., Li, Q., 2017. Microbial production of rhamnolipids: Opportunities, challenges and strategies. Microbial Cell Factories 16, 137. https://doi.org/10.1186/s12934-017-0753-2
- Chory, J., Donohue, T.J., Varga, A.R., Staehelin, L.A., Kaplan, S., 1984. Induction of the photosynthetic membranes of *Rhodopseudomonas sphaeroides*: Biochemical and morphological studies. Journal of Bacteriology 159, 540–554.
- Christianson, D.W., 2017. Structural and chemical biology of terpenoid cyclases. Chemical Reviews 117, 11570–11648. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00287
- Christofi, N., Ivshina, I.B., 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. Journal of Applied Microbiology 93, 915–929. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01774.x
- Chung, P.Y., 2019. Novel targets of pentacyclic triterpenoids in *Staphylococcus aureus*: A systematic review. Phytomedicine 152933. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152933
- Clements, T., Ndlovu, T., Khan, S., Khan, W., 2019. Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. Applied Microbiology and Biotechnology 103, 589–602. https://doi.org/10.1007/s00253-018-9520-5
- CLSI, 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard Ninth edition.
- Coates, A.R., Halls, G., Hu, Y., 2011. Novel classes of antibiotics or more of the same? British Journal of Pharmacology 163, 184–194. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x
- Coelho, A.L.S., Feuser, P.E., Carciofi, B.A.M., de Andrade, C.J., de Oliveira, D., 2020. Mannosylerythritol lipids: Antimicrobial and biomedical properties. Applied Microbiology and Biotechnology 104, 2297–2318. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10354-z
- Collignon, P., Kennedy, K.J., 2015. Long-term persistence of multidrug-resistant Enterobacteriaceae after travel. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 61, 1766–1767. https://doi.org/10.1093/cid/civ703
- Compean, K.L., Ynalvez, R.A., 2014. Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A review. Research Journal of Medicinal Plant 8, 204–213. https://doi.org/10.3923/rjmp.2014.204.213
- Cooper, T.E., Chen, J., Wiffen, P.J., Derry, S., Carr, D.B., Aldington, D., Cole, P., Moore, R.A., 2017. Morphine for chronic neuropathic pain in adults. Cochrane Database of Systematic Reviews 5, CD011669. https://doi.org/10.1002/14651858.CD011669.pub2
- Corey, E.J., Matsuda, S.P.T., Bartel, B., 1993. Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 11628–11632. https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11628
- Cornett, J.B., Shockman, G.D., 1978. Cellular lysis of *Streptococcus faecalis* induced with Triton X-100. Journal of Bacteriology 135, 153–160.
- Cottarel, G., Wierzbowski, J., 2007. Combination drugs, an emerging option for antibacterial therapy. Trends in Biotechnology 25, 547–555. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.09.004
- Craft, K.M., Nguyen, J.M., Berg, L.J., Townsend, S.D., 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. MedChemComm 10, 1231–

1241. https://doi.org/10.1039/c9md00044e

- Craig, J.W., Chang, F.-Y., Kim, J.H., Obiajulu, S.C., Brady, S.F., 2010. Expanding small-molecule functional metagenomics through parallel screening of broad-host-range cosmid environmental DNA libraries in diverse *Proteobacteria*. Applied and Environmental Microbiology 76, 1633– 1641. https://doi.org/10.1128/AEM.02169-09
- Cravens, A., Payne, J., Smolke, C.D., 2019. Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products. Nature Communications 10, 2142. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09848-w
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G., 2000. Natural Products (Secondary Metabolites), in: Biochemistry & Molecular Biology of Plants. pp. 1250–1318. https://doi.org/10.1201/b11003-3
- D'Aoust, J.Y., Gerber, N.N., 1974. Isolation and purification of prodigiosin from *Vibrio psychroerythrus*. Journal of Bacteriology 118, 756–757.
- da Rosa, T.F., Coelho, S.S., Foletto, V.S., Bottega, A., Serafin, M.B., Machado, C. de S., Franco, L.N., de Paula, B.R., Hörner, R., 2020. Alternatives for the treatment of infections caused by ESKAPE pathogens. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics 45, 863–873. https://doi.org/10.1111/jcpt.13149
- Dahl, R.H., Zhang, F., Alonso-Gutierrez, J., Baidoo, E., Batth, T.S., Redding-Johanson, A.M., Petzold, C.J., Mukhopadhyay, A., Lee, T.S., Adams, P.D., Keasling, J.D., 2013. Engineering dynamic pathway regulation using stress-response promoters. Nature Biotechnology 31, 1039–1046. https://doi.org/10.1038/nbt.2689
- Danevčič, T., Borić Vezjak, M., Tabor, M., Zorec, M., Stopar, D., 2016a. Prodigiosin induces autolysins in actively grown *Bacillus subtilis* cells. Frontiers in Microbiology 7, 27. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00027
- Danevčič, T., Borić Vezjak, M., Zorec, M., Stopar, D., 2016b. Prodigiosin A multifaceted *Escherichia coli* antimicrobial agent. PLoS One 11, e0162412. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162412
- Darshan, N., Manonmani, H.K., 2016. Prodigiosin inhibits motility and activates bacterial cell death revealing molecular biomarkers of programmed cell death. AMB Express 6, 50. https://doi.org/10.1186/s13568-016-0222-z
- Darshan, N., Manonmani, H.K., 2015. Prodigiosin and its potential applications. Journal of Food Science and Technology 52, 5393–5407. https://doi.org/10.1007/s13197-015-1740-4
- Davis, J.S., Van Hal, S., Tong, S.Y.C., 2015. Combination antibiotic treatment of serious methicillinresistant *Staphylococcus aureus* infections. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine 36, 3–16. https://doi.org/10.1055/s-0034-1396906
- de Lima Procópio, R.E., da Silva, I.R., Martins, M.K., de Azevedo, J.L., de Araújo, J.M., 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 16, 466–471. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014
- Delcour, A.H., 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1794, 808–816. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005
- Demain, A.L., 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology 52, 455–463. https://doi.org/10.1007/s002530051546
- Demain, A.L., Fang, A., 2000. The natural functions of secondary metabolites, in: Fiechter, A. (Ed.), History of Modern Biotechnology I. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–39. https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1
- Desai, J.D., Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews 61, 47–64.
- Díaz De Rienzo, M.A., Stevenson, P., Marchant, R., Banat, I.M., 2016. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and -negative bacteria. FEMS Microbiology Letters 363, fnv224. https://doi.org/10.1093/femsle/fnv224
- Dickey, S.W., Cheung, G.Y.C., Otto, M., 2017. Different drugs for bad bugs: Antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. Nature Reviews Drug Discovery 16, 457–471.

https://doi.org/10.1038/nrd.2017.23

- Dickschat, J.S., 2016. Bacterial terpene cyclases. Natural Product Reports 33, 87–110. https://doi.org/10.1039/c5np00102a
- Domröse, A., Klein, A.S., Hage-Hülsmann, J., Thies, S., Svensson, V., Classen, T., Pietruszka, J., Jaeger, K.-E., Drepper, T., Loeschcke, A., 2015. Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*. Frontiers in Microbiology 6, 972. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00972
- Douafer, H., Andrieu, V., Phanstiel IV, O., Brunel, J.M., 2019. Antibiotic adjuvants: Make antibiotics great again! Journal of Medicinal Chemistry 62, 8665–8681. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01781
- Dwivedi, D., Jansen, R., Molinari, G., Nimtz, M., Johri, B.N., Wray, V., 2008. Antimycobacterial serratamolides and diacyl peptoglucosamine derivatives from *Serratia* sp. Journal of Natural Products 71, 637–641. https://doi.org/10.1021/np7007126
- Džidić, S., Šušković, J., Kos, B., 2008. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. Food Technology & Biotechnology 46, 11–21.
- Ebizuka, Y., Katsube, Y., Tsutsumi, T., Kushiro, T., Shibuya, M., 2003. Functional genomics approach to the study of triterpene biosynthesis. Pure and Applied Chemistry 75, 369–374. https://doi.org/10.1351/pac200375020369
- Edgar, S., Li, F.-S., Qiao, K., Weng, J.-K., Stephanopoulos, G., 2017. Engineering of taxadiene synthase for improved selectivity and yield of a key Taxol biosynthetic intermediate. ACS Synthetic Biology 6, 201–205. https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00206
- EFEMA, 2019. EFEMA (European Food Emulsifiers Manufacturers Association) index of food emulsifiers March 2019 Edition.
- Efferth, T., 2017. From ancient herb to modern drug: *Artemisia annua* and artemisinin for cancer therapy. Seminars in Cancer Biology 46, 65–83. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.02.009
- Ejim, L., Farha, M.A., Falconer, S.B., Wildenhain, J., Coombes, B.K., Tyers, M., Brown, E.D., Wright, G.D., 2011. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. Nature Chemical Biology 7, 348–350. https://doi.org/10.1038/nchembio.559
- Elahian, F., Moghimi, B., Dinmohammadi, F., Ghamghami, M., Hamidi, M., Mirzaei, S.A., 2013. The anticancer agent prodigiosin is not a multidrug resistance protein substrate. DNA and Cell Biology 32, 90–97. https://doi.org/10.1089/dna.2012.1902
- Elder, D.P., Kuentz, M., Holm, R., 2016. Antibiotic resistance: The need for a global strategy. Journal of Pharmaceutical Sciences 105, 2278–2287. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.06.002
- Eliopoulos, G.M., Eliopoulos, C.T., 1988. Abtibiotic combinations: Should they be tested? Clinical Microbiology Reviews 1, 139–156. https://doi.org/10.1128/CMR.1.2.139
- Eljaaly, K., Alharbi, A., Alshehri, S., Ortwine, J.K., Pogue, J.M., 2019. Plazomicin: A novel aminoglycoside for the treatment of resistant gram-negative bacterial infections. Drugs 79, 243–269. https://doi.org/10.1007/s40265-019-1054-3
- Elramady, M.G., Aly, S.S., Rossitto, P. V, Crook, J.A., Cullor, J.S., 2013. Synergistic effects of lactic acid and sodium dodecyl sulfate to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 on cattle hide sections. Foodborne Pathogens and Disease 10, 661–663. https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1420
- Elserafi, M.M., Zeeneldin, A.A., Abdelsalam, I.M., Nassar, H.R., Moneer, M.M., Buhoush, W.H., 2018. First-line paclitaxel and cisplatin used sequentially or in combination in metastatic breast cancer: A phase II randomized study. Journal of the Egyptian National Cancer Institute 30, 13– 20. https://doi.org/10.1016/j.jnci.2018.01.002
- Elshikh, M., Moya-Ramírez, I., Moens, H., Roelants, S., Soetaert, W., Marchant, R., Banat, I.M., 2017.
 Rhamnolipids and lactonic sophorolipids: Natural antimicrobial surfactants for oral hygiene.
 Journal of Applied Microbiology 123, 1111–1123. https://doi.org/10.1111/jam.13550
- EMA/CHMP, 2018. Information for the package leaflet regarding polysorbates used as excipients in medicinal products for human use. European medicines agency Commitee for Medicinal Products for Human Use. November, 1–42.

- Erkal, N.A., Eser, M.G., Özgür, E., Gündüz, U., Eroglu, I., Yücel, M., 2019. Transcriptome analysis of *Rhodobacter capsulatus* grown on different nitrogen sources. Archives of Microbiology 201, 661–671. https://doi.org/10.1007/s00203-019-01635-x
- EUCAST, 2006. International Standard ISO 20776-1: Clinical laboratory testing and *in vitro* diagnostic test systems Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).
- EUCAST, 2000. Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clinical Microbiology and Infection 6, 503–508. https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2000.00149.x
- Feng, J.S., Webb, J.W., Tsang, J.C., 1982. Enhancement by sodium dodecyl sulfate of pigment formation in *Serratia marcescens* 08. Applied and Environmental Microbiology 43, 850–853.
- Fernandes, P., Martens, E., 2017. Antibiotics in late clinical development. Biochemical Pharmacology 133, 152–163. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.025
- Fernández, L., Hancock, R.E.W., 2012. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. Clinical Microbiology Reviews 25, 661–681. https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12
- Figura, N., Marcolongo, R., Cavallo, G., Santucci, A., Collodel, G., Spreafico, A., Moretti, E., 2012. Polysorbate 80 and *Helicobacter pylori*: A microbiological and ultrastructural study. BMC Microbiology 12, 217. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-217
- Finland, M., Wilcox, C., 1953. Antibiotic combinations and resistance to antibiotics: Penicillin with other antibiotics against Ppenicillin-resistant staphylococci. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 83, 605–608. https://doi.org/10.3181/00379727-83-20433
- Fleming, A., 1945. Penicillin Nobel Lecture, December 11, 1945. PA Norstedt & Söner.
- Fleming, A., 1929. On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* 226–236. https://doi.org/10.1093/clinids/2.1.129
- Fletcher, C., 1984. First clinical use of penicillin. British Medical Journal 289, 1721–1723. https://doi.org/10.1136/bmj.289.6460.1721
- Fontanay, S., Grare, M., Mayer, J., Finance, C., Duval, R.E., 2008. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. Journal of Ethnopharmacology 120, 272–276. https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.09.001
- Frank, A., Groll, M., 2017. The methylerythritol phosphate pathway to isoprenoids. Chemical Reviews 117, 5675–5703. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00537
- Freitas, R., Silvestro, S., Coppola, F., Costa, S., Meucci, V., Battaglia, F., Intorre, L., Soares, A.M.V.M., Pretti, C., Faggio, C., 2020. Toxic impacts induced by Sodium lauryl sulfate in *Mytilus* galloprovincialis. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology 242, 110656. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110656
- Fukushima, E.O., Seki, H., Muranaka, T., 2014. Heterologous expression of triterpene biosynthetic genes in yeast and subsequent metabolite identification through GC-MS, in: Rodríguez-Concepción, M. (Ed.), Plant Isoprenoids. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). Humana Press, New York, NY, pp. 235–243. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0606-2 17
- Gamal-Eldin, H., Elbanna, K., 2011. Field evidence for the potential of *Rhodobacter capsulatus* as biofertilizer for flooded rice. Current Microbiology 62, 391–395. https://doi.org/10.1007/s00284-010-9719-x
- Garg, M., Priyanka, Chatterjee, M., 2018. Isolation, characterization and antibacterial effect of biosurfactant from *Candida parapsilosis*. Biotechnology Reports 18, e00251. https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00251
- Gaur, V.K., Regar, R.K., Dhiman, N., Gautam, K., Srivastava, J.K., Patnaik, S., Kamthan, M., Manickam, N., 2019. Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: Application as food emulsifier and antibacterial agent. Bioresource Technology 285, 121314. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121314

- Ge, F., Zeng, F., Liu, S., Guo, N., Ye, H., Song, Y., Fan, J., Wu, X., Wang, X., Deng, X., Jin, Q., Yu, L., 2010. *In vitro* synergistic interactions of oleanolic acid in combination with isoniazid, rifampicin or ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Medical Microbiology 59, 567–572. https://doi.org/10.1099/jmm.0.014837-0
- Gerber, N.N., 1975. Prodigiosin-like pigments. CRC Critical Reviews in Microbiology 3, 469–485. https://doi.org/10.3109/10408417509108758
- Gershenzon, J., Dudareva, N., 2007. The function of terpene natural products in the natural world. Nature Chemical Biology 3, 408–414. https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.5
- Gibson, K.J., Miller, J.M., Johnson, P.D., Stewart, P.M., 2016. Toxicity of sodium dodecyl sulfate to federally threatened and petitioned freshwater mollusk species. Freshwater Mollusk Biology and Conservation 19, 29–35. https://doi.org/10.31931/fmbc.v19i1.2016.29-35
- Giertsen, E., Scheie, A.A., Rölla, G., 1989. Antimicrobial and antiplaque effects of a chlorhexidine and Triton X-100 combination. European Journal of Oral Sciences 97, 233–241. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1989.tb01607.x
- Giménez-Rota, C., Lorán, S., Mainar, A.M., Hernáiz, M.J., Rota, C., 2019. Supercritical carbon dioxide antisolvent fractionation for the sustainable concentration of *Lavandula luisieri* (Rozeira) Riv.-Mart antimicrobial and antioxidant compounds and comparison with its conventional extracts. Plants 8, 455. https://doi.org/10.3390/plants8110455
- Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J.I., Morfín-Otero, M.D.R., Torres-López, F.J., Alcántar-Curiel, M.D., 2020. Antimicrobial resistance. Its importance and efforts to control it. Gaceta Medica de Mexico 156, 171–178. https://doi.org/10.24875/GMM.M20000358
- Giri, S.S., Ryu, E., Sukumaran, V., Park, S.C., 2019. Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains. Microbial Pathogenesis 132, 66–72. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.035
- Gokhale, M., Wadhwani, M., 2015. Antimicrobial activity of secondary metabolites from plants A review. International Journal of Pharmacognosy 2, 60–65. https://doi.org/10.1310.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.2(2).60-65
- González-Bello, C., 2017. Antibiotic adjuvants A strategy to unlock bacterial resistance to antibiotics. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 27, 4221–4228. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.08.027
- Gora, L., 2015. Evaluation of the *Rhodobacter capsulatus* based synthesis of squalene and further plant triterpenes. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universtät Düsseldorf.
- Gould, K., 2016. Antibiotics: From prehistory to the present day. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 71, 572–575. https://doi.org/10.1093/jac/dkv484
- Grayson, M.L., Crowe, S.M., McCarthy, J.S., Mills, J., Mouton, J.W., Norrby, S.R., Paterson, D.L., Pfaller, M.A., 2010. Kucers' The Use of Antibiotics, Sixth Edition. A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs. CRC Press, Taylor & Francis Group. ISBN 978-1-4441-4752-0.
- Green, S.K., Schroth, M.N., Cho, J.J., Kominos, S.D., Vitanza-jack, V.B., 1974. Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. Applied Microbiology 28, 987–991. https://doi.org/10.1128/AEM.28.6.987-991.1974
- Gridelli, C., Chen, T., Ko, A., O'Brien, M.E., Ong, T.J., Socinski, M.A., Postmus, P.E., 2018. nab-Paclitaxel/carboplatin in elderly patients with advanced squamous non-small cell lung cancer: A retrospective analysis of a Phase III trial. Drug Design, Development and Therapy 12, 1445– 1451. https://doi.org/10.2147/dddt.s155750
- Gruenberger, A., Probst, C., Heyer, A., Wiechert, W., Frunzke, J., Kohlheyer, D., 2013. Microfluidic picoliter bioreactor for microbial single-cell analysis: Fabrication, system setup, and operation. Journal of Visualized Experiments e50560. https://doi.org/10.3791/50560
- Grünberger, A., Paczia, N., Probst, C., Schendzielorz, G., Eggeling, L., Noack, S., Wiechert, W., Kohlheyer, D., 2012. A disposable picolitre bioreactor for cultivation and investigation of industrially relevant bacteria on the single cell level. Lab on a Chip 12, 2060–2068. https://doi.org/10.1039/c2lc40156h

- Gulani, C., Bhattacharya, S., Das, A., 2012. Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials. Malaysian Journal of Microbiology 8, 116–122.
- Gunnison, J.B., Kunishige, E., Coleman, V.R., Jawetz, E., 1955. The mode of action of antibiotic synergism and antagonism: The effect *in vitro* on bacteria not actively multiplying. Journal of General Microbiology 13, 509–518. https://doi.org/10.1099/00221287-13-3-509
- Gunnison, J.B., Shevky, M.C., Bruff, J.A., Coleman, V.R., Jawetz, E., 1953. Studies on antibiotic synergism and antagonism: The effect *in vitro* of combinations of antibiotics on bacteria of varying resistance to single antibiotics. Journal of Bacteriology 66, 150–158.
- Günther, M., Zibek, S., Hirth, T., Rupp, S., 2010. Synthese und Optimierung von Cellobioselipiden und Mannosylerythritollipiden. Chemie Ingenieur Technik 82, 1215–1221. https://doi.org/10.1002/cite.201000078
- Hage-Hülsmann, J., 2015. Combinatorial antimicrobial effects of selected secondary metabolites. Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Hage-Hülsmann, J., Grünberger, A., Thies, S., Santiago-Schübel, B., Klein, A.S., Pietruszka, J., Binder, D., Hilgers, F., Domröse, A., Drepper, T., Kohlheyer, D., Jaeger, K.-E., Loeschcke, A., 2018.
 Natural biocide cocktails: Combinatorial antibiotic effects of prodigiosin and biosurfactants. PLoS One 13, e0200940. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200940
- Hage-Hülsmann, J., Metzger, S., Wewer, V., Buechel, F., Troost, K., Thies, S., Loeschcke, A., Jaeger, K.E., Drepper, T., 2019. Biosynthesis of cycloartenol by expression of plant and bacterial oxidosqualene cyclases in engineered *Rhodobacter capsulatus*. Journal of Biotechnology: X 4, 100014. https://doi.org/10.1016/j.btecx.2020.100014
- Han, J.Y., Jo, H.-J., Kwon, E.K., Choi, Y.E., 2019. Cloning and characterization of oxidosqualene cyclases involved in taraxasterol, taraxerol and bauerenol triterpene biosynthesis in *Taraxacum coreanum*. Plant & Cell Physiology 60, 1595–1603. https://doi.org/10.1093/pcp/pcz062
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal of Molecular Biology 166, 557–580. https://doi.org/10.1016/s0022-2836(83)80284-8
- Hancock, R.E.W., 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. Trends in Microbiology 5, 37–42. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)81773-8
- Haney, E.F., Mansour, S.C., Hancock, R.E.W., 2017. Antimicrobial peptides: An introduction, in: Hansen, P.R. (Ed.), Antimicrobial Peptides. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, NY, pp. 3–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6737-7_1
- Harris, A.K.P., Williamson, N.R., Slater, H., Cox, A., Abbasi, S., Foulds, I., Simonsen, H.T., Leeper, F.J., Salmond, G.P.C., 2004. The *Serratia* gene cluster encoding biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, shows species- and strain-dependent genome context variation. Microbiology 150, 3547–3560. https://doi.org/10.1099/mic.0.27222-0
- Harshada, K., 2014. Biosurfactant: A potent antimicrobial agent. Journal of Microbiology & Experimentation 1, 173–177. https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00031
- Hayashi, H., Hiraoka, N., Ikeshiro, Y., Kushiro, T., Morita, M., Shibuya, M., Ebizuka, Y., 2000. Molecular cloning and characterization of a cDNA for *Glycyrrhiza glabra* cycloartenol synthase. Biological and Pharmaceutical Bulletin 23, 231–234. https://doi.org/10.1248/bpb.23.231
- Heck, A., Drepper, T., 2017. Engineering photosynthetic α-Proteobacteria for the production of recombinant proteins and terpenoids, in: Hallenbeck, P.C. (Ed.), Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes. Springer, Cham, pp. 395–425. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46261-5_12
- Hegreness, M., Shoresh, N., Damian, D., Hartl, D., Kishony, R., 2008. Accelerated evolution of resistance in multidrug environments. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 13977–13981. https://doi.org/10.1073/pnas.0805965105
- Hemschemeier, S.K., Ebel, U., Jäger, A., Balzer, A., Kirndörfer, M., Klug, G., 2000. *In vivo* and *in vitro* analysis of RegA response regulator mutants of *Rhodobacter capsulatus*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 2, 291–300.
- Herráez, R., Mur, A., Merlos, A., Viñas, M., Vinuesa, T., 2019. Using prodigiosin against some gram-

positive and gram-negative bacteria and *Trypanosoma cruzi*. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 25, e20190001. https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0001

- Herrera, J.B.R., Bartel, B., Wilson, W.K., Matsuda, S.P.T., 1998. Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* lupeol synthase gene. Phytochemistry 49, 1905–1911. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00366-5
- Hewald, S., Josephs, K., Bölker, M., 2005. Genetic analysis of biosurfactant production in Ustilago maydis. Applied and Environmental Microbiology 71, 3033–3040. https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3033-3040.2005
- HEXAL AG, 2010. Gebrauchsinformation: Information für den Anwender. Paclitaxel HEXAL[®] 30 mg/5 ml.
- Hider, R.C., Kong, X., 2010. Chemistry and biology of siderophores. Natural Product Reports 27, 637–657. https://doi.org/10.1039/b906679a
- Hong, B., Prabhu, V. V., Zhang, S., van den Heuvel, A.P.J., Dicker, D.T., Kopelovich, L., El-Deiry, W.S., 2014. Prodigiosin rescues deficient p53 signaling and antitumor effects via upregulating p73 and disrupting its interaction with mutant p53. Cancer Research 74, 1153–1165. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0955
- Hooton, T.M., Blair, A.D., Turck, M., Counts, G.W., 1984. Synergism at clinically attainable concentrations of aminoglycoside and β-lactam antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 26, 535–538. https://doi.org/10.1128/AAC.26.4.535
- Hou, X.-F., Li, S., Wu, C., Li, K., Xu, S.-N., Wang, J.-F., 2018. Effects of obatoclax combined with gemcitabine on the biological activity of pancreatic cancer cells under hypoxic conditions. Molecular Medicine Reports 18, 495–501. https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8932
- Hu, D.X., Withall, D.M., Challis, G.L., Thomson, R.J., 2016. Structure, chemical synthesis, and biosynthesis of prodiginine natural products. Chemical Reviews 116, 7818–7853. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00024
- Hümbelin, M., Thomas, A., Lin, J., Li, J., Jore, J., Berry, A., 2002. Genetics of isoprenoid biosynthesis in *Paracoccus zeaxanthinifaciens*. Gene 297, 129–139. https://doi.org/10.1016/s0378-1119(02)00877-6
- Huntley, S., Hamann, N., Wegener-Feldbrügge, S., Treuner-Lange, A., Kube, M., Reinhardt, R., Klages, S., Müller, R., Ronning, C.M., Nierman, W.C., Søgaard-Andersen, L., 2011. Comparative genomic analysis of fruiting body formation in Myxococcales. Molecular Biology and Evolution 28, 1083– 1097. https://doi.org/10.1093/molbev/msq292
- Huttner, A., Harbarth, S., Carlet, J., Cosgrove, S., Goossens, H., Holmes, A., Jarlier, V., Voss, A., Pittet, D., 2013. Antimicrobial resistance: A global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. Antimicrobial Resistance and Infection Control 2, 31. https://doi.org/10.1186/2047-2994-2-31
- Hwang, J.J., Kuruvilla, J., Mendelson, D., Pishvaian, M.J., Deeken, J.F., Siu, L.L., Berger, M.S., Viallet, J., Marshall, J.L., 2010. Phase I dose finding studies of obatoclax (GX15-070), a small molecule pan-BCL-2 family antagonist, in patients with advanced solid tumors or lymphoma. Clinical Cancer Research 16, 4038–4045. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0822
- Ibrahim, D., Nazari, T.F., Kassim, J., Lim, S.-H., 2014. Prodigiosin An antibacterial red pigment produced by *Serratia marcescens* IBRL USM 84 associated with a marine sponge *Xestospongia testudinaria*. Journal of Applied Pharmaceutical Science 4, 001–006. https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.40101
- Irorere, V.U., Tripathi, L., Marchant, R., McClean, S., Banat, I.M., 2017. Microbial rhamnolipid production: A critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. Applied Microbiology and Biotechnology 101, 3941–3951. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8262-0
- Ivanković, T., Hrenović, J., 2010. Surfactants in the environment. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology 61, 95–110. https://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-1943
- Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M.N., Scheffler, A., 2009. Pentacyclic triterpene distribution in

various plants - Rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. Molecules 14, 2016–2031. https://doi.org/10.3390/molecules14062016

- Jain, C., Khatana, S., Vijayvergia, R., 2019. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: A review. International Journal of Pharmaceutical Science and Research 10, 494–504. https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(2).494-04
- Jana, S., Deb, J.K., 2006. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. Applied Microbiology and Biotechnology 70, 140–150. https://doi.org/10.1007/s00253-005-0279-0
- Jardak, K., Drogui, P., Daghrir, R., 2016. Surfactants in aquatic and terrestrial environment: Occurrence, behavior, and treatment processes. Environmental Science and Pollution Research 23, 3195–3216. https://doi.org/10.1007/s11356-015-5803-x
- Jenny, M., Kingsbury, J., 2018. Properties and prevention: A review of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Biology and Medical Research 2, 18.
- Jeong, H., Yim, J.H., Lee, C., Choi, S.-H., Park, Y.K., Yoon, S.H., Hur, C.-G., Kang, H.-Y., Kim, D., Lee, H.H., Park, K.H., Park, S.-H., Park, H.-S., Lee, H.K., Oh, T.K., Kim, J.F., 2005. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. Nucleic Acids Research 33, 7066–7073. https://doi.org/10.1093/nar/gki1016
- Jesus, J.A., Lago, J.H.G., Laurenti, M.D., Yamamoto, E.S., Passero, L.F.D., 2015. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: An update. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2015, 620472. https://doi.org/10.1155/2015/620472
- Jezierska, S., Claus, S., Van Bogaert, I., 2018. Yeast glycolipid biosurfactants. FEBS Letters 592, 1312– 1329. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12888
- Jiménez-Arellanes, A., Luna-Herrera, J., Cornejo-Garrido, J., López-García, S., Castro-Mussot, M.E., Meckes-Fischer, M., Mata-Espinosa, D., Marquina, B., Torres, J., Hernández-Pando, R., 2013. Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. BMC Complementary and Alternative Medicine 13, 258. https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-258
- Jiménez-Guerrero, R., Gasca, J., Flores, M.L., Pérez-Valderrama, B., Tejera-Parrado, C., Medina, R., Tortolero, M., Romero, F., Japón, M.A., Sáez, C., 2018. Obatoclax and paclitaxel synergistically induce apoptosis and overcome paclitaxel resistance in urothelial cancer cells. Cancers 10, 490. https://doi.org/10.3390/cancers10120490
- Jin, M.L., Lee, W.M., Kim, O.T., 2017. Two cycloartenol synthases for phytosterol biosynthesis in *Polygala tenuifolia* Willd. International Journal of Molecular Sciences 18, 2426. https://doi.org/10.3390/ijms18112426
- Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J., 2009. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. Clinical Infectious Diseases 49, 1749–1755. https://doi.org/10.1086/647952
- Joung, D., Choi, S., Kang, O., Kim, S., Mun, S., Seo, Y., Kang, D.-H., Gong, R., Shin, D., Kim, Y.-C., Kwon, D., 2015. Synergistic effects of oxyresveratrol in conjunction with antibiotics against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. Molecular Medicine Reports 12, 663–667. https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3345
- Juhas, M., 2015. Horizontal gene transfer in human pathogens. Critical Reviews in Microbiology 41, 101–108. https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.804031
- Kadouri, D.E., Shanks, R.M.Q., 2013. Identification of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* inhibitory compound isolated from *Serratia marcescens*. Research in Microbiology 164, 821–826. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2013.06.002
- Kalan, L., Wright, G.D., 2011. Antibiotic adjuvants: Multicomponent anti-infective strategies. Expert Reviews in Molecular Medicine 13, e5. https://doi.org/10.1017/S1462399410001766
- Kallscheuer, N., Classen, T., Drepper, T., Marienhagen, J., 2019. Production of plant metabolites with applications in the food industry using engineered microorganisms. Current Opinion in Biotechnology 56, 7–17. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.008
- Kang, H.-K., Kim, C., Seo, C.H., Park, Y., 2017. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): A patent review. Journal of Microbiology 55, 1–12. https://doi.org/10.1007/s12275-
017-6452-1

- Kang, S.-Y., Sohn, K.-H., Lee, J.-O., Kim, S.-H., Cho, S.-H., Chang, Y.-S., 2015. Intravenous tacrolimus and cyclosporine induced anaphylaxis: What is next? Asia Pacific Allergy 5, 181–186. https://doi.org/10.5415/apallergy.2015.5.3.181
- Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A., 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology 33, 300–305. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- Karsa, D.R., Houston, J., 2007. What are Surfactants?, in: Farn, R.J. (Ed.), Chemistry and Technology of Surfactants. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, pp. 1–23. https://doi.org/10.1002/9780470988596.ch1
- Kashyap, R., Shah, A., Dutt, T., Wieruszewski, P.M., Ahdal, J., Jain, R., 2019. Treatments and limitations for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A review of current literature. World Journal of Clinical Infectious Diseases 9, 1–10. https://doi.org/10.5495/wjcid.v9.i1.1
- Kaspar, F., Neubauer, P., Gimpel, M., 2019. Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: A comprehensive review. Journal of Natural Products 82, 2038–2053. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110
- Katabami, A., Li, L., Iwasaki, M., Furubayashi, M., Saito, K., Umeno, D., 2015. Production of squalene by squalene synthases and their truncated mutants in *Escherichia coli*. Journal of Bioscience and Bioengineering 119, 165–171. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.07.013
- Katz, L., Baltz, R.H., 2016. Natural product discovery: Past, present, and future. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 43, 155–176. https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5
- Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Markert, A., Svensson, V., Jaeger, K.-E., Heck, A., Drepper, T., 2010. A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. Protein Expression and Purification 69, 137–146. https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.08.008
- Ke, D., Caiyin, Q., Zhao, F., Liu, T., Lu, W., 2018. Heterologous biosynthesis of triterpenoid ambrein in engineered *Escherichia coli*. Biotechnology Letters 40, 399–404. https://doi.org/10.1007/s10529-017-2483-2
- Kehrenberg, C., Catry, B., Haesebrouck, F., de Kruif, A., Schwarz, S., 2005. Novel spectinomycin/streptomycin resistance gene, aadA14, from *Pasteurella multocida*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49, 3046–3049. https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.3046-3049.2005
- Kennedy, J., 2008. Mutasynthesis, chemobiosynthesis, and back to semi-synthesis: Combining synthetic chemistry and biosynthetic engineering for diversifying natural products. Natural Product Reports 25, 25–34. https://doi.org/10.1039/b707678a
- Kerantzas, C.A., Jacobs, W.R.J., 2017. Origins of combination therapy for tuberculosis: Lessons for future antimicrobial development and application. mBio 8, e01586-16. https://doi.org/10.1128/mBio.01586-16
- Kerwin, B.A., 2008. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways. Journal of Pharmaceutical Sciences 97, 2924–2935. https://doi.org/10.1002/jps.21190
- Kesarwani, S.S., Mumbai Group of Paediatric Ophthalmologists and Strabismologists, 2019. Consensus statement and guidelines for use of dilute atropine sulphate in myopia control. Indian Journal of Ophthalmology 67, 461–463. https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_1457_18
- Keyes, K., Lee, M.D., Maurer, J.J., 2003. Antibiotics: Mode of action, mechanisms of resistance, and transfer, in: Torrence, M.E., Isaacson, R.E. (Eds.), Microbial Food Safety in Animal Agriculture: Current Topics. pp. 45–56.
- Khan, N.E., Nybo, S.E., Chappell, J., Curtis, W.R., 2015. Triterpene hydrocarbon production engineered into a metabolically versatile host - *Rhodobacter capsulatus*. Biotechnology and Bioengineering 112, 1523–1532. https://doi.org/10.1002/bit.25573
- Khanafari, A., Assadi, M.M., Fakhr, F.A., 2006. Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia* marcescens. OnLine Journal of Biological Sciences 6, 1–13.

https://doi.org/10.3844/ojbsci.2006.1.13

- Kim, D., Lee, J.S., Park, Y.K., Kim, J.F., Jeong, H., Oh, T.-K., Kim, B.S., Lee, C.H., 2007. Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396. Journal of Applied Microbiology 102, 937–944. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03172.x
- Kim, S., Lee, H., Lee, S., Yoon, Y., Choi, K.-H., 2015. Antimicrobial action of oleanolic acid on *Listeria monocytogenes, Enterococcus faecium*, and *Enterococcus faecalis*. PLoS One 10, e0118800. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118800
- Kim, S., Lee, S., Kim, J.-K., Chung, H.J., Jeon, J.S., 2019a. Microfluidic-based observation of local bacterial density under antimicrobial concentration gradient for rapid antibiotic susceptibility testing. Biomicrofluidics 13, 014108. https://doi.org/10.1063/1.5066558
- Kim, S., Masum, F., Jeon, J.S., 2019b. Recent developments of chip-based phenotypic antibiotic susceptibility testing. BioChip Journal 13, 43–52. https://doi.org/10.1007/s13206-019-3109-7
- Kirby, J., Keasling, J.D., 2009. Biosynthesis of plant isoprenoids: Perspectives for microbial engineering. Annual Review of Plant Biology 60, 335–355. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.091955
- Kirschning, A., Taft, F., Knobloch, T., 2007. Total synthesis approaches to natural product derivatives based on the combination of chemical synthesis and metabolic engineering. Organic and Biomolecular Chemistry 5, 3245–3259. https://doi.org/10.1039/b709549j
- Kishore, R.S.K., Pappenberger, A., Dauphin, I.B., Ross, A., Buergi, B., Staempfli, A., Mahler, H.-C., 2011. Degradation of polysorbates 20 and 80: Studies on thermal autoxidation and hydrolysis. Journal of Pharmaceutical Sciences 100, 721–731. https://doi.org/10.1002/jps.22290
- Kitamoto, D., Yanagishita, H., Shinbo, T., Nakane, T., Kamisawa, C., Nakahara, T., 1993. Surface active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. Journal of Biotechnology 29, 91–96. https://doi.org/10.1016/0168-1656(93)90042-L
- Klaus, O., 2017. Optimierung der heterologen Squalenproduktion in *Rhodobacter capsulatus* durch *metabolic engineering* und optogenetische Verfahren. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Klein, A.S., Brass, H.U.C., Klebl, D.P., Classen, T., Loeschcke, A., Drepper, T., Sievers, S., Jaeger, K.-E., Pietruszka, J., 2018. Preparation of cyclic prodiginines by mutasynthesis in *Pseudomonas putida* KT2440. ChemBioChem 19, 1545–1552. https://doi.org/10.1002/cbic.201800154
- Klein, A.S., Domröse, A., Bongen, P., Brass, H.U.C., Classen, T., Loeschcke, A., Drepper, T., Laraia, L., Sievers, S., Jaeger, K.-E., Pietruszka, J., 2017. New prodigiosin derivatives obtained by mutasynthesis in *Pseudomonas putida*. ACS Synthetic Biology 6, 1757–1765. https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00099
- Klein, M., Schorr, S.E., 1953. The role of bacterial resistance in antibiotic synergism and antagonism. Journal of Bacteriology 65, 454–465.
- Klipp, W., Masepohl, B., Pühler, A., 1988. Identification and mapping of nitrogen fixation genes of *Rhodobacter capsulatus*: Duplication of a *nifA-nifB* region. Journal of Bacteriology 170, 693–699. https://doi.org/10.1128/jb.170.2.693-699.1988
- Klockgether, J., Tümmler, B., 2017. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. F1000Research 6, 1261. https://doi.org/10.12688/f1000research.10506.1
- Kohnen-Johannsen, K., Kayser, O., 2019. Tropane alkaloids: Chemistry, pharmacology, biosynthesis and production. Molecules 24, 796. https://doi.org/10.3390/molecules24040796
- Kolesnikova, M.D., Obermeyer, A.C., Wilson, W.K., Lynch, D.A., Xiong, Q., Matsuda, S.P.T., 2007. Stereochemistry of water addition in triterpene synthesis: The structure of arabidiol. Organic Letters 9, 2183–2186. https://doi.org/10.1021/ol070709b
- Komatsuzawa, H., Sugai, M., Shirai, C., Suzuki, J., Hiramatsu, K., Suginaka, H., 1995. Triton X-100 alters the resistance level of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin. FEMS Microbiology Letters 134, 209–212. https://doi.org/10.1016/0378-1097(95)00406-X
- Komatsuzawa, H., Suzuki, J., Sugai, M., Miyake, Y., Suginaka, H., 1994. The effect of triton X-100 on the *in-vitro* susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 34, 885–897. https://doi.org/10.1093/jac/34.6.885

- Konno, H., Matsuya, H., Okamoto, M., Sato, T., Tanaka, Y., Yokoyama, K., Kataoka, T., Nagai, K., Wasserman, H.H., Ohkuma, S., 1998. Prodigiosins uncouple mitochondrial and bacterial F-ATPases: Evidence for their H+/Cl- symport activity. Journal of Biochemistry 124, 547–556. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022147
- Kossel, A., 1891. Ueber die chemische Zusammensetzung der Zelle. Archiv für Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medicin 181–186.
- Kotra, L.P., Haddad, J., Mobashery, S., 2000. Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44, 3249–3256. https://doi.org/10.1128/aac.44.12.3249-3256.2000
- Krause, K.M., Serio, A.W., Kane, T.R., Connolly, L.E., 2016. Aminoglycosides: An overview. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 6, a027029. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029
- Kubicki, S., Bator, I., Jankowski, S., Schipper, K., Tiso, T., Feldbrügge, M., Blank, L.M., Thies, S., Jaeger, K.-E., 2020. A straightforward assay for screening and quantification of biosurfactants in microbial culture supernatants. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 8, 958. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00958
- Kubicki, S., Bollinger, A., Katzke, N., Jaeger, K.-E., Loeschcke, A., Thies, S., 2019. Marine Biosurfactants: Biosynthesis, structural diversity and biotechnological applications. Marine Drugs 17, 408. https://doi.org/10.3390/md17070408
- Kurek, A., Grudniak, A.M., Szwed, M., Klicka, A., Samluk, L., Wolska, K.I., Janiszowska, W., Popowska, M., 2010. Oleanolic acid and ursolic acid affect peptidoglycan metabolism in *Listeria monocytogenes*. Antonie van Leeuwenhoek 97, 61–68. https://doi.org/10.1007/s10482-009-9388-6
- Kushiro, T., Hoshino, M., Tsutsumi, T., Kawai, K., Shiro, M., Shibuya, M., Ebizuka, Y., 2006. Stereochemical course in water addition during LUP1-catalyzed triterpene cyclization. Organic Letters 8, 5589–5592. https://doi.org/10.1021/ol062310d
- Kwon, S.-K., Park, Y.-K., Kim, J.F., 2010. Genome-wide screening and identification of factors affecting the biosynthesis of prodigiosin by *Hahella chejuensis*, using *Escherichia coli* as a surrogate host. Applied and Environmental Microbiology 76, 1661–1668. https://doi.org/10.1128/AEM.01468-09
- Lapenda, J.C., Silva, P.A., Vicalvi, M.C., Sena, K.X.F.R., Nascimento, S.C., 2015. Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. World Journal of Microbiology and Biotechnology 31, 399–406. https://doi.org/10.1007/s11274-014-1793-y
- Le Guenic, S., Chaveriat, L., Lequart, V., Joly, N., Martin, P., 2019. Renewable surfactants for biochemical applications and nanotechnology. Journal of Surfactants and Detergents 22, 5–21. https://doi.org/10.1002/jsde.12216
- Lee, C.-M., Kim, S.-Y., Yoon, S.-H., Kim, J.-B., Yeo, Y.-S., Sim, J.-S., Hahn, B.-S., Kim, D.-G., 2019. Characterization of a novel antibacterial *N*-acyl amino acid synthase from soil metagenome. Journal of Biotechnology 294, 19–25. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.01.017
- Lee, J.S., Kim, Y.-S., Park, S., Kim, J., Kang, S.-J., Lee, M.-H., Ryu, S., Choi, J.M., Oh, T.-K., Yoon, J.-H., 2011. Exceptional production of both prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1. Applied and Environmental Microbiology 77, 4967–4973. https://doi.org/10.1128/AEM.01986-10
- Leonard, E., Ajikumar, P.K., Thayer, K., Xiao, W.-H., Mo, J.D., Tidor, B., Stephanopoulus, G., Prather, K.L.J., 2010. Combining metabolic and protein engineering of a terpenoid biosynthetic pathway for overproduction and selectivity control. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107, 13654–13659. https://doi.org/10.1073/pnas.1006138107
- Levy, S.B., Marshall, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. Nature Medicine 10, S122–S129. https://doi.org/10.1038/nm1145
- Lewis, K., 2013. Platforms for antibiotic discovery. Nature Reviews Drug Discovery 12, 371–387. https://doi.org/10.1038/nrd3975
- Li, D., Zhang, Q., Zhou, Z., Zhao, F., Lu, W., 2016. Heterologous biosynthesis of triterpenoid dammarenediol-II in engineered *Escherichia coli*. Biotechnology Letters 38, 603–609.

https://doi.org/10.1007/s10529-015-2032-9

- Li, H., Tanikawa, T., Sato, Y., Nakagawa, Y., Matsuyama, T., 2005. *Serratia marcescens* gene required for surfactant serrawettin W1 production encodes putative aminolipid synthetase belonging to nonribosomal peptide synthetase family. Microbiology and Immunology 49, 303–310. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03734.x
- Li, H., Torab, P., Mach, K.E., Surrette, C., England, M.R., Craft, D.W., Thomas, N.J., Liao, J.C., Puleo, C., Wong, P.K., 2019. Adaptable microfluidic system for single-cell pathogen classification and antimicrobial susceptibility testing. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 116, 10270–10279. https://doi.org/10.1073/pnas.1819569116
- Lin, D.M., Koskella, B., Lin, H.C., 2017. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multidrug resistance. World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics 8, 162–173. https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162
- Linke, K.R., 2017. Heterologous production of different terpene classes in *Rhodobacter capsulatus*. Masterarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Liu, G., Zhong, H., Yang, X., Liu, Y., Shao, B., Liu, Z., 2018. Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review. Biotechnology and Bioengineering 115, 796–814. https://doi.org/10.1002/bit.26517
- Liu, J., 2005. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. Journal of Ethnopharmacology 100, 92–94. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.024
- Liu, J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. Journal of Ethnopharmacology 49, 57–68. https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01310-5
- Liu, Y., Ding, S., Shen, J., Zhu, K., 2019a. Nonribosomal antibacterial peptides that target multidrugresistant bacteria. Natural Product Reports 36, 573–592. https://doi.org/10.1039/c8np00031j
- Liu, Y., Li, R., Xiao, X., Wang, Z., 2019b. Antibiotic adjuvants: An alternative approach to overcome multi-drug resistant Gram-negative bacteria. Critical Reviews in Microbiology 45, 301–314. https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1599813
- Lobanovska, M., Pilla, G., 2017. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? Yale Journal of Biology and Medicine 90, 135–145.
- Loeschcke, A., Dienst, D., Wewer, V., Hage-Hülsmann, J., Dietsch, M., Kranz-Finger, S., Hüren, V., Metzger, S., Urlacher, V.B., Gigolashvili, T., Kopriva, S., Axmann, I.M., Drepper, T., Jaeger, K.-E., 2017. The photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 as new hosts for cyclic plant triterpene biosynthesis. PLoS One 12, e0189816. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189816
- Loeschcke, A., Markert, A., Wilhelm, S., Wirtz, A., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., Drepper, T., 2013. TREX: A universal tool for the transfer and expression of biosynthetic pathways in bacteria. ACS synthetic biology 2, 22–33. https://doi.org/10.1021/sb3000657
- Lombard, J., Moreira, D., 2011. Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. Molecular Biology and Evolution 28, 87–99. https://doi.org/10.1093/molbev/msq177
- Lu, J.-J., Dang, Y.-Y., Huang, M., Xu, W.-S., Chen, X.-P., Wang, Y.-T., 2012. Anti-cancer properties of terpenoids isolated from *Rhizoma Curcumae* - A review. Journal of Ethnopharmacology 143, 406–411. https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.009
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., Georgiev, M.I., 2017. Terpenoids, in: Pharmacognosy. Elsevier, pp. 233–266. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1
- Ma, Y.-X., Wang, C.-Y., Li, Y.-Y., Li, J., Wan, Q.-Q., Chen, J.-H., Tay, F.R., Niu, L.-N., 2019. Considerations and caveats in combating ESKAPE pathogens against nosocomial infections. Advanced Science 7, 1901872. https://doi.org/10.1002/advs.201901872
- Machowska, A., Stålsby Lundborg, C., 2019. Drivers of irrational use of antibiotics in europe. International Journal of Environmental Research and Public Health 16, 27. https://doi.org/10.3390/ijerph16010027
- Mackay, M.L., Milne, K., Gould, I.M., 2000. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. International Journal of Antimicrobial Agents 15, 125–129.

https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00149-7

- Madsen, J.K., Giehm, L., Otzen, D.E., 2018. The use of surfactants to solubilise a glucagon analogue. Pharmaceutical Research 35, 235. https://doi.org/10.1007/s11095-018-2494-2
- Magalhães, L., Nitschke, M., 2013. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. Food Control 29, 138–142. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.009
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., Björn, C., 2016. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 6, 194. https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194
- Majik, M.S., Shirodkar, D., Rodrigues, C., D'Souza, L., Tilvi, S., 2014. Evaluation of single and joint effect of metabolites isolated from marine sponges, *Fasciospongia cavernosa* and *Axinella donnani* on antimicrobial properties. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 24, 2863–2866. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.04.097
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M., 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. AMB Express 1, 5. https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5
- Malinowski, A.M., McClarty, B.M., Robinson, C., Spear, W., Sanchez, M., Sparkes, T.C., Brooke, J.S., 2017. Polysorbate 80 and polymyxin B inhibit *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 87, 154–156. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.11.008
- Manikprabhu, D., Li, W.-J., 2015. Antibiotics From discovery to journey, in: Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., Panneerselvam, A. (Eds.), Antimicrobials: Synthetic and Natural Compounds. pp. 1–14. https://doi.org/10.1201/b19224-2
- Marchant, R., Banat, I.M., 2012. Microbial biosurfactants: Challenges and opportunities for future exploitation. Trends in Biotechnology 30, 558–565. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.003
- Marienhagen, J., Bott, M., 2013. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. Journal of Biotechnology 163, 166–178. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.001
- Marshall, B.M., Levy, S.B., 2011. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. Clinical Microbiology Reviews 24, 718–733. https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11
- Martens, E., Demain, A.L., 2017. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. Journal of Antibiotics 70, 520–526. https://doi.org/10.1038/ja.2017.30
- Martin, V.J.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D., Keasling, J.D., 2003. Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. Nature Biotechnology 21, 796–802. https://doi.org/10.1038/nbt833
- Martino, E., Tarantino, M., Bergamini, M., Castelluccio, V., Coricello, A., Falcicchio, M., Lorusso, E., Collina, S., 2019. Artemisinin and its derivatives; ancient tradition inspiring the latest therapeutic approaches against malaria. Future Medicinal Chemistry 11, 1443–1459. https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0337
- Martins, D., Costa, F.T.M., Brocchi, M., Durán, N., 2011. Evaluation of the antibacterial activity of poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. Journal of Nanoparticle Research 13, 355–363. https://doi.org/10.1007/s11051-010-0037-9
- Matsuyama, T., Fujita, M., Yano, I., 1985. Wetting agent produced by *Serratia marcescens*. FEMS Microbiology Letters 28, 125–129.
- Matsuyama, T., Murakami, T., Fujita, M., Fujita, S., Yano, I., 1986. Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. Journal of General Microbiology 132, 865– 875. https://doi.org/10.1099/00221287-132-4-865
- Matsuyama, T., Tanikawa, T., Nakagawa, Y., 2011. Serrawettins and other surfactants produced by *Serratia*, in: Soberón-Chávez, G. (Ed.), Biosurfactants, Microbiology Monographs 20. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 93–120. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_4
- Matuschek, E., Brown, D.F.J., Kahlmeter, G., 2014. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology

laboratories. Clinical Microbiology and Infection 20, O255–O266. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373

- Mazodier, P., Davies, J., 1991. Gene transfer between distantly related bacteria. Annual Review of Genetics 25, 147–171. https://doi.org/10.1146/annurev.ge.25.120191.001051
- Mazumdar, K., Dutta, N.K., Kumar, K.A., Dastidar, S.G., 2005. *In vitro* and *in vivo* synergism between tetracycline and the cardiovascular agent oxyfedrine HCl against common bacterial strains. Biological and Pharmaceutical Bulletin 28, 713–717. https://doi.org/10.1248/bpb.28.713
- Melander, R.J., Melander, C., 2017. The challenge of overcoming antibiotic resistance: An adjuvant approach? ACS Infectious Diseases 3, 559–563. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00071
- Meléndez-Martínez, A.J., Stinco, C.M., Mapelli-Brahm, P., 2019. Skin carotenoids in public health and nutricosmetics: The emerging roles and applications of the UV radiation-absorbing colourless carotenoids phytoene and phytofluene. Nutrients 11, 1093. https://doi.org/10.3390/nu11051093
- Meléndez-Martínez, A.J., 2019. An overview of carotenoids, apocarotenoids, and vitamin A in agrofood, nutrition, health, and disease. Molecular Nutrition & Food Research 63, 1801045. https://doi.org/10.1002/mnfr.201801045
- Meletiadis, J., Pournaras, S., Roilides, E., Walsh, T.J., 2010. Defining fractional inhibitory concentration index cutoffs for additive interactions based on self-drug additive combinations, Monte Carlo simulation analysis, and *in vitro-in vivo* correlation data for antifungal drug combinations against *Aspergillus fumigatus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54, 602– 609. https://doi.org/10.1128/AAC.00999-09
- Mercado, C., Shah, A.R., 1991. United States Patent. Patent Number: 5,013,543. Cosmetic eyeliner formulation.
- Messina, C.M., Faggio, C., Laudicella, V.A., Sanfilippo, M., Trischitta, F., Santulli, A., 2014. Effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) on stress response in the Mediterranean mussel (*Mytilus Galloprovincialis*): Regulatory volume decrease (Rvd) and modulation of biochemical markers related to oxidative stress. Aquatic Toxicology 157, 94–100. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.10.001
- Michel, J.-B., Yeh, P.J., Chait, R., Moellering Jr., R.C., Kishony, R., 2008. Drug interactions modulate the potential for evolution of resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105, 14918–14923. https://doi.org/10.1073/pnas.0800944105
- Mishra, A.K., Alderwick, L.J., Rittmann, D., Tatituri, R.V. V, Nigou, J., Gilleron, M., Eggeling, L., Besra, G.S., 2007. Identification of an $\alpha(1\rightarrow 6)$ mannopyranosyltransferase (MptA), involved in *Corynebacterium glutamicum* lipomanann biosynthesis, and identification of its orthologue in *Mycobacterium tuberculosis*. Molecular Microbiology 65, 1503–1517. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05884.x
- Mishra, M., Muthuprasanna, P., Surya Prabha, K., Sobhita Rani, P., Satish Babu, I.A., Chandiran, I.S., Arunachalam, G., Shalini, S., 2009. Basics and potential applications of surfactants A review. International Journal of PharmTech Research 1, 1354–1365.
- Mo, S., Sydor, P.K., Corre, C., Alhamadsheh, M.M., Stanley, A.E., Haynes, S.W., Song, L., Reynolds, K.A., Challis, G.L., 2008. Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* pathway to 2-undecylpyrrole, a key intermediate in undecylprodiginine and streptorubin B biosynthesis. Chemistry and Biology 15, 137–148. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.11.015
- Mohan, P.K., Nakhla, G., Yanful, E.K., 2006. Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions. Water Research 40, 533–540. https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.030
- Mohr, K.I., 2016. History of antibiotics research, in: How to Overcome the Antibiotic Crisis. pp. 237–272. https://doi.org/10.1007/82_2016_499
- Mokoka, T.A., McGaw, L.J., Mdee, L.K., Bagla, V.P., Iwalewa, E.O., Eloff, J.N., 2013. Antimicrobial activity and cytotoxicity of triterpenes isolated from leaves of *Maytenus undata* (Celastraceae).
 BMC Complementary and Alternative Medicine 13, 111. https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-111

- Monk, G.W., 1957. Spectral absorption of prodigiosin in intact cells. Journal of Bacteriology 74, 71– 74.
- Montaner, B., Navarro, S., Piqué, M., Vilaseca, M., Martinell, M., Giralt, E., Gil, J., Pérez-Tomás, R., 2000. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. British Journal of Pharmacology 131, 585–593. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703614
- Morehead, M.S., Scarbrough, C., 2018. Emergence of global antibiotic resistance. Primary Care: Clinics in Office Practice 45, 467–484. https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.006
- Morita, M., Shibuya, M., Lee, M.-S., Sankawa, U., Ebizuka, Y., 1997. Molecular cloning of pea cDNA encoding cycloartenol synthase and its functional expression in yeast. Biological and Pharmaceutical Bulletin 20, 770–775. https://doi.org/10.1248/bpb.20.770
- Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Kitamoto, D., 2015. Mannosylerythritol lipids: Production and applications. Journal of Oleo Science 64, 133–141. https://doi.org/10.5650/jos.ess14185
- Morrisette, T., Kebriaei, R., Lev, K.L., Morales, S., Rybak, M.J., 2020. Bacteriophage therapeutics: A primer for clinicians on phage-antibiotic combinations. Pharmacotherapy 40, 153–168. https://doi.org/10.1002/phar.2358
- Mortensen, A., 2006. Carotenoids and other pigments as natural colorants. Pure and Applied Chemistry 78, 1477–1491. https://doi.org/10.1351/pac200678081477
- Moser, S., Pichler, H., 2019. Identifying and engineering the ideal microbial terpenoid production host. Applied Microbiology and Biotechnology 103, 5501–5516. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09892-y
- Moses, T., Papadopoulou, K.K., Osbourn, A., 2014. Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 49, 439–462. https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953628
- Mühlen, S., Dersch, Petra, 2015. Anti-virulence strategies to target bacterial infections, in: Stadler, M., Dersch, P. (Eds.), How to Overcome the Antibiotic Crisis. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer, Cham, pp. 147–183. https://doi.org/10.1007/82_2015_490
- Mulani, M.S., Kamble, E.E., Kumkar, S.N., Tawre, M.S., Pardesi, K.R., 2019. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. Frontiers in Microbiology 10, 539. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539
- Munita, J.M., Arias, C.A., 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiology Spectrum 4, VMBF-0016-2015. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
- Murray, J.F., Schraufnagel, D.E., Hopewell, P.C., 2015. Treatment of tuberculosis. A historical perspective. Annals of the American Thoracic Society 12, 1749–1759. https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201509-632PS
- Naing, C., Whittaker, M.A., Mak, J.W., Aung, K., 2015. A systematic review of the efficacy of a single dose artemisinin-naphthoquine in treating uncomplicated malaria. Malaria Journal 14, 392. https://doi.org/10.1186/s12936-015-0919-5
- Nashida, J., Nishi, N., Takahashi, Y., Hayashi, C., Igarashi, M., Takahashi, D., Toshima, K., 2018. Systematic and stereoselective total synthesis of mannosylerythritol lipids and evaluation of their antibacterial activity. The Journal of Organic Chemistry 83, 7281–7289. https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00032
- Nasiri, M.J., Haeili, M., Ghazi, M., Goudarzi, H., Pormohammad, A., Fooladi, A.A.I., Feizabadi, M.M., 2017. New insights in to the intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in mycobacteria. Frontiers in Microbiology 8, 681. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00681
- Naughton, P.J., Marchant, R., Naughton, V., Banat, I.M., 2019. Microbial biosurfactants: Current trends and applications in agricultural and biomedical industries. Journal of Applied Microbiology 127, 12–28. https://doi.org/10.1111/jam.14243
- Ndlovu, T., Rautenbach, M., Vosloo, J.A., Khan, S., Khan, W., 2017. Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. AMB Express 7, 108. https://doi.org/10.1186/s13568-017-0363-8

- Nelson, D.R., 2009. The cytochrome P450 homepage. Human Genomics 4, 59–65. https://doi.org/10.1186/1479-7364-4-1-59
- Nemeth, J., Oesch, G., Kuster, S.P., 2015. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: Systematic review and meta-analysis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 70, 382–395. https://doi.org/10.1093/jac/dku379
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. Journal of Natural Products 79, 629–661. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055
- Niu, Y., Wu, J., Wang, W., Chen, Q., 2019. Production and characterization of a new glycolipid, mannosylerythritol lipid, from waste cooking oil biotransformation by *Pseudozyma aphidis* ZJUDM34. Food Science and Nutrition 7, 937–948. https://doi.org/10.1002/fsn3.880
- Novartis Pharma GmbH, 2011. Gebrauchsinformation: Information für Anwender. Riamet[®] 20 mg/120 mg Tabletten 1–3.
- Novartis Pharma GmbH, 2002. Fachinformation Novartis Pharma Riamet[®] Tabletten 1–3.
- O'Brien, S.M., Claxton, D.F., Crump, M., Faderl, S., Kipps, T., Keating, M.J., Viallet, J., Cheson, B.D., 2009. Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan–Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. Blood 113, 299–305. https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-137943
- Ocampo, P.S., Lázár, V., Papp, B., Arnoldini, M., Abel zur Wiesch, P., Busa-Fekete, R., Fekete, G., Pál, C., Ackermann, M., Bonhoeffer, S., 2014. Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58, 4573–4582. https://doi.org/10.1128/AAC.02463-14
- Odds, F.C., 2003. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 52, 1. https://doi.org/10.1093/jac/dkg301
- Oldfield, E., Lin, F.-Y., 2012. Terpene biosynthesis: Modularity rules. Angewandte Chemie -International Edition 51, 1124–1137. https://doi.org/10.1002/anie.201103110
- Orsi, E., Folch, P.L., Monje-López, V.T., Fernhout, B.M., Turcato, A., Kengen, S.W.M., Eggink, G., Weusthuis, R.A., 2019. Characterization of heterotrophic growth and sesquiterpene production by *Rhodobacter sphaeroides* on a defined medium. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 46, 1179–1190. https://doi.org/10.1007/s10295-019-02201-6
- Ortega, Y.R., Torres, M.P., Tatum, J.M., 2011. Efficacy of levulinic acid Sodium dodecyl sulfate against *Encephalitozoon intestinalis, Escherichia coli* O157:H7, and *Cryptosporidium parvum*. Journal of Food Protection 74, 140–144. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-104
- Osbourn, A.E., Lanzotti, V. (Eds.), 2009. Plant-derived natural products. Synthesis, function and application. Springer-Verlag New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-85498-4
- Otzen, D.E., 2017. Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different? Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1859, 639–649. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.09.024
- Owens, B., 2015. 2015 Nobel Prize goes to antiparasitic drug discoverers. The Lancet 386, 1433. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00455-9
- Özgür, A.Y., 2015. Evaluation of a *Rhodobacter capsulatus nif* promoter-based system for the heterologous expression of therapeutically relevant membrane proteins. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S., 2011. Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. International Journal of Molecular Sciences 12, 633–654. https://doi.org/10.3390/ijms12010633
- Pagès, J.-M., Amaral, L., 2009. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1794, 826–833. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.12.011
- Paik, P.K., Rudin, C.M., Pietanza, M.C., Brown, A., Rizvi, N.A., Takebe, N., Travis, W., James, L., Ginsberg, M.S., Juergens, R., Markus, S., Tyson, L., Subzwari, S., Kris, M.G., Krug, L.M., 2011. A phase II study of obatoclax mesylate, a Bcl-2 antagonist, plus topotecan in relapsed small cell lung cancer. Lung Cancer 74, 481–485. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.05.005

- Pankey, G.A., Sabath, L.D., 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. Clinical Infectious Diseases 38, 864–870. https://doi.org/10.1086/381972
- Papireddy, K., Smilkstein, M., Kelly, J.X., Shweta, Salem, S.M., Alhamadsheh, M., Haynes, S.W., Challis, G.L., Reynolds, K.A., 2011. Antimalarial activity of natural and synthetic prodiginines. Journal of Medicinal Chemistry 54, 5296–5306. https://doi.org/10.1021/jm200543y
- Park, J., Yu, B.J., Choi, J., Woo, H.M., 2019. Heterologous production of squalene from glucose in engineered *Corynebacterium glutamicum* using multiplex CRISPR interference and highthroughput fermentation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 67, 308–319. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05818
- Park, J., Zielinski, M., Magder, A., Tsantrizos, Y.S., Berghuis, A.M., 2017. Human farnesyl pyrophosphate synthase is allosterically inhibited by its own product. Nature Communications 8, 14132. https://doi.org/10.1038/ncomms14132
- Patait, M., Urvashi, N., Rajderkar, M., Kedar, S., Shah, K., Patait, R., 2015. Antibiotic prescription: An oral physician's point of view. Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences 7, 116–120. https://doi.org/10.4103/0975-7406.154434
- Pathan, H., Williams, J., 2012. Basic opioid pharmacology: An update. British Journal of Pain 6, 11 16. https://doi.org/10.1177/2049463712438493
- Pemberton, T.A., Chen, M., Harris, G.G., Chou, W.K.W., Duan, L., Köksal, M., Genshaft, A.S., Cane, D.E., Christianson, D.W., 2017. Exploring the influence of domain architecture on the catalytic function of diterpene synthases. Biochemistry 56, 2010–2023. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00137
- Petchiappan, A., Chatterji, D., 2017. Antibiotic resistance: Current perspectives. ACS Omega 2, 7400–7409. https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01368
- Peters, L., Weidenfeld, I., Klemm, U., Loeschcke, A., Weihmann, R., Jaeger, K.-E., Drepper, T., Ntziachristos, V., Stiel, A.C., 2019. Phototrophic purple bacteria as optoacoustic *in vivo* reporters of macrophage activity. Nature Communications 10, 1191. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09081-5
- Petushkova, E.P., Tsygankov, A.A., 2017. Acetate metabolism in the purple non-sulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus*. Biochemistry (Moscow) 82, 587–605. https://doi.org/10.1134/S0006297917050078
- Pham, T., Loupias, P., Dassonville-Klimpt, A., Sonnet, P., 2019. Drug delivery systems designed to overcome antimicrobial resistance. Medicinal Research Reviews 39, 2343–2396. https://doi.org/10.1002/med.21588
- Pichersky, E., Raguso, R.A., 2018. Why do plants produce so many terpenoid compounds? New Phytologist 220, 692–702. https://doi.org/10.1111/nph.14178
- Piper, B.J., Shah, D.T., Simoyan, O.M., McCall, K.L., Nichols, S.D., 2018. Trends in medical use of opioids in the U.S., 2006–2016. American Journal of Preventive Medicine 54, 652–660. https://doi.org/10.1016/j.amepre.2018.01.034
- Pitera, D.J., Paddon, C.J., Newman, J.D., Keasling, J.D., 2007. Balancing a heterologous mevalonate pathway for improved isoprenoid production in *Escherichia coli*. Metabolic Engineering 9, 193–207. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2006.11.002
- Podolsky, S.H., 2018. The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). Palgrave Communications 4, 124. https://doi.org/10.1057/s41599-018-0181-x
- Pollier, J., Goossens, A., 2012. Oleanolic acid. Phytochemistry 77, 10–15. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.12.022
- Pontesa, D.S., de Araújob, R.S.A., Dantas, N., Scotti, L., Scotti, M.T., de Moura, R.O., Mendonça-Junior, F.J.B., 2018. Genetic mechanisms of antibiotic resistance and the role of antibiotic adjuvants. Current Topics in Medicinal Chemistry 18, 42–74. https://doi.org/10.2174/1568026618666180206095224
- Priya, K.A., Satheesh, S., Ashokkumar, B., Varalakshmi, P., Selvakumar, G., Sivakumar, N., 2013. Antifouling activity of prodigiosin from estuarine isolate of *Serratia marcescens* CMST 07, in:

Velu, R.K. (Ed.), Microbiological Research In Agroecosystem Management. Springer India, pp. 11–21. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1087-0_2

- Prousali, E., Haidich, A.-B., Fontalis, A., Ziakas, N., Brazitikos, P., Mataftsi, A., 2019. Efficacy and safety of interventions to control myopia progression in children: An overview of systematic reviews and meta-analyses. BMC Ophthalmology 19, 106. https://doi.org/10.1186/s12886-019-1112-3
- Qiao, W., Zhou, Z., Liang, Q., Mosongo, I., Li, C., Zhang, Y., 2019. Improving lupeol production in yeast by recruiting pathway genes from different organisms. Scientific Reports 9, 2992. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39497-4
- Rahul, S., Chandrashekhar, P., Hemant, B., Bipinchandra, S., Mouray, E., Grellier, P., Satish, P., 2015.
 In vitro antiparasitic activity of microbial pigments and their combination with phytosynthesized metal nanoparticles. Parasitology International 64, 353–356. https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.05.004
- Rasbery, J.M., Shan, H., LeClair, R.J., Norman, M., Matsuda, S.P.T., Bartel, B., 2007. *Arabidopsis thaliana* squalene epoxidase 1 is essential for root and seed development. Journal of Biological Chemistry 282, 17002–17013. https://doi.org/10.1074/jbc.M611831200
- Ravindran, A., Anishetty, S., Pennathur, G., 2020. Molecular dynamics of the membrane interaction and localisation of prodigiosin. Journal of Molecular Graphics and Modelling 98, 107614. https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2020.107614
- Rebello, S., Asok, A.K., Mundayoor, S., Jisha, M.S., 2014. Surfactants: Toxicity, remediation and green surfactants. Environmental Chemistry Letters 12, 275–287. https://doi.org/10.1007/s10311-014-0466-2
- Rehman, S., Ali, Z., Khan, M., Bostan, N., Naseem, S., 2019. The dawn of phage therapy. Reviews in Medical Virology 29, e2041. https://doi.org/10.1002/rmv.2041
- Rice, L.B., 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. The Journal of Infectious Diseases 197, 1079–1081. https://doi.org/10.1086/533452
- Risin, S.A., Hunter, R.L., Kobak, M., Ariel, B., Vishnevsky, B., Erokhin, V., Demikhova, O., Bocharova, I., Stoops, J.K., 2014. Certain surfactants significantly enhance the activity of antibiotics in the mouse model of MTB and drug resistant MTB infection and effectively remove the bacteria from a pulmonary cavity in human *ex-vivo* study. Annals of Clinical and Laboratory Science 44, 117–122.
- Rivera, F., Benavides, M., Gallego, J., Guillen-Ponce, C., Lopez-Martin, J., Küng, M., 2019. Tumor treating fields in combination with gemcitabine or gemcitabine plus nab-paclitaxel in pancreatic cancer: Results of the PANOVA phase 2 study. Pancreatology 19, 64–72. https://doi.org/10.1016/j.pan.2018.10.004
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Blázquez, J., 2013. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. International Journal of Medical Microbiology 303, 293–297. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.004
- Roell, K.R., Reif, D.M., Motsinger-Reif, A.A., 2017. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy - Perspectives from across disciplines. Frontiers in Pharmacology 8, 158. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00158
- Romanowski, E.G., Lehner, K.M., Martin, N.C., Patel, K.R., Callaghan, J.D., Stella, N.A., Shanks, R.M.Q., 2019. Thermoregulation of prodigiosin biosynthesis by *Serratia marcescens* is controlled at the transcriptional level and requires HexS. Polish Journal of Microbiology 68, 43–50. https://doi.org/10.21307/pjm-2019-005
- Rosety, M., Ordóñez, F.J., Rosety-Rodríguez, M., Rosety, J.M., Rosety, I., Carrasco, C., Ribelles, A., 2001. Acute toxicity of anionic surfactants sodium dodecyl sulphate (SDS) and linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on the fertilizing capability of gilthead (*Sparus aurata* L.) sperm. Histology and Histopathology 16, 839–843. https://doi.org/10.14670/HH-16.839
- Ruzicka, L., 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. Experientia 9, 357–367. https://doi.org/10.1007/BF02167631
- Saha, D., Mukherjee, R., 2019. Ameliorating the antimicrobial resistance crisis: Phage therapy. IUBMB Life 71, 781–790. https://doi.org/10.1002/iub.2010

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487–491. https://doi.org/10.1126/science.239.4839.487
- Sakai-Kawada, F.E., Ip, C.G., Hagiwara, K.A., Awaya, J.D., 2019. Biosynthesis and bioactivity of prodiginine analogs in marine bacteria, *Pseudoalteromonas*: A mini review. Frontiers in Microbiology 10, 1715. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01715
- Samadi, N., Abadian, N., Ahmadkhaniha, R., Amini, F., Dalili, D., Rastkari, N., Safaripour, E., Mohseni, F.A., 2012. Structural characterization and surface activities of biogenic rhamnolipid surfactants from *Pseudomonas aeruginosa* isolate MN1 and synergistic effects against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Folia Microbiologica 57, 501–508. https://doi.org/10.1007/s12223-012-0164-z
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2. Auflage. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sana, S., Datta, S., Biswas, D., Sengupta, D., 2018. Assessment of synergistic antibacterial activity of combined biosurfactants revealed by bacterial cell envelop damage. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1860, 579–585. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.09.027
- Sandoval-Motta, S., Aldana, M., 2016. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: A systems biology perspective. WIREs Systems Biology and Medicine 8, 253–267. https://doi.org/10.1002/wsbm.1335
- Sansinenea, E., Ortiz, A., 2011. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. Biotechnology Letters 33, 1523–1538. https://doi.org/10.1007/s10529-011-0617-5
- Santos, D.K.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Sarubbo, L.A., 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. International Journal of Molecular Sciences 17, 401. https://doi.org/10.3390/ijms17030401
- Sato, T., 2013. Unique biosynthesis of sesquarterpenes (C₃₅ terpenes). Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 77, 1155–1159. https://doi.org/10.1271/bbb.130180
- Sato, T., Konno, H., Tanaka, Y., Kataoka, T., Nagai, K., Wasserman, H.H., Ohkuma, S., 1998. Prodigiosins as a new group of H⁺/Cl⁻ symporters that uncouple proton translocators. Journal of Biological Chemistry 273, 21455–21462. https://doi.org/10.1074/jbc.273.34.21455
- Savoia, D., 2012. Plant-derived antimicrobial compounds: Alternatives to antibiotics. Future Microbiology 7, 979–990. https://doi.org/10.2217/fmb.12.68
- Sawai, S., Saito, K., 2011. Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. Frontiers in Plant Science 2, 25. https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00025

Schempp, F.M., Drummond, L., Buchhaupt, M., Schrader, J., 2018. Microbial cell factories for the production of terpenoid flavor and fragrance compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 66, 2247–2258. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00473

- Schimmer, A.D., Raza, A., Carter, T.H., Claxton, D., Erba, H., DeAngelo, D.J., Tallman, M.S., Goard, C., Borthakur, G., 2014. A multicenter phase I/II study of obatoclax mesylate administered as a 3or 24-hour infusion in older patients with previously untreated acute myeloid leukemia. PLoS One 9, e108694. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108694
- Schloss, P.D., Handelsman, J., 2006. Toward a census of bacteria in soil. PLoS Computational Biology 2, e92. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020092
- Schneider, E.K., Reyes-Ortega, F., Velkov, T., Li, J., 2017. Antibiotic non-antibiotic combinations for combating extremely drug-resistant Gram-negative 'superbugs.' Essays in Biochemistry 61, 115–125. https://doi.org/10.1042/EBC20160058
- Schneider, P.A., Laird, J.R., Doros, G., Gao, Q., Ansel, G., Brodmann, M., Micari, A., Shishehbor, M.H., Tepe, G., Zeller, T., 2019. Mortality not correlated with paclitaxel exposure: An independent patient-level meta-analysis of a drug-coated Balloon. Journal of the American College of Cardiology 73, 2550–2563. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.01.013
- Schrader, J., Bohlmann, J. (Eds.), 2015. Biotechnology of Isoprenoids. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20107-8

Segura, M.J.R., Meyer, M.M., Matsuda, S.P.T., 2000. Arabidopsis thaliana LUP1 converts

oxidosqualene to multiple triterpene alcohols and a triterpene diol. Organic Letters 2, 2257–2259. https://doi.org/10.1021/ol006016b

- Seo, D.Y., Lee, S.R., Heo, J.-W., No, M.-H., Rhee, B.D., Ko, K.S., Kwak, H.-B., Han, J., 2018. Ursolic acid in health and disease. Korean Journal of Physiology and Pharmacology 22, 235–248. https://doi.org/10.4196/kjpp.2018.22.3.235
- Serio, A.W., Keepers, T., Andrews, L., Krause, K.M., 2018. Aminoglycoside revival: Review of a historically important class of antimicrobials undergoing rejuvenation. EcoSal Plus 8. https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018
- Shah, S.K., Bhattarai, A., Chatterjee, S.K., 2013. Applications of surfactants in modern science and technology, in: Adhikari, D., Rai, S.K., Limbu, K.P. (Eds.), Modern Trends in Science and Technology. Nepal Biological Society, Nepal Physical Society (Eastern Chapter), Research Council of Science and Technology, pp. 147–158.
- Shanks, R.M.Q., Lahr, R.M., Stella, N.A., Arena, K.E., Brothers, K.M., Kwak, D.H., Liu, X., Kalivoda, E.J., 2013. A *Serratia marcescens* PigP homolog controls prodigiosin biosynthesis, swarming motility and hemolysis and is regulated by cAMP-CRP and HexS. PLoS One 8, e57634. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057634
- Shekhar, S., Sundaramanickam, A., Balasubramanian, T., 2015. Biosurfactant producing microbes and their potential applications: A review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 45, 1522–1554. https://doi.org/10.1080/10643389.2014.955631
- Sheng, H., Sun, H., 2011. Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: A multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. Natural Product Reports 28, 543–593. https://doi.org/10.1039/c0np00059k
- Sheng, J.J., 2011. Surfactant Flooding, in: Modern Chemical Enhanced Oil Recovery. Elsevier, pp. 239– 335. https://doi.org/10.1016/B978-1-85617-745-0.00007-3
- Shin, J., Prabhakaran, V.-S., Kim, K.-S., 2018. The multi-faceted potential of plant-derived metabolites as antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens. Microbial Pathogenesis 116, 209–214. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.043
- Shu, Q., Niu, Y., Zhao, W., Chen, Q., 2019. Antibacterial activity and mannosylerythritol lipids against vegetative cells and spores of *Bacillus cereus*. Food Control 106, 106711. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106711
- Sierra, J.M., Fusté, E., Rabanal, F., Vinuesa, T., Viñas, M., 2017. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. Expert Opinion on Biological Therapy 17, 663– 676. https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1315402
- Silhavy, T.J., Kahne, D., Walker, S., 2010. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2, a000414. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414
- Siliakus, M.F., van der Oost, J., Kengen, S.W.M., 2017. Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. Extremophiles 21, 651–670. https://doi.org/10.1007/s00792-017-0939-x
- Silver, L.L., 2011. Challenges of antibacterial discovery. Clinical Microbiology Reviews 24, 71–109. https://doi.org/10.1128/CMR.00030-10
- Simon, R., Priefer, U., Pühler, A., 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Bio/Technology 1, 784–791. https://doi.org/10.1038/nbt1183-784
- Singh, B., Sharma, R.A., 2015. Plant terpenes: Defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. 3 Biotech 5, 129–151. https://doi.org/10.1007/s13205-014-0220-2
- Singh, N., Yeh, P.J., 2017. Suppressive drug combinations and their potential to combat antibiotic resistance. The Journal of Antibiotics 70, 1033–1042. https://doi.org/10.1038/ja.2017.102
- Singh, S.B., Barrett, J.F., 2006. Empirical antibacterial drug discovery Foundation in natural products. Biochemical Pharmacology 71, 1006–1015. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.016
- Slezakova, S., Ruda-Kucerova, J., 2017. Anticancer activity of artemisinin and its derivatives. Anticancer Research 37, 5995–6003. https://doi.org/10.21873/anticanres.12046
- Sonawane, S., Pal, S., Tayade, S., Bisht, N., 2015. Application of surfactant in various fields.

International Journal of Scientific & Engineering Research 6, 30–32.

- Sorger-Herrmann, U., 2006. Analyse des Mechanismus der Phosphatregulation in *Corynebacterium glutamicum*. Schriften des Forschungszentrums Jülich. Reihe Lebenswissenschaften /Life Sciences 33. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Sotgiu, G., Centis, R., D'ambrosio, L., Battista Migliori, G., 2015. Tuberculosis treatment and drug regimens. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 5, a017822. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017822
- Sotirova, A. V, Spasova, D.I., Galabova, D.N., Karpenko, E., Shulga, A., 2008. Rhamnolipidbiosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. Current Microbiology 56, 639–644. https://doi.org/10.1007/s00284-008-9139-3
- Spoeckner, S., Wray, V., Nimtz, M., Lang, S., 1999. Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. Applied Microbiology and Biotechnology 51, 33–39. https://doi.org/10.1007/s002530051359
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. International Journal of Systematic Bacteriology 47, 479– 491. https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-479
- Steele, T.M., Talbott, G.C., Sam, A., Tepper, C.G., Ghosh, P.M., Vinall, R.L., 2019. Obatoclax, a BH3 mimetic, enhances cisplatin-induced apoptosis and decreases the clonogenicity of muscle invasive bladder cancer cells via mechanisms that involve the inhibition of pro-survival molecules as well as cell cycle regulators. International Journal of Molecular Sciences 20, 1285. https://doi.org/10.3390/ijms20061285
- Stella, N.A., Lahr, R.M., Brothers, K.M., Kalivoda, E.J., Hunt, K.M., Kwak, D.H., Liu, X., Shanks, R.M.Q., 2015. Serratia marcescens cyclic AMP receptor protein controls transcription of EepR, a novel regulator of antimicrobial secondary metabolites. Journal of Bacteriology 197, 2468–2478. https://doi.org/10.1128/JB.00136-15
- Stern, A.L., Van der Verren, S.E., Kanchugal P, S., Näsvall, J., Gutiérrez-de-Terán, H., Selmer, M., 2018. Structural mechanism of AadA, a dual-specificity aminoglycoside adenylyltransferase from *Salmonella enterica*. The Journal of Biological Chemistry 293, 11481–11490. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003989
- Stokes, J.M., MacNair, C.R., Ilyas, B., French, S., Côté, J.-P., Bouwman, C., Farha, M.A., Sieron, A.O., Whitfield, C., Coombes, B.K., Brown, E.D., 2017. Pentamidine sensitizes Gram-negative pathogens to antibiotics and overcomes acquired colistin resistance. Nature Microbiology 2, 17028. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.28

Stoltz, E.I., 1999. United States Patent. Patent Number: 5,902,789. Nasal administration of drugs.

- Strnad, H., Lapidus, A., Paces, J., Ulbrich, P., Vlcek, C., Paces, V., Haselkorn, R., 2010. Complete genome sequence of the photosynthetic purple nonsulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus* SB 1003. Journal of Bacteriology 192, 3545–3546. https://doi.org/10.1128/JB.00366-10
- Su, C., Xiang, Z., Liu, Y., Zhao, X., Sun, Y., Li, Z., Li, L., Chang, F., Chen, T., Wen, X., Zhou, Y., Zhao, F., 2016. Analysis of the genomic sequences and metabolites of *Serratia surfactantfaciens* sp. nov. YD25T that simultaneously produces prodigiosin and serrawettin W2. BMC Genomics 17, 865. https://doi.org/10.1186/s12864-016-3171-7
- Subramaniam, S., Ravi, V., Sivasubramanian, A., 2014. Synergistic antimicrobial profiling of violacein with commercial antibiotics against pathogenic micro-organisms. Pharmaceutical Biology 52, 86–90. https://doi.org/10.3109/13880209.2013.815634
- Suryawanshi, R.K., Patil, C.D., Borase, H.P., Salunke, B.K., Patil, S. V., 2014. Studies on production and biological potential of prodigiosin by *Serratia marcescens*. Applied Biochemistry and Biotechnology 173, 1209–1221. https://doi.org/10.1007/s12010-014-0921-3
- Takemura, M., Tanaka, R., Misawa, N., 2017. Pathway engineering for the production of β-amyrin and cycloartenol in *Escherichia coli* - A method to biosynthesize plant-derived triterpene skeletons in *E. coli*. Applied Microbiology and Biotechnology 101, 6615–6625. https://doi.org/10.1007/s00253-017-8409-z
- Tang, K.-H., Tang, Y.J., Blankenship, R.E., 2011. Carbon metabolic pathways in phototrophic bacteria

and their broader evolutionary implications. Frontiers in Microbiology 2, 165. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00165

- Tanikawa, T., Nakagawa, Y., Matsuyama, T., 2006. Transcriptional downregulator hexS controlling prodigiosin and serrawettin W1 biosynthesis in *Serratia marcescens*. Microbiology and Immunology 50, 587–596. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03833.x
- Tansakul, P., Shibuya, M., Kushiro, T., Ebizuka, Y., 2006. Dammarenediol-II synthase, the first dedicated enzyme for ginsenoside biosynthesis, in *Panax ginseng*. FEBS Letters 580, 5143–5149. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.044
- Teichmann, B., Liu, L., Schink, K.O., Bölker, M., 2010. Activation of the ustilagic acid biosynthesis gene cluster in *Ustilago maydis* by the C₂H₂ zinc finger transcription factor Rua1. Applied and Environmental Microbiology 76, 2633–2640. https://doi.org/10.1128/AEM.02211-09
- Tetali, S.D., 2019. Terpenes and isoprenoids: A wealth of compounds for global use. Planta 249, 1–8. https://doi.org/10.1007/s00425-018-3056-x
- Theuretzbacher, U., 2013. Global antibacterial resistance: The never-ending story. Journal of Global Antimicrobial Resistance 1, 63–69. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2013.03.010
- Thies, S., Rausch, S.C., Kovacic, F., Schmidt-Thaler, A., Wilhelm, S., Rosenau, F., Daniel, R., Streit, W., Pietruszka, J., Jaeger, K.-E., 2016. Metagenomic discovery of novel enzymes and biosurfactants in a slaughterhouse biofilm microbial community. Scientific Reports 6, 27035. https://doi.org/10.1038/srep27035
- Thies, S., Santiago-Schübel, B., Kovačić, F., Rosenau, F., Hausmann, R., Jaeger, K.-E., 2014. Heterologous production of the lipopeptide biosurfactant serrawettin W1 in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology 181, 27–30. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.03.037
- Thimmappa, R., Geisler, K., Louveau, T., O'Maille, P., Osbourn, A., 2014. Triterpene biosynthesis in plants. Annual Review of Plant Biology 65, 225–257. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120229
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S.S.S., Vijayakumar, R., 2018. An introductory chapter: Secondary metabolites, in: Vijayakumar, R., Raja, S.S.S. (Eds.), Secondary Metabolites - Sources and Applications. InTech. https://doi.org/10.5772/intechopen.79766
- Thomson, N.R., Crow, M.A., McGowan, S.J., Cox, A., Salmond, G.P.C., 2000. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. Molecular Microbiology 36, 539–556. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01872.x
- Tiso, T., Thies, S., Müller, M., Tsvetanova, L., Carraresi, L., Bröring, S., Jaeger, K.-E., Blank, L.M., 2017. Rhamnolipids: Production, performance, and application, in: Lee, S.Y. (Ed.), Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Cham, pp. 587–622. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50436-0_388
- Tomlinson, A., Demeule, B., Lin, B., Yadav, S., 2015. Polysorbate 20 degradation in biopharmaceutical formulations: Quantification of free fatty acids, characterization of particulates, and insights into the degradation mechanism. Molecular Pharmaceutics 12, 3805–3815. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00311
- Trevor, A.J., Katzung, B.G., Kruidering-Hall, M., 2015. Katzung & Trevor's Pharmacology examination and board review, 11th Edition. McGraw-Hill Education.
- Troost, K., 2017. *Rhodobacter capsulatus* als alternativer Wirt zur Produktion pflanzlicher Sesquiterpenoide. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Troost, K., Loeschcke, A., Hilgers, F., Özgür, A.Y., Weber, T.M., Santiago-Schübel, B., Svensson, V., Hage-Hülsmann, J., Habash, S.S., Grundler, F.M.W., Schleker, A.S.S., Jaeger, K.-E., Drepper, T., 2019. Engineered *Rhodobacter capsulatus* as a phototrophic platform organism for the synthesis of plant sesquiterpenoids. Frontiers in Microbiology 10, 1998. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01998
- Tsao, S.-W., Rudd, B.A.M., He, X.-G., Chang, C.-J., Floss, H.G., 1985. Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives. The Journal of Antibiotics 38, 128–131. https://doi.org/10.7164/antibiotics.38.128

- Tse, B.N., Adalja, A.A., Houchens, C., Larsen, J., Inglesby, T. V, Hatchett, R., 2017. Challenges and opportunities of nontraditional approaches to treating bacterial infections. Clinical Infectious Diseases 65, 495–500. https://doi.org/10.1093/cid/cix320
- Turner, N.A., Sharma-Kuinkel, B.K., Maskarinec, S.A., Eichenberger, E.M., Shah, P.P., Carugati, M., Holland, T.L., Fowler Jr, V.G., 2019. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An overview of basic and clinical research. Nature Reviews Microbiology 17, 203–218. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4
- Tyers, M., Wright, G.D., 2019. Drug combinations: A strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. Nature Reviews Microbiology 17, 141–155. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0141-x
- URSAPHARM Arzneimittel GmbH, 2014. Gebrauchsinformation: Information für den Anwender. Atropin-POS[®] 0,5 % Augentropfen 1–4.
- VAAM, 2016. Mikrobe des Jahres 2016 *Streptomyces*: Nobelpreisträger und Recycling-Profi. Pressemitteilung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie.
- Vaishnav, P., Demain, A.L., 2011. Unexpected applications of secondary metabolites. Biotechnology Advances 29, 223–229. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.006
- Ventola, C.L., 2015. The antibiotic resistance crisis Part 1: Causes and threats. Pharmacy and Therapeutics 40, 277–283.
- Vijay, S., Nair, R.R., Sharan, D., Jakkala, K., Mukkayyan, N., Swaminath, S., Pradhan, A., Joshi, N. V., Ajitkumar, P., 2017. Mycobacterial cultures contain cell size and density specific subpopulations of cells with significant differential susceptibility to antibiotics, oxidative and nitrite stress. Frontiers in Microbiology 8, 463. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00463
- Vijayakuma, S., Saravanan, V., 2015. Biosurfactants-types, sources and applications. Research Journal of Microbiology 10, 181–192. https://doi.org/10.3923/jm.2015.181.192
- Visser, B.J., Wieten, R.W., Kroon, D., Nagel, I.M., Bélard, S., van Vugt, M., Grobusch, M.P., 2014. Efficacy and safety of artemisinin combination therapy (ACT) for non-falciparum malaria: A systematic review. Malaria Journal 13, 463. https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-463
- von Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S., Häbich, D., 2006. Antibacterial natural products in medicinal chemistry Exodus or revival? Angewandte Chemie International Edition 45, 5072–5129. https://doi.org/10.1002/anie.200600350
- Vrdoljak, J., Boban, T., Petrić Miše, B., Boraska Jelavić, T., Bajić, Ž., Tomić, S., Vrdoljak, E., 2019. Efficacy and safety of TC dose-dense chemotherapy as first-line treatment of epithelial ovarian cancer: A single-institution retrospective cohort study. Japanese Journal of Clinical Oncology 49, 347–353. https://doi.org/10.1093/jjco/hyz011
- Vuillemin, P., 1889. Antibiose et symbiose. Association Francaise pour l'Avancement des Sciences 2, 525–543.
- Waksman, S.A., 1947. What is an antibiotic or an antibiotic substance? Mycologia 39, 565–569. https://doi.org/10.2307/3755196
- Walsh, C., 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature 406, 775–781. https://doi.org/10.1038/35021219
- Walsh, C.T., Wencewicz, T.A., 2014. Prospects for new antibiotics: A molecule-centered perspective. The Journal of Antibiotics 67, 7–22. https://doi.org/10.1038/ja.2013.49
- Walsh, V., Goodman, J., 2002. From taxol to Taxol[®]: The changing identities and ownership of an anticancer drug. Medical Anthropology 21, 307–336. https://doi.org/10.1080/01459740214074
- Walvekar, P., Gannimani, R., Govender, T., 2019. Combination drug therapy *via* nanocarriers against infectious diseases. European Journal of Pharmaceutical Sciences 127, 121–141. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.10.017
- Wang, C.-M., Jhan, Y.-L., Tsai, S.-J., Chou, C.-H., 2016. The pleiotropic antibacterial mechanisms of ursolic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Molecules 21, 884. https://doi.org/10.3390/molecules21070884
- Wang, F., Luo, H., Song, G., Liu, C., Wang, J., Xu, J., Su, X., Ma, X., 2013. Prodigiosin found in *Serratia* marcescens y2 initiates phototoxicity in the cytomembrane. Electronic Journal of Biotechnology

16. https://doi.org/10.2225/vol16-issue4-fulltext-7

- Wang, G., 2010. Antimicrobial peptides: Discovery, design and novel therapeutic strategies. CABI Publishing. https://doi.org/10.1079/9781845936570.0000
- Wang, X., Tao, J., Wei, D., Shen, Y., Tong, W., 2004. Development of an adsorption procedure for the direct separation and purification of prodigiosin from culture broth. Biotechnology and Applied Biochemistry 40, 277–280. https://doi.org/10.1042/BA20030210
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H.C., 2012.
 Mechanisms of plant defense against insect herbivores. Plant Signaling & Behavior 7, 1306– 1320. https://doi.org/10.4161/psb.21663
- Warra, A.A., 2012. Current trends and future application of sodium dodecyl sulphate in biotechnology and surfactant chemistry. Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology 1, 1–5.
- Wasserman, H.H., Keggi, J.J., McKeon, J.E., 1962. The structure of serratamolide. Journal of the American Chemical Society 84, 2978–2982. https://doi.org/10.1021/ja00874a028
- Wasserman, H.H., Keggi, J.J., McKeon, J.E., 1961. Serratamolide, a metabolic product of *Serratia*. Journal of the American Chemical Society 83, 4107–4108. https://doi.org/10.1021/ja01480a046
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D., 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? Archives of Microbiology 176, 386–390. https://doi.org/10.1007/s002030100345
- Weathers, P.J., Arsenault, P.R., Covello, P.S., McMickle, A., Teoh, K.H., Reed, D.W., 2011. Artemisinin production in *Artemisia annua*: Studies *in planta* and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases. Phytochemistry Reviews: Proceedings of the Phytochemical Society of Europe 10, 173–183. https://doi.org/10.1007/s11101-010-9166-0
- Weaver, P.F., Wall, J.D., Gest, H., 1975. Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. Archives of Microbiology 105, 207–216. https://doi.org/10.1007/BF00447139
- Weber, T.M., 2016. Produktion des Triterpens Squalen und verschiedener Derivate in *Rhodobacter capsulatus*. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Wei, J.H., Yin, X., Welander, P. V., 2016. Sterol synthesis in diverse bacteria. Frontiers in Microbiology 7, 990. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00990
- White, A.R., Kaye, C., Poupard, J., Pypstra, R., Woodnutt, G., Wynne, B., 2004. Augmentin[®] (amoxicillin/clavulanate) in the treatment of community-acquired respiratory tract infection: A review of the continuing development of an innovative antimicrobial agent. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 53, i3–i20. https://doi.org/10.1093/jac/dkh050
- WHO, 2019. World Health Organization model list of essential medicines application, 21st list. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO, 2015. Guidelines for the treatment of malaria Third edition. World Health Organization. ISBN 978 92 4 154912 7.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E.W., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols 3, 163– 175. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521
- Williamson, N.R., Fineran, P.C., Gristwood, T., Chawrai, S.R., Leeper, F.J., Salmond, G.P.C., 2007. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. Future Microbiology 2, 605–618. https://doi.org/10.2217/17460913.2.6.605
- Williamson, N.R., Fineran, P.C., Leeper, F.J., Salmond, G.P.C., 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. Nature Reviews Microbiology 4, 887–899. https://doi.org/10.1038/nrmicro1531
- Williamson, N.R., Fineran, P.C., Ogawa, W., Woodley, L.R., Salmond, G.P.C., 2008. Integrated regulation involving quorum sensing, a two-component system, a GGDEF/EAL domain protein and a post-transcriptional regulator controls swarming and RhIA-dependent surfactant biosynthesis in *Serratia*. Environmental Microbiology 10, 1202–1217. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01536.x
- Windeln, L.M., 2016. Kombinatorische antimikrobielle Effekte von Acyltyrosin mit etablierten

Antibiotika. Bachelorarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Withers, S.T., Keasling, J.D., 2007. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. Applied Microbiology and Biotechnology 73, 980–990. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0593-1
- Wolosik, K., Knaś, M., Zalewska, A., Niczyporuk, M., Przystupa, A.W., 2013. The importance and perspective ol plant-based squalene in cosmetology. Journal of Cosmetic Science 64, 59–65.
- Wong, J., Rios-Solis, L., Keasling, J.D., 2017. Microbial Production of Isoprenoids, in: Lee, S.Y. (Ed.), Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31421-1_219-2
- Woodruff, H.B., 2014. Selman A. Waksman, Winner of the 1952 Nobel Prize for physiology or medicine. Applied and Environmental Microbiology 80, 2–8. https://doi.org/10.1128/AEM.01143-13
- Woolhouse, M., Ward, M., van Bunnik, B., Farrar, J., 2015. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 370, 20140083. https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083
- Wray, R., Iscla, I., Gao, Y., Li, H., Wang, J., Blount, P., 2016. Dihydrostreptomycin directly binds to, modulates, and passes through the MscL channel pore. PLOS Biology 14, e1002473. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002473
- Wright, G.D., 2005. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. Advanced Drug Delivery Reviews 57, 1451–1470. https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002
- Wu, P.-C., Chuang, M.-N., Choi, J., Chen, H., Wu, G., Ohno-Matsui, K., Jonas, J.B., Cheung, C.M.G., 2019. Update in myopia and treatment strategy of atropine use in myopia control. Eye 33, 3–13. https://doi.org/10.1038/s41433-018-0139-7
- Xiang, T., Shibuya, M., Katsube, Y., Tsutsumi, T., Otsuka, M., Zhang, H., Masuda, K., Ebizuka, Y., 2006. A new triterpene synthase from *Arabidopsis thaliana* produces a tricyclic triterpene with two hydroxyl groups. Organic Letters 8, 2835–2838. https://doi.org/10.1021/ol060973p
- Yamashita, M., Nakagawa, Y., Li, H., Matsuyama, T., 2001. Silica gel-dependent production of prodigiosin and serrawettins by *Serratia marcescens* in a liquid culture. Microbes and Environments 16, 250–254.
- Yeh, P.J., Hegreness, M.J., Aiden, A.P., Kishony, R., 2009. Drug interactions and the evolution of antibiotic resistance. Nature Reviews Microbiology 7, 460–466. https://doi.org/10.1038/nrmicro2133
- Yip, C.-H., Yarkoni, O., Ajioka, J., Wan, K.-L., Nathan, S., 2019. Recent advancements in high-level synthesis of the promising clinical drug, prodigiosin. Applied Microbiology and Biotechnology 103, 1667–1680. https://doi.org/10.1007/s00253-018-09611-z
- You, Z., Zhang, S., Liu, X., Zhang, J., Wang, Y., Peng, Y., Wu, W., 2019. Insights into the anti-infective properties of prodiginines. Applied Microbiology and Biotechnology 103, 2873–2887. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09641-1
- Yu, M., Liu, Z., Zeng, G., Zhong, H., Liu, Y., Jiang, Y., Li, M., He, X., He, Y., 2015. Characteristics of mannosylerythritol lipids and their environmental potential. Carbohydrate Research 407, 63– 72. https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.12.012
- Zacchino, S.A., Butassi, E., Di Liberto, M., Raimondi, M., Postigo, A., Sortino, M., 2017. Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. Phytomedicine 37, 27–48. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.10.018
- Zaman, S. Bin, Hussain, M.A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K.T., Hossain, N., 2017. A review on antibiotic resistance: Alarm bells are ringing. Cureus 9, e1403. https://doi.org/10.7759/cureus.1403
- Zhao, L., Chang, W., Xiao, Y., Liu, H., Liu, P., 2013. Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. Annual Review of Biochemistry 82, 497–530. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052010-100934
- Zhao, T., Zhao, P., Doyle, M.P., 2009. Inactivation of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on

lettuce and poultry skin by combinations of levulinic acid and sodium dodecyl sulfate. Journal of Food Protection 72, 928–936. https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.5.928

Anhang

Abbildungen des Anhangs

Anhang-Abbildung 1:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und einem Leervektor-Extrakt des Produktionswirts <i>P. putida</i> im Agardiffusionstest gegen <i>C. glutamicum</i>
Anhang-Abbildung 2:	Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und Rohextrakt des <i>U. maydis</i> -Stamms UMa2112 im Agardiffusionstest gegen <i>C. glutamicum</i> 222
Anhang-Abbildung 3:	Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 224
Anhang-Abbildung 4:	Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 225
Anhang-Abbildung 5:	Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 6057 226
Anhang-Abbildung 6:	Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Anhang-Abbildung 7:	Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 228
Anhang-Abbildung 8:	Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen <i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880

Tabellen des Anhangs

Anhang-Tabelle 1:	Physikochemische Eigenschaften und gemessene antibakterielle Effekte der eingesetzten Tenside. 223
Anhang-Tabelle 2:	Konvertierungstabelle der zur MIC-Bestimmung verwendeten Stoff- mengenkonzentrationen diverser Prodiginine in Massenkonzentrationen 230
Anhang-Tabelle 3:	In Massenkonzentrationen umgerechnete minimale Hemmkonzentra- tionen von Prodigiosin und diversen Prodigiosin-Derivaten gegen humane Modellpathogene
Anhang-Tabelle 4:	Codon-optimierte Sequenz der bakteriellen Cycloartenolsynthase aus S. aurantiaca DW4/3-1
Anhang-Tabelle 5:	Codon-optimierte Sequenz der bakteriellen Cycloartenolsynthase aus S. aurantiaca Sg a15
Anhang-Tabelle 6:	Codon-optimierte Sequenz der pflanzlichen Cycloartenolsynthase aus A. thaliana
Anhang-Tabelle 7:	Codon-optimierte Sequenz der pflanzlichen Squalensynthase aus A. thaliana
Anhang-Tabelle 8:	Codon-optimierte Sequenz der pflanzlichen Squalenepoxidase aus A. thaliana
Anhang-Tabelle 9:	Codon-optimierte Sequenz der pflanzlichen Lupeolsynthase aus A. thaliana
Anhang-Tabelle 10:	Cycloartenolmengen in <i>R. capsulatus</i>



Fotodokumentation

Anhang-Abbildung 1: Kombinierte antibakterielle Wirkung von Prodigiosin und einem Leervektor-Extrakt des Produktionswirts *P. putida* im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum*.

Die Kombination von Prodigiosin mit dem Leervektor-Extrakt im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum* diente zur Kontrolle. Bei dem Leervektor handelte es sich um das Grundgerüst des Plasmids, auf welchem das Expressionsplasmid für die heterologe Produktion von Serrawettin W1 in *P. putida* beruht. Damit diente dieser Kontrollversuch dem Ausschluss von kombinierten Effekten, welche auf Substanzen aus *P. putida* und nicht auf Serrawettin W1 zurückgehen. Da keine kombinatorisch antibakteriellen Effekte zu erkennen waren, kann davon ausgegangen werden, dass die verstärkten gemeinsamen Effekte, welche in Abbildung 17 gezeigt sind, auf Serrawettin W1 zurückzuführen sind. Bei den gezeigten Daten handelt es sich um eine Einfachbestimmung, da ähnliche Experimente mit dem gleichen Ergebnis bereits in einer dieser Arbeit vorangegangenen Masterarbeit (Hage-Hülsmann, 2015) generiert wurden. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.



Um ausschließen zu können, dass es sich bei der beobachteten kombinatorischen antibakteriellen Wirkung von Prodigiosin und MEL-Rohextrakt um einen Effekt, welcher auf mitextrahierte Bestandteile des Produktionswirts *U. maydis* zurückzuführen ist, handelt, wurde hier ein Extrakt der *U. maydis*-Mutante UMa2112 in Kombination mit Prodigiosin getestet. Die Mutante ist in den Genen *rua1* und *cyp1* deletiert, wodurch keine MEL und Ustilaginsäure in dieser gebildet werden. (A) Prodigiosin wurde zusammen mit dem UMa2112-Extrakt in den Konzentrationen 0, 10, 25, 50 µg pro Celluloseblättchen im Agardiffusionstest gegen *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Die mit den Stoffen benetzten Celluloseblättchen wurden auf einen *C. glutamicum*-Ausstrich auf einer LB-Agarplatte aufgelegt und nach der Bebrütung bei 30 °C für 20 h fotodokumentiert. In der Abbildung ist ein repräsentatives Bild aus einer Dreifachbestimmung gezeigt. (B) Die Größen der Hemmhöfe sind in mm als Durchmesser minus der Größe der Filterblättchen von 6 mm angegeben. Die Mittelwerte der Größen der Hemmhöfe einer Dreifachbestimmung sind zusammen mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. In grau hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche kleiner 1 mm sind. Farbig hinterlegte Kästchen zeigen Hemmhofgrößen, welche größer oder gleich 1 mm sind. Anhang-Tabelle 1: Physikochemische Eigenschaften und gemessene antibakterielle Effekte der eingesetzten Tenside. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2018.

Tensid ¹	Gruppe	Molekular- gewicht [Da] ²	CMC ³	Stoff, der im Test eingesetzt wurde ⁴	beobachteter, antibakterieller Effekt ⁵			
synthetisches Tensid								
Triton X-100 (Octylphenol- ethoxylat)	nicht- ionisch	625	0,2 - 0,9 mM ^a 0,012 - 0,056 % (in Wasser)	kommerziell	keine alleinige Wirkung, synergistischer Effekt mit Prodigiosin (konzentrations- abhängig)			
SDS (engl.: sodium dodecyl sulfate)	anionisch	288	7 - 10 mMª 0,2 - 0,29 % (in Wasser)	kommerziell	alleinige Wirkung, synergistischer Effekt mit Prodigiosin (konzentrations- abhängig)			
Tween 20 (Polysorbat 20)	nicht- ionisch	1228	0,06 mMª 0,0072 % (in Wasser)	kommerziell	keine alleinige Wirkung, synergistischer Effekt mit Prodigiosin (konzentrations- unabhängig)			
Biotenside								
Serrawettin W1 (Serratia marcescens)	nicht- 515 ionisch (C10, C10) unbekannt Rohextrakt aus P. putido		Rohextrakt aus <i>P. putida</i>	keine alleinige Wirkung, synergistischer Effekt mit Prodigiosin (konzentrations- abhängig)				
Rhamnolipide (Pseudomonas aeruginosa)	anionisch	679 Di-Rhamnolipid (C10, C10)	0,0005 - 0,02 % ^b (abhängig von Bedingungen und Kongeneren)	kommerziell aus <i>P. aeruginosa</i>	alleinige Wirkung, synergistischer Effekt mit Prodigiosin (konzentrations- abhängig)			
N-Myristoyl- tyrosin (unbekannt)	anionisch	392	2,9 mM ^c 0,114 % (in 0,1 M NaOH)	chemische Synthese	alleinige Wirkung, synergistischer Effekt mit Prodigiosin (konzentrations- abhängig)			

¹ Verbindungen mit chemischer Bezeichnung (synthetische Tenside) oder natürlichem Produzent (Biotensid).

² Das Molekulargewicht von Triton X-100 ist als Durchschnittswert bezogen auf ein Molekül mit 9-10 Ethylenoxid-Einheiten angegeben. Von Biotensiden liegen in der Natur verschiedene Kongenere mit unterschiedlichen Hydroxyfettsäuren vor. Im Fall der Rhamnolipide variieren des Weiteren die Zuckerreste. Das angegebene Molekulargewicht bezieht sich auf eines der häufigsten Kongenere. Die dazugehörigen Kettenlängen der Hydroxyfettsäuren sind in Klammern aufgeführt.

³ Die gezeigten CMC (engl.: *critical micellar concentrations*) wurden im Rahmen anderer Studien determiniert. Die genaue Übertragbarkeit der CMC-Werte auf die Verbindungen in den hier vorliegenden Experimenten kann nicht garantiert werden, da CMC stark von den jeweiligen Testbedingungen abhängen. ^a Sigma Aldrich "detergent_selection_table", ^b (Tiso *et al.*, 2017), ^c (Thies *et al.*, 2016).

⁴ Herkunft der in dieser Arbeit eingesetzten Verbindungen.

⁵ Zusammengefasste Ergebnisse der Agardiffusionstests, in denen jeweils ein Tensid zusammen mit Prodigiosin mit der *Checkerboard*-Anordnung gegen *C. glutamicum* eingesetzt wurde.



Anhang-Abbildung 3: Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen Staphylococcus aureus ATCC 25923.



Anhang-Abbildung 4: Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen Corynebacterium glutamicum ATCC 13032.



Anhang-Abbildung 5: Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen Enterococcus faecium ATCC 6057.



Anhang-Abbildung 6: Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



Anhang-Abbildung 7: Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen Staphylococcus epidermidis ATCC 12228.



Anhang-Abbildung 8: Minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und verschiedenen Prodigiosin-Derivaten gegen Serratia marcescens ATCC 13880.

Anhang-Tabelle 2: Konvertierungstabelle der zur MIC-Bestimmung verwendeten Stoffmengenkonzentrationen diverser Prodiginine in Massenkonzentrationen.

Mittels der auf die Hydrochloride bezogenen Molekulargewichte der verwendeten Prodiginine (vgl. Abbildung 29) wurden die in den Mikrodilutionstests verwendeten Stoffmengenkonzentrationen (μ M) in äquivalente Angaben in Massenkonzentrationen (μ g mL⁻¹) umgerechnet. Diese Angaben erlauben einen leichteren Vergleich mit anderen in der Literatur üblicherweise in Massenkonzentrationen (μ g mL⁻¹ bzw. mg L⁻¹) angegebenen MIC-Werten sowie den vorherigen Experimenten dieser Arbeit. Rot: verwendete Prodigiosinmengen in μ g mL⁻¹; schwarz: verwendete Prodigiosin-Derivat-Konzentration in μ g mL⁻¹ zu der entsprechenden Prodigiosin-Referenzmenge in μ g mL⁻¹.

Stoff	A:	В:	C:	D:	E:	F:	G:	H:
μМ	Prodigiosin Hydrochlorid	Prodiginin SNY_024_01	Prodiginin _MS036	DKL_3.3 _P_2	Prodiginin SNY_028_01	Prodiginin SNY_021_01	Prodiginin SNY_022_01	Prodiginin _015_P.6_01
25,6	10,121 8,136 Δ 1,98		9,162 ∆ 0,959	8,444 ∆ 1,677	7,777 ∆ 2,344	8,854 8,136 Δ 1,267 Δ 1,985		9,573 ∆ 0,548
12,8	5,060	4,068 ∆ 0,992	4,581 ∆ 0,480	4,222 ∆ 0,839	3,889 ∆ 1,172	4,427 ∆ 0,633	4,068 ∆ 0,992	4,786 ∆ 0,274
6,4	2,530	2,034 ∆ 0,496	2,290 ∆ 0,240	2,111 ∆ 0,419	1,944 ∆ 0,586	2,214 ∆ 0,317	2,034 ∆ 0,496	2,393 ∆ 0,137
3,2	2 1,265 1,01		1,145 ∆ 0,120	1,055 ∆ 0,210	0,972 ∆ 0,293	1,107 Δ 0,158	1,017 ∆ 0,248	1,197 ∆ 0,069
1,6	0,633 0,509 Δ 0,12		0,573 ∆ 0,060	0,528 Δ 0,105	0,486 ∆ 0,146	0,553 ∆ 0,079	0,509 ∆ 0,124	0,598 ∆ 0,034
0,8	0,316 0,25 Δ		0,286 ∆ 0,030	0,264 ∆ 0,052	0,243 ∆ 0,073	0,277 ∆ 0,040	0,254 ∆ 0,062	0,299 ∆ 0,017
0,4	0,158	0,127 ∆ 0,031	0,143 ∆ 0,015	0,132 Δ 0,026	0,122 ∆ 0,037	0,138 ∆ 0,020	0,127 ∆ 0,031	0,150 ∆ 0,009
0,2	0,079	0,064 ∆ 0,016	0,072 ∆ 0,007	0,066 ∆ 0,013	0,061 ∆ 0,018	0,069 ∆ 0,010	0,064 ∆ 0,016	0,075 ∆ 0,004
0,1	0,040	0,032 ∆ 0,008	0,036 ∆ 0,004	0,033 ∆ 0,007	0,030 ∆ 0,009	0,035 ∆ 0,005	0,032 ∆ 0,008	0,037 ∆ 0,002
0,05	0,020	0,016 ∆ 0,004	0,018 ∆ 0,002	0,016 ∆ 0,003	0,015 ∆ 0,005	0,017 ∆ 0,002	0,016 ∆ 0,004	0,019 ∆ 0,001

Anhang-Tabelle 3: In Massenkonzentrationen umgerechnete minimale Hemmkonzentrationen von Prodigiosin und diversen Prodigiosin-Derivaten gegen humane Modellpathogene.

Die MIC-Werte wurden in unabhängigen Triplikatmessungen mittels Flüssigkulturen in MH-Medium im Mikrodilutionsverfahren (100 μ L Kulturvolumen) determiniert (vgl. Tabelle 13). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und gesättigter Luftfeuchtigkeit für 20 h. Die Prodiginine wurden in Verdünnungsreihen mit einem Verdünnungsfaktor von zwei in Stoffmengenkonzentrationen zwischen 25,6 bis 0,05 μ M beziehungsweise in den unten stehenden umgerechneten Massenkonzentrationen mit 3 % DMSO als Co-Solvens zugegeben. Das Wachstum wurde durch Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von λ = 750 nm in einem Mikroplatten-Reader gemessen. Die Messwerte des zur Kultivierung verwendeten reinen Mediums (MH-Medium) wurden von den gemessenen Absorptionen der Kulturen subtrahiert. Zudem erfolgte durch die Anwendung eines Korrekturfaktors (vgl. Kapitel 2.7.2.2) eine Umrechnung auf theoretisch mit einem Spektralphotometer der Serie GENESYS 10S gemessene Werte. Anhand des auf diese Weise detektierten Zellwachstums wurden die nachfolgend zusammengefassten MIC-Werte bestimmt. Dabei ist die MIC die jeweils niedrigste notwendige Konzentration einer Verdünnungsreihe, bei der kein Wachstum im Zuge der Absorptionsmessungen detektiert wurde.

		Gram-positive Bakterien				Gram-negative Bakterien	
	MIC in Massenkonzentrationsangaben [µg mL ⁻¹]	C. glutamicum	S. aureus	S. epidermidis	E. faecium	P. aeruginosa	S. marcescens
Α	Prodigiosin Hydrochlorid	5,060	5,060	5,060	5,060		
В	Prodigiosin-Derivat-B	4,068	8,136	8,136	8,136		
С	Prodigiosin-Derivat-C	4,581	4,581	9,162	9,162		
D	Prodigiosin-Derivat-D	4,222	4,222	8,444	8,444		
E	Prodigiosin-Derivat-E	3,889	7,777	7,777	7,777		
F	Prodigiosin-Derivat-F	4,427	4,427	4,427	4,427		
G	Prodigiosin-Derivat-G						
н	Prodigiosin-Derivat-H	4,786	4,786	4,786	4,786		

Anhang-Tabelle 4: Codon-optimierte Sequenz der bakteriellen Cycloartenolsynthase aus *S. aurantiaca* **DW4/3-1.** Unterstrichen: Restriktionsschnittstellen; schwarz: Promoter-Sequenz und 5'UTR (einschließlich der RBS: orange) des Expressionsvektors pRhon5Hi-2; grün: kodierende Sequenz (Start- und Stopcodon sind in fett hervorgehoben); hellgrün: fusionierter Hexahistidin-Tag; blau: 5'UTR einschließlich der Ribosomenbindestelle (RBS) des Gens *nifK* aus *R. capsulatus*. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2019.

Cycloartenolsynthase aus Stigmatella aurantiaca DW4/3-1

GTCGACCACCTCGCAGAACACCCTCGCCGCGCGGTCGAGATGGGTCAGAAGATCCTCATCGTCGGCTGCGACCCCAAG GCTGACAGCACCCGTCTGATCCTGAACACCAAGCTGCAGGACACCGTGCTGCACCTGGCCGTCTAGAAATAATTTTGTTTA CTGGATGTGCTGGCGGCGACCCAGGATACCGAAGGCAGCTGGTATGGCGATTATGGCGGCCCGCAGTTCCTGATCCCGA TCTATGTGGCGGGCCTGCATGTGATGGGCCGCACCCCGGAACCGGAACAGCGCGATGGCCTGATCGCGTATCTGCGCAA CCATCAGAACGCGGATGGCGGCTGGGGCCTGGATGTGGAAGCGCCGAGCCAGGTGTTCACCAGCGTGCTGAACTATGTG CCGCTGGGCAGCGCGCGCGGGGCAAAATCATCCTGGCGCTGCTGGGCCTGTATGAATATGGCGGCCTGCAGCCGGTGC CGCCGGAACTGTGGCTGCCGGAAAGCCTGCCGTTCCATCCGAGCCGCCTGTGGTGCCATTGCCGCATGGTGTATCTG ATTTCGCGCTGGAACAGATCCGCGCGGAAGATGAAGCGACCCATTATATCTGCATCGGCCCGATCAACAAAGTGCTGAACA GGCGATGATGGCGTGCGCATGAACGGCTATAACAGCAGCGAACTGTGGGATACCGCGTTCGCGGTGCAGGCGGTGGCGG CGACCGGCGAAACCGGCCGCCATCGCCGCATGCTGGAAGAAGCGGCGCGCCTTCATCGAAGCGAACCAGGTGCTGGAAGA ATCAGCGATTGCACCGCGGAAGGCCTGAAAGCCGAGCCTGGTGCTGGAACCGCTGGGCCTGAACCGCGTGCCGCAGGCG CGCCTGCAGGATGCGGTGCAGCTGATCCTGAGCATGCAGAACGAAGATGGCGGCTGGGCGACCTATGAACTGCAGCGCG GCCCGAAAGTGCTGGAACTGCTGAACCCGAGCGATGTGTTCAGCACCATCATGGTGGATGTGAGCTATGTGGAATGCACC CGCGGCGTGGAATTCATCCGCCGCACCCAGCGCGAAGATGGCAGCTGGGCAGCTGGGGCGTGTGCTTCACCTATG GCACCTGGTTCGGCGTGATGGGCCTGATCGCGGCGGGCGCGAGCCCGGATGATATGGCGCTGCGCCGCGCGACCGCGT CGCAGCGCGCGCGCGCGGCGCGCGCGCGCAGCAGGAAGATGGCCGCCGCCGGAACCGATCGCGGGCATCT TCAACCGCACCTGCGCGATCCATTATGATGCGTATCTGCGCATCTTCCCGGTGTGGGCGCTGGCGGTGTGCGATAAACGC CACCACCACCACCACCACTGAGCCTTTGACAAGGAATTGACATATG

Anhang-Tabelle 5: Codon-optimierte Sequenz der bakteriellen Cycloartenolsynthase aus *S. aurantiaca* Sg a15. Unterstrichen: Restriktionsschnittstellen; schwarz: Promoter-Sequenz und 5'UTR (einschließlich der RBS: orange) des

Expressionsvektors pRhon5Hi-2; grün: kodierende Sequenz (Start- und Stopcodon sind in fett hervorgehoben); hellgrün: fusionierter Hexahistidin-Tag; blau: 5'UTR einschließlich der Ribosomenbindestelle (RBS) des Gens *nifK* aus *R. capsulatus*. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2019.

Cycloartenolsynthase aus Stigmatella aurantiaca Sg a15

GTCGACCACCTCGCAGAACACCCTCGCCGCGCGGTCGAGATGGGTCAGAAGATCCTCATCGTCGGCTGCGACCCCAAG GCTGACAGCACCCGTCTGATCCTGAACACCAAGCTGCAGGACACCGTGCTGCACCTGGCCGTCTAGAAATAATTTTGTTTA ACTTTAAGAAGGAGATATACACATGAGCGCGGCGGAACAGCGCATCCCGCGCAGCGAACCGGCGATCCAGCGCGCCTG GATGTGCTGGCGGCGAGCCAGGATGCGGAAGGCAGCTGGTATAGCGATTATGGCGGCCCGCTGTTCCTGATCCCGATCT ATGTGACCGGCCTGCATGTGATGGGCCGCGAATTCGAACCGGCGCAGCGCGAAGGCCTGATCGTGTATCTGCGCAACCAT CAGAACGCGGATGGCGGCTGGGGCCTGGATGTGGAAAGCCCGAGCCAGGTGTTCACCAGCGTGCTGAACTATGTGGCGC CTGAGCAGCGGCGCGTGGGGCAAAATCATCCTGGCGCTGCTGGGCCTGTATGAATATAACGGCCTGCAGCCGATGCCGC CGGAACTGTGGCTGCCGGAAAGCCTGCCGTTCCATCCGAGCAAACTGTGGTGCCATTGCCGCATGGTGTATCTGCCG GCGCTGGAACAGATCCGCGCGGAAGATGAAGCGACCCATTTCATCTGCATCGGCCCGATCAACAAAGTGCTGAACATGGT CGGATGGCATCAAAATGAACGGCTATAACAGCAGCGAACTGTGGGATACCAGCTTCGCGGTGCAGGCGGCGGCGGCGAC GCGATTGCACCGCGGAAGGCCTGAAAGCGAGCCTGGCGCTGGAACCGCTGGGCCTGAACCGCGTGCCGCAGGCGCGCCC TGCAGGATGCGGTGCAGTTCATCCTGAGCATGCAGAACAAGATGGCGGCTGGGCGACCTATGAACTGCAGCGCGGCCC GCTGGCGGCTGGAAGTGCTGAACCCGAGCGATGTGCTGGGCACCATCATGGTGGGATGTGGGCTATGTGGGAATGCACCAGCG CGTGCGTGCAGGCGCTGGCGGCGTGGCGCAAACATCATCAGGTGCAGGATGCGCGCGTGGATCTGGCGATCAGCCGCG GCGCGGAATTCATCCGCCGCGCGCGCGCGCGAGGATGGCAGCTGGATCGGCAGCTGGGGCGTGTGCTTCACCTATGGCAC CTGGTTCGGCGTGACCGGCCTGATCGCGGCGGGGCGTGAGCCCGGGCGATATGGTGCTGCGCCGCGCGGCGGCGTTCCT GCGCAGCCATCAGCGCAGCGATGGCAGCTGGAGCGAAGTGGTGGAAAGCTGCCGCCAGGGCCGCTGGATCGAAGGCAC CCATGGCCATGCGGTGAACACCAGCTGGGCGCGCTGCTGACCCTGGCGAGCGTGGGCGAACAGAACAGCGAAGCGGTGCG CCGCGGCATCCGCTGGCTGCGCGATCGCCAGCAGGAAGATGGCCGCTGGCCGCGGAACCGATCGTGGGCATCTTCAAC CGCACCTGCGCGATCCATTATGATGCGTATCTGCGCATCTTCCCGGTGTGGGCGCTGGCGGTGTGCGATAAACGCCACCA CCACCACCACCACTGAGCCTTTGACAAGGAATTGACATATG

Anhang-Tabelle 6: Codon-optimierte Sequenz der pflanzlichen Cycloartenolsynthase aus A. thaliana.

Unterstrichen: Restriktionsschnittstellen; schwarz: Promoter-Sequenz und 5'UTR (einschließlich der RBS: orange) des Expressionsvektors pRhon5Hi-2; grün: kodierende Sequenz (Start- und Stopcodon sind in fett hervorgehoben); hellgrün: fusionierter Hexahistidin-Tag; blau: 5'UTR einschließlich der Ribosomenbindestelle (RBS) des Gens *nifK* aus *R. capsulatus*. Modifiziert nach Hage-Hülsmann et al., 2019; Loeschcke et al., 2017.

Cycloartenolsynthase CAS1 aus Arabidopsis thaliana

GTCGACCACCTCGCAGAACACCCTCGCCGCGCGGTCGAGATGGGTCAGAAGATCCTCATCGTCGGCTGCGACCCCAAG GCTGACAGCACCCGTCTGATCCTGAACACCAAGCTGCAGGACACCGTGCTGCACCTGGCCGTCTAGAAATAATTTTGTTTA ACTTTAAGAAGGAGATATACACATGTGGAAAACTGAAAATCGCGGAAGGCGGCAGCCCGTGGCTGCGCACCACCAACAACC ATGTGGGCCGCCAGTTCTGGGAGTTCGATCCGAACCTGGGCACCCCGGAAGATCTGGCGGCGGTGGAAGAAGCGCGCAA GAGCTTCAGCGATAACCGCTTCGTGCAGAAACATAGCGCGGATCTGCTGATGCGCCTGCAGTTCAGCCGCGAAAACCTGA TCAGCCCGGTGCTGCCGCAGGTGAAAATCGAAGATACCGATGATGTGACCGAAGAAATGGTGGAAACCACCCTGAAACGC GGCCTGGATTTCTATAGCACCATCCAGGCGCATGATGGCCATTGGCCGGGCGGATTATGGCGGCCCGATGTTCCTGCTGCC ATCTGTATAACCATCAGAACGAAGATGGCGGCTGGGGCCTGCATATCGAAGGCCCCGAGCACCATGTTCGGCAGCGTGCTG AACTATGTGACCCTGCGGCCTGCTGGGCGAAGGCCCGAACGATGGCGATGGCGATATGGAAAAAGGCCGCGATTGGATCCT GAACCATGGCGGCGCGACCAACATCACCAGCTGGGGCAAAATGTGGCTGAGCGTGCTGGGCGCGCGTTCGAATGGAGCGGC CATGGTGTATCTGCCGATGAGCTATCTGTATGGCAAACGCTTCGTGGGCCCGATCACCAGCACCGTGCTGAGCCTGCGCA AAGAACTGTTCACCGTGCCGTATCATGAAGTGAACTGGAACGAAGCGCGCAACCTGTGCGCGAAAGAAGATCTGTATTATC CGCATCCGCTGGTGCAGGATATCCTGTGGGCGAGCCTGCATAAAATCGTGGAACCGGTGCTGATGCGCTGGCCGGGCGC GAACCTGCGCGAAAAAGCGATCCGCACCGCGATCGAACATATCCATTATGAAGATGAAAACACCCGCTATATCTGCATCGG CCCGGTGAACAAAGTGCTGAACATGCTGTGCTGCTGGGTGGAAGATCCGAACAGCGAAGCGTTCAAACTGCATCTGCCGC TTCGCGATCCAGGCGATCCTGGCGACCAACCTGGTGGAAGAATATGGCCCCGGTGCTGGAAAAAGCGCATAGCTTCGTGAA AAACAGCCAGGTGCTGGAAGATTGCCCGGGCGATCTGAACTATTGGTATCGCCATATCAGCAAAGGCGCGTGGCCGTTCA GCACCGCGGATCATGGCTGGCCGATCAGCGATTGCACCGCGGAAGGCCTGAAAGCGGCGCTGCTGCTGAGCAAAGTGCC GAAAGCGATCGTGGGCGAACCGATCGATGCGAAACGCCTGTATGAAGCGGTGAACGTGATCATCAGCCTGCAGAACGCG GATGGCGGCCTGGCGACCTATGAACTGACCCGCAGCTATCCGTGGCTGGAACTGATCAACCCGGCGGAAACCTTCGGCG ATATCGTGATCGATTATCCGTATGTGGAATGCACCAGCGCGGCGATCCAGGCGCTGATCAGCTTCCGCAAACTGTATCCGG GCCATCGCAAAAAAGAAGTGGATGAATGCATCGAAAAAGCGGTGAAATTCATCGAAAGCATCCAGGCGGCGGATGGCAGC TGGTATGGCAGCTGGGCGGTGTGCTTCACCTATGGCACCTGGTTCGGCGTGAAAGGCCTGGTGGCGGTGGGCAAAACCC CTATCTGAGCTGCCAGGATAAAGTGTATAGCAACCTGGATGGCAACCGCAGCCATGTGGTGAACACCGCGTGGGCGATGC GATGGAAAACGGCGATTTCCCGCAGCAGGAAATCATGGGCGTGTTCAACCGCAACTGCATGATCACCTATGCGGCGTATC GCAACATCTTCCCGATCTGGGCGCTGGGCGAATATCGCTGCCAGGTGCTGCTGCAGCAGGGCGAACACCACCACCACCA CCACTGAGCCTTTGACAAGGAATTGACATATG

Anhang-Tabelle 7: Codon-optimierte Sequenz der pflanzlichen Squalensynthase aus A. thaliana.

Gezeigt ist die kodierende Sequenz der Squalensynthase SQS1 aus *A. thaliana*, wobei Start- und Stopcodon in fett hervorgehoben und unterstrichen sind. Modifiziert nach Loeschcke *et al.*, 2017.

Squalensynthase SQS1 aus Arabidopsis thaliana

GGAAAAACAGATCCCGCCGGAACCGCATTGGGGCTTCTGCTATAGCATGCTGCATAAAGTGAGCCGCAGCTTCAGCCTGG GATGATACCAGCATCCCGACCGATGAAAAAGTGCCGATCCTGATCGCGTTCCATCGCCATATCTATGATACCGATTGGCAT TATAGCTGCGGCACCAAAGAATATAAAATCCTGATGGATCAGTTCCATCATGTGAGCGCGCGTTCCTGGAACTGGAAAAA GGCTATCAGGAAGCGATCGAAGAAATCACCCGCCGCATGGGCGCGGGCATGGCGAAATTCATCTGCCAGGAAGTGGAAA CCGTGGATGATTATGATGAATATTGCCATTATGTGGCGGGCCTGGTGGGCCTGGGCCTGAGCAAACTGTTCCTGGCGGCG GGCAGCGAAGTGCTGACCCCGGATTGGGAAGCGATCAGCAACAGCATGGGCCTGTTCCTGCAGAAAACCAACATCATCCG CGATTATCTGGAAGATATCAACGAAAATCCCCGAAAAGCCGCATGTTCTGGCCGCGCGAAATCTGGGGCAAATATGCGGATAA ACTGGAAGATCTGAAATATGAAGAAAAACACCAACAAAAGCGTGCAGTGCCTGAACGAAATGGTGACCAACGCGCTGATGCA TATCGAAGATTGCCTGAAATATATGGTGAGCCTGCGCGATCCGAGCATCTTCCGCTTCTGCGCGATCCCGCAGATCATGGC GATCGGCACCCTGGCGCTGTGCTATAACAACGAACAGGTGTTCCGCGGCGTGGAAACTGCGCCGCGGCCTGACCGCG AAAGTGATCGATCGCACCAAAACCATGGCGGATGTGTATGGCGCGTTCTATGATTTCAGCTGCATGCTGAAAACCAAAGTG GATAAAAACGATCCGAACGCGAGCAAAACCCTGAACCGCCTGGAAGCGGTGCAGAAACTGTGCCGCGATGCGGGCGTGC TGCAGAACCGCAAAAGCTATGTGAACGATAAAGGCCAGCCGAACAGCGTGTTCATCATGGTGGTGATCCTGCTGGCG ATCGTGTTCGCGTATCTGCGCGCGAAC**TAA**

Anhang-Tabelle 8: Codon-optimierte Sequenz der pflanzlichen Squalenepoxidase aus A. thaliana.

Gezeigt ist die kodierende Sequenz der Squalenepoxidase SQE1 aus *A. thaliana*, wobei Start- und Stopcodon in fett hervorgehoben und unterstrichen sind. Modifiziert nach Loeschcke *et al.*, 2017.

Squalenepoxidase SQE1 aus Arabidopsis thaliana

ATG GAAAGCCAGCTGTGGAACTGGATCCTGCCGCTGCTGATCAGCAGCCTGCTGATCAGCTTCGTGGCGTTCTATGGCTT CTTCGTGAAACCGAAACGCAACGGCCTGCGCCATGATCGCAAAACCGTGAGCACCGTGACCAGCGATGTGGGCAGCGTG GGCAAAGATAAACGCCGCGTGCATGTGATCGAACGCGATCTGAGCGAACCGGATCGCATCGTGGGCGAACTGCTGCAGC CGGGCCGCTATCTGAAACTGCTGGAACTGGGCATCGAAGATTGCGTGGAAGAAATCGATGCGCAGCGCGTGTATGGCTAT GCGCTGTTCAAAAACGGCAAACGCATCCGCCTGGCGTATCCGCTGGAAAAATTCCATGAAGATGTGAGCGGCCGCAGCTT CCATAACGGCCGCTTCATCCAGCGCATGCGCGAAAAAGCGGCGAGCCTGCCGAACGTGCAGCTGGAACAGGGCACCGTG CTGAGCCTGCTGGAAGAAAACGGCACCATCAAAGGCGTGCGCTATAAAAACAAAGCGGGCGAAGAACAGACCGCGTTCGC GGCGCTGACCATCGTGTGCGATGGCTGCTTCAGCAACCTGCGCCGCAGCCTGTGCAACCCGCAGGTGGAAGTGCCGAGC TGCTTCGTGGGCCTGGTGCTGGAAAACTGCAACCTGCCGTATGCGAACCATGGCCATGTGGTGCTGGCGGATCCGAGCCC GATCCTGATGTATCCGATCAGCAGCACCGAAGTGCGCTGCCTGGTGGATGTGCCGGGCCAGAAAGTGCCCGAGCATCGCG AACGGCGAAATGAAAAACTATCTGAAAAACCGTGGTGGCGCCGCAGATGCCGCATGAAGTGTATGATAGCTTCATCGCGGC ATGGGCGATGCGTTCAACATGCGCCATCCGCTGACCGGCGGCGGCATGACCGTGGCGGCTGGCGGATATCGTGGTGCTGC GCAACCTGCTGCGCCCGCTGCGCGATCTGAGCGATGGCGCGAGCCTGTGCAAATATCTGGAGAGCTTCTATACCCTGCGC AAACCGGTGGCGGCGACCATCAACACCCTGGCGAACGCGCTGTATCAGGTGTTCTGCAGCAGCGAAAACGAAGCGCGCA ACGAAATGCGCGAAGCGTGCTTCGATTATCTGGGCCTGGGCGGCATGTGCACCAGCGGCCCGGTGAGCCTGCTGAGCGG CCTGAACCCGCGCCCGCTGACCCTGGTGTGCCATTTCTTCGCGGTGGCGGTGTATGGCGTGATCCGCCTGCTGATCCCGT TCCCGAGCCCGAAACGCATCTGGCTGGGCGCGAAACTGATCAGCGGCGCGAGCGGCATCATCTTCCCGATCATCAAAGC GGAAGGCGTGCGCCAGATGTTCTTCCCGGCGACCGTGCCGGCGTATTATTATAAAGCGCCGACCGTGGGCGAAACCAAAT GCAGC**TAA**
Anhang-Tabelle 9: Codon-optimierte Sequenz der pflanzlichen Lupeolsynthase aus A. thaliana.

Gezeigt ist die kodierende Sequenz der Lupeolsynthase LUP1 aus *A. thaliana*, wobei Start- und Stopcodon in fett hervorgehoben und unterstrichen sind. Modifiziert nach Loeschcke *et al.*, 2017.

Lupeolsynthase LUP1 aus Arabidopsis thaliana

ATG TGGAAACTGAAGATCGGGAAGGGCAACGGCGAGGATCCCCATCTGTTTTCGTCGAACAACTTCGTCGGCCGCCAAAC GTGGAAGTTCGACCATAAGGCCGGCAGCCCGGAAGAGCGCGCCGCCGTGGAGGAGGCCCGCCGGGGCTTCCTGGACAA CCGGTTCCGCGTCAAGGGCTGCTCCGACCTGCTGTGGCGCATGCAGTTCCTGCGCGAAAAAAATTCGAACAGGGCATCC CCCAGCTGAAAGCCACGAACATCGAGGAAATCACGTATGAGACCACGACGAACGCGCTGCGGCGCGGGGGGGCGCGCTATTT CACGGCGCTGCAGGCGTCCGACGGCCACTGGCCCGGCGAAATCACCGGCCCGCTGTTTTTCCTGCCGCCGCCTTATCTTCT GCCTGTATATCACGGGCCACCTGGAAGAAGTGTTCGACGCGGAACACCGCAAGGAGATGCTGCGGCATATCTATTGCCAT CAGAATGAAGACGGCGGCTGGGGCCTGCACATCGAGTCGAAAAGCGTGATGTTTTGCACGGTCCTGAACTACATCTGCCT AGCTGCTGATGCTGCCCAGCTTTCTGCCGATCCACCCGGGCAAGATCCTGTGCTACAGCCGCATGGTGAGCATCCCGATG TCCTATCTGTATGGGAAGCGGTTCGTCGGCCCGATCACGCCGCTGATCCTTCTGCTGCGCGAGGAACTGTACCTGGAGCC CTATGAAGAGATCAATTGGAAGAAGAGCCGCCGCCTGTACGCGAAGGAGGACATGTACTATGCGCACCCGCTGGTGCAAG ATCTGCTGTCGGACACCCTGCAGAACTTTGTCGAGCCGCTGCTGACGCGCCCCTGAATAAGCTGGTGCGGGAGAAG GCGCTGCAGCTTACCATGAAACATATCCACTACGAGGACGAAAATTCGCATTACATCACGATCGGCTGCGTCGAAAAGGTC CTGTGCATGCTGGCCTGCTGGGTGGAAAACCCCGAACGGGGACTATTTTAAGAAGCACCTGGCGCGGATCCCCGGATTATAT GTGGGTGGCGGAAGACGGGATGAAAATGCAGAGCTTCGGCTGCCAGCTGTGGGATACGGGCTTCGCGATCCAGGCCCTG CTGGCGTCGAATCTGCCGGACGAGACCGATGACGCCCTTAAGCGGGGCCACAACTACATCAAGGCCTCCCAGGTCCGCG AAAATCCGAGCGGCGACTTCCGCAGCATGTACCGGCATATCTCGAAAGGCGCCTGGACCTTTTCGGACCGGGATCATGGC AGAAGATCGATGACGAGCAACTGTATGACTCGGTGAATCTGCTGCTTTCGCTTCAGTCGGGGAACGGCGGCGTCAACGCC TGGGAGCCGTCGCGCGCGTATAAATGGCTGGAGCTGCTGAATCCCACCGAGTTCATGGCCAATACGATGGTCGAACGCGA ATTCGTGGAATGCACGTCGTCCGTGATCCAGGCGCTGGATCTGTTTCGGAAACTGTATCCCGACCATCGGAAGAAGGAGAT CAATCGCTCGATCGAGAAAGCGGTCCAGTTCATCCAGGACAACCAGACGCCGGATGGCTCCTGGTACGGCAACTGGGGG GTGTGCTTCATCTACGCCACCTGGTTCGCCCTGGGGGGCCTGGCGGCGGCGGGGGAGACCTATAACGATTGCCTGGCGA TGCGGAACGGGGTGCATTTCCTGCTGACCACCCAGCGCGACGATGGGGGGCGAGTCCTACCTGAGCTGCTCCGA GCAGCGCTATATCCCGTCGGAAGGCGAACGGTCGAACCTGGTCCAGACGTCGTGGGCGATGATGGCCCTGATCCATACC TTCCGCAGCAGGAAATCGTGGGCGCCTTCATGAACACCTGCATGCTGCATTACGCGACGTACCGCAACACCTTCCCCCTGT GGGCGCTGGCGGAGTATCGCAAGGTCGTCTTCATCGTCAAT**TAA**

Anhang-Tabelle 10: Cycloartenolmengen in R. capsulatus.

Durch die Koexpression der Squalensynthase SQS1 und der Squalenepoxidase SQE1 aus *A. thaliana* sowie je einer Cycloartenolsynthase aus *A. thaliana* bzw. *S. aurantiaca* (*At*-CAS, *Sa*Sg-CAS, *Sa*DW-CAS) wurde Cycloartenol heterolog in verschiedenen *R. capsulatus*-Stämmen (SB1003, SB1003-MVA, SB1003- Δ crtE) hergestellt. Die dabei erhaltenen Cycloartenolmengen sind hier in den Angaben als (i) Titer (mg L⁻¹), (ii) spezifische Ausbeute (mg gDCW⁻¹) und (iii) spezifische Produktivität (µg gDCW⁻¹ h⁻¹) zusammengefasst. Die Berechnungen basieren auf den Zelldichten am Ende der Inkubation und somit zum Zeitpunkt der Ernte der Proben nach 48 Stunden. Außerdem wurde die zuvor bestimmte Korrelation des Zelltrockengewichts einer OD_{660 nm} = 1 von 0,58 mgDCW (engl.: *dry cell weight*, DCW) verwendet. Modifiziert nach Hage-Hülsmann *et al.*, 2019.

<i>R. capsulatus-</i> Stamm	Cycloartenol- synthase	Titer mg L ⁻¹	spezifische Ausbeute mg gDCW ⁻¹	spezifische Produktivität μg gDCW ⁻¹ h ⁻¹
SB1003	At-CAS	0,38 ± 0,02	0,39 ± 0,05	8,08 ± 0,97
	SaSg-CAS	0,37 ± 0,03	0,35 ± 0,03	7,33 ± 0,54
	SaDW-CAS	0,32 ± 0,07	0,31 ± 0,08	6,38 ± 1,64
SB1003-MVA	At-CAS	0,51 ± 0,07	0,50 ± 0,06	10,37 ± 1,35
	SaSg-CAS	0,57 ± 0,07	0,49 ± 0,04	10,23 ± 0,77
	SaDW-CAS	0,55 ± 0,04	0,52 ± 0,06	10,82 ± 1,32
SB1003-∆crtE	At-CAS	1,13 ± 0,14	1,05 ± 0,06	21,88 ± 1,32
	SaSg-CAS	0,90 ± 0,19	0,88 ± 0,18	18,38 ± 3,75
	SaDW-CAS	0,84 ± 0,19	0,88 ± 0,25	18,30 ± 5,29

Author Contributions Statement

Anteile der Doktorandin Jennifer Hage-Hülsmann an den, in der vorliegenden Arbeit als Ergebnisse aufgeführten Daten aus nachfolgenden Manuskripten:

Hage-Hülsmann J., Metzger S., Wewer V., Buechel F., Troost K., Thies S., Loeschcke A., Jaeger K.-E., Drepper T. (2019). Biosynthesis of cycloartenol by expression of plant and bacterial oxidosqualene cyclases in engineered *Rhodobacter capsulatus*. Journal of Biotechnology: X 4, 100014. https://doi.org/10.1016/j.btecx.2020.100014.

Jennifer Hage-Hülsmann:	Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing
Sabine Metzger:	Formal analysis, Validation, Writing - review & editing
Vera Wewer:	Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing - review &
editing. Felix Buechel:	Investigation, Writing - review & editing
Katrin Troost:	Investigation, Writing - review & editing
Stephan Thies:	Validation, Writing - review & editing
Anita Loeschcke:	Supervision, Validation, Writing - review & editing
Karl- Erich Jaeger:	Conceptualization, Funding acquisition, Writing - review & editing
Thomas Drepper:	Conceptualization, Validation, Writing - review & editing

Hage-Hülsmann J., Grünberger A., Thies S., Santiago-Schübel B., Klein A. S., Pietruszka J., Binder D., Hilgers F., Domröse A., Drepper T., Kohlheyer D., Jaeger K.-E., Loeschcke A. (2018). Natural biocide cocktails: Combinatorial antibiotic effects of prodigiosin and biosurfactants. PLoS One 13, e0200940. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200940

Jennifer Hage-Hülsmann: Alexander Grünberger: Stephan Thies: Beatrix Santiago-Schübel: Andreas Sebastian Klein: Jörg Pietruszka: Dennis Binder: Fabienne Hilgers: Andreas Domröse:	Investigation, Visualization, Writing – original draft Investigation, Validation Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing Methodology, Resources Resources Resources Conceptualization, Validation Investigation Resources
Andreas Domröse:	Resources
Thomas Drepper:	Conceptualization
Dietrich Kohlheyer:	Resources
Karl-Erich Jaeger:	Funding acquisition, Writing – review & editing
Anita Loeschcke:	Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing

Loeschcke A., Dienst D., Wewer V., **Hage-Hülsmann J.**, Dietsch M., Kranz-Finger S., Hüren V., Metzger S., Urlacher V. B., Gigolashvili T., Kopriva S., Axmann I. M., Drepper T., Jaeger K.-E. (2017). The photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 as new hosts for cyclic plant triterpene biosynthesis. PLoS One 12, e0189816. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189816

Anita Loeschcke:	Formal analysis, Methodology, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing
Dennis Dienst:	Formal analysis, Methodology, Visualization, Writing – original draft,
	Writing – review & editing
Vera Wewer:	Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – review & editing
Jennifer Hage-Hülsmann:	Investigation, Methodology, Writing – review & editing
Maximilian Dietsch:	Investigation, Writing – review & editing
Sarah Kranz-Finger:	Methodology, Writing – review & editing
Vanessa Hüren:	Investigation, Writing – review & editing
Sabine Metzger:	Formal analysis, Validation, Writing – review & editing
Vlada B. Urlacher:	Conceptualization, Writing – review & editing
Tamara Gigolashvili:	Conceptualization, Writing – review & editing
Stanislav Kopriva:	Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing
Ilka M. Axmann:	Conceptualization, Supervision, Validation, Writing – review & editing
Thomas Drepper:	Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation, Writing – review & editing
Karl-Erich Jaeger:	Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in dieser oder ähnlicher Form nicht einer anderen Fakultät vorgelegt. Es bestehen keine vorherigen erfolglosen oder erfolgreichen Promotionsversuche.

Ort, Datum

Jennifer Hage-Hülsmann

Erschließung kombinatorisch wirksamer antibakterieller Sekundärmetabolite

Jennifer Hage-Hülsmann



Dissertation

Dezember 2020