

Die Untersuchung von Allicin aus Knoblauch als Alternative zu konventionellen Antibiotika

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen University
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Jana Reiter, M. Sc. Biologie
aus
Wolgograd, Russland

Berichter: Professor Alan J. Slusarenko, Ph. D. DIC
 Professor Dr. Lothar Rink

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Januar 2020

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek verfügbar.

I. Zusammenfassung

Allicin ist eine antimikrobiell wirksame Substanz, die bei der Verletzung des Knoblauchgewebes zum Schutz vor pathogenen Mikroorganismen und Schädlingen entsteht. Allicin zählt zur Gruppe der reaktiven Schwefel-Spezies (RSS) und oxidiert zelluläre Thiole, wie z.B. Cystein-Reste in Proteinen oder den Redox-Puffer Glutathion (GSH). Diese Oxidation kann die enzymatische Aktivität beeinflussen bzw. die Funktionalität inhibieren, und sogar bei höheren Konzentrationen zum Zelltod führen.

In Rahmen dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob Allicin grundsätzlich das Potenzial zum Einsatz als Antibiotikum zur Behandlung bakterieller Lungeninfektionen in der Medizin hat.

Die Oxidationsziele des Allicins wurden mithilfe der differentiellen Isotopen-kodierten Markierungsmethode OxICAT im bakteriellen Proteom identifiziert. Das Proteom des Allicin-anfälligen *Pf0-1* und des Allicin-resistenten *PfAR-1* wurden nach der Behandlung mit subletalen Allicin-Mengen miteinander verglichen. Bei der Kontrolle liegen die Proteine überwiegend im reduzierten Zustand vor: bei 77% der Proteine liegen Cysteine bis zu 20% oxidiert vor. Nach Allicin-Behandlung erhöht sich der Anteil der oxidierten Proteine: nur 54% der Proteine in dem Allicin-anfälligen *Pf0-1*, aber 66% der Proteine in dem Allicin-resistenten *PfAR-1* bleiben zu weniger als 20% oxidiert. Als einer der spezifisch oxidierten Proteine wurde die Untereinheit A der DNA-Gyrase (GyrA) identifiziert. DNA-Gyrase ist ein bekannter Angriffsort für Antibiotika, da dieses Enzym nur in prokaryotischen Zellen vorkommt. Cys₄₃₃ in GyrA liegt bei der Kontrolle nur zu 6% oxidiert vor. Nach Allicin-Behandlung steigt der Anteil des oxidierten Cys₄₃₃ in dem Allicin-anfälligen *Pf0-1* bis zu 56%, aber nur bis zu 11% in dem Allicin-resistenten *PfAR-1*. Allicin inhibierte die Aktivität der DNA-Gyrase aus *E. coli* in dem gleichen Konzentrationsbereich wie Nalidixinsäure, der erste entdeckte DNA-Gyrase-Inhibitor, bei *in vitro* Experimenten. Aufgereinigtes DNA-Gyrase-Enzym aus *PfAR-1* und *Pf0-1* wurde in *in vitro* Versuchen bei ähnlichen Allicin-Konzentrationen inhibiert. Der Austausch des *gyrA*-Gens in *Pf0-1* durch das aus *PfAR-1* führte zur höheren Anfälligkeit gegenüber Allicin in Vergleich zum *Pf0-1* Wildtyp. Dies bedeutet, dass GyrA aus *PfAR-1* keine erhöhte Allicin-Resistenz *per se* vermittelt und nicht für Allicin-Resistenz des *PfAR-1* Stammes verantwortlich ist. Vielmehr ist es der genetische Hintergrund des *PfAR-1* Stammes, der die DNA-Gyrase vor Oxidation durch Allicin schützt.

Die Wirksamkeit des Allicins im Flüssigkultur gegenüber mehreren lungenpathogenen Bakterien-Stämmen (*Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* und *Staphylococcus*) unter anderem auch MDR-Stämmen (engl. *multiple drug resistant*), wurde gezeigt. Die minimalen hemmenden und bakteriziden Konzentrationen (MHK und MBK) wurden unter den standardisierten Bedingungen von EUCAST (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) bestimmt und mit den Werten von konventionellen Antibiotika verglichen. Die zytotoxische Wirkung des Allicins wurde auf menschliche Lungen- und Darm-Epithelzellen und auf murine Fibroblasten-Zellen *in vitro* und in Gegenwart der protektiven Wirkung des GSH gezeigt. In Gewebeschnitten der Rattenlunge verringert sich die Sensitivität gegenüber Allicin bei GSH-Zugabe in Blutplasma-ähnlichen Konzentration von 1 mM.

Dadurch, dass Allicin das bakterielle Wachstum von mehreren lungenpathogenen Bakterien (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae*) über die Gasphase inhibiert, bietet sich die direkte Inhalation des Allicins für die Behandlung der Lungeninfektionen an. Da bis jetzt noch keine gasförmigen Antibiotika zur Behandlung von Lungen-Infektionen verwendet werden, wäre Allicin, auch in den subletalen Konzentrationen, in Kombination mit oral-aufgenommenen konventionellen Antibiotika eine denkbare Ergänzung zu den aktuellen Behandlungsmöglichkeiten. Um die Allicin-Behandlung der infizierten Lungen zu simulieren wurde ein Lungen-Modell in Kooperation mit dem Aerodynamischen Institut der RWTH Aachen, das die menschlichen Bronchien der 2. bis 5. Generation darstellt, entwickelt. Die innere Fläche des Modells war mit 1 mm-dickem *E. coli*-haltigen Agar zur Simulation der bakteriellen Infektion beschichtet. Die Verwendung des Lungenmodells erlaubt das Beobachten der Ablagerung des antibiotisch wirksamen Aerosols an der „Bronchien“-Oberfläche des Modells ohne Notwendigkeit der Tierversuche. Die differenzielle Sensitivität der Test-Bakterien zu den verschiedenen Antibiotika sowie die konzentrationsabhängige Wachstumsinhibition wurden bei der Verwendung des Modells gezeigt. Bei der Behandlung der Bakterien über die Gasphase wurde der synergistische Effekt des Allicins mit Ethanol beobachtet. Die modellierte Luft-Strom-Geschwindigkeit innerhalb des Modells korreliert mit den Regionen, in denen das bakterielle Wachstum zuerst inhibiert wird. Dies lässt darauf schließen, dass das Lungen-Modell vorhersehbare Ergebnisse liefert und deren Verwendung bei initialen Untersuchungen und präklinischen Studien die Anzahl der notwendigen Tierversuche reduzieren kann.

II. Summary

Allicin is an antimicrobial substance, produced by garlic tissue upon wounding as a defence against pathogens and pests. Allicin is a reactive sulfur species (RSS) that oxidizes accessible cysteines in proteins and the redox buffer glutathione (GSH), thus inhibiting essential enzymes, and if the concentration is high enough, causing cell death.

The aim of this work was to investigate allicin's potential for medical use as an antibiotic for the treatment of bacterial lung infections.

A differential isotopic labelling method (OxICAT) was used to identify allicin targets in the bacterial proteome. The proteomes of allicin-susceptible *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and allicin-resistant PfAR-1 were compared after sublethal allicin exposure. Before exposure to allicin, proteins were in a predominantly reduced state, with approximately 77% of proteins showing less than 20% cysteine oxidation. Protein oxidation increased after exposure to allicin, and only 54% of proteins from allicin-susceptible Pf0-1, but 66% from allicin-tolerant PfAR-1, remained less than 20% oxidised. DNA gyrase was one of the proteins oxidized by allicin. Because it is only found in prokaryotes, DNA gyrase is a popular candidate target for antibiotics. Cys₄₃₃ in DNA gyrase subunit A (GyrA) was approximately 6% oxidized in untreated bacteria, however, after allicin treatment the degree of Cys₄₃₃ oxidation increased to 56% in sensitive Pf0-1 but only to 11% in resistant PfAR-1. Allicin inhibited *E. coli* DNA gyrase activity *in vitro* in the same concentration range as nalidixic acid, the first described DNA gyrase inhibitor. Purified PfAR-1 DNA gyrase was inhibited to greater extent by allicin *in vitro* than the Pf0-1 enzyme. Substituting PfAR-1 GyrA into Pf0-1 rendered the exchange mutants more susceptible to allicin than the Pf0-1 wild type. Taken together, these results suggest that GyrA was protected from oxidation *in vivo* in the allicin-resistant PfAR-1 background, rather than the PfAR-1 GyrA subunit being intrinsically less susceptible to oxidation by allicin than the Pf0-1 GyrA subunit *per se*.

The growth inhibitory effect of allicin to clinical isolates of lung pathogenic bacteria from the genera *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, and *Staphylococcus*, including MDR (multiple drug resistant) strains, was demonstrated. Minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal concentrations (MBC) were determined and compared to clinical antibiotics using standard EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) procedures. The cytotoxicity of allicin to human lung and colon epithelial and murine fibroblast cells was tested *in vitro* and shown to be ameliorated by glutathione (GSH). Similarly, the sensitivity of rat precision-cut lung slices (PCLS) to allicin was decreased by raising the [GSH] to the approximate blood plasma level of 1 mM.

Because allicin inhibited bacterial growth (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*) as a vapour, it could be used to combat bacterial lung infections via direct inhalation. Since there are no volatile antibiotics available to treat pulmonary infections, allicin, particularly at sublethal doses in combination with oral antibiotics, could make a valuable addition to currently available treatments. For the simulation of the allicin treatment of infected lungs, a lung model was developed in cooperation with Institute of Aerodynamics (RWTH Aachen University). The lung model represents

the human lung from the 2nd to the 5th bronchial generation. To simulate bacterial infection the inner model surface was covered with 1 mm thick bacteria-seeded agar layer. The deposition of antimicrobial aerosols on the modelled bronchial surfaces was followed in preliminary tests without the need for animal experiments. The differential sensitivity of the test bacteria to different antibiotics and the dose-dependency of inhibition was shown using the model. Furthermore, a synergistic effect of allicin vapour and ethanol in inhibiting bacterial growth was demonstrated. The modelling of the axial velocity air-flow distribution correlated with the regions showing inhibition of bacterial growth, demonstrating that the model has predictive value and can reduce the requirement for animal sacrifice in pre-clinical trials of novel antibiotics.

III. Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	1
II. Summary	3
III. Inhaltsverzeichnis	6
IV. Abbildungsverzeichnis	12
V. Tabellenverzeichnis	18
VI. Abkürzungen	24
1. Einleitung	30
1.1. Antibiotika-resistente Bakterien als wachsendes Problem in der modernen Medizin	30
1.1.1. Antibiotika	30
1.1.2. Antibiotika-Resistenzen	34
Bakterien mit Mehrfachresistenzen gegen Antibiotika: MDR-Stämme	35
Biofilme sind essenziell für die Ausbildung von Infektionen	36
1.1.3. Infektiöse Pneumonie ist auch heute noch eine Bedrohung	38
1.1.4. Aktuelle Methoden und Techniken zur Untersuchung der Lungeninfektionen (Infektionsmodelle)	39
1.2. Allicin als natürliches Antibiotikum	41
1.2.1. Knoblauch	41
1.2.2. Allicin, ein schwefelhaltiges Antibiotikum aus Knoblauch	42
1.3. Fragestellung	47
2. Material und Methoden	48
2.1. Materialien	48
2.1.1. Geräte	48
2.1.2. Programme und Online-Tools	50
2.1.3. Verbrauchsmaterialien	51
2.1.4. Chemikalien	52
2.1.5. Enzyme	55
2.1.6. Käuflich erworbene Nährmedien und Kits	55
2.1.7. Biologisches Material	57
2.1.7.1. Plasmide und Vektoren	57

2.1.7.2.	Oligonukleotide	60
2.1.7.3.	Mikroorganismen	61
2.1.7.4.	Zelllinien	67
2.1.7.5.	Versuchstiere	67
2.2.	Methoden	68
2.2.1.	Chemische Methoden	68
2.2.1.1.	Allicin-Synthese	68
2.2.1.2.	Allicin-Analyse mittels HPLC	68
2.2.1.3.	Herstellung der Novobiocin-Agarose-Säule für die DNA-Gyrase-Aufreinigung	69
2.2.2.	Mikrobiologische Methoden	70
2.2.2.1.	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	70
2.2.2.2.	Antibiotika-Stammlösungen	73
2.2.2.3.	Blau-Weiß-Selektion	74
2.2.2.4.	Herstellung der Glycerin-Stocks	74
2.2.2.5.	Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhoftest	75
2.2.2.6.	Bestimmung der minimalen hemmende Konzentration (MHK) und minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) bei Bakterien	76
2.2.2.7.	Bestimmung der minimalen hemmende (MHK) und minimalen fungiziden Konzentration (MBK) bei Pilzen	76
2.2.2.8.	Bestimmung der bakteriellen Biofilm-Ausbildung in Flüssigkultur	77
2.2.2.9.	Bestimmung der bakteriellen Biofilm-Ausbildung auf Agar-Platten	77
2.2.2.10.	Bestimmung der Biofilm-Ausbildung von <i>C. albicans</i> in 96-Mikrotiter-Format	78
2.2.2.11.	Untersuchung des Synergismus von Allicin mit verschiedenen Antibiotika bei Pseudomonaden	79
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden	79
2.2.3.1.	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	79
2.2.3.2.	Präparation von genomischer DNA aus Bakterien	80
2.2.3.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	81
2.2.3.4.	DNA-Gelelektrophorese	82
2.2.3.5.	Aufkonzentrierung und Aufreinigung der DNA aus dem PCR-Ansatz	83
2.2.3.6.	Restriktion der DNA	83
2.2.3.7.	Ligation eines DNA-Fragments in einem Vektor	84
2.2.3.8.	Gibson-Assemblierung	84

2.2.3.9.	Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> _____	85
2.2.3.10.	Transformation von <i>E. coli</i> mit Hitze-Schock-Methode _____	86
2.2.3.11.	Herstellung von elektro-kompetenten Pseudomonaden _____	86
2.2.3.12.	Transformation von Pseudomonaden durch die Elektroporation _____	87
2.2.3.13.	Transformation von Pseudomonaden durch triparentales Mating _____	87
2.2.3.14.	Methode zur Herstellung von <i>Pseudomonas</i> -Mutanten mittels des pEMG- knock out -Systems _____	88
2.2.3.15.	Klonieren der Biofilm-Reporter-Plasmide pJP2- <i>aprA::gusA</i> _____	90
2.2.4.	Methoden der Zellkultur _____	92
2.2.4.1.	Nährmedien und Kultivierung _____	92
2.2.4.2.	Herstellung der Zellkultur-Kryostocks _____	92
2.2.4.3.	Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Allicin in 96-Mikrotiter-Platten ____	92
2.2.5.	Bestimmung von Suszeptibilität der Lungenschnitte aus der Ratte gegenüber Allicin _____	93
2.2.6.	OxICAT-Methode _____	95
2.2.6.1.	Behandlung der Bakterienkulturen mit Allicin für die anschließende OxICAT- Analyse _____	96
2.2.6.2.	OxICAT-Markierung _____	97
2.2.6.3.	Trypsin-Verdau _____	98
2.2.6.4.	Kationenaustausch- und Affinitätschromatografie _____	98
2.2.6.5.	Entfernen des Biotin-Markers _____	99
2.2.6.6.	Massenspektrometrie _____	99
2.2.6.7.	Datenanalyse _____	99
	MaxQuant-Auswertung _____	100
	Excel-Auswertung _____	100
	Mass++-Auswertung _____	103
2.2.7.	Methoden zur Untersuchung der DNA-Gyrase-Aktivität _____	103
2.2.7.1.	DNA-Gyrase-Aufreinigung aus <i>P. fluorescens</i> Pf0-1 und <i>P. fluorescens</i> PfAR-1 _____	103
2.2.7.2.	Bradford-Assay _____	104
2.2.7.3.	SDS-PAGE _____	106
2.2.7.4.	DNA-Gyrase-Aktivitäts-Test _____	107
	Vorbereitung des Plasmids in entspannter Form _____	107

Nachweis der DNA-Gyrase-Aktivität	108
Gelelektrophorese und Gelfärbung	108
2.2.8. Methoden zur Simulation der Behandlung der infizierten Lunge mit Allicin	109
2.2.8.1. Untersuchung der Beständigkeit der verschiedenen Materialien gegenüber Allicin zu Bau der Lungen-Simulationsapparatur	109
2.2.8.2. Aufbau der Lungen-Simulationsapparatur	109
2.2.8.3. Beschichtung des Lungen-Modells	112
2.2.8.4. Durchführung der Behandlung	113
3. Ergebnisse	114
3.1. Identifikation der Oxidationsziele des Allicins in <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> mittels OxICAT	114
3.1.1. Oxidationsziele des Allicins in <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> nach Allicin-Behandlung	114
3.1.2. Sequenz-Analyse des oxidierten Peptides	120
3.1.3. Untereinheit A der DNA-Gyrase als Allicin-Target	125
3.2. Einfluss des Allicins auf die Aktivität der DNA-Gyrase	128
3.2.1. Allicin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus <i>E. coli in vitro</i>	128
3.2.2. Allicin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1 in vitro</i>	131
Aufreinigung	131
Aktivitätstest	134
3.2.3. Herstellung der <i>gyrA</i> -Austauschmutanten <i>Pf0-1_{gyrAPfAR-1}</i> und <i>PfAR-1_{gyrAPf0-1}</i>	136
3.2.4. Anfälligkeit der <i>gyrA</i> -Austauschmutanten <i>Pf0-1_{gyrAPfAR-1}</i> und <i>PfAR-1_{gyrAPf0-1}</i> gegenüber Allicin und anderen Antibiotika	145
3.3. Bestimmung von MHK und MBK für Allicin bei lungenpathogenen Bakterien	152
3.4. Auswirkung des Allicins auf die Biofilm-Ausbildung	155
3.4.1. Auswirkung des Allicins auf die Biofilm-Ausbildung bei <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> in Flüssigkultur	155
3.4.2. Biofilm-Reporter-Stämme <i>Ps4612</i> mit <i>pZLR4- traR-traG::lacZ</i> -Plasmid und <i>PfAR-1</i> mit <i>pJP2-aprA::gusA</i>	156
3.4.3. Auswirkung des Allicins auf den Biofilm von <i>Candida albicans</i>	158
3.5. Synergistischer Effekt des Allicins mit konventionellen Antibiotika	162
3.6. Einfluss des Allicins auf tierische Zellen	167
3.6.1. Sensitivität der tierischen Zellen in der Zellkultur gegenüber Allicin	167
3.6.2. Sensitivität von Lungengewebeschnitten der Ratte gegenüber Allicin	172
3.7. Allicin inhibiert das Wachstum lungenpathogener Bakterien über die Gasphase	173

3.8.	Lungen-Simulationsmodell	179
3.8.1.	Beständigkeit der Baumaterialien gegenüber Allicin	179
3.8.2.	Vorversuche zur Beschichtung des Modells	184
3.8.3.	Aufbau des Lungen-Simulationsmodells	185
3.8.4.	Beschichtung des Lungen-Simulationsmodells mit dem bakterienhaltigen Agar	186
3.8.5.	Behandlung des beschichteten Lungen-Simulationsmodells mit Allicin und konventionellen Antibiotika	189
4.	Diskussion	196
4.1.	Hintergrund und Ziele der Arbeit	196
4.2.	Oxidationsziele des Allicins in <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i>	197
4.3.	DNA-Gyrase als Oxidationsziel des Allicins	202
	Allicin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase	205
4.4.	MHK und MBK für Allicin bei lungenpathogenen Bakterien	207
4.5.	Auswirkung des Allicins auf die Biofilm-Ausbildung	208
4.6.	Synergistischer Effekt des Allicins mit konventionellen Antibiotika	209
4.7.	Einfluss des Allicins auf tierische Zellen	210
4.8.	Allicin inhibiert das Wachstum der lungenpathogenen Bakterien über die Gasphase	211
4.9.	Lungen-Simulationsmodell	212
4.10.	Allicin als Medikament	215
4.11.	Zusammenfassung und Fazit	218
5.	Literatur	221
VII.	Kooperationspartner	239
VIII.	Liste der Veröffentlichungen	240
IX.	Eidesstattliche Erklärung	241
X.	Danksagung	242
XI.	Anhang	243
a.	Identifikation der Oxidationsziele des Allicins in <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> mittels OxICAT	243
	Statistische Analyse der Ergebnisse aus dem OxICAT-Experiment	243
	Oxidationsziele des Allicins	247
b.	Einfluss des Allicins auf die Aktivität der DNA-Gyrase	250
	Proteinmenge-Bestimmung der DNA-Gyrase	250
	Sequenzierung	251

1. pEMG-TS1 _{Pf0-1} - <i>gyrA</i> _{PfAR-1} -TS2 _{Pf0-1} Nummer 1 und 14	251
2. <i>gyrA</i> -Gene in <i>PfAR-1</i> - und <i>Pf0-1</i> - <i>gyrA</i> -Austauschmutanten	255
3. <i>Intergenic spacer</i> Region (16S–23S rRNA Gene) der <i>gyrA</i> -Austauschmutanten sowie Wildtypen von <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> (Primerpaar 21 & 22)	267
Anfälligkeit der <i>GyrA</i> -Austauschmutanten <i>Pf0-1</i> _{<i>gyrA</i><i>PfAR-1</i>} und <i>PfAR-1</i> _{<i>gyrA</i><i>Pf0-1</i>} gegenüber Allicin und anderen Antibiotika	271
c. Bestimmung von MHK und MBK für Allicin bei lungenpathogenen Bakterien	275
d. Auswirkung des Allicins auf die Biofilm-Ausbildung	278
e. Einfluss des Allicins auf tierische Zellen	282
Sensitivität tierischer Zellen in der Zellkultur gegenüber Allicin	282
Sensitivität von Lungengewebe-Schnitte der Ratte gegenüber Allicin	288
f. Auswertung der Oxidationszielen des Allicins in Bakterien	289

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Entdeckung neuer Antibiotika-Klassen und der erste Ansatz in der Medizin. _____	35
Abbildung 2. Querschnitt durch den ausgebildeten Biofilm von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . _____	37
Abbildung 3. Geerntete Knoblauch-Knollen (<i>Allium sativum</i> L.). _____	41
Abbildung 4. Biosynthese des Allicins ausgehend von Alliin. _____	42
Abbildung 5. Allicin ist eine Reaktive Schwefel-Spezies (RSS). _____	43
Abbildung 6. Allicin als reaktive Schwefel-Spezies (RSS) vollzieht eine dem Thiol-Disulfid-Austausch ähnliche Reaktion. _____	44
Abbildung 7. Antimikrobielle Wirkung des Allicins auf <i>E. coli</i> ist vergleichbar mit den konventionellen Antibiotika. _____	45
Abbildung 8. Inhalationsmaske, die mit dem Knoblauch-Saft in einem Schwamm befüllt ist. _____	46
Abbildung 9. Allicin besitzt antibakterielle Wirkung über die Gasphase. _____	46
Abbildung 10. Plasmid-Karte von pEMG-TS1 _{PfAR-1} -gyrA _{Pf0-1} -TS2 _{PfAR-1} . _____	58
Abbildung 11. Plasmid-Karte pEMG-TS1 _{Pf0-1} -gyrA _{PfAR-1} -TS2 _{Pf0-1} . _____	58
Abbildung 12. Plasmid-Karte pRU1097-clone1. _____	59
Abbildung 13. Plasmid-Karte von pJP2- aprA _{Pf0-1} ::gusA. _____	59
Abbildung 14. Plasmid-Karte von pJP2- aprA _{PfAR-1} ::gusA. _____	59
Abbildung 15. Analyse des Allicins mittels HPLC-Messung, mit der man Konzentration und Reinheit des Allicins bestimmen kann. _____	69
Abbildung 16. Replikatorstempel mit dem gespannten Transfertuch für die Übertragung der Bakterien von einer bewachsenen auf eine neue Agar-Platte. _____	75
Abbildung 17. GeneRuler 1 kb DNA-Größenmarker von Invitrogen. _____	83
Abbildung 18. Erzeugung der gyrA-Austausch-Mutanten bei <i>Pseudomonas fluorescens</i> (auf dem Beispiel von Pf0-1 _{gyrAPfAR-1}) mit Hilfe der modifizierten pEMG-knock out-Methode. _____	89
Abbildung 19. Upstream-DNA-Sequenz, die von Liu et al. (2007) als Promoter-Bereich des Gens alkalische Metalloprotease aprX aus dem <i>Pseudomonas fluorescens</i> 395 Stamm verwendet wurde. _____	91
Abbildung 20. Schematische Darstellung der Präparation von 250 µm-dicken Lungenscheibchen aus der Ratte zur Testung der Anfälligkeit der Lungengewebe gegenüber Allicin im Mikrotiter-Format. _____	94
Abbildung 21. Schematische Darstellung der Funktionsweise der OxICAT-Methode zur Analyse des Oxidationszustandes des Proteoms. _____	96
Abbildung 22. Auswertung der OxICAT-Daten nach der Massenspektrometrie. _____	100
Abbildung 23. Kalibrationskurve des Bradford-Assays für Proteinmengen bis 10 µg. _____	105
Abbildung 24. Der lineare Bereich der Kalibrationskurve des Bradford-Assay liegt zwischen der Proteinmenge 0 bis 5 µg. _____	106
Abbildung 25. Aufbau der Lungen-Simulationsapparatur. _____	110
Abbildung 26. Temperierter Inkubator-Kasten mit dem Lungen-Modell. _____	110
Abbildung 27. Zeichnung des Lungen-Modells. _____	111
Abbildung 28. Beschichtung des Lungen-Modells mit dem bakterienhaltigen Agar. _____	112

Abbildung 29. Versuchsaufbau bei der Behandlung mit dem Allicin über die Gasphase. _____	113
Abbildung 30. Oxidationszustand der bei OxICAT identifizierten Proteine in Allicin-anfälligen <i>Pf0-1</i> und Allicin-resistenten <i>PfAR-1</i> bei Kontroll-Bedingungen und nach Allicin-Behandlung. _____	116
Abbildung 31. Die umgebende Aminosäuresequenz von Allicin oxidiertem Cystein ist nicht konserviert. _____	121
Abbildung 32. Massen-Spektren vom OxICAT-markierten DNA-Gyrase-Peptid AGADSCRPENLDPQYGLR ³⁺ mit dem Cys ₄₃₃ in unbehandelten und Allicin-behandelten <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> . _____	126
Abbildung 33. Plasmid pUC18 wird durch die Behandlung mit dem Enzym Topoisomerase I in die entspannte Form überführt und durch die Behandlung mit DNA-Gyrase aus <i>E. coli</i> wird das Plasmid aus entspannter in die <i>super coiled</i> -Form überführt. _____	128
Abbildung 34. Nalidixinsäure inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus <i>E. coli</i> . _____	129
Abbildung 35. Allicin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus <i>E. coli</i> . _____	130
Abbildung 36. Levofloxacin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase bei <i>E. coli</i> . _____	130
Abbildung 37. Aufreinigungsschritte der DNA-Gyrase aus <i>PfAR-1</i> , die Proben wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt. _____	131
Abbildung 38. SDS-PAGE des Lysozyms, das bei der Aufreinigung der DNA-Gyrase verwendet wurde. _____	132
Abbildung 39. Aufgereinigte DNA-Gyrase aus <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> . _____	133
Abbildung 40. Nach der Aufreinigung weisen die DNA-Gyrase aus <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> enzymatische Aktivität auf. _____	134
Abbildung 41. Nalidixinsäure und Allicin inhibieren die Aktivität der DNA-Gyrase aus <i>Pf0-1</i> . _____	135
Abbildung 42. Allicin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus <i>PfAR-1</i> bei 1 mM. _____	135
Abbildung 43. Novobiocin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> in gleicher Konzentrationsspanne zwischen 1 und 10 µM. _____	136
Abbildung 44. Bausteine für pEMG-TS1 _{<i>Pf0-1</i>} - <i>gyrA</i> _{<i>PfAR-1</i>} -TS2 _{<i>Pf0-1</i>} sind PCR-Produkte mit Überhängen für die Gibson-Assemblierung. _____	137
Abbildung 45. <i>gyrA</i> aus <i>PfAR-1</i> als Baustein für pEMG-TS1 _{<i>Pf0-1</i>} - <i>gyrA</i> _{<i>PfAR-1</i>} -TS2 _{<i>Pf0-1</i>} . _____	137
Abbildung 46. Restriktionsverdau der Plasmide pEMG-TS1 _{<i>Pf0-1</i>} - <i>gyrA</i> _{<i>PfAR-1</i>} -TS2 _{<i>Pf0-1</i>} 1, 2, 11 und 14 nach der Gibson-Assemblierung mit dem Enzym EcoRI. _____	138
Abbildung 47. Restriktionsverdau der Plasmide pEMG-TS1 _{<i>Pf0-1</i>} - <i>gyrA</i> _{<i>PfAR-1</i>} -TS2 _{<i>Pf0-1</i>} 1, 2, 11 und 14 nach der Gibson-Assemblierung mit dem Enzymen EcoRI und KpnI. _____	139
Abbildung 48. Restriktionsverdau von PCR-Produkt (Primer 60 und 61, binden in TS1 und TS2 von <i>Pf0-1</i>) mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI zeigt, dass Plasmide <i>gyrA</i> aus <i>PfAR-1</i> besitzen. _____	140
Abbildung 49. Restriktionsverdau der TS1 _{<i>Pf0-1</i>} - <i>gyrA</i> _{<i>PfAR-1</i>} -TS2 _{<i>Pf0-1</i>} aus <i>Pf0-1</i> _{pEMG} -Transformanten, die das Plasmid pEMG-TS1 _{<i>Pf0-1</i>} - <i>gyrA</i> _{<i>PfAR-1</i>} -TS2 _{<i>Pf0-1</i>} in dem Genom integriert haben, mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI. _____	141
Abbildung 50. Nachweis des <i>gyrA</i> -Gens aus <i>PfAR-1</i> in dem Genom von <i>Pf0-1</i> - <i>gyrA</i> -Austausch-Kandidaten nach dem Verlust der Kanamycin-Resistenz. _____	142
Abbildung 51. PCR mit TS1 _{<i>Pf0-1</i>} und TS2 _{<i>Pf0-1</i>} spezifischen Primern (Primer 60 und 61). _____	142

Abbildung 52. Restriktionsverdau der PCR-Produkte TS _{1Pf0-1-gyrA} -TS _{2Pf0-1} (Primer 60 und 61) aus <i>Pf0-1-gyrA</i> -Austausch-Kandidaten mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI.	143
Abbildung 53. Allicin-Anfälligkeit der <i>Pf0-1</i> - und <i>PfAR-1</i> -Gyrase-Austauschmutanten wurde mittels Hemmhof-Tests untersucht.	146
Abbildung 54. Untersuchung der Allicin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> -Gyrase-Austausch-Mutanten.	146
Abbildung 55. Anfälligkeit gegenüber Levofloxacin, Novobiocin und Nalidixinsäure der <i>Pf0-1</i> - und <i>PfAR-1</i> -Gyrase-Austauschmutanten, untersucht mittels Hemmhof-Tests.	147
Abbildung 56. Untersuchung der Nalidixinsäure-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> -Gyrase-Austausch-Mutanten.	148
Abbildung 57. Untersuchung der Novobiocin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> -Gyrase-Austausch-Mutanten.	149
Abbildung 58. Untersuchung der Levofloxacin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> -Gyrase-Austausch-Mutanten.	150
Abbildung 59. Biofilm-Ausbildung bei <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> bei verschiedenen Allicin-Konzentrationen.	155
Abbildung 60. Wachstum der Bakterien <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> bei verschiedenen Allicin-Konzentrationen in Stand-Kultur bei der Untersuchung der Biofilm-Ausbildung.	156
Abbildung 61. Allicin inhibiert die Ausbildung von Biofilm bei <i>Pseudomonas syringae</i> 4612.	157
Abbildung 62. Allicin inhibiert die Ausbildung von Biofilm bei <i>PfAR-1</i> .	158
Abbildung 63. Die minimale hemmende Konzentration (MHK) des Allicins, die das sichtbare Wachstum von <i>C. albicans</i> inhibiert.	159
Abbildung 64. Bestimmung der minimalen fungiziden Konzentration (MFK) von Allicin bei <i>C. albicans</i> .	159
Abbildung 65. Allicin inhibiert die Ausbildung des Biofilms von <i>C. albicans</i> .	160
Abbildung 66. Eradikation des 1-Tag-alten Biofilms von <i>C. albicans</i> durch 1,25 mM Allicin.	161
Abbildung 67. Suszeptibilität der Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit.	168
Abbildung 68. Suszeptibilität der Darmepithel-Zelllinie Caco-2 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit.	169
Abbildung 69. Suszeptibilität der Lungenepithel-Zelllinie A549 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit..	170
Abbildung 70. Suszeptibilität der Lungen-Bronchiengewebe-Zelllinie Beas-2B gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit.	171
Abbildung 71. Allicin inhibiert das Wachstum von <i>Micrococcus luteus</i> über die Gasphase in konzentrationsabhängiger Weise.	173
Abbildung 72. Hemmhof-Test für Allicin mit <i>Staphylococcus aureus</i> SNo 68709.	174
Abbildung 73. Hemmhof-Test für Allicin mit <i>Klebsiella pneumoniae</i> SNo 45412 und SNo 45413.	174
Abbildung 74. Hemmhof-Test für Allicin mit <i>Streptococcus pyogenes</i> (SNo 67467), <i>Streptococcus agalactiae</i> (SNo 67764) und <i>Streptococcus dysgalactiae</i> (SNo 67799).	175

Abbildung 75. Hemmhof-Test für Allicin mit drei Stämmen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PAO1 SBUG8, PAO25 und DSM2659).	176
Abbildung 76. Hemmhof-Test für Allicin mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> (klinische Isolate SNo 68665, SNo 68668 und MDR-Stämme <i>S. pneumoniae</i> ^{23F} -1 Spain und -16 Poland).	176
Abbildung 77. Hemmhof-Test für Allicin mit <i>Haemophilus influenzae</i> -Stämmen 2019, R2866 und 86-028 NP.	177
Abbildung 78. Hemmhof-Test für Allicin mit <i>Haemophilus influenzae</i> -Stämmen R2866 und 2019.	177
Abbildung 79. Allicin tötet ausgebildeten Bakterienrasen von <i>E. coli</i> DH5 α über die Gasphase.	178
Abbildung 80. Allicin tötet ausgebildeten Bakterienrasen von Pf0-1 und PfAR-1 über die Gasphase.	178
Abbildung 81. Allicin greift die Aluminium-Oberfläche an, im Unterschied dazu bleiben keine sichtbaren Spuren an der Edelstahl- und Glas-Oberfläche.	180
Abbildung 82. Die Kunststoffe Polymethylmethacrylat (PMMA) und Polyetheretherketon (PEEK) sind nicht beständig gegenüber Allicin. Polyethylenterephthalat (PET) von einer Getränkeflasche weist nach der Behandlung mit Allicin keine sichtbaren Spuren an der Oberfläche auf.	181
Abbildung 83. Die Kunststoffe Polystyrol und Polyvinylchlorid (PVC) sind nicht beständig gegenüber Allicin.	182
Abbildung 84. Die Kunststoffe Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS) und Polylactid (PLA) sind nicht beständig gegenüber Allicin.	182
Abbildung 85. Die Kunststoffe Polytetrafluorethylen (PTFE), Polyoxymethylen (POM) und Polyamid sind beständig gegenüber Allicin.	183
Abbildung 86. Vorversuche zur Ermittlung des Beschichtungsmaterials des Lungenmodells.	184
Abbildung 87. Untersuchung der Guss-Formstabilität unter Verwendung verschiedener Dorn-Stärken und verschiedener Gelkonzentrationen.	185
Abbildung 88. Lungen-Modell beschichtet mit <i>E. coli</i> -haltigem LB-Agar nach 18 h Inkubation bei 37°C wurde zur Detektion lebender Bakterien mit MTT-Lösung behandelt.	187
Abbildung 89. Stärke der Blau-Färbung durch MTT-Lösung korreliert mit der Menge der Bakterien im Agar.	188
Abbildung 90. Die durch UV-Behandlung abgetöteten Bakterien erscheinen nach der Färbung mit MTT hell in der LB-Agar-Beschichtung.	189
Abbildung 91. Behandlung des Lungen-Modells mit Allicin-Aerosol.	191
Abbildung 92. Behandlung des Lungen-Modells mit Gentamicin-Aerosol.	192
Abbildung 93. Behandlung mit wässriger Allicin-Lösung und mit konzentriertem Allicin über die Gasphase zeigt keine antimikrobielle Wirkung.	193
Abbildung 94. Allicin gelöst in Ethanol zeigt antimikrobielle Wirkung über die Gasphase.	194
Abbildung 95. Aminosäuren-Vergleich der Untereinheit A der DNA-Gyrase bei Pf0-1 und PfAR-1.	204
Abbildung 96. Vergleich der Aminosäuresequenz von GyrA von PfAR-1 mit Allicin-anfälligem <i>Pseudomonas syringae</i> Stamm Ps 1448A (<i>Ps</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A).	205

Abbildung 97. Modellerte Geschwindigkeitsverteilung innerhalb des Lungenmodells während der Behandlung. _____	214
Abbildung 98. Antimikrobiell wirksame Allicin-Derivate Dimethyl-Thiosulfinat und Pyridyl-Disulfide. _____	217
Abbildung A1. Plasmid-Karte von pEMG-TS1 _{Pf0-1} -gyrA _{PfAR-1} -TS2 _{Pf0-1} . _____	251
Abbildung A2. Sequenzierung der Plasmides pEMG 1 mit dem Primer 41. _____	251
Abbildung A3. Sequenzierung der Plasmides pEMG 1 mit dem Primer 14. _____	252
Abbildung A4. Sequenzierung der Plasmides pEMG 14 mit dem Primer 41. _____	253
Abbildung A5. Sequenzierung der Plasmides pEMG 14 mit dem Primer 14. _____	254
Abbildung A6. Die PfAR-1-gyrA-Austauschmutanten wurden im Bereich TS1 _{PfAR-1} -gyrA _{Pf0-1} -TS2 _{PfAR-1} mit den zwei Primer 12 (am 3'-Ende) und 17 (am 5'-Ende) teilweise sequenziert. _____	255
Abbildung A7. Sequenzierung der PfAR-1-gyrA-Austauschmutante 1 mit dem Primer 17. _____	255
Abbildung A8. Sequenzierung der PfAR-1-gyrA-Austauschmutante 1 mit dem Primer 12. _____	256
Abbildung A9. Sequenzierung der PfAR-1-gyrA-Austauschmutante 2 mit dem Primer 17. _____	257
Abbildung A10. Sequenzierung der PfAR-1-gyrA-Austauschmutante 2 mit dem Primer 12. _____	258
Abbildung A11. Sequenzierung der PfAR-1-gyrA-Austauschmutante 3 mit dem Primer 17. _____	259
Abbildung A12. Sequenzierung der PfAR-1-gyrA-Austauschmutante 3 mit dem Primer 12. _____	260
Abbildung A13. Die Pf0-1-gyrA-Austauschmutanten wurden im Bereich TS1 _{Pf0-1} -gyrA _{PfAR-1} -TS2 _{Pf0-1} mit den zwei Primer 60 (am 5'-Ende) und 61 (am 3'-Ende) teilweise sequenziert. _____	261
Abbildung A14. Sequenzierung der Pf0-1-gyrA-Austauschmutante 1 mit dem Primer 60. _____	261
Abbildung A15. Sequenzierung der Pf0-1-gyrA-Austauschmutante 1 mit dem Primer 61. _____	262
Abbildung A16. Sequenzierung der Pf0-1-gyrA-Austauschmutante 2 mit dem Primer 60. _____	263
Abbildung A17. Sequenzierung der Pf0-1-gyrA-Austauschmutante 2 mit dem Primer 61. _____	264
Abbildung A18. Sequenzierung der Pf0-1-gyrA-Austauschmutante 3 mit dem Primer 60. _____	265
Abbildung A19. Sequenzierung der Pf0-1-gyrA-Austauschmutante 3 mit dem Primer 61. _____	266
Abbildung A20. Sequenzierung von <i>intergenic spacer</i> Region (16S–23S rRNA Gene) von Pf0-1- und PfAR-1-Wildtypen. _____	267
Abbildung A21. Sequenzierung von <i>intergenic spacer</i> Region (16S–23S rRNA Gene) des Pf0-1-Wildtyps. _____	267
Abbildung A22. Sequenzierung von <i>intergenic spacer</i> Region (16S–23S rRNA Gene) der gyrA-Austauschmutanten Pf0-1-AM-1. _____	268
Abbildung A23. Sequenzierung von <i>intergenic spacer</i> Region (16S–23S rRNA Gene) der gyrA-Austauschmutanten Pf0-1-AM-2. _____	268
Abbildung A24. Sequenzierung von <i>intergenic spacer</i> Region (16S–23S rRNA Gene) der gyrA-Austauschmutanten Pf0-1-AM-3. _____	268
Abbildung A25. Sequenzierung von <i>intergenic spacer</i> Region (16S–23S rRNA Gene) des PfAR-1-Wildtyps. _____	269
Abbildung A26. Sequenzierung von <i>intergenic spacer</i> Region (16S–23S rRNA Gene) der gyrA-Austauschmutanten PfAR-1-AM-1. _____	269
Abbildung A27. Sequenzierung von <i>intergenic spacer</i> Region (16S–23S rRNA Gene) der gyrA-Austauschmutanten PfAR-1-AM-2. _____	270

Abbildung A28. Sequenzierung von <i>intergenic spacer</i> Region (16S–23S rRNA Gene) der <i>gyrA</i> -Austauschmutanten <i>PfAR-1-AM-3</i> . _____	270
Abbildung A29. Ergebnisse der Sequenzsuche von <i>PfAR-1</i> 's 40-AS-spezifischen Sequenz mit Hilfe von BLAST ergeben vier Treffer. _____	295
Abbildung A30. Aminosäuren-Vergleich der Untereinheit B der DNA-Gyrase bei <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> . _____	295

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Antibiotika-Klassen und deren Wirkungsmechanismen. _____	32
Tabelle 2. Verwendete Geräte. _____	48
Tabelle 3. Aufbau der HPLC-Anlage. _____	49
Tabelle 4. Aufbau der LC-MS/MS-Anlage. _____	49
Tabelle 5. Verwendete Computer-Programme und Online-Tools. _____	50
Tabelle 6. Verbrauchsmaterialien. _____	51
Tabelle 7. Verwendete Chemikalien. _____	52
Tabelle 8. Verwendete Enzyme. _____	55
Tabelle 9. Käuflich erworbenen Nährmedien und Zusatzstoffe. _____	55
Tabelle 10. Käuflich erworbene Kits. _____	56
Tabelle 11. Verwendete Größenmarker. _____	56
Tabelle 12. Verwendete und hergestellte Plasmide. _____	57
Tabelle 13. Verwendete Oligonukleotide. _____	60
Tabelle 14. Verwendete Bakterien-Stämme der Sicherheitsstufe S1 . _____	61
Tabelle 15. Verwendete Bakterien-Stämme der Sicherheitsstufe S2. _____	63
Tabelle 16. Verwendeter Pilzstamm der Sicherheitsstufe S2. _____	67
Tabelle 17. Verwendete Zellkultur-Linien. _____	67
Tabelle 18. HPLC-Laufprogramm für die Allicin-Konzentrationsmessung. _____	69
Tabelle 19. King's B-Nährmedium zur Kultivierung der Pseudomonaden ohne Magnesiumsulfat-Zusatz. _____	70
Tabelle 20. Luria-Bertani (LB)-Nährmedium zur Kultivierung der <i>E. coli</i> . _____	71
Tabelle 21. Cetrimid-Nährmedium zur Selektion der Pseudomonaden. _____	71
Tabelle 22. ABM-Nährmedium zur Untersuchung des Biofilm-Ausbildung. _____	71
Tabelle 23. CASO-Agar-Nährmedium zur Kultivierung der S2-Bakterien. _____	72
Tabelle 24. Müller-Hinton-Bouillon II, die für den Suszeptibilität-Test verwendet wurde. _____	72
Tabelle 25. CDM-Flüssignährmedium zur Kultivierung <i>Haemophilus influenzae</i> . _____	73
Tabelle 26. YPD-Nährmedium für die Kultivierung Hefepilzes <i>C. albicans</i> . _____	73
Tabelle 27. Arbeits- und Stocklösung-Konzentrationen der verwendeten Antibiotika. _____	74
Tabelle 28. Zusammensetzung der Phosphat-gepufferten Salzlösung für <i>C. albicans</i> . _____	77
Tabelle 29. Zusammensetzung der Puffer-Lösungen für die Plasmid-Präparation aus Bakterien. _____	80
Tabelle 30. Zusammensetzung des TE-Puffers. _____	80
Tabelle 31. Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes mit 20 µl Volumen. _____	81
Tabelle 32. Zusammensetzung des Polymerase-Master-Mix für PCR. _____	81
Tabelle 33. Programm für die <i>touch down</i> -PCR mit dem Polymerase-Enzym Phusion®. _____	82
Tabelle 34. TAE-Puffer für die Agarosegel-Elektrophorese, 50fach konzentriert. _____	83
Tabelle 35. Zusammensetzung eines typischen DNA-Restriktion-Ansatzes mit 20 µl Volumen. _____	84
Tabelle 36. Zusammensetzung eines Ligation-Ansatzes. _____	84
Tabelle 37. Zusammensetzung des Master-Mixes für die Gibson-Assemblierung. _____	85

Tabelle 38. Zusammensetzung des 5fach konzentrierten Reaktionspuffers für die Gibson-Assemblierung. _____	85
Tabelle 39. Zusammensetzung der TFB I- und der TFB II-Lösung zur Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> (Rubidiumchlorid-Methode). _____	86
Tabelle 40. PCR-Produkte und die verwendeten Oligonukleotide, die durch die Gibson-Assemblierung zu den pEMG-Plasmiden pEMG-TS1 _{Pf0-1} - <i>gyrA</i> _{PfAR-1} -TS2 _{Pf0-1} bzw. pEMG-TS1 _{PfAR-1} - <i>gyrA</i> _{Pf0-1} -TS2 _{PfAR-1} zusammengesetzt wurden. _____	90
Tabelle 41. Zusammensetzung der Phosphat-gepufferten Salzlösung für die Zell-Kultur. _____	93
Tabelle 42. Zusammensetzung der Zusatzstoffe für das MEM-Nährmedium zur Inkubation der PCLS. _____	94
Tabelle 43. Zusammensetzung der 2fach konzentrierten Phosphat-gepufferten Salzlösung für Bakterienkultur. _____	97
Tabelle 44. Zusammensetzung der DAB-Lösung. _____	97
Tabelle 45. Zusammensetzung der AB-Load-Lösung für Affinitätschromatografie. _____	99
Tabelle 46. Zusammensetzung des Puffers A für die Säulen-Aufreinigung der DNA-Gyrase. ____	104
Tabelle 47. Zusammensetzung des DNA-Gyrase-Lagerungspuffers. _____	104
Tabelle 48. Zusammensetzung des Bradford-Reagenz. _____	105
Tabelle 49. Kalibration-Messung für Bradford-Assay. _____	105
Tabelle 50. Zusammensetzung des BisTRIS-gepufferten Polyacrylamid-haltigen Gels zur SDS-PAGE. _____	106
Tabelle 51. Zusammensetzung des 5fach konzentrierten Laufpuffer für SDS-PAGE. _____	107
Tabelle 52. Zusammensetzung des Lämmli-Puffers. _____	107
Tabelle 53. Zusammensetzung der kolloidalen Coomassie-Lösung <i>Silver blue</i> zur Färbung der Gele. _____	107
Tabelle 54. Pipettierschema eines Topoisomerase I-Reaktionsansatzes. _____	108
Tabelle 55. Zusammensetzung des DNA-Gyrase-Reaktionsansatzes. _____	108
Tabelle 56. Geräte der Lungen-Simulationsapparatur. _____	111
Tabelle 57. Bestandteile der Lungensimulation-Apparatur. _____	112
Tabelle 58. Anzahl der bei dem OxICAT-Experiment identifizierten Peptide bei Pf0-1 und PfAR-1. _____	114
Tabelle 59. Oxidationszustand der bei dem OxICAT-Experiment identifizierten Proteine im Allicin-anfälligen Pf0-1 bei Kontroll-Bedingungen und nach Allicin-Behandlung. _____	115
Tabelle 60. Oxidationszustand der bei dem OxICAT-Experiment identifizierten Proteine im Allicin-resistenten PfAR-1 bei Kontroll-Bedingungen und nach Allicin-Behandlung. _____	115
Tabelle 61. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-anfälligen Pf0-1 und Allicin-resistenten PfAR-1, identifiziert in OxICAT-Experimenten. _____	117
Tabelle 62. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-anfälligen Pf0-1 und Allicin-resistenten PfAR-1, detektiert in allen drei OxICAT-Experimenten. _____	118
Tabelle 63. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-anfälligen Pf0-1 (und nicht in Allicin-resistenten PfAR-1), detektiert in allen drei OxICAT-Experimenten. _____	119

Tabelle 64. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-resistenten <i>PfAR</i> -1 (und nicht in Allicin-anfälligen <i>Pf0</i> -1), detektiert in allen drei OxICAT-Experimenten. _____	120
Tabelle 65. Sekundärstruktur, in der sich das durch Allicin-Behandlung oxidierte Cystein befindet. _____	122
Tabelle 66. Chemische Polarität der Aminosäuren, die zu dem nach Allicin-Behandlung oxidierten Cystein benachbart sind. _____	123
Tabelle 67. Umgebung der oxidierten Cysteine (Allicin-Targets) in Bezug auf die chemische Polarität der benachbarten Aminosäuren. _____	123
Tabelle 68. Umgebung der nicht-oxidierten Cysteine (kein Allicin-Target) in Bezug auf die chemische Polarität der benachbarten Aminosäuren. _____	124
Tabelle 69. Säure-Basen-Eigenschaften der Aminosäuren, die zu dem nach Allicin-Behandlung oxidierten Cystein benachbart sind. _____	124
Tabelle 70. Umgebung des oxidierten Cysteins (Allicin-Targets) in Bezug auf die Säure-Basen-Eigenschaften der benachbarten Aminosäuren. _____	125
Tabelle 71. Umgebung des nicht-oxidierten Cysteins (keine Allicin-Targets) in Bezug auf die Säure-Basen-Eigenschaften der benachbarten Aminosäuren. _____	125
Tabelle 72. Oxidationszustand der Untereinheit A der DNA-Gyrase in Allicin-resistenten <i>PfAR</i> -1 und Allicin-anfälligen <i>Pf0</i> -1 bei Kontroll-Bedingungen und bei Allicin-Behandlung, ermittelt im OxICAT-Experiment. _____	127
Tabelle 73. Minimale hemmende Konzentration (MHK) von Allicin, Nalidixinsäure, Novobiocin und Levofloxacin bei den Gyrase-Austauschmutanten der <i>Pf0</i> -1 und <i>PfAR</i> -1. _____	151
Tabelle 74. Minimale bakterizide Konzentration (MBK) von Allicin, Nalidixinsäure, Novobiocin und Levofloxacin bei den Gyrase-Austauschmutanten der <i>Pf0</i> -1 und <i>PfAR</i> -1. _____	151
Tabelle 75. Ermittelte MHKs und MBKs für Allicin bei lungenpathogenen Bakterien. _____	153
Tabelle 76. MHK für verschiedene Antibiotika im Vergleich zu Allicin bei lungenpathogenen Bakterien. _____	154
Tabelle 77. Allicin besitzt einen synergistischen Effekt mit Rifampicin bei <i>Pf0</i> -1. _____	162
Tabelle 78. Allicin zeigt keinen synergistischen Effekt mit Rifampicin bei <i>Pf0</i> -1 nach 24 h Inkubation. _____	163
Tabelle 79. Allicin zeigt keinen synergistischen Effekt mit Rifampicin bei <i>PfAR</i> -1 nach 24 h Inkubation. _____	163
Tabelle 80. Synergistischer Effekt des Allicins mit Rifampicin bei <i>Pf0</i> -1 nach drei Tagen Inkubation. _____	164
Tabelle 81. Synergistischer Effekt des Allicins mit Rifampicin bei <i>PfAR</i> -1 nach drei Tagen der Inkubation. _____	164
Tabelle 82. Allicin zeigt einen synergistischen Effekt mit Rifampicin und keinen Effekt mit den restlichen getesteten konventionellen Antibiotika bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 SBUG8. _____	165
Tabelle 83. Allicin zeigt keinen synergistischen Effekt mit getesteten konventionellen Antibiotika bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM2659. _____	166
Tabelle 84. Die Anfälligkeit des Lungen-Gewebes der Ratte gegenüber Allicin verringert sich durch die Glutathion-Zugabe. _____	172

Tabelle 85. Liste der getesteten Allicin-beständigen und nicht beständigen Materialien. _____	183
Tabelle 86. Stabilität und Entformbarkeit der Beschichtung der Vorversuchsform mit Agarose und Agar. _____	185
Tabelle 87. Allicin-Mengen, die bei der Auswahl der Behandlungen über die Gas-Phase und mit dem Aerosol verwendet wurden. _____	195
Tabelle 88. Überblick über die molekularen und physiologischen Funktionen der Oxidationsziele des Allicins in <i>E. coli</i> identifiziert von Müller et al. (2016). _____	199
Tabelle 89. Überblick über die molekularen und physiologischen Funktionen der Oxidationsziele des Allicins in <i>Pseudomonas fluorescens</i> Stämmen <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> . _____	200
Tabelle 90. Typen und die Funktionen der Topoisomerase-Enzyme. _____	203
Tabelle 91. Allicin erfüllt die Lipinski's „rule of five“ für die Bioverfügbarkeit der potenziellen Arzneimittel. _____	216
Tabelle A1. Oxidationszustand der Proteine bei <i>Pf0-1</i> ermittelt im OxICAT-Experiment. _____	243
Tabelle A2. Oxidationszustand der Proteine bei <i>PfAR-1</i> ermittelt im OxICAT-Experiment. _____	243
Tabelle A3. Oxidationszustand der Proteine bei <i>Pf0-1</i> bei einzelnen Experimenten. _____	243
Tabelle A4. Oxidationszustand der Proteine bei <i>PfAR-1</i> bei einzelnen Experimenten. _____	244
Tabelle A5. Oxidationszustand der Proteine bei <i>Pf0-1</i> bei allen drei Experimenten. _____	244
Tabelle A6. Oxidationszustand der Proteine bei <i>PfAR-1</i> bei allen drei Experimenten. _____	244
Tabelle A7. Mittelwerte des Oxidationszustandes der Proteine bei <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> wird als Erwartungswert bei dem Chi-Quadrat-Wert verwendet. _____	244
Tabelle A8. Erwartete Verteilung der Oxidationszustände bei <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> , angenommen das Oxidationszustand unterscheidet sich bei den beiden Bakterien nicht signifikant voneinander. _____	245
Tabelle A9. Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) für den Oxidationszustand der Proteine bei <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> bei Kontroll-Bedingungen. _____	245
Tabelle A10. Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) für den Oxidationszustand der Proteine bei <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> bei der Allicin-Behandlung. _____	246
Tabelle A11. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-resistenten <i>PfAR-1</i> und Allicin-anfälligen <i>Pf0-1</i> , detektiert in allen drei OxICAT-Experimenten. _____	247
Tabelle A12. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-anfälligen <i>Pf0-1</i> und nicht in Allicin-resistenten <i>PfAR-1</i> , detektiert in allen drei OxICAT-Experimenten. _____	248
Tabelle A13. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-resistenten <i>PfAR-1</i> und nicht in Allicin-anfälligen <i>Pf0-1</i> , detektiert in allen drei OxICAT-Experimenten. _____	249
Tabelle A14. Proteinmenge-Bestimmung der DNA-Gyrase aus Pseudomonaden und <i>E. coli</i> mittels Bradford-Assay. _____	250
Tabelle A15. Gen- und Protein-Größe der Untereinheiten A und B der DNA-Gyrase von <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> . _____	250
Tabelle A16. Untersuchung der Allicin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> -Gyrase-Austausch-Mutanten. _____	271
Tabelle A17. Statistische Analyse der Ergebnisse zur Untersuchung der Allicin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> -Gyrase-Austausch-Mutanten mittels Einweg-ANOVA-Tukey's Test. _____	271

Tabelle A18. Untersuchung der Nalidixinsäure-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit <i>Pf0</i> -1 und <i>PfAR</i> -1-Gyrase-Austausch-Mutanten. _____	272
Tabelle A19. Statistische Analyse der Ergebnisse zur Untersuchung der Nalidixinsäure-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit <i>Pf0</i> -1 und <i>PfAR</i> -1-Gyrase-Austausch-Mutanten mittels Einweg-ANOVA-Tukey's Test. _____	272
Tabelle A20. Untersuchung der Novobiocin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit <i>Pf0</i> -1 und <i>PfAR</i> -1-Gyrase-Austausch-Mutanten. _____	273
Tabelle A21. Statistische Analyse der Ergebnisse zur Untersuchung der Novobiocin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit <i>Pf0</i> -1 und <i>PfAR</i> -1-Gyrase-Austausch-Mutanten mittels Einweg-ANOVA-Tukey's Test. _____	273
Tabelle A22. Untersuchung der Levofloxacin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit <i>Pf0</i> -1 und <i>PfAR</i> -1-Gyrase-Austausch-Mutanten. _____	274
Tabelle A23. Statistische Analyse der Ergebnisse zur Untersuchung der Levofloxacin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit <i>Pf0</i> -1 und <i>PfAR</i> -1-Gyrase-Austausch-Mutanten mittels Einweg-ANOVA-Tukey's Test. _____	274
Tabelle A24. Bestimmung der minimalen hemmenden (MHK) und bakteriziden Konzentrationen (MBK) des Allicins bei den lungen-pathogenen Bakterien. _____	275
Tabelle A25. Wachstum von <i>Pf0</i> -1 als Standkultur in dem Glasröhrchen, gemessen als optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD ₆₀₀). _____	278
Tabelle A26. Wachstum von <i>PfAR</i> -1 als Standkultur in dem Glasröhrchen bei verschiedenen Allicin-Konzentrationen, gemessen als optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD ₆₀₀). _____	278
Tabelle A27. Bestimmung der minimalen hemmenden Allicin-Konzentration (MHK) bei <i>Candida albicans</i> in 96-Mikrotiter-Format. _____	279
Tabelle A28. Bestimmung der minimalen hemmenden Allicin-Konzentration (MHK) bei <i>Candida albicans</i> in 96-Mikrotiter-Format, dargestellt in Prozent des Kontrollwertes. _____	279
Tabelle A29. Bestimmung der minimalen Allicin-Konzentration, die Ausbildung von Biofilm bei <i>C. albicans</i> hemmt. _____	280
Tabelle A30. Bestimmung der minimalen Allicin-Konzentration, die Ausbildung von Biofilm bei <i>C. albicans</i> hemmt, dargestellt in Prozent des Kontrollwertes. _____	280
Tabelle A31. Bestimmung der minimalen Allicin-Konzentration, die das ausgebildeten Biofilm von <i>C. albicans</i> abtötet. _____	281
Tabelle A32. Bestimmung der minimalen Allicin-Konzentration, die das ausgebildeten Biofilm von <i>C. albicans</i> abtötet, dargestellt in Prozent des Kontrollwertes. _____	281
Tabelle A33. Suszeptibilität der Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Tests in zwei Experimenten (n=8). _____	282
Tabelle A34. Suszeptibilität der Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Tests in zwei Experimenten (n=8). _____	282
Tabelle A35. Suszeptibilität der Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Tests in zwei Experimenten (n=8). _____	283
Tabelle A36. Suszeptibilität der Darmepithel -Zelllinie Caco-2 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Tests in zwei Experimenten (n=8). _____	283

Tabelle A37. Suszeptibilität der Darmepithel-Zelllinie Caco-2 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Tests in zwei Experimenten (n=8). _____	284
Tabelle A38. Suszeptibilität der Darmepithel-Zelllinie Caco-2 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Tests in zwei Experimenten (n=8). _____	284
Tabelle A39. Suszeptibilität der Lungenepithel-Zelllinie A549 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Tests in zwei Experimenten (n=8). _____	285
Tabelle A40. Suszeptibilität der Lungenepithel-Zelllinie A549 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Tests in zwei Experimenten (n=8). _____	285
Tabelle A41. Suszeptibilität der Lungenepithel-Zelllinie A549 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Tests in zwei Experimenten (n=8). _____	286
Tabelle A42. Suszeptibilität der Lungen/Bronchiengewebe-Zelllinie Beas-2B gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Tests in zwei Experimenten (n=8). _____	286
Tabelle A43. Suszeptibilität der Lungen/Bronchiengewebe-Zelllinie Beas-2B gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Tests in zwei Experimenten (n=8). _____	287
Tabelle A44. Suszeptibilität der Lungen/Bronchiengewebe-Zelllinie Beas-2B gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Tests in zwei Experimenten (n=8). _____	287
Tabelle A45. Untersuchung der Sensitivität der Lungengewebe aus Ratte gegenüber Allicin. _	288
Tabelle A46. Chemische Polarität der Aminosäuren, die zu dem homologen Cystein, das nicht durch Allicin-Behandlung oxidiert wurde, benachbart sind. _____	289
Tabelle A47. Nicht-Targets von Allicin in <i>Pf0-1</i> , <i>PfAR-1</i> und <i>E. coli</i> als Referenz-Proteine. ____	290
Tabelle A48. Zusammenfassung der Nicht-Targets von Allicin in <i>Pf0-1</i> , <i>PfAR-1</i> und <i>E. coli</i> . ____	296
Tabelle A49. Oxidationszustand des Cystein ₄₁₄ der Untereinheit B der DNA-Gyrase in <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> bei der Kontrolle und nach Allicin-Behandlung. _____	296
Tabelle A50. Oxidationszustand des Cystein ₄₈₀ der Untereinheit B der DNA-Gyrase in <i>Pf0-1</i> und <i>PfAR-1</i> bei der Kontrolle und nach Allicin-Behandlung. _____	297

VI. Abkürzungen

A ₅₉₀	Absorption, z.B. A ₅₉₀ Absorption bei der Wellenlänge von 590 nm
A	Alanin
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AB	engl. <i>affinity buffer</i>
ABM	Nährmedium, engl. <i>AB minimal mannitol medium</i>
ABS	Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer
AHL	N-Acyl-Homoserin-Lactone
AIA	Aerodynamisches Institut Aachen, Lehrstuhl für Strömungslehre der RWTH Aachen
AIP	engl. <i>autoinducing peptide</i>
AK	Austauschkandidaten
AM	Austauschmutanten
Amox	Amoxicillin
Arg	Arginin
AS	Aminosäuren
Asp	Asparagin
ATCC	Referenz-Nummer von engl. <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUS	Australien
B	Breite
BHI	Nährmedium, engl. <i>brain heart infusion</i>
BisTRIS	Bis(2-hydroxyethyl)-amino-tris(hydroxymethyl)-methan
BLAST	engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare, DNA-Länge-Einheit
C	Cystein
CAP	ambulant erworbenen Pneumonie, engl. <i>community-acquired pneumonia</i>
CASO	Casein-Soja-Pepton-Nährmedium
CDM	Nährmedium, engl. <i>chemically defined media</i>
CEB	engl. <i>cation exchange buffer</i>
cfu	koloniebildende Einheit, Einheit zur Quantifizierung der Mikroorganismen, engl. <i>colony-forming unit</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan- sulfonat
Chl	Chloramphenicol
Clin	Clindamycin
COPD	chronische obstruktive Lungenerkrankung, engl. <i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid, auch Cetrimid genannt
Cys	Cystein

D	Aspartat
Da	Dalton, atomare Masseneinheit
DAB	engl. <i>denaturing alkylation buffer</i>
DADS	Diallyldisulfid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Nährmedium, engl. <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMTS	Dimethyl-Thiosulfinat
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Glutamat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EK50	halbmaximale effektive Konzentration
Ery	Erythromycin
EMBL-EBI	Europäisches Institut für Bioinformatik des Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie, engl. <i>European Bioinformatics Institute of European Molecular Biology Laboratory</i>
ESKAPE	Akronym für die folgenden Bakterienstämme: <i>Enterococcus</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und <i>Enterobacter</i> spp.
et al.	und andere, lat. <i>et alii/ et aliae/ et alia</i>
EU	Europäische Union
EUCAST	engl. <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ExPASy	Internet-Portal für bioinformatische Werkzeuge vom Schweizer Institut für Bioinformatik, engl. <i>Expert Protein Analysis System</i>
F	Phenylalanin
FBS	fetales Kälberserum, engl. <i>fetal bovine serum</i>
ff.	folgende
Fot	Cefotaxim
g	Gramm, Einheit der Masse
GFP	grün fluoreszierende Protein, engl. <i>green fluorescent protein</i>
Gly	Glycin
GRX	Glutaredoxine
GSH	Glutathion
GyrA / <i>gyrA</i>	Untereinheit A der DNA-Gyrase (Protein / Gen)
H	Histidin
H	Höhe

h	Stunde, Zeiteinheit, engl. <i>hour</i>
H/L	Verhältnis der Signalstärke von isotopisch schwer-markiertem zu dem isotopisch leicht-markierten Peptid, engl. <i>heavy to light</i>
HAP	nosokomiale Lungenentzündung, engl. <i>hospital-acquired pneumonia</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
HSL	Homoserin-Lactone
I	Isoleucin
IAM	Iodacetamid
iAMB	Institut für Angewandte Mikrobiologie der RWTH Aachen
IBIVU	Centre for Integrative Bioinformatics Vrije Universität (VU) Amsterdam (NLD)
ICAT	engl. <i>isotope-coded affinity tag</i>
ID	Kennzeichen, engl. <i>identity document</i>
IPL	engl. <i>isolated, perfused and ventilated lung model</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Lysin
kb	Kilobasen, DNA-Länge-Einheit
kDa	Kilodalton, atomare Masseneinheit
L	Länge
L	Leucin
l	Liter, Einheit des Volumens
LB	Luria-Bertani -Nährmedium
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung, engl. <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LDH	Lactat-Dehydrogenase
Levo	Levofloxacin
logP	n-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
m	Meter, Einheit der Länge
M	molar, Einheit der Stoffmengenkonzentration
MBK	minimale bakterizide Konzentration
MDR	engl. <i>multiple drug resistance</i>
MEM	Nährmedium, engl. <i>minimal essential medium</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MFK	minimale fungizide Konzentration
MHBII	Nährmedium, engl. <i>Müller-Hinton-bouillon II</i>
MHK	minimale hemmende Konzentration
EK ₅₀	mittlere effektive Konzentration
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MurA	UDP-N-Acetylglucosamin-1-Carboxyvinyltransferase
Mxf	Moxifloxacin
n	Anzahl der Replikate bei der Versuchsdurchführung
N	Asparagin
N	normal, Einheit der Stoffmengenkonzentration
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCBI	Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation, engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NRZ	Nationalen Referenz-Zentrums für Streptokokken, Universitätsklinik Aachen
OD	optische Dichte, z.B. OD ₆₀₀ ist optische Dichte bei der Wellenlänge von 600 nm
OxICAT	engl. <i>oxidative isotope-coded affinity tag</i>
p	Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses, engl. <i>propability</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
PBS	Phosphat-gepufferten Salzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCLS	Lungengewebe-Schnitte, engl. <i>precision-cut lung tissue slices</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PEEK	Polyetheretherketon
PEG-8000	Polyethylenglykol mit mittleren relativen molaren Masse von 8.000g/mol
Pen	Penicillin
PET	Polyethylenterephthalat
PK	Positivkontrolle
PLA	Polylactid
PMEN	engl. <i>Pneumococcal Molecular Epidemiology Network</i>
PMMA	Polymethylmethacrylat, auch Plexiglas genannt
POM	Polyoxymethylen
POM	Polyoxymethylen
PRDX	Peroxiredoxine
PTFE	Polytetrafluorethylen, auch Teflon genannt
PVC	Polyvinylchlorid
Q	Glutamin
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
RoR	„Ratio of Ratios“, RoR-Wert ist das Verhältnis von „Ratio H/L“-Wert bei Allicin-Behandlung zu dem „Ratio H/L“-Wert bei der Kontrolle
ROS	reaktiven Sauerstoff-Spezies, engl. <i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute engl. <i>revolutions per minute</i>

RPMI	Zellkulturnährmedium, engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RSS	reaktiven Schwefel-Spezies
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule
S.	Seite
S	Stärke
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S1	biologische Sicherheitsstufe
S2	biologische Sicherheitsstufe
sBHI	Nährmedium, engl. <i>supplemented brain heart infusion</i>
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt, engl. <i>severe combined immunodeficiency</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	Methode der Gel-Elektrophorese, engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SNo	interne Referenz-Nummern des Nationalen Referenz-Zentrums für Streptokokken, Universitätsklinik Aachen
StAbw	Standardabweichung
Sxt	Trimethoprim/Sulfamethoxazol
TC	Zellkultur, engl. <i>tissue culture</i>
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TCL	Dünnschichtchromatographie, engl. <i>thin layer chromatography</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
Tet	Tetracyclin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TRX	Thioredoxine
TS	flankierende Sequenz bei der pEMG- <i>knock out</i> -Klonierung, engl. <i>targeted sequence</i>
U	Enzymeinheit, engl. <i>unit</i>
US	Vereinigten Staaten, engl. <i>United States</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Valin
V	Volt, Maßeinheit für die elektrische Spannung
v/v	Volumen pro Volumen, Einheit der Stoffmengenkonzentration, engl. <i>volume by volume</i>
Van	Vancomycin
vs.	versus
w/v	Masse pro Volumen, Einheit der Stoffmengenkonzentration, engl. <i>weight by volume</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. <i>World Health Organization</i>

WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol-disulfonat, engl. <i>water soluble tetrazolium</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure
Y	Tyrosin
YPD	Nährmedium, engl. <i>yeast extract peptone dextrose</i>
z	Ladung
Δ	Differenz, delta
$\Delta\%$	die Differenz zwischen prozentualem Anteil des oxidierten Proteins nach Allicin-Behandlung und der Kontrolle
3R	Verringerung, Verfeinerung und Vermeidung, engl. <i>reduction, refinement & replacement</i>
$\emptyset$	Durchmesser

1. Einleitung

1.1. Antibiotika-resistente Bakterien als wachsendes Problem in der modernen Medizin

1.1.1. Antibiotika

Die Entdeckung der Antibiotika und deren Anwendung zur Behandlung infektiöser Krankheiten war einer der bedeutendsten Schritte in der Geschichte der Menschheit. Im 19. Jahrhundert waren Pneumonie, Diphtherie, Diarrhoe, Tuberkulose und Syphilis, verursacht durch bakterielle Infektionen, die häufigsten Todesursachen (Zaffri et al., 2012).

Arsphenamin, eine organische Arsen-Verbindung, wurde von Sata und Ehrlich entdeckt und 1910 für die Chemotherapie-Behandlung von Syphilis erfolgreich eingesetzt. Bis in die 1940er Jahre war es die am häufigsten eingesetzte antimikrobiell wirksame Substanz. Die Sulfonamide sind die erste entdeckte Antibiotika-Klasse mit Breitband-Wirkung gegen gramnegative und -positive Bakterien. Sie wirken bakteriostatisch, greifen in den Folsäure-Synthese ein und wurden zur Behandlung von Harnweg-, Augen- und Haut-Infektionen eingesetzt (Zaffri et al., 2012).

Das bedeutendste Ereignis fand 1928 statt, als Alexander Flemming das Penicillin entdeckt. Flemming untersuchte systematisch die antimikrobiellen Eigenschaften des Penicillins auf unterschiedlichen Stämme, entwickelte die ersten Methoden zum Suszeptibilität-Testen, die heute in modifizierter Form als Hemmhof-Test bekannt sind, und beschrieb die notwendigen wirksamen Wirkstoff-Mengen, die vergleichbar mit der modernen minimalen hemmenden Konzentration (MHK) sind (Fleming, 1929). 1941 wurde Penicillin als Medikament eingeführt und seit der Behandlung von Wund-Infektionen im zweiten Weltkrieg bis heute wurden mehrere 10 Millionen Leben damit gerettet (Kardos und Demain, 2011).

Antibiotika sind Arzneimittel, die die Bakterien in ihrem Stoffwechsel oder ihrem Wachstum hindern und somit die bakteriellen Infektionen unterbinden. Antibiotika kann man nach deren Angriffsort bzw. Wirkungsmechanismus unterteilen (Tabelle 1). Die häufigsten Angriffsziele sind die bakterielle Zellwand, Protein-Biosynthese, DNA-Gyrase und -Topoisomerase (Lewis, 2013). Diese Ziele haben den Vorteil, dass sie in Menschen nicht vorkommen oder sich erheblich unterscheiden, so dass von den Antibiotika keine oder nur eine geringe Toxizität für den Menschen ausgeht. Zusätzlich unterscheidet man Antibiotika mit der bakteriziden Wirkung, die den bakteriellen Zelltod auslöst, und der bakteriostatischen Wirkung, die das bakterielle Wachstum inhibiert (Kohanski et al., 2010).

Zu den Antibiotika, die die Zellwand-Synthese stören oder die bestehende Zellwand modifizieren, zählen β -Lactame, Glykopeptide, Lipopeptide und Fosfomycin als der einzige Vertreter der Klasse (Brown-Elliott et al., 2012; Coates et al., 2002). Die charakteristische Eigenschaft der Klasse **β -Lactame** ist das Vorhandensein des Lactam-Ringes. Die β -Lactame hemmen die Peptidoglycan-Synthese von Bakterien und stören den Aufbau der bakteriellen Zellwände. Durch die Synthese des Enzyms β -Lactamase, das den β -Lactame-Ring spaltet und das Antibiotikum inaktiviert, erwerben die Bakterien Resistenz gegenüber diese Antibiotika-Klasse. Im Bezug dazu

stehen β -Lactamase-Inhibitoren, die üblicherweise zusammen mit β -Lactamen verabreicht werden (Drawz & Bonomo, 2010).

Glykopeptide wurden 1956 mit dem Wirkstoff Vancomycin entdeckt (McCormick, 1956). Diese Antibiotika-Klasse bindet an Murein, ein Makromolekül aus quervernetzten Polysaccharid-Ketten und Proteinen der bakteriellen Zellwand. Dadurch wird die korrekte sterische Anordnung der Murein-Moleküle an die Enzyme der Zellwandsynthese -und damit der Zellwand-Aufbau verhindert (Kapoor et al., 2017). Im Gegensatz zu Glykopeptiden inhibiert **Fosfomycin** direkt die Murein-Biosynthese (Silver, 2017).

Neben der Zellwand wird die Bakterienzelle von einer lipidhaltigen Plasmamembran umgeben. Antibiotika aus der Klasse der **Lipopeptide** interkalieren in die Zellmembran Gram-positiver Bakterien, agieren als Ionenkanäle, durch die Kalium-Ionen aus der Zelle ausströmen (Straus & Hancock, 2006).

Zudem greifen verschiedene Antibiotika auch den Stoffwechsel auch innerhalb der Zelle an. So interagieren z.B. mehrere Antibiotika-Klassen mit den bakteriellen Ribosomen (50S- oder 30S-Untereinheiten) und stören die Protein-Synthese durch die Transkriptions- und Translationsfehler. Dazu gehören **Aminoglykoside**, **Tetracycline**, **Makrolide**, **Chloramphenikole**, **Lincosamide**, **Ketolide**, **Oxazolidinone** und **Streptogramine** (Kapoor et al., 2017). Die Protein-Synthese wird auch von Rifamycinen und Mupirocin gestört. **Rifamycine** binden an die DNA-abhängige RNA-Polymerase und stören die Transkription (Floss & Yu, 2005).

Neben der Neu-Synthese von Proteinen stellt die DNA, durch die Proteine codiert werden, einen wichtigen Bestandteil des bakteriellen Wachstums und der bakteriellen Vermehrung dar. Z. B. sind **Sulfonamide** und **Diaminopyrimidine** Antibiotika, die die DNA-Synthese beeinflussen, indem Sie an verschiedenen Stellen in den Folsäure-Stoffwechsel eingreifen, welcher für die DNA-Synthese von Bakterien notwendig ist (Schneider et al., 2003; Sköld, 2000). **Chinolone** inhibieren die essenziellen bakteriellen Enzyme Topoisomerase II (DNA-Gyrase) und Topoisomerase IV, was zur Inhibition der DNA-Spiralisierung und Verhinderung der Transkription und Replikation führt (Aldred et al, 2014). Ebenso inhibieren die **Aminocumarine** die DNA-Gyrase, interagieren aber mit der Untereinheit B, im Gegensatz zu den Chinolonen, die mit der Untereinheit A der DNA-Gyrase interagieren (Heide, 2014). Nitrogruppen der **Nitroimidazole** werden in den Zellen von anaeroben Bakterien reduziert und reagieren anschließend mit der DNA, was zur DNA-Schädigung führt (Ang et al., 2017).

Tabelle 1. Antibiotika-Klassen und deren Wirkungsmechanismen (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Antibiotika-Klasse	Vertreter	Wirkungsmechanismus
Wirkungsort: Zellwand & Zellmembran		
1. β-Lactame		• enthalten den Lactam-Ring • Hemmung der Peptidoglycan-Synthese • Störung des Aufbaus der bakteriellen Zellwände • Lyse der Bakterien • bakterizid • gegen grampositive und gramnegative Bakterien
• Penicilline	Penicillin Ampicillin Amoxicillin Carbenicillin Methicillin	
• Cephalosporine	Cefotaxime Cefazolin Ceftazidime Ceftaroline	
• Monobactame	Aztreonam	
• Carbapeneme	Imipenem	
2. β-Lactamase-Inhibitoren	Clavulanate Sulbactam Tazobactam	• Hemmung der β-Lactamase • werden zusammen mit β-Lactamen eingebracht
3. Glykopeptide	Vancomycin Teicoplanin	• Hemmung der Zellwand-Synthese • bakterizid • gegen grampositive Bakterien
4. Lipopeptide	Daptomycin	• Störung der Membranen-Integrität • interkalieren in die Zellmembran der grampositiven Bakterien • agieren als Ionenkanäle, durch die Kalium-Ionen aus der Zelle ausströmen. • bakterizid • gegen grampositive Bakterien
5. Fosfomycin	Fosfomycin	• Hemmung der Murein-Synthese • alkyliert die Cystein-Seitenkette des Enzyms MurA der Murein-Biosynthese • bakterizid • gegen grampositive und gramnegative Bakterien
Wirkungsort: Protein-Biosynthese		
6. Tetracycline	Tetracyclin Chlortetracyclin Doxycyclin Minocyclin Lymecyclin Tigecyclin	• binden an die ribosomale 30S-Untereinheit • führen zu Modifikation von Aminoacyl-tRNA und zum Abbruch der Peptidkette • bakteriostatisch • gegen grampositive und gramnegative Bakterien
7. Aminoglykoside	Gentamicin Streptomycin Kanamycin Torbamycin	• binden an die 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen • führen zu den Transkriptions- und schließlich zu Translationsfehlern • Entstehen von <i>nonsense</i> Proteine • bakterizid • gegen grampositive und gramnegative Bakterien

Tabelle 1 (Fortsetzung). Antibiotika-Klassen und deren Wirkungsmechanismen (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Antibiotika-Klasse	Vertreter	Wirkungsmechanismus
8. Makrolide Ketolide	Erythromycin Roxithromycin Clarithromycin Azithromycin Telithromycin	- lagern sich an die 50S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen - bakteriostatisch - gegen grampositive und gramnegative Bakterien
9. Oxazolidinone	Linezolid	- binden an die 50S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen - bakteriostatisch - gegen aerobe grampositive und anaerobe Bakterien
10. Chloramphenicole	Chloramphenicol	- binden an die 50S-Untereinheit und verhindern Translation - bakteriostatisch - gegen grampositive und gramnegative Bakterien
11. Lincosamide	Lincomycin Clindamycin	- binden an die 50S-Untereinheit - bakteriostatisch
12. Streptogramine	Quinupristin Daftopristin	- binden an die 50S-Untereinheit des Ribosoms - interferieren mit der Peptidyltransferase - zwei Typen A und B, sind einzeln bakteriostatisch, in Kombination bakterizid - gegen grampositive Bakterien
Wirkungsort: Folsäure-Zyklus		
13. Sulfonamide	Sulfamethoxazol Sulfadiazin	- greifen in den Folsäure-Stoffwechsel der Bakterien - führen zur Hemmung der DNA-Synthese - bakteriostatisch - gegen grampositive Bakterien
14. Diaminopyrimidine	Trimethoprim	- inhibieren bakterielles Enzym Dihydrofolat-Reduktase - Hemmung der Tetrahydrofolsäure-Synthese - Hemmung der Purin-Synthese und DNA-Synthese - bakteriostatisch

Tabelle 1 (Fortsetzung). Antibiotika-Klassen und deren Wirkungsmechanismen.

Antibiotika-Klasse	Vertreter	Wirkungsmechanismus
Wirkungsort: DNA/RNA		
15. Chinolone Fluorochinolone	Levofloxacin Ciprofloxacin Ofloxacin Moxifloxacin Nalidixinsäure	- inhibieren die essenziellen bakteriellen Enzyme Topoisomerase II (DNA-Gyrase) und Topoisomerase IV - Inhibition der DNA-Spiralisierung und Verhinderung der Transkription und Replikation - Hemmung der DNA-Gyrase - bakterizid - gegen grampositive und gramnegative Bakterien
16. Aminocumarine	Novobiocin	- inhibieren das essentielle bakterielle Enzym Topoisomerase II (DNA-Gyrase) - binde an die Untereinheit B der DNA-Gyrase - bakteriostatisch
17. Rifamycine	Rifampicin (Rifampin) Rifabutin Rifapentine	- binden an die DNA-abhängige RNA-Polymerase - stören die Transkription - bakterizid - gegen grampositive Bakterien
18. Nitroimidazole	Metronidazol Nimorazol Tinidazol	- Nitrogruppen der Nitroimidazole werden in den Zellen anaerober Bakterien reduziert und reagieren mit der DNA - DNA-Schädigung - bakterizid - gegen Anaerobier

1.1.2. Antibiotika-Resistenzen

Die „Goldene Ära“ der Antibiotika fand zwischen den 1930er und 1970er Jahren statt (Levy, 1982; Lewis, 2012). In dieser Zeit wurden die meisten Antibiotika-Klassen entdeckt bzw. entwickelt und in der medizinischen Praxis eingeführt (Abbildung 1). Dabei wurden bakterielle und pilzlichen Sekundär-Metabolite systematisch auf deren antimikrobielle Wirkung untersucht (Paleaz, 2006). Die Entdeckung neuer Antibiotika-Klassen ist seit der 70er Jahre eine Seltenheit geworden (Davies & Davies, 2010), denn es wurden nur zwei neue Klassen, die Oxazolidinone (2000) und die Lipopeptide (2003), entdeckt (Högberg et al., 2010; Norrby et al., 2005; Powers, 2004; Silver, 2011; Ventola, 2015). Die moderne Antibiotika-Forschung basiert auf der Entwicklung der Wirkstoff-Analoga durch chemische Modifikationen. Die geeigneten Kandidaten werden *in silico* entworfen und deren Wirksamkeit abgeschätzt bzw. die Substanzen-Bibliotheken werden in den Hochdurchsatzverfahren untersucht (Lewis, 2013). Die Neuentwicklung der Antibiotika ist kostenintensiv und aufwendig. Dazu

1. Einleitung

kommen geringe finanzielle Gewinne im Vergleich zu der Medikamenten-Forschung für chronischen Erkrankungen, da die Antibiotika nur kurzzeitig angewendet werden. Dies macht diesen Forschungsbereich für die pharmazeutischen Unternehmen unattraktiv (Ventola, 2015).

Ein weiteres Problem sind die Antibiotika-resistenten Bakterien. Sie brauchen gewöhnlich nur wenige Jahre nach dem ersten klinischen Einsatz des Präparates, um die entsprechenden Resistenzen zu entwickeln (Abbildung 1). Es gibt vier Hauptmechanismen, die zur Antibiotika-Resistenz führen: Minimierung der Antibiotika-Aufnahme durch Verringerung der Membran-Permeabilität, Export aus der Zelle durch die Membran-Transporter, Veränderung des Antibiotika-Zielortes und Modifikation oder Abbau der wirksamen Substanz (Blair et al., 2015). Die Resistenz kann sich durch die Mutation endogen entwickeln oder auch durch den horizontalen Gentransfer von außen hinzukommen (Laws et al., 2019).

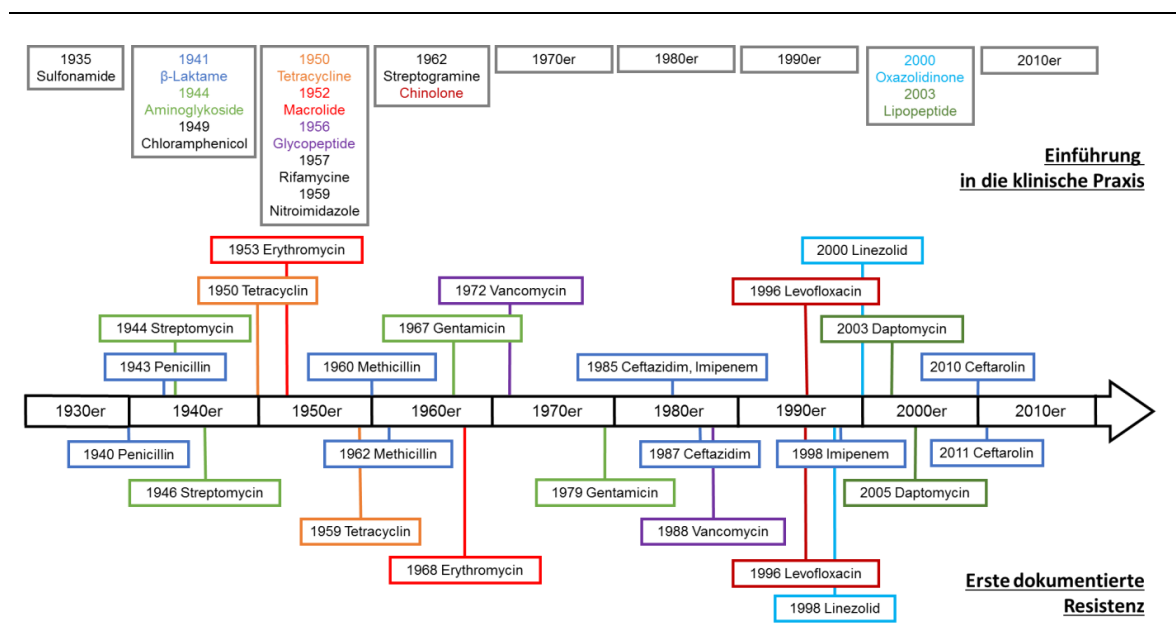


Abbildung 1. Entdeckung neuer Antibiotika-Klassen und der erste Ansatz in der Medizin (oben, farblich gleich markiert) und die erste Dokumentation der entwickelten Resistenzen bei Bakterien (verändert nach Högberg et al., 2010; Norrby et al., 2005; Powers, 2004; Silver, 2011; Ventola, 2015).

Bakterien mit Mehrfachresistenzen gegen Antibiotika: MDR-Stämme

Die MDR-Stämme (engl. *multiple drug resistant*) von pathogenen Bakterien sind ein wichtiges Problem in der modernen Medizin. MDR bedeutet, dass die Bakterien mindestens gegen drei verschiedene Antibiotika-Klassen resistent sind. So sind MDR-Stämme bei *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Mycobacterium tuberculosis* bekannt (Croucher et al., 2011; Dini et al., 2011; George et al., 2009; Muto et al., 2003). Als besonders gefährliche Bakterien sind die sogenannten ESKAPE Stämme (*Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter* spp.) von der US-amerikanischen Behörde des Gesundheitsministeriums (*Centers for Disease Control*) aufgelistet, da sie zur besonders schnellen

Ausbildung der Antibiotika-Resistenzen fähig sind. Dazu gehören der Vancomycin-resistente *Enterococcus* und Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA) (Pendleton et al., 2013). Die Lage ist beunruhigend, da manche gramnegative Bakterien, die schwere Krankheiten verursachen, nicht mehr auf die modernen Antibiotika reagieren (Perros, 2015).

Biofilme sind essenziell für die Ausbildung von Infektionen

Neben genetischen Resistenzmechanismen, die einzelnen Zellen Resistenz verleihen, ist die Antibiotika-Resistenzen von biofilmbildenden Bakterienkolonien oft höher als bei freilebenden Vertretern. 65%-80% der bakteriellen Infektionen bei Menschen werden von Biofilm-bildenden Bakterien ausgelöst. Vor allem sind es chronische infektiöse Erkrankungen, wie z.B. Lungeninfektionen bei zystischer Fibrose, Infektionen bei Brandwunden, Ohrinfektionen, bakterieller Endokarditis (Herzinnenhaut-Entzündung), chronischen Wundinfektionen und Zahnfäule (Chua et al., 2014; Donelli, 2015). So bilden die wichtigsten lungenpathogenen Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*) und Pilze (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*) wie bei der Infektion einen Biofilm aus (Archer et al., 2011; Kaur & Singh, 2013; LaFleur et al., 2006; Mann & Wozniak, 2012; Moscoso et al., 2006; Starner et al., 2006; Vuotto et al., 2014).

Biofilme sind hoch-organisierte bakterielle Verbünde, die an den Oberflächen (z. B. menschliche Gewebe) angeheftet und von extrazellulären Polymer- Matrices zum Schutz vor äußeren Einflüssen umhüllt sind. Zum Anfang der Ausbildung des Biofilms haften sich die einzelnen planktonischen bakteriellen Zellen an die Oberfläche an. Durch die Synthese und Freisetzung der extrazellulären Polymere findet eine irreversible Anhaftung an die Oberfläche statt. Durch die folgende Zellteilung wächst die Mikrokolonie in ihrer Größe und bildet eine pilzförmige Struktur bzw. Ausstülpung aus. Der Biofilm erreicht seine Reife, wenn wieder motile Bakterien entstehen und aus den Ausstülpungen freigesetzt werden, mit dem Ziel die bewachsene Fläche zu vergrößern (Høiby et al., 2010; O'Toole et al., 2000).

Im Unterschied zu den einzelnen planktonisch-schwebenden Bakterien, besitzt der Biofilm eine hundert- bis tausendfach erhöhte Resistenz gegenüber antibiotisch-wirksamen Substanzen. Diese Resistenz lässt sich mit mehreren Gründen erklären. Zu einen können Wirkstoffe durch Diffusion nicht in die inneren bzw. tieferen Schichten des Biofilms eindringen und somit dort nur geringe, nicht effektive Konzentrationen erreichen. Die einfache Diffusion der positiv-geladenen Molekülen, wie z.B. Aminoglukoside, kann zusätzlich durch die positiv-geladene Polymer-Matrix erschwert werden (de la Fuente-Núñez et al., 2013; Walter et al., 2003). Zum Zweiten können auch die Nährstoffe und Sauerstoff nicht in die inneren Schichten des Biofilms eindringen. Dies führt zum „Hungerzustand“ und langsamen Metabolismus der Zellen. Die Vielzahl der Antibiotika ist nur bei metabolisch-aktiven Bakterien wirksam, da sie in die Biosynthese der Makromoleküle eingreifen (Abbildung 2). Aus diesem Grund bleiben viele Wirkstoffe gegenüber langsam-wachsenden und den Bakterien in der stationären Phase unwirksam. Der dritte Grund für die Resistenz der Biofilm-Bakterien ist die an die Stress-Bedingungen angepasste Genexpression. Dabei haben die Biofilm-Bakterien entscheidende Vorteile gegenüber den planktonisch-lebenden Zellen: durch das langsamere Wachstum und die nur langsam steigenden Antibiotika-Konzentrationen haben die Bakterien im Inneren des Biofilms

ausreichend Zeit sich anzupassen und die Resistenz-Mechanismen als Antwort auf die Antibiotika-Behandlung zu aktivieren. So werden z.B. die Expression von *multidrug* Efflux-Pumpen aktiviert und die verstärkte Synthese von Exopolymeren eingeschaltet. Der letzte Grund der Biofilm-Resistenz ist die erhöhte Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer kleinen Population der persistenten Bakterien. Die Zelldichte im Biofilm ist ca. tausendfach höher als bei den planktonischen Zellen (10^8 cfu/ml vs. 10^{11} cfu/ml), somit auch die Wahrscheinlichkeit zum horizontalen Gentransfer und somit Entstehung der Mutationen und Änderungen in der Virulenz. Außerdem können wenige Zellen in einen sporenähnlichen Zustand übergehen und Stress-Bedingungen überdauern (Donelli, 2015; Fux et al., 2005; Gilbert & McBain, 2001; Steward, 2002).

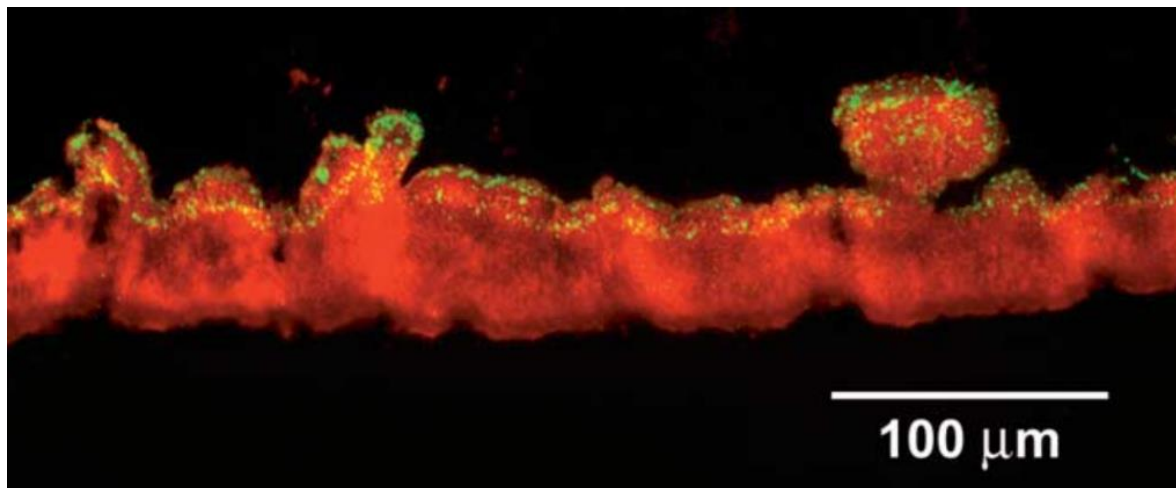


Abbildung 2. Querschnitt durch den ausgebildeten Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa*. Die Bakterien in dem Biofilm sind unterschiedlich physiologisch aktiv. Die Bakterien an der Oberfläche des Biofilms betreiben die Protein-Synthese, dargestellt in Grün als Synthese des GFP-markierten Enzyms alkalischen Phosphatase). In den tieferen Schichten des Biofilms sind die Bakterien physiologisch nicht aktiv und es findet keine Protein-Biosynthese statt (aus Fux et al., 2005).

Die Fähigkeit der Bakterien miteinander zu kommunizieren wird als *Quorum Sensing* bezeichnet und dient zur Regulation der Genexpression in Abhängigkeit von der Zelldichte. Die Gram-negativen Bakterien benutzen dafür als Signal-Moleküle N-Acyl-Homoserin-Lactone (AHL), um die Populationsdichte zu kontrollieren. Die Gram-positiven Bakterien verwenden bei Quorum Sensing Oligopeptide, die von den Bakterien durch die membranständigen Histidin-Kinasen als Rezeptoren wahrgenommen werden (engl. *autoinducing peptide*, AIP). Durch die darauffolgenden Phosphorylierungsschritte wird die Stärke der Antwort reguliert (Vu et al, 2009).

Es gibt mehrere Voraussetzungen, die zur Biofilm-Ausbildung notwendig sind: bei *P. aeruginosa*, der Modell-Organismus zur Untersuchung des Biofilms bei Gram-negativen Bakterien, ist Eisenmangel und dadurch eine induzierte Produktion von Siderophoren wie Pyoverdine zur Ausbildung von Biofilm notwendig. Siderophore binden Eisen und transportieren dies in das Zellinnere mithilfe spezifischer Rezeptoren an der Zelloberfläche. Siderophore sind wichtige Virulenz-Faktoren und regulieren die eigene und die Expression weiterer Virulenz-Faktoren wie Exotoxin A und Endoproteasen (Sadikot et al., 2005). Außerdem ist die Anwesenheit extrazellulärer DNA in der Matrix zur initialen Biofilm-Ausbildung notwendig (Whitchurch et al., 2002).

Weitere Virulenz-Faktoren sind die Flagellen und die Pili, die für die Biofilm- und Mikrokolonien-Ausbildung notwendig sind. Um die Nährstoffe aus der besiedelten Umgebung bzw. der Gewebe zu gewinnen, werden die abbauenden Enzyme wie Hemolysine, Zytotoxine, Elastase und alkalische Protease freigesetzt. Alkalische Protease verdaut und verhindert die Ausbildung von Fibrin, das für die Blutgerinnung verantwortlich ist, ebenso hemmt sie die wichtigen Abwehrpeptide wie Antikörper, Proteine des Komplement-Systems, die die Immunantwort in Anwesenheit von pathogenen Bakterien aktivieren, und Zytokine wie Interferon- γ (Sadikot et al., 2005).

1.1.3. Infektiöse Pneumonie ist auch heute noch eine Bedrohung

Pneumonie ist eine Lungenerkrankung, bei der sich die Lungengewebe entzündet. Die häufigste Ursache der Pneumonie sind Viren, Bakterien oder Pilze, die die Infektionen hervorrufen und die häufig in Kombinationen auftreten (McCullers, 2014; Peleg et al., 2010). Dies ist die Haupttodesursache unter den Infektionskrankheiten und ist für die meisten Todesfälle bei Kindern unter fünf Jahren weltweit verantwortlich (Crane et al., 2018). Besonders dramatisch ist die Situation in den medizinisch unterversorgten und armen Regionen der Welt wie Afrika, Lateinamerika und Südostasien (Zar et al., 2013).

Die oberen Atemwege (Nase, Mund, Rachen und Kehlkopf) sind mit mehreren kommensalen aber auch potenziell pathogenen Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus* besiedelt. So besiedeln z. B. Pneumokokken die Schleimhäute der oberen Atemwege von bis zu 10% der gesunden Erwachsenen und bis zu 40% der Kinder (Kayser et al., 2014). Die Gesamtheit der Mikroorganismen wird auch als Mikrobiom der oberen Atemwege bezeichnet. Das Mikrobiom befindet sich bei gesunden Menschen im Gleichgewicht, d. h. die kommensale Stämme unterbinden das exponentielle Wachstum der pathogenen Stämme, was die Entwicklung einer Infektion verhindert. Unter besonderen Voraussetzungen oder bei bestimmten Risikogruppen kann es aber zur Störung der Balance zwischen den Bakterien und somit zur Infektion kommen (Bosch et al., 2013). Infektiöse bakterielle oder Pilz-Erkrankungen entwickeln sich bei Menschen mit schwachem Immunsystem (Kinder, ältere Menschen, Chemotherapie-Patienten oder Humane Immundefizienz-Virus (HIV)-Patienten) oder bei Patienten mit angeborenen Immunschwächen wie SCID (engl. *severe combined immunodeficiency*; schwerer kombinierter Immundefekt) oder zystischer Fibrose (auch Mukoviszidose genannt) (Bosch et al., 2013; Mizgerd, 2012). Im Falle der Erkrankung besiedeln die pathogenen Bakterien auch die unteren Atemwege (Trachea, Bronchie und Alveolen). Die Symptome der Infektion sind akutes Unwohlsein mit Husten und Fieber als Hauptsymptome und mit möglichen weiteren Symptomen wie Sputum-Produktion (Auswurf), Atemnot bzw. Kurzatmigkeit, Keuchen oder Schmerz im Brustbereich (Woodhead et al., 2011).

Die häufigsten bakteriellen Lungenpathogene sind dabei *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* und *Haemophilus influenzae* (Liczak et al., 2002). Die obengenannten Bakterien gehören zu der von der WHO (engl. *World Health Organization*, Weltgesundheitsorganisation) publizierten Liste (WHO, 2017), wie auch Carbenicillin-resistente *A. baumannii* und *P. aeruginosa*, Methicillin- und Vancomycin-resistente

S. aureus, Penicillin-resistente *S. pneumoniae* und Ampicillin-resistente *H. influenzae*, die aufgrund ihrer Antibiotika-Resistenzen zu den gefährlichsten Lungenpathogenen zählen.

1.1.4. Aktuelle Methoden und Techniken zur Untersuchung der Lungeninfektionen (Infektionsmodelle)

Aktuelle Tiermodelle zur Erforschung der Lungeninfektionskrankheiten bzw. Infektionsmodelle sind kleine Nagetiere wie Maus, Ratte und Meerschweinchen. Bei Mäusen werden Lunge oder Oberschenkel mit den Bakterien infiziert und anschließend die Tiere mit subkutanen Injektionen bzw. durch die orale Aufnahme der Testsubstanzen behandelt. Diese Verfahren gehören zu den häufigsten anwendungsnahen Modellen für Behandlungsexperimente, die die Realität der Lungeninfektion bei den Menschen am nächsten abbilden. Nachteilig sind die Anzahl und das hohe Leiden der benötigten Versuchstiere. Zur Verabreichung von Medikamenten über den pulmonalen Weg durch Inhalation werden ebenfalls Tiermodelle verwendet. Die meist genutzten Tiermodelle sind das *in vivo* Maus/Ratte-Inhalationsmodell, bei dem die Tiere in der dynamischen Ganzkörperkammer behandelt werden (Andes & Crag, 2002), sowie das *ex vivo* Ratte/Kaninchen-Inhalationsmodell, bei dem die isolierte tierische Lunge (engl. *isolated, perfused and ventilated lung model*; IPL) behandelt wird (Beck et al., 2009; Seeger et al., 1994). Das letzte Modell wird z.B. für die Untersuchung von Nanopartikel-Verteilungen verwendet.

Eine Alternative zu den Nagetierversuchen stellt die Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) als Tiermodell dar. Das Infektionsmodell *D. melanogaster* – *Pseudomonas aeruginosa* ist ein etabliertes und verbreitetes Versuchsmodell. Es wird für die Infektionsdynamik und Pathogenese verwendet. *D. melanogaster* als Modellorganismus kann auch mit mehreren anderen lungenpathogenen Bakterien und Pilzen verwendet werden (Anders & Craig, 2002; Apidianakis & Rahme, 2009; Cady et al., 2012). Vorteile der Nutzung der *Drosophila* sind eine Verringerung von Säugetierexperimenten und eine günstige Haltung der Versuchstiere. Dieses Modell eignet sich für die molekularbiologischen Untersuchungen von Infektionskrankheiten, ist aber anwendungs- und realitätsfern. Eine Alternative zu den Tierversuchen stellen die *in vitro* Versuche mit Co-Kulturen aus pathogenen Bakterien und humanen bzw. Säugetier-Zellen dar. Das Co-Kultur-Modell eignet sich auch für die Untersuchung der molekularen Mechanismen (Adamou et al., 1998; Moreau-Marquis et al., 2010; Talbot et al., 1996). Nachteil ist der ebenfalls anwendungsferne Versuchsaufbau, da die Experimente in Petrischalen durchgeführt werden. Bei der Weiterentwicklung des Versuchssystems werden die drei-dimensionale Zellkulturen unter anderem aus mehreren Zelllinien erzeugt. Z.B. kann man Lungenepithel an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche an der semipermeablen Membran kultivieren. Unter diesen Bedingungen weisen die Zellenverbünde eine realitätsnähere Physiologie, wie z.B. die Mucus-Produktion und -transport durch Cilien-Bewegung auf (BéruBé et al., 2010). Noch weiter gehen die Ansätze, die durch das 3D-Printing mit verschiedenen Zelllinien die Organabschnitte, z.B. Trachea-Abschnitt, rekonstruieren (Bae et al., 2018; Taniguchi et al., 2018). Das Verfahren ist aber bis jetzt technologisch und kosten- aufwendig, sodass es zur Herstellung der künstlichen Organe für die Transplantationsoperationen angewendet wird.

Der Einsatz der Tierversuche für Forschungszwecke hat eine große gesellschaftliche Resonanz, da hier auf Kosten von Tierwohl die wissenschaftlichen Erkenntnisse gewonnen werden. In diesem Zusammenhang wurden die ethischen Ansätze bei den Tierversuchen in der Forschung als 3R *reduction, refinement & replacement* (Verringerung, Verfeinerung und Vermeidung) schon im Jahre 1959 von Russel und Burch formuliert. Dabei soll die Anzahl der Tierversuche reduziert bzw. die Tierversuche vermieden werden und dabei das Leiden der Tiere soweit es geht reduziert werden.

Die Europäische Kommission hat sich die Verfolgung der 3R Ansätze in der Forschung als Ziel gesetzt (Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates, 2010). Laut dem Bericht der Europäischen Kommission von 2013 liegt Deutschland EU-weit auf dem zweiten Platz nach Frankreich in der Anzahl der Tierversuche (Bericht der Kommission an den Rat und das europäische Parlament, 2013; Deutscher Tierschutzbund, 2019). Nordrhein-Westfalen liegt deutschlandweit nach dem Baden-Württemberg auf dem zweiten Platz mit den 458.128 Versuchstieren im Jahr 2017 (Deutscher Tierschutzbund, 2019). In Folge dessen verfolgt das Bundesministerium für die Ernährung und Landwirtschaft aktuell die Strategie die Anzahl der Tierversuche zu reduzieren und langfristig durch die alternativen Methoden zu ersetzen (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2018). Allerdings verändern sich die Zahlen der für die wissenschaftlichen Zwecke verwendeten Versuchstiere in Deutschland in dem Zeitraum zwischen 2014 und 2017 nicht und bleiben bei 2,8 Millionen Tiere (Deutscher Tierschutzbund, 2019). 50% der bei den Tierversuchen verwendeten Tiere dienten der Grundlagenforschung und 15% der Erforschung der Menschen- und Tierkrankheiten (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, 2018). Dies verdeutlicht, dass ein dringender Bedarf an neuen versuchstierfreien, realitäts- und anwendungsnahen Modellen für Infektionsversuche und für die Inhalationsbehandlungen besteht.

1.2. Allicin als natürliches Antibiotikum

1.2.1. Knoblauch

Auf der Suche nach neuen antibiotisch wirksamen Substanzen werden auch altertümliche Rezepte aus dem Mittelalter aufgegriffen, deren Wirksamkeit in den Schriftstücken dieser Zeit festgehalten ist und die mit der heutigen modernen Wissenschaft erneut evaluiert werden. Ein Beispiel ist die angelsächsische Bald's Augensalbe aus dem 10. Jahrhundert (Cockayne, 1864-1866). Dem Rezept nach besteht die Salbe aus Knoblauch, Zwiebel oder Lauch, Wein, Rindergalle und Kupfer. Die aktuelle Studie von 2018 hat die Salbe hergestellt und deren antimikrobielle Wirksamkeit untersucht. Tatsächlich besitzt die Salbe antimikrobielle Wirkung gegen antibiotika-resistente Stämme von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* (Fuchs et al., 2018). Als wirksame Substanz in der Salbe wurde Allicin identifiziert, da die Zugabe von Cystein zu der Salbe die antimikrobielle Wirksamkeit der Salbe aufhob.

Knoblauch (*Allium sativum*) wird schon seit der Antike angebaut und aufgrund seines charakteristischen Geschmacks und Geruchs als Gewürzpflanze verwendet (Abbildung 3, Benkeblia, 2004).



Abbildung 3. Geerntete Knoblauch-Knollen (*Allium sativum* L.).

Knoblauch besitzt eine starke antimikrobielle Wirkung (Agarwal, 1996; Block, 2010; Miron et al., 2000; Rabinkov et al., 1998) und außerdem gesundheitsfördernde Eigenschaften. Studien haben bereits gezeigt, dass Knoblauch eine positive Wirkung bei Bluthochdruck und kardiovaskulären Erkrankungen besitzt (Agarwal, 1996; Miron et al., 2000; Rabinkov et al., 1998).

1.2.2. Allicin, ein schwefelhaltiges Antibiotikum aus Knoblauch

Der physiologisch wirksame Inhaltsstoff des Knoblauchs, das Allicin, wurde 1944 identifiziert (Cavallito & Bailey, 1944). Allicin ist die erste und quantitativ bedeutendste flüchtige Schwefelverbindung, die nach Verletzung des Knoblauchgewebes aus der Aminosäure Alliin durch die Aktivität des Enzyms Alliinase synthetisiert wird (Abbildung 4) (Block, 2010; Illic et al., 2011; Rabinkov et al., 1998). Da das Allicin ohne Energieverbrauch aus den Vorstufen sofort nach der Verletzung hergestellt wird, wird es als Phytoanticipin bezeichnet, also eine präformierte pflanzliche Abwehrsubstanz (Curtis et al., 2004). Eine Knoblauchzehe hat etwa 5 mg Allicin, was bezogen auf eine Knolle etwa 50 mg ergibt (Slusarenko et al., 2008). Es gibt frisch-verletztem Knoblauch das typische Aroma.

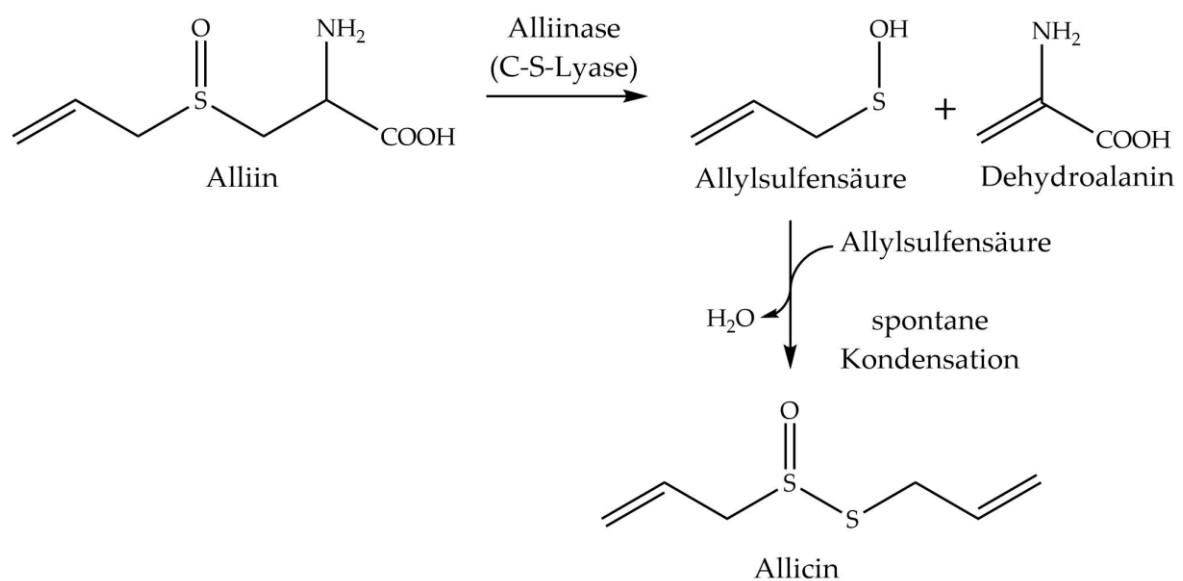


Abbildung 4. Biosynthese des Allicins ausgehend von Alliin. Alliin wird ohne Energieaufwand in Allylsulfensäure und Dehydroalanin gespalten. In einem zweiten Schritt reagieren zwei Moleküle Allylsulfensäure spontan zu Allicin (modifiziert nach Borlinghaus et al., 2014).

Allicin ist eine Reaktive Schwefel-Spezies (RSS) und löst in der Zelle oxidativen Stress aus (Giles et al., 2001; Gruhlke & Slusarenko, 2012). Allicin hat einen logP-Wert von $1,29 \pm 0,13$ (www.vcclab.org/lab/alogps/, Tetko et al., 2005) und kann leicht die Zellmembranen passieren. Das oxidierte Schwefelatom in Allicin dient als elektrophiles Zentrum und reagiert intrazellulär durch Schwefel-Schwefel-Austauschreaktion mit freien nukleophilen Thiol-Gruppen zu den Mischdisulfiden (Giles et al., 2001; Gruhlke et al., 2014; Rabinkov et al., 2000, Abbildung 5). Somit oxidiert das Allicin die Thiol-Gruppen von Cysteinen der Proteine und von Glutathion-Molekülen.

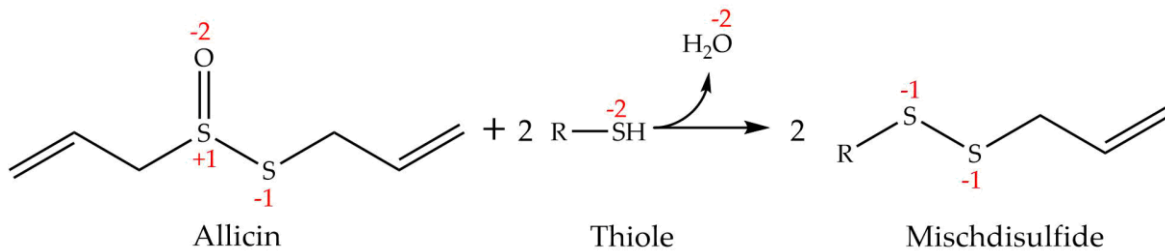


Abbildung 5. Allicin ist eine Reaktive Schwefel-Spezies (RSS). Das oxidierte Schwefelatom in Allicin dient als elektrophiles Zentrum und reagiert intrazellulär durch eine dem Thiol-Disulfid-Austausch ähnliche Reaktion unter Wasserabspaltung mit freien nukleophilen Thiol-Gruppen, wie sie am Cystein vorkommen, reagieren. Der Oxidationszustand bzw. die Oxidationszahl der Schwefel- und Sauerstoff-Atome sind in Rot dargestellt (geändert nach Borlinghaus et al., 2014).

Die Mischdisulfide können in den weiteren Austausch-Reaktionen mit den neuen Thiolen reagieren und so eine zyklische Redox-Kaskade unter der Mitwirkung von Redox-Enzymen wie z. B. Thioredoxine (TRX) und Glutaredoxine (GRX) ausbilden (Abbildung 6). Nach der Reaktion von Allicin mit einem Thiol entstehen Allyl-Mischdisulfide und Allyl-Sulfoxid. Das Allyl-Sulfoxid steht im Gleichgewicht mit der Allyl-Sulfensäure, die aber mit dem weiteren Thiol-Molekül zu dem zweiten Allyl-Mischdisulfid-Molekül unter Wasser-Abspaltung reagieren kann. Dieses Allyl-Mischdisulfid kann im Rahmen des TRX/GRX-katalysierten Zyklus zu dem Allyl-Mercaptan und dem Thiol reduziert und wiederum zu dem Allyl-Mischdisulfid ohne Wasser-Abspaltung oxidiert werden. Falls die bei dieser Reaktion beteiligten Thiole Bestandteile der Cysteine sind, können die ausgebildeten Protein-Disulfide von TRX bzw. GRX mit Hilfe von NADPH-abhängigen Thioredoxin-Reduktase und Glutathion als Reduktionsäquivalent für die weiteren Zyklus-Schritte zur Verfügung gestellt werden. Das entstandene Allyl-Mercaptan kann enzymatisch durch die Peroxiredoxine (PRDX) und Wasserstoff-Peroxid zu Sulfensäure oxidiert werden, wodurch der katalytische Kreislauf geschlossen wird (Reiter et al., 2017).

Deshalb hat Allicin große Auswirkungen auf die zelluläre Thiol-Homeostasis der Proteine und den zellulären Redox-Puffer wie Glutathion. Durch die Reaktion mit Glutathion verschiebt sich das Redox-Potenzial der Zelle zu dem stärker oxidierten Zustand und löst Disulfid-Stress aus. Aus diesem Grund wird Allicin als zelluläres Redox-Toxin genannt (Müller et al., 2016; Rabinkov et al., 2000; Gruhlke et al., 2010).

Die Oxidationsreaktionen durch Allicin führen letztlich zur Strukturänderung der Proteine und damit zur Veränderung ihrer Funktion. Mögliche physiologische Folgen sind Veränderungen in Enzymaktivität oder Signaltransduktion (Brandes et al., 2009; Giles et al., 2003; Gruhlke et al., 2019; Wills, 1956). Die Inhibition essenzieller Enzyme und die Wirkung auf das Redoxpotential in der Zelle sind Hauptgründe für Allicins Toxizität. Durch diese *multiple target sites* für die Allicin-Wirkung ist die spontane Mutation zur Resistenz eher schwierig für Mikroorganismen.

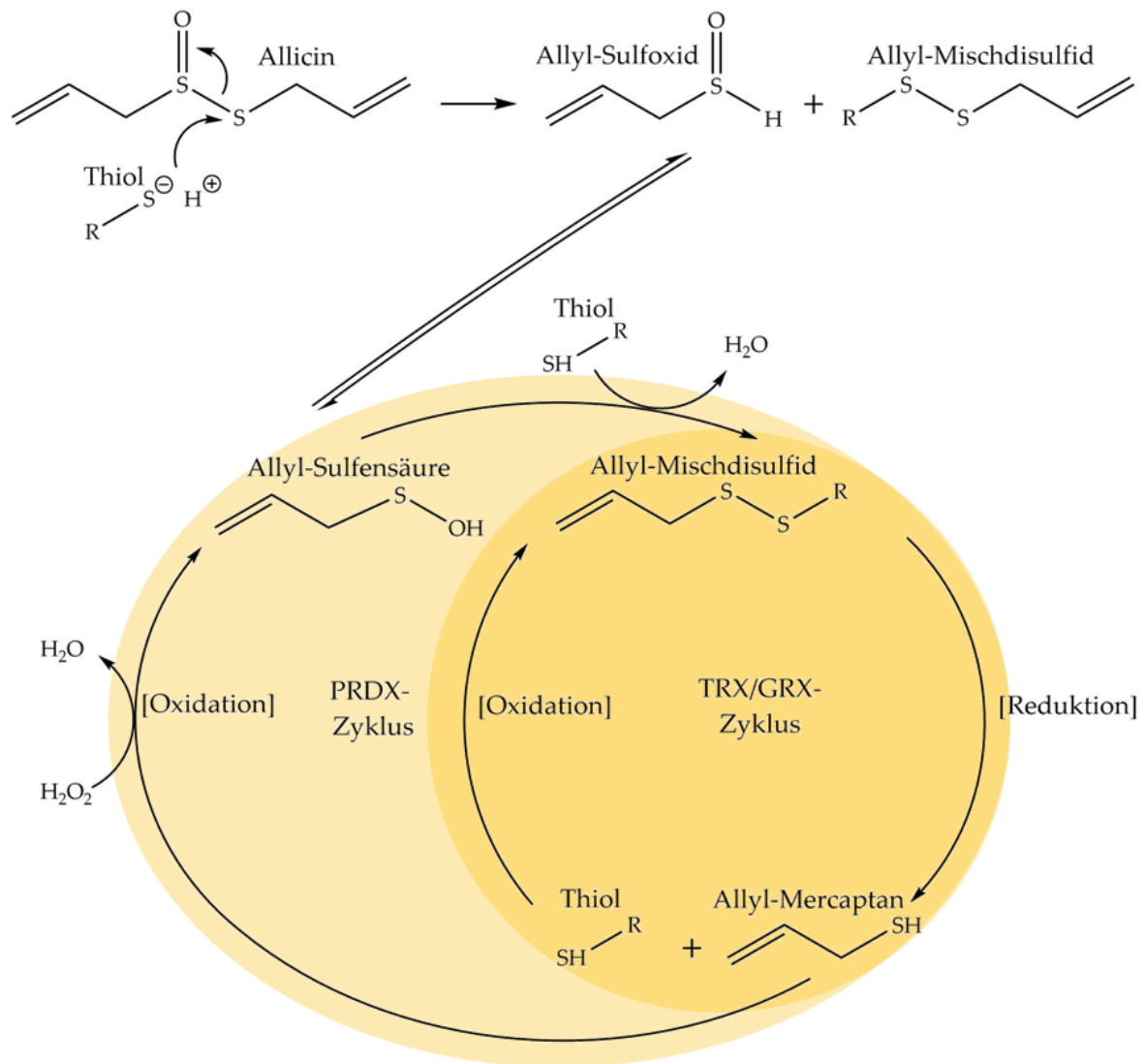


Abbildung 6. Allicin als reaktive Schwefel-Spezies (RSS) vollzieht eine dem Thiol-Disulfid-Austausch ähnliche Reaktion, in der zwei Allicin-Moleküle mit zwei Thiolen zu Wasser und zwei Misch-Allyl-Disulfid-Molekülen reagieren. Die Misch-Allyl-Disulfide können in den katalytischen Redox-Zyklus einbezogen werden. Nach der Reaktion von Allicin mit einem Thiol-Molekül entstehen ein Allyl-Sulfoxid-Molekül und ein Allyl-Mischdisulfid-Molekül. Allyl-Sulfoxid und Allyl-Sulfensäure befinden sich in einer tautomerischen Gleichgewichts. Allyl-Sulfensäure kann mit einem weiteren Thiol reagieren, was zur Bildung von einem weiteren Allyl-Mischdisulfid führt. Dieses kann mit weiteren Thiolen in der Thiol-Disulfid-Austausch-Reaktion teilnehmen. Im Fall der Reaktion mit den Cysteinen in Proteinen als Thiole sind die entstandenen Disulfide potenzielle Substrate für Thioredoxine (TRX) und Glutaredoxine (GRX). Das entstehende Allyl-Mercaptan kann wieder zu er Allyl-Sulfensäure durch Peroxiredoxine (PRDX) durch Verbrauch von Wasserstoffperoxid (PRDX) oxidiert werden (modifiziert nach Reiter et al., 2017).

Allicin hat ein breites Wirkungsspektrum, es ist effektiv gegen Bakterien, Pilze, Oomyceten und Protozoa (Ankri & Mirelman, 1999; Arora & Kaur, 1999; Curtis et al., 2004; Ilic et al., 2011; Rabinkov et al., 1998). Durch das in dem Knoblauchextrakt enthaltenen Allicin kann man die Hefe-Stämme von *Candida albicans*, *Candida inconspicua* komplett abtöten. Typhus-Erreger *Salmonella typhi* sterben nach drei Stunden zu über 90% ab. Auch bei diversen pflanzenpathogenen Bakterien und Pilzen (*Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Aspergillus niger*, *Fusarium pallidorosum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*, *Magnaporthe grisea*)

wirkt Knoblauch antibiotisch (Ankri & Mirelman, 1999; Curtis et al., 2004). Es besitzt eine starke antibiotische Wirkung, ähnlich wie Kanamycin und Ampicillin (Abbildung 7) (Borlinghaus et al., 2014).

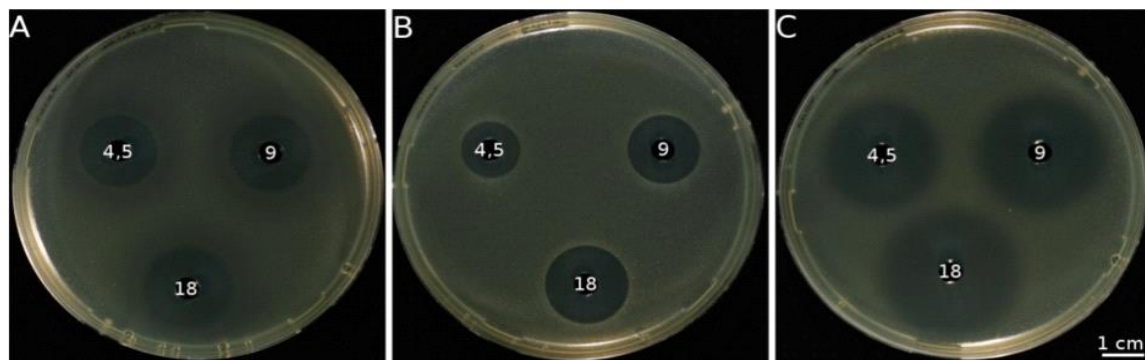


Abbildung 7. Antimikrobielle Wirkung des Allicins (B) auf *E. coli* ist vergleichbar mit den konventionellen Antibiotika wie Kanamycin (A) und Ampicillin (C) (Borlinghaus et al., 2014).

In den letzten Jahren wurde die Idee populär, eine Knoblauch- bzw. Allicin-Therapie als Alternative zu konventionellen Antibiotika-Behandlungen bei Krankheiten wie Tuberkulose, Pneumonie und zystischer Fibrose, bei denen die konventionellen Antibiotika versagen, anzuwenden (Abubakar, 2009; Bjarnsholt et al., 2005; Dini et al., 2011; Smyth et al., 2010; Wallock-Richards et al., 2014). Die angewendeten Therapien basieren auf der oralen Aufnahme oder auf der subkutanen Injektion des Knoblauchextraktes. Obwohl die subkutane Injektion des Knoblauchextraktes bei mit *P. aeruginosa*-infizierten Mäusen wirksam war und den bakteriellen Titer in der Lunge verringert hatte, ist die analoge Behandlung bei Menschen in der Praxis nicht durchführbar (50 Knoblauchknollen pro Tag und Person) (Bjarnsholt et al., 2005). Die Behandlung der zystischen Fibrose durch orale Aufnahme von Knoblauchkapseln ist bei Menschen in Studien gescheitert (Smyth et al., 2010).

Der Misserfolg liegt darin begründet, dass es nicht einfach ist, eine effektive Konzentration im Körper durch orale Einnahme oder über die Blutbahn zu erreichen. Die menschlichen Zellen wehren sich bei der Allicin-Behandlung gegen oxidativen Stress mit Hilfe des Redox-Puffers Glutathion (GSH). Glutathion reagiert direkt mit Allicin und kommt in hohen Konzentrationen in Zellen und im Blut (1 mM GSH, Samiec et al., 1998) vor. Somit wird Allicin im Körper schnell durch hohe Mengen Glutathion in menschlichen Geweben austitriert, und so keine effektive Allicin-Konzentrationen *in vivo* erreicht werden können (Rabinkov et al., 2000). Einerseits schützt diese hohe Konzentration von GSH die Körperzellen gegen Allicin, andererseits erschwert es den therapeutischen Einsatz von Allicin.

Die Behandlung der Lungeninfektionen durch die Inhalation des Knoblauchextraktes wurde bereits Anfang letzten Jahrhunderts vor der Entdeckung der klassischen Antibiotika durchgeführt. Schon 1927 hat der irische Arzt W. C. Minchin Tuberkulose-krankte Patienten mit Knoblauch erfolgreich behandelt (Minchin, 1927). Dafür mussten Patienten eine mit Knoblauch-Saft gefüllte Inhalations-Maske zweimal pro Tag je eine Stunde tragen (Abbildung 8). Daraufhin haben Walton et al. (1936) gezeigt, dass Knoblauchbrei über die Gasphase eine antimikrobielle Aktivität auf mehrere Bakterienstämme hat. Diese Studien sind aber in Vergessenheit geraten, da 1944 geruchsneutrales

Streptomycin zur Behandlung der Tuberkulose eingeführt wurde (Schatz et al., 1944). Allicin ist für die antimikrobielle Eigenschaften des Knoblauchs verantwortlich. Da Allicin flüchtig ist, ist es auch über die Gasphase effektiv. So inhibiert z.B. ein Allicin-Tropfen das bakterielle Wachstum auf einer über dem Tropfen platzierten Agar-Platte (Abbildung 9). Es bietet sich daher an, Allicin-Präparate zu entwickeln, die möglicherweise in Kombination mit anderen herkömmlichen Mitteln, über die Atemwege für die Behandlung von infektiösen Lungenkrankheiten eingesetzt werden könnten.

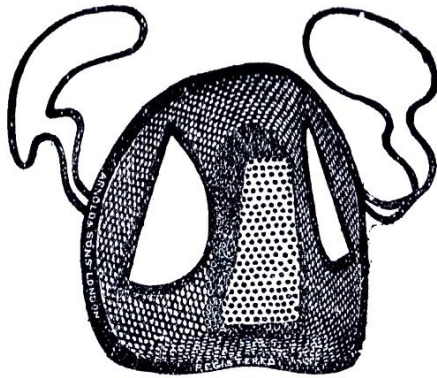


Abbildung 8. Inhalationsmaske, die mit dem Knoblauch-Saft in einem Schwamm befüllt ist. Die Tuberkulose-kranken Patienten wurden 1927 von dem irischen Arzt W. C. Minchin auf diese Weise erfolgreich behandelt (Minchin, 1927).

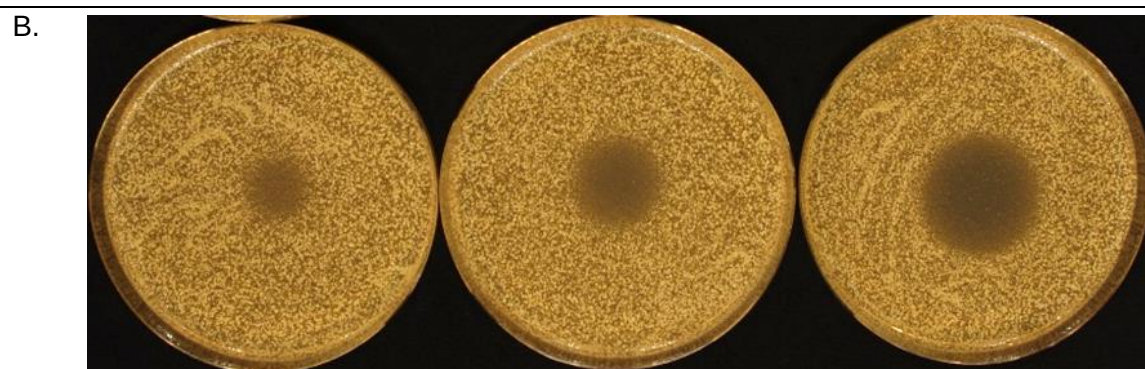
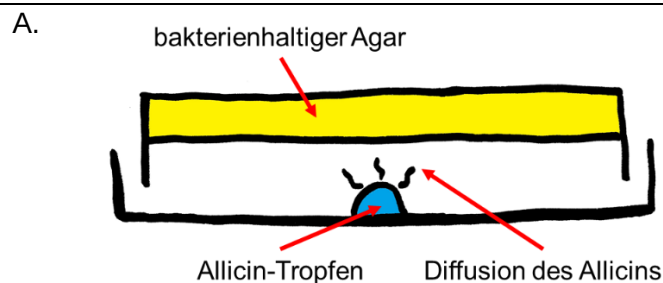


Abbildung 9. Allicin besitzt antibakterielle Wirkung über die Gasphase. (A) Bei der Versuchsaufbau wird ein Allicin-Tropfen auf den Deckel einer Petrischale appliziert und darüber eine Agar-Platte mit den Bakterien platziert. (B) Nach der Inkubation bildet sich ein Hemmhof, eine Zone ohne bakterielles Wachstum. Allicin inhibiert konzentrationsabhängig das Wachstum den nicht-pathogenen *Micrococcus luteus* (20 μ l von 20 mM, 40 mM und 80 mM Allicin, von links nach rechts).

1.3. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist war es zu untersuchen, ob Allicin in der Medizin als Behandlungsmittel bei infektiösen Lungenerkrankungen eingesetzt werden kann. Hierzu sollten *proof of principle*-Versuche durchgeführt werden. Es sollte gezeigt werden, dass Allicin antibiotische Wirkung auf lungenpathogene Bakterien besitzt. Die effektive Allicin-Konzentrationen, bei denen das bakterielle Wachstum inhibiert wird und bei denen Bakterien abgetötet werden, sollten ermittelt werden. Es sollte grundlegend überprüft werden, ob der Einsatz des Allicins zur Behandlung von Lungeninfektionen durch direktes Einatmen von Allicin-haltigen Aerosolpartikeln geeignet ist. Für diese Fragestellung sollte eine *in vitro* Lungensimulationsapparatur konzipiert und angefertigt werden. Außerdem sollte die physiologische Wirkung des Allicins auf die Bakterien untersucht werden. Unter diesem Aspekt sollte überprüft werden, ob Allicin die Ausbildung des bakteriellen Biofilms inhibieren bzw. die Zellen im ausgebildeten Biofilm abtöten kann. Ferner soll geprüft werden, ob Allicin Einfluss auf die mikrobielle Wirkung der konventionellen Antibiotika nehmen kann, also ob ein synergistischer Effekt zu beobachten ist. In diesem Zusammenhang erfolgte auch die Untersuchung der Allicin-Toxizität auf die tierischen bzw. humanen Zellen, da für eine effektive Anwendung eine höhere Toxizität für pathogene Bakterien als für humane Wirtszellen sichergestellt sein muss. Zur näheren Untersuchung der Wirkungsweise von Allicin wurden mit Hilfe der OxICAT-Methode Oxidationsziele des Allicins in *Pseudomonas fluorescens Allicin Resistant-1* (PfAR-1) (zum Teil aus einer vorgehenden Arbeit, Reiter, 2014) und dem nahe verwandten aber Allicin-anfälligeren Referenz-Stamm Pf0-1 identifiziert. Unter diesen Zielen befand sich die Untereinheit A der DNA-Gyrase, welche nur in Pf0-1 aber nicht in PfAR-1 stark oxidiert wurde, und die daraufhin in dieser Doktorarbeit als möglicher Resistenzfaktor gegen Allicin weiter untersucht werden sollte.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Tabelle 2. Verwendete Geräte (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Gerät	Hersteller
Autoklav, VX150	Syntec (DE)
Binokular, Elvar	Leitz Wetzlar (DE)
ChemiDoc™ MP Imaging System	BioRad (USA)
Dampfdrucktopf	Fissler (DE)
Digitalmikroskop, Keyence VHX-6000 mit DIK	Keyence (JAP)
Universalobjektiv VH-Z100UR	
Elektrophorese-Netzgerät, Consort E143	Consort nv (BEL)
Elektrophorese-Netzgerät, PowerPac™ HC	BioRad (USA)
Elektroporationsgerät, MicroPulser™	BioRad (USA)
Feinwaage, New Classic MF	Mettler-Toledo (USA)
Gefrierschrank, Privileg Öko (-20°C)	Whirlpool Corporation (USA)
Gewebe-Schneidegerät, Krumdieck	Alabama Research & Development (USA)
Heizblock, Thermomixer comfort	Eppendorf (DE)
Heizplatte mit Magnetrührer, Combimag-RET	IKA (DE)
Inkubationsschrank	Memmert (DE)
Korkbohrer, Durchmesser 6 mm und 10 mm	
Kryo-Lagerungsgefäß für flüssigen Stickstoff	Messer Griesheim (DE)
Kühlschrank, comfort (7°C)	Liebherr (DE)
Kühltruhe, New Brunswick™ C 660 Premium (-80°C)	Eppendorf (DE)
Kühlzentrifuge, Centrifuge 5417R	Eppendorf (DE)
Laborhebebühne	IKA (DE)
Mikrowelle, Combi Grill	Clatronic (DE)
Nanophotometer, P 330	IMPLEN (DE)
pH-Meter, MP220	Mettler Toledo (USA)
Photometer, DU 800	Beckman Coulter (DE)
Platereader, TriStar² S LB 942	Berthold (DE)
Pipette 0,5-10 µl	Eppendorf (DE)
Pipette 100-1.000 µl, Rainin	Mettler-Toledo (USA)
Pipette 20-200 µl, Rainin	Mettler-Toledo (USA)
Pipette 2-20 µl, Rainin	Mettler-Toledo (USA)
Reagenzglas-Schüttler, Vortex-Genie	Bruno Kummer (DE)
Replikatorstempel mit Transfertüchern	Carl Roth (DE)

Tabelle 2 (Fortsetzung). Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Rotationsverdampfer	IKA (DE)
Schüttelinkubator, New Brunswick™ I 26	Eppendorf (DE)
Schüttler, 4010	Köttermann (DE)
Sterilbank, Labgard® Class II NU-437-500E	NuAire (USA)
Thermocycler, Bioer GeneTouch	Biozym (DE)
Ultrazentrifuge, Optima™ L-100 XP und Rotor SW60	Beckman Coulter (DE)
UV-Lampe	CAMAG (CHE)
Waage, PCB2500-2	Kern & Sohn (DE)
Wasser-Bad mit Thermostat-Heizer, Paratherm II	Haake (DE)/JULABO (DE)
Wippschüttler	Eigenbau (Werkstatt Biologie RWTH)
CO ₂ -Inkubator für Zellkultur, MCO-19AIC (UV)	Panasonic (JAP)
Zentrifugalverdampfer, Concentrator plus	Eppendorf (DE)
Zentrifuge, Centrifuge 5415 C (1,5 und 2 ml Gefäße)	Eppendorf (DE)
Zentrifuge, Megafuge 1.0R (15 und 50 ml Gefäße)	Heraeus Instruments (DE)

Tabelle 3. Aufbau der HPLC-Anlage (engl. *high pressure liquid chromatography*, Hochdruckflüssigkeitschromatographie).

Bestandteil	Hersteller
HPLC FP 920 Intelligent Fluorescence Detector	Jasco (DE)
UV-2077 Mehrkanal-Detektor	Jasco (DE)
AS 1555 Intelligent Sampler	Jasco (DE)
Pumpenblock PU-980	Jasco (DE)
Degasser DG-980-02	Jasco (DE)
Gradienteneinheit LG-980-02	Jasco (DE)
Vorsäule CC 8/4 Nucleosil 100-5 C18	Macherey-Nagel (DE)
Säule SC-150 (150x4,6) Kromaplu 100-5-C18 5.0	Bischoff Chromatography (DE)

Tabelle 4. Aufbau der LC-MS/MS-Anlage (an der Ruhr-Universität Bochum, Prof. Leichert).

Bestandteil	Hersteller
UltiMate™ 3000 RSLCnano system	Thermo Scientific (USA)
Orbitrap Elite Hybrid Ion Trap-Orbitrap mass spectrometer	Thermo Scientific (USA)

2.1.2. Programme und Online-Tools

Tabelle 5. Verwendete Computer-Programme und Online-Tools.

Programm	Hersteller/Anbieter	Bearbeitung von
ALOGPS 2.1 Online-Tool	Virtual Computational Chemistry Laboratory www.vcclab.org/lab/alogps/ Tetko et al., 2005	Vorhersage der logP-Werte
ChemDraw Professional Version 16.0	PerkinElmer	Molekül-Strukturen und chemischen Reaktionen
ChromPass Version 1.8.6.1	JASCO	Analyse der HPLC-Daten
Chromas Version 2.6.5	Technelysium	DNA-Sequenzierungsdaten
Clone Manager Version 9	Scientific & Educational Software	<i>in silico</i> Klonierung
Clustal Omega Online-Tool	EMBL-EBI www.ebi.ac.uk Chojnacki et al., 2017; Madeira et al., 2019	Vergleich der DNA- und Aminosäuren- Sequenzen
Conserved Domains Online- Tool	NCBI http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi Marchler-Bauer et al., 2016	Vorhersage der Protein-Domänen
EMBOSS Transeq Online- Tool	EMBL-EBI https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/ Madeira et al., 2019	Konvertierung der Nukleotid- in Aminosäure-Sequenz
ProtParam Online-Tool	ExPASy, Schweizer Institut für Bioinformatik www.web.expasy.org/protparam/	Berechnung der molekularen Größe der Proteine
InterPro Online- Tool	EMBL-EBI www.ebi.ac.uk/interpro Mitchell et al., 2019	Vorhersage der Protein-Domänen
MaxQuant	www.maxquant.org Cox & Mann, 2008	Analyse der Massenspektrometrie- Daten
Mass++	Shiamatzu, Tanaka et al., 2014	Analyse der Massenspektrometrie- Daten
Microsoft Excel Version 2016	Microsoft Corporation	Auswertung der OxICAT-Daten
PRALINE Online- Tool	IBIVU, Vrije Universität Amsterdam www.ibivu.cs.vu.nl/programs/pralinewww/ Simossis & Heringa, 2005	Vergleich der Aminosäuren- Sequenzen
YASPINE Online- Tool	IBIVU, Vrije Universität Amsterdam www.ibivu.cs.vu.nl/programs/yaspinwww/ Lin et al., 2004	Vorhersage der sekundären Protein- Struktur

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6. Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Glaswolle	
Glaskügelchen, 1 mm Durchmesser	Carl Roth (DE)
Einweg-Impfösen, steril	VWR (DE)
Einweg-Küvetten	Brand (DE)
Elektroporationsküvetten, Spalt 2 mm	Greiner (AUT)
Kryoröhrchen, 1,5 ml	Carl Roth (DE)
Membranfilter, Durchmesser 5 cm, Porengröße 0,45 µm	Sartorius (DE)
Mikrotiter-Platte, 96-well	Sarstedt (DE)
Mikrotiter-Platte, 24-well	Sarstedt (DE)
Parafilm-Folie „M“	Bemis (USA)
Petri-Schalen, 9 cm Durchmesser	Greiner BioOne (DE)
Pipetten-Spitzen, 20 µl, 200 µl, 1 ml	Greiner (AUT)
Quarz-Küvetten	Carl Roth (DE)
Reaktionsgefäße für PCR, 200 µl	Sarstedt (DE)
Sterilfilter, Filtropur S Porengröße 0,45 µm	Sarstedt (DE)
Spritze Omnifix®, steril 10 ml	B. Braun (DE)
TC (engl. <i>tissue culture</i>)-Mikrotiter-Platte, 96-well	Sarstedt (DE)
TC-Petri-Schalen, 6 cm Durchmesser	Sarstedt (DE)
Verschlussfilm für Zellkultur, Rotilabo®	Carl Roth (DE)
Zentrifugationsröhrchen, 15 und 50 ml	Greiner (AUT)
Zentrifugen-Filtereinheiten, Amicon Ultra-15 100K	Merck Millipore (USA)

2.1.4. Chemikalien

Tabelle 7. Verwendete Chemikalien (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Chemikalienname	Hersteller ¹
Aceton	
Aceton, technisch	Carl Roth (DE)
Acetonitril	Carl Roth (DE)
Acrylamid 30% (Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1))	Carl Roth (DE)
Agar	Carl Roth (DE)
Agarose	
Agarose mit dem niedrigen Schmelzpunkt	
Agarose, epoxy-aktiviert	eigene Herstellung
Allicin	Eigensynthese
Alkylphenylpolyethylenglykol (Triton® X100)	
Ammoniumchlorid	
Ammoniumpersulfat	
Ammoniumsulfat	
Ampicillin-Natriumsalz	
β-Mercaptoethanol	
β-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD)	
Betain-Monohydrat	
Bis(2-hydroxyethyl)-amino-tris(hydroxymethyl)methan (BisTRIS)	Duchefa Biochemie (NL)
Borsäure	
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure (X-Gluc)	
Bromphenolblau	Merck (DE)
Calciumchlorid	
Carbenicillin-Natriumsalz	Sigma (DE)
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB, Cetrimid)	
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan- sulfonate (CHAPS)	Carl Roth (DE)
Chloroform	Carl Roth (DE)
Coomassie Brilliant Blue G-250 (Farbstoff)	Serva (DE)
Cystein	AppliChem (DE)
Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	
Desoxycytidintriphosphat (dCTP)	
Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)	
Desoxythymidintriphosphat (dTTP)	

Tabelle 7 (Fortsetzung). Verwendete Chemikalien (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Chemikalienname	Hersteller ¹
Diallyldisulfid (DADS)	Sigma (DE)
Diethylether	Carl Roth (DE)
di-Kalium-Hydrogenphosphat	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Carl Roth (DE)
di-Natriumhydrophosphat	
Dithiothreitol (DTT)	
Eisensulfat	
Essigsäure	
Epichlorohydrin, ≥99% Reinheit	Sigma-Aldrich (DE)
Ethanol	
Ethanolamin, ≥99% Reinheit	Sigma-Aldrich (DE)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	
Ethylen-Glykol	
Glukose	
Glutamin	
Glutathion, reduziert	Sigma-Aldrich (DE)
Glycerin	Carl Roth (DE)
Harnstoff	
Hefeextrakt	Duchefa (NL)
Hemin-Salzsäure (aus Rind)	Sigma-Aldrich
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	
Iodacetamid (IAM)	AppliChem (DE)
4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-	
Disulfonat WST-1 (engl. <i>water soluble tetrazolium</i>)	Roche (CHE)
Inosin	Sigma-Aldrich (DE)
Isopropanol	
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	
Isoamylalkohol	
Kalziumcarbonat	
Kaliumacetat	
Kaliumchlorid	
Kalium-di-Hydrogenphosphat	
Kanamycin-Sulfat	
Kupfersulfat	
L- Histidin (freie Säure)	Sigma-Aldrich (DE)
Magnesiumchlorid	
Magnesiumsulfat	

Tabelle 7 (Fortsetzung). Verwendete Chemikalien (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Chemikalienname	Hersteller ¹
Manganchlorid	
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	
Nalidixinsäure	
Natriumcarbonat	
Natriumchlorid	
Natriumhydroxid	
Natriumhydrogencarbonat	
Natriumhydrogenphosphat	
Natriumlaurylsulfat (SDS)	
Natriumpyruvat	
Novobiocin	AppliChem (DE)
Nicotinamadenindinukleotid (NAD)	
Orange G (Farbstoff)	
ortho-Phosphorsäure	
Pentobarbital als Narcoren®	Boehringer Ingelheim (DE)
Pepton	
Polyethylenglykol (mittlere relative molare Masse 8.000g/mol, PEG-8000)	
reinst Wasser	
Roti®-Phenol für DNA Extraktion	Carl Roth (DE)
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth (DE)
Rubidiumchlorid	
Saccharose	
Salzsäure	
Stickstoff _{gasförmig}	
Stickstoff _{flüssig}	
Streptomycin-Sulfat	
Tetracyclin-Hydrochlorid	
Thioharnstoff	
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	
Trifluoressigsäure	
Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	
Uracil	
Wasserstoffperoxid	Merck (DE)
Xylencianol (Farbstoff)	

¹ Herstellerangaben sind für Chemikalien angegeben, die nicht zur Grundausstattung des Labors gehören.

2.1.5. Enzyme

Tabelle 8. Verwendete Enzyme.

Name	Hersteller
DNA-Gyrase (<i>E. coli</i>)	New England BioLabs (USA)
DNA-Gyrase (<i>Pf0</i> -1)	eigene Aufreinigung
DNA-Gyrase (<i>PfAR</i> -1)	eigene Aufreinigung
Lysozym	Boehringer Mannheim (DE)
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase und HF-Puffer	New England BioLabs (USA)
Proteinase K	Fermentas (USA)
Restriktionsenzym FastDigest BamHI	Thermo Scientific (USA)
Restriktionsenzym FastDigest KpnI	Thermo Scientific (USA)
Restriktionsenzym FastDigest PvuI	Thermo Scientific (USA)
Restriktionsenzym FastDigest XbaI	Thermo Scientific (USA)
RNase A	Thermo Scientific (USA)
T4 DNA-Ligase	Thermo Scientific (USA)
T5 Exonuklease	Epicentre (USA)
Taq DNA-Ligase	EURx (PL)
Topoisomerase I (<i>E. coli</i>)	New England BioLabs (USA)
Trypsin, 10fach	Lonza (BEL)

2.1.6. Käuflich erworbene Nährmedien und Kits

Tabelle 9. Käuflich erworbenen Nährmedien und Zusatzstoffe.

Nährmedium/Zusatzstoff	Hersteller
Bacto® Nutrient Broth, dehydriert	Difco Laboratories (USA)
Bacto® Brain Heart Infusion Agar (BHI)	BD Biosciences (USA)
Cleavable ICAT® Reagent (ICAT-10er Bulk Kits)	Sciex (USA)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin	Lonza (BEL)
Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal bovine serum</i> , FBS)	Sigma-Aldrich (DE)
Gibco™ MEM Nährmedium (engl. <i>Minimum Essential Medium</i>)	Thermo Scientific (USA)
Gibco™ MEM Aminosäuren-Lösung, 50fach konzentriert	Thermo Scientific (USA)
Gibco™ MEM Vitamine-Lösung, 100fach konzentriert	Thermo Scientific (USA)
MEM Natriumpyruvat-Lösung, 100 mM	InVitrogen (USA)
Müller-Hinton-Bouillon II (MHBII), kationen-adjustiert	Sigma-Aldrich (DE)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (je 10.000 U/ml)	Lonza (BEL)
Pferdeblut, lysiert	OXOID (USA)
Roti®-Cell RPMI-1640 (flüssig)	Carl Roth (DE)
RPMI-1640 mit L-Glutamin und 25 mM HEPES	InVitrogen (USA)
Schafblut, defibriert	OXOID (USA)
Sensititre® NLMCP, Antibiotika-haltige Mikrotiterplatte zur MHK-Bestimmung	Thermo Scientific (USA)

Tabelle 10. Käuflich erworbene Kits.

Kit	Hersteller
CellTiter-Blue® <i>Cell Viability Assay</i>	Promega (USA)
Cleavable ICAT® <i>Bulk Reagent Kit for Protein Labeling</i>	AB Sciex (DE)
LDH Cytotoxicity Detection Kit	Roche (CHE)

Tabelle 11. Verwendete Größenmarker.

Marker	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb DNA-Größenmarker und Ladepuffer, 6fach konzentriert	Invitrogen (USA)
BlueStar, Protein-Größenmarker	Nippon Genetics (JPN)
<i>Prestained Protein Molecular Weight Marker</i> SM0441, Protein-Größenmarker	Fermentas (USA)
Precision Plus, Protein-Größenmarker	BioRad (USA)

2.1.7. Biologisches Material

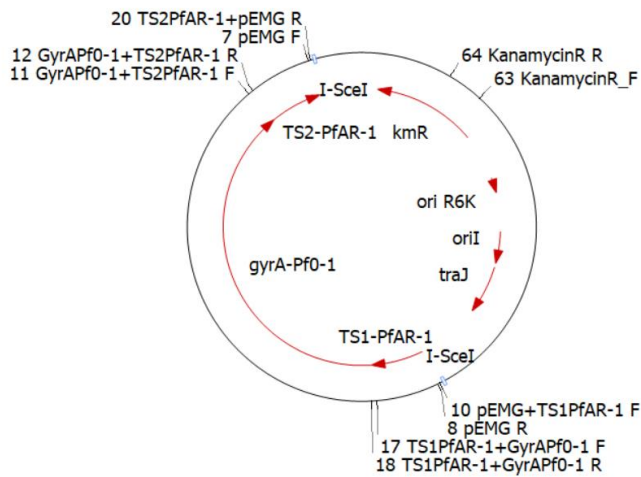
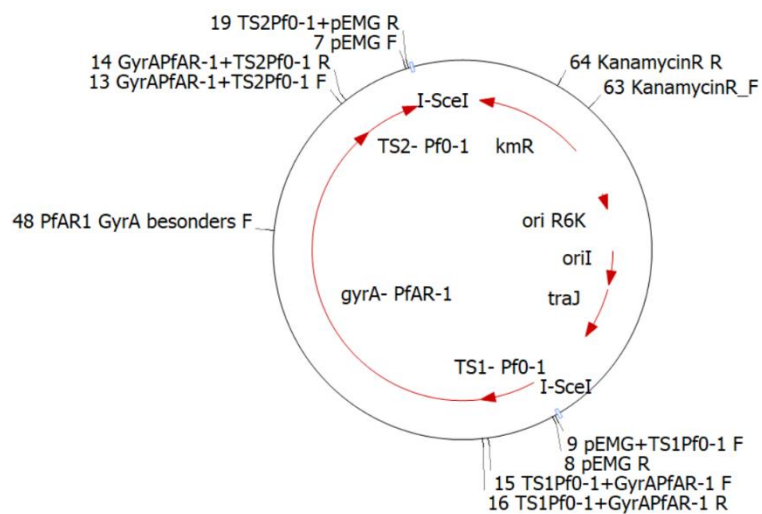
2.1.7.1. Plasmide und Vektoren

Tabelle 12. Verwendete und hergestellte Plasmide (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Plasmid-Name	Resistenz	Experiment	Referenz
pSW2	Gentamycin	pEMG-knock-out-System	Martinez-Garcia & de Lorenzo, 2011/ Institut für Mikrobiologie, RWTH Aachen, Prof. Blank
pEMG	Kanamycin, Blau-Weiß- Selektion	pEMG-knock-out-System	Martinez-Garcia & de Lorenzo, 2011/ Institut für Mikrobiologie, RWTH Aachen, Prof. Blank
pEMG-TS1 _{PfAR-1} - gyrA _{Pf0-1} -TS2 _{PfAR-1}	Kanamycin	Vektor für Gyrase-Austausch-Mutante, Klonierung in <i>PfAR-1</i>	Hübbers, 2015 Bachelor Thesis
pEMG-TS1 _{Pf0-1} - gyrA _{PfAR-1} -TS2 _{Pf0-1}	Kanamycin	Vektor für GyraseA-Austausch-Mutante, Klonierung in <i>Pf0-1</i>	Hübbers, 2015 Bachelor Thesis
pUC18	Ampicillin	Gyrase-Aktivitätsnachweis	Norlander et al., 1983/ eigene Laborsammlung
pRU1097	Gentamycin	Lungensimulator	Karunakaran et al., 2005/ eigene Laborsammlung
pRU1097-clone 1	Gentamycin	Lungensimulator, Allicin-Resistenz-Gene aus <i>PfAR-1</i>	Borlinghaus, 2019 eigene Laborsammlung
pJP2	Ampicillin, Tetracyclin	Klonierungsvektor	Prell et al., 2002/ eigene Laborsammlung
pJP2- aprA _{Pf0-1} ::gusA	Ampicillin, Tetracyclin	Biofilm-Reporter-Plasmid, β -Glucuronidase unter der Regulation des Promotors der alkalischen Protease aus <i>PfAR-1</i>	von Salzen, 2015 Bachelor Thesis
pJP2- aprA _{PfAR-1} ::gusA	Ampicillin, Tetracyclin	Biofilm-Reporter-Plasmid, β -Glucuronidase unter der Regulation des Promotors der alkalischen Protease aus <i>PfAR-1</i>	von Salzen, 2015 Bachelor Thesis

Tabelle 12 (Fortsetzung). Verwendete und hergestellte Plasmide.

Plasmid-Name	Resistenz	Experiment	Referenz
pZLR4- <i>traR</i> - <i>traG</i> :: <i>lacZ</i>	Carbenicillin, Gentamycin	Biofilm-Reporter-Plasmid, β -Galactosidase	Cha et al., 1998/ Austrian Institute of Technology (Tulln), Dr. Brader
pHV200I ⁻	Ampicillin	Biofilm-Reporter-Plasmid, Lumineszenz	Pearson et al., 1994/ Austrian Institute of Technology (Tulln), Dr. Brader

Abbildung 10. Plasmid-Karte von pEMG-TS1_{PfAR-1}-*gyrA*_{Pf0-1}-TS2_{PfAR-1}.Abbildung 11. Plasmid-Karte pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1}.

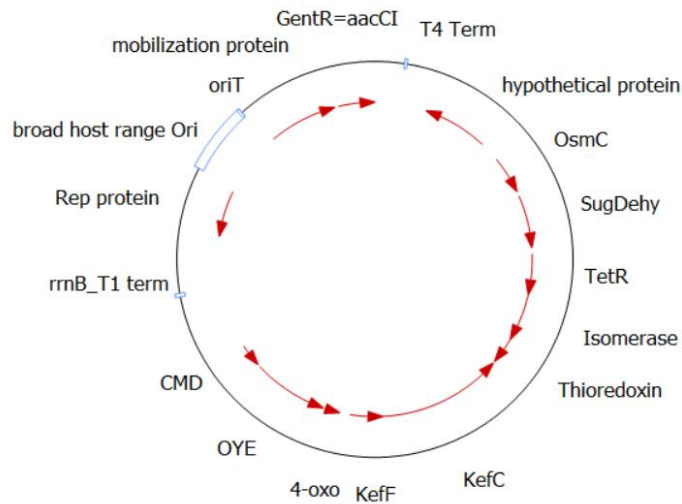


Abbildung 12. Plasmid-Karte pRU1097-clone1.

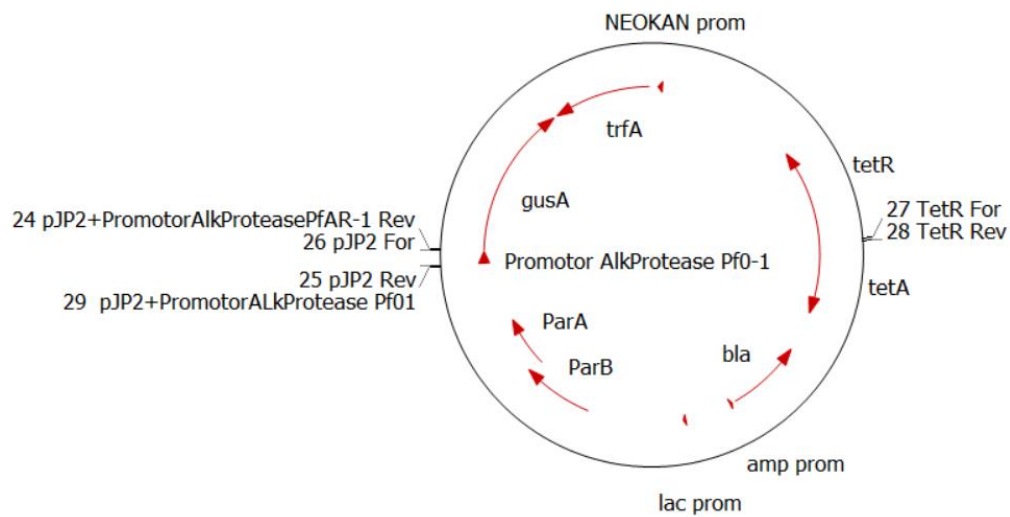


Abbildung 13. Plasmid-Karte von pJP2- *aprA*_{Pf0-1}::*gusA*.

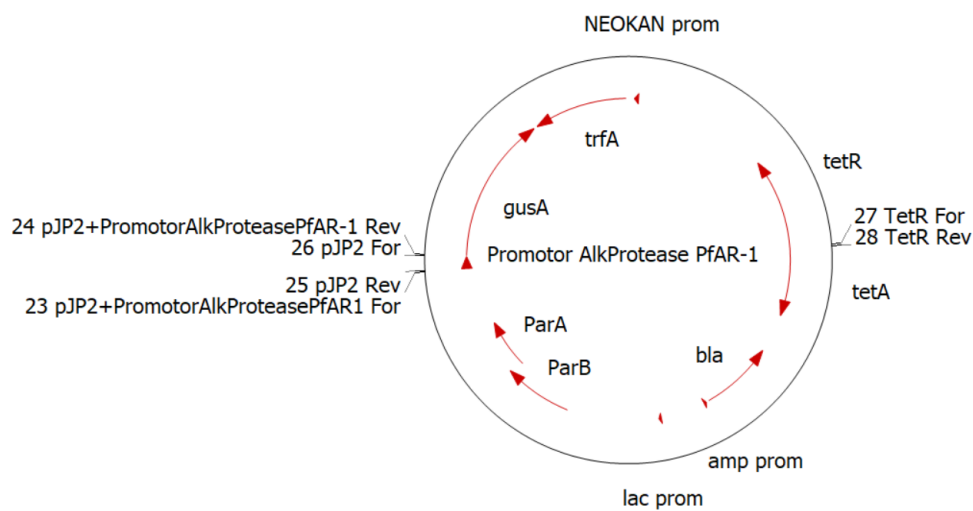


Abbildung 14. Plasmid-Karte von pJP2- *aprA*_{PfAR-1}::*gusA*.

2.1.7.2. Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden im Auftrag von Integrated DNA Technologies BVBA (Belgien) hergestellt. Die Sequenzierungs-Oligonukleotide, die in der ribosomalen *intergenic spacer* Region binden, wurden bei Sigma-Aldrich erworben.

Tabelle 13. Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid-Name	Sequenz (3' → 5')
7 pEMG F	TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAA
8 pEMG R	GAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCG
9 pEMG+TS1 _{Pf0-1} F	GTACCCGGGGATCCTCCTTCGCGAGCAGGCTCGCTCCCAC
10 pEMG+TS1 _{PfAR-1} F	GTACCCGGGGATCCTCGCCATCGCGAGCAGGCTCACTCCT
11 GyrA _{Pf0-1} +TS2 _{PfAR-1} F	AGAGTCGCAAGACTAAGCGGACAAACGAGGGGGCGGATGA
12 GyrA _{Pf0-1} +TS2 _{PfAR-1} R	CCCCTCGTTTGTCCGCTTAGTCTTGCGACTCTTCTTCGTC
13 GyrA _{PfAR-1} +TS2 _{Pf0-1} F	AGAGCCGCAAGAATAACCAAATCGTAGCAGGGCAGAGTGT
14 GyrA _{PfAR-1} +TS2 _{Pf0-1} R	CCCTGCTACGATTTGGTTATTCTTGCGGCTCTTCGTCAGC
15 TS1 _{Pf0-1} +GyrA _{PfAR-1} F	AGGAATCAGGCTTCTCATGGGCGAACTGGCCAAAGAAATC
16 TS1 _{Pf0-1} +GyrA _{PfAR-1} R	TGGCCAGTTCGCCCATGAGAAGCCTGATTCCTTTTTCTGG
17 TS1 _{PfAR-1} +GyrA _{Pf0-1} F	AGGAATCAGGCTTCTCATGGGCGAACTGGCCAAAGAAATC
18 TS1 _{PfAR-1} +GyrA _{Pf0-1} R	TGGCCAGTTCGCCCATGAGAAGCCTGATTCCTTTTTCTGG
19 TS2 _{Pf0-1} +pEMG R	CTGCAGGTCGACTCTAACGCGCTTCCTCGATGGCTTTCTT
20 TS2 _{PfAR-1} +pEMG R	CTGCAGGTCGACTCTAATCCTGCTCGGCCTGGGTGCGCAAT
21 Intergenic spacer 23S rRNA R2 ¹	TGACTGCGAAGGCATCCACC
22 Intergenic spacer 16S rRNA F2 ¹	AGCCGTAGGGGAACCTGCGG
23 pJP2-PromotorAlkProtease _{PfAR-1} F	AAGCTTCTCGAGCTCAACCCAACTAAAAAATCCTTTACG
24 pJP2-PromotorAlkProtease _{PfAR-1} R	GATTACCTCAGTCTAAAACACACTTCCTTGTTAAGCAATG
25 pJP2 R	GAGCTCGAGAAGCTTGGATCCATGG
26 pJP2 F	TAGACTGAGGTAATCATGGTCCGTC
27 TetR F	TTATATTGCCGATATCACTGATGGC
28 TetR R	GCCATCAGTGATATCGGCAATATAA
29 pJP2-PromotorAlkProtease _{Pf0-1} F	AAGCTTCTCGAGCTCAAAAAACGCTAGACGTTAGATTTC
41 pEMG Seq F	TCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTAC
60 Pf0-1 GyrA Seq F	TGCGCAAATCCAGGGTCAACTTGTC
61 Pf0-1 GyrA Seq R	GGCTCGTTTGCTCACATCCACTCTC

¹ Milyutina et al., 2004

2.1.7.3. Mikroorganismen

Tabelle 14. Verwendete Bakterien-Stämme der Sicherheitsstufe S1 (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Bakterium-Stamm	Resistenz	Experiment	Referenz/Herkunft
<i>Micrococcus luteus</i>	-	WT	F. Cohn, 1872/ DSMZ GmbH, Braunschweig
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 0-1 (Pf0-1)	natürliche Resistenz gegen Ampicillin	WT	Compeau et al., 1988/ eigene Laborsammlung
<i>Pseudomonas fluorescens</i> AR-1 (allicin resistant) (PfAR-1)	natürliche Resistenz gegen Ampicillin und Nalidixinsäure	WT	Borlinghaus, 2019
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> 4612 (Ps4612)	-	WT, Rasse 2, sehr anfällig gegenüber Allicin	R. E. Mitchell, 1984, Gardan et al., 1992/ eigene Laborsammlung
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A (Ps1448A)	natürliche Resistenz gegenüber Rifampicin	WT, Rasse 6, sehr anfällig gegenüber Allicin	Fillingham et al., 1992/ eigene Laborsammlung
<i>E. coli</i> K12 DH5α	Nalidixinsäure	Klonierungsstamm	Hanahan, 1983/ eigene Laborsammlung
<i>E. coli</i> K12 DHα λpir		Klonierungsstamm, pEMG-knock-out- System	Martínez-García & de Lorenzo, 2011/ Institut für Mikrobiologie, RWTH Aachen, Prof. Blank
<i>E. coli</i> MegaX DH10B T1R	Streptomycin	Klonierungsstamm	Invitrogen/ ThermoFischer Scientific
PfAR-1 pZLR4-traR-traG:: <i>lacZ</i>	Carbenicillin, Gentamycin	Biofilm-Reporter- Stamm, β-Galactosidase	von Salzen, 2015 Bachelor Thesis

Tabelle 14 (Fortsetzung). Verwendete Bakterien-Stämme der Sicherheitsstufe S1 (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Bakterium-Stamm	Resistenz	Experiment	Referenz/Herkunft
<i>Pf0-1</i> pZLR4-traR-traG::lacZ	Carbenicillin, Gentamycin	Biofilm-Reporter- Stamm, β-Galactosidase	von Salzen, 2015 Bachelor Thesis
<i>Ps4612</i> pZLR4-traR-traG::lacZ	Carbenicillin, Gentamycin	Biofilm-Reporter- Stamm, β-Galactosidase	von Salzen, 2015 Bachelor Thesis
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> pZLR4-traR-traG::lacZ	Carbenicillin, Gentamycin	Biofilm-Reporter- Stamm, β-Galactosidase	Cha et al., 1998/ Austrian Institute of Technology (Tulln), Dr. Brader
<i>E. coli</i> pHV200I ⁻	Ampicillin	Biofilm-Reporter- Stamm, Lumineszens	Pearson et al., 1994/ Austrian Institute of Technology (Tulln), Dr. Brader
<i>Pf0-1</i> pJP2-aprA _{Pf0-1} ::gusA	Ampicillin, Tetracyclin	Biofilm-Reporter- Stamm, β-Glucuronidase	von Salzen, 2015 Bachelor Thesis
<i>PfAR-1</i> pJP2-aprA _{PfAR-1} ::gusA	Ampicillin, Tetracyclin	Biofilm-Reporter- Stamm, β-Glucuronidase	von Salzen, 2015 Bachelor Thesis
<i>E. coli</i> HB101 pRK2013	Kanamycin	pEMG-knock-out- System, Helfer- Stamm bei der triparental Mating	Boyer & Roulland- Dussoix, 1969, Figurski & Hellinski, 1979/ Institut für Mikrobiologie, RWTH Aachen, Prof. Blank
<i>PfAR-1</i> -GyrA _{Pf0-1} 1	Ampicillin	GyrA- Austauschmutante 1	Hübbers, 2015 Bachelor Thesis
<i>PfAR-1</i> -GyrA _{Pf0-1} 2	Ampicillin	GyrA- Austauschmutante 2	Hübbers, 2015 Bachelor Thesis

Tabelle 14 (Fortsetzung). Verwendete Bakterien-Stämme der Sicherheitsstufe S1.

Bakterium-Stamm	Resistenz	Experiment	Referenz/Herkunft
<i>PfAR-1-GyrA_{Pf0-1}</i> 3	Ampicillin	GyrA- Austauschmutante 3	Hübbers, 2015 Bachelor Thesis
<i>PfAR-1GyrA_{Pf0-1+PfAR-1}</i>	Ampicillin, Kanamycin	GyrA- Austauschmutante mit beiden Gyrase-Genen	Hübbers, 2015 Bachelor Thesis
<i>Pf0-1-GyrA_{PfAR-1}</i> 1	Ampicillin, Nalidixinsäure	GyrA- Austauschmutante 1	diese Arbeit
<i>Pf0-1-GyrA_{PfAR-1}</i> 2	Ampicillin, Nalidixinsäure	GyrA- Austauschmutante 2	diese Arbeit
<i>Pf0-1-GyrA_{PfAR-1}</i> 3	Ampicillin, Nalidixinsäure	GyrA- Austauschmutante 3	diese Arbeit
<i>Pf0-1-GyrA_{Pf0-1+PfAR-1}</i>	Ampicillin, Kanamycin	GyrA- Austauschmutante mit beiden Gyrase-Genen	diese Arbeit

Tabelle 15. Verwendete Bakterien-Stämme der Sicherheitsstufe S2 (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Organismus	Referenz- Nummer	Beschreibung	Referenz/Herkunft
<i>Acinetobacter baumannii</i>	SNo ¹ 45760	klinisches Isolat	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Acinetobacter baumannii</i>	SNo 45757	klinisches Isolat	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Acinetobacter baumannii</i>	SNo 45541	klinisches Isolat	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Haemophilis influenzae</i>	SNo 68732	klinisches Isolat	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Haemophilis influenzae</i>	2019		Campagnari ez al., 1987/ School of Chemistry and Molecular Biosciences, The University of Queensland (AUS), Prof. Kappler

Tabelle 15 (Fortsetzung). Verwendete Bakterien-Stämme der Sicherheitsstufe S2 (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Organismus	Referenz-Nummer	Beschreibung	Referenz/Herkunft
<i>Haemophilis influenzae</i>	86-028		Bakaletz et al., 1988/ School of Chemistry and Molecular Biosciences, The University of Queensland (AUS), Prof. Kappler
<i>Haemophilis influenzae</i>	R2866		Nizet et al., 1996/ School of Chemistry and Molecular Biosciences, The University of Queensland (AUS), Prof. Kappler
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SNo 45412	klinisches Isolat	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SNo 45413	klinisches Isolat	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1 SBUG8		Holloway, 1955 Institut für Mikrobiologie, RWTH Aachen, Prof. Blank
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO25		Haas & Holloway, 1976 Institut für Mikrobiologie, RWTH Aachen, Prof. Blank
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 2659		Guerra-Santos et al., 1984 Institut für Mikrobiologie, RWTH Aachen, Prof. Blank
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC ² 43300	MRSA	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Staphylococcus aureus</i>	SNo 68709	klinisches Isolat	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Staphylococcus aureus</i> - GFP	ATCC 29213		NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden

Tabelle 15 (Fortsetzung). Verwendete Bakterien-Stämme der Sicherheitsstufe S2 (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Organismus	Referenz-Nummer	Beschreibung	Referenz/Herkunft
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Spain 23F-1 (PMEN-1)	ATCC 700669	MDR-Standard-Stamm	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus pneumoniae</i> S. Africa 9A-13 (PMEN-13)	ATCC 700904	MDR-Standard-Stamm	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Poland 23F-16 (PMEN-16)	ATCC BAA- 343	MDR-Standard-Stamm	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus pneumoniae</i> CSR14-10 (PMEN-10)	ATCC 700677	MDR-Standard-Stamm	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SNo 67715	klinisches Isolat	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SNo 68668	klinisches Isolat	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SNo 68665	klinisches Isolat	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SNo 23083	Levofloxacin-resistentes klinisches Isolat, <i>gyrA</i> -Mutation (E ₈₅ K), Levo _≥ 32	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SNo 32540	Levofloxacin-resistentes klinisches Isolat, Isolate, <i>gyrA</i> - Mutation (S ₈₁ F), Levo _≥ 32	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden

Tabelle 15 (Fortsetzung). Verwendete Bakterien-Stämme der Sicherheitsstufe S2 (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Organismus	Referenz-Nummer	Beschreibung	Referenz/Herkunft
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SNo 33163	Levofloxacin-resistentes klinisches Isolat, Isolate, <i>gyrA</i> - Mutation (E ₄₃₅ D), Levo≥8	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SNo 67764	klinisches Isolat	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SNo 69235	Levofloxacin-resistentes klinisches Isolat, Levo=8, Mfx=2	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SNo 72800	Levofloxacin-resistentes klinisches Isolat, Levo=8, Mfx=4	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 13813	Standard-Stamm	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	SNo 67799	klinisches Isolat	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	SNo 71818	Levofloxacin-resistentes klinisches Isolat, Levo=8, Mfx=4	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	SNo 73742	Levofloxacin-resistentes klinisches Isolat, Levo=2, Mfx=0.25	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden
<i>Streptococcus pyogenes</i>	SNo 67467	klinisches Isolat	NRZ für Streptokokken, RWTH Aachen, Dr. van der Linden

¹ interne Referenz-Nummern des Nationalen Referenz-Zentrums für Streptokokken, Universitätsklinik Aachen² Referenz-Nummer von *American Type Culture Collection*

Tabelle 16. Verwendeter Pilzstamm der Sicherheitsstufe S2.

Organismus	Referenz-Nummer	Referenz/Herkunft
<i>Candida albicans</i> SC5314 CAI4	ATCC MYA-2876	Gillum et al., 1984/ Institut für Mikrobielle- und Pflanzengenetik, KU Leuven (Belgien), Thevissen

2.1.7.4. Zelllinien

Tabelle 17. Verwendete Zellkultur-Linien.

Name	Gewebe	Herkunfts- organismus	Typ	Referenz/Herkunft
NIH/3T3 ATCC CRL-1658	Fibroblasten	<i>Mus musculus</i>	adhärent, embryonal	Todano & Green, 1963/ Institut für Immunologie, RWTH Aachen, Prof. Rink
Caco-2 ATCC HTB-37	Darm- Epithelzellen	<i>Homo sapiens</i>	adhärent, Carcinom	Fogh & Trempe, 1975/ Institut für Immunologie, RWTH Aachen, Prof. Rink
A549 ATCC CCL-185	Lungen- Epithelzellen	<i>Homo sapiens</i>	adhärent, Carcinom	Giard et al., 1973/ Institut für Pharmakologie und Toxikologie, RWTH Aachen, Prof. Martin
Beas-2B ATCC CRL-9609	Lungen/Bronchien- Gewebe	<i>Homo sapiens</i>	adhärent, immortalisiert durch Transformation mit Polynoma- Virus	Reddel et al., 1988/ Institut für Pharmakologie und Toxikologie, RWTH Aachen, Prof. Martin

2.1.7.5. Versuchstiere

Die Ratten (*Rattus norvegicus*) Rasse Wistar wurden von Charles River (Sulzfeld, Germany) erworben. Für die Experimente wurden die weiblichen ein Jahr alten Tiere mit einem Körpergewicht 270 ± 10 g verwendet. Die Versuche wurden an dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Uniklinik RWTH Aachen mit der Zulassung von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (ID: 8.87-51.05.20.10.245, 16 April 2013) laut der Richtlinien des Europäischen Parlaments 2010/63/EU durchgeführt.

2.2. Methoden

2.2.1. Chemische Methoden

2.2.1.1. *Allicin-Synthese*

Allicin wurde durch die Oxidation von Diallyldisulfid (DADS) in Anwesenheit von Per-Ameisensäure als Katalysator synthetisiert. Allicin wurde erst nach der modifizierten Methode von Lawson und Wang (2001) und anschließend nach der Methode von Albrecht et al. (2017) synthetisiert.

Das käuflich erworbene 80%ige DADS (Sigma-Aldrich) wurde destilliert, da für die Allicin-Synthese ein hochreines DADS mit >98% notwendig ist. Nach Methode von Lawson und Wang (2001) wurden 4 ml DADS, 6 ml Wasserstoffperoxid (30%) und 10 ml Ameisensäure (statt Essigsäure) 4,5 h lang bei Raumtemperatur und konstantem Rühren inkubiert. Nach der Methode von Albrecht et al. wurden 2,5 ml Ameisensäure mit 1,5 ml 30%igem Wasserstoffperoxid 2 h lang zur Erzeugung der Per-Ameisensäure in einem Eis-Wasser-Bad in einem 50 ml Rundkolben gerührt. In einem neuen 50 ml Rundkolben wurden 5 ml Methanol mit 1 ml destilliertem DADS vorgelegt. Das Ameisensäure-Wasserstoffperoxid-Gemisch wurde zu dem Methanol-DADS-Gemisch unter ständigem Rühren dazugegeben und 15 min im Eis-Wasser-Bad gerührt. Durch Zugabe von 25 ml ^{reinst} Wasser wurde die Reaktion bei den beiden Methoden beendet.

Das Allicin wurde 3-mal mit 25 ml Dichlormethan in einem Scheidetrichter extrahiert, in einem 250 ml Rundkolben aufgefangen, und anschließend im Rotationsverdampfer die Allicinlösung vom Lösungsmittel bei Raumtemperatur getrennt. 3 ml des Laufmittels (Hexan: Ethylacetat, 2:1) wurde zu dem Syntheseansatz dazugegeben, auf die Kieselgel-Säule (100 ml Kieselgel 60) zu Aufreinigung gegeben und mit dem Laufmittel eluiert. Jede 3 min wurden die Eluat-Tropfen auf eine TLC-Zellulose-F-Platte (engl. *thin layer chromatography*, TLC) appliziert und unter dem UV-Licht bei der Wellenlänge von 254 nm untersucht. Nach Auftreten der Fluoreszenz wurden die 3 ml Fraktionen solange gesammelt, bis das Eluat nicht mehr fluoreszierte. 2 µl aus jeder Fraktion wurden auf die TLC-Platte (s.o.) aufgetragen und mit dem 2:1-Hexan: Ethylacetat-Gemisch als Laufmittel chromatografisch aufgetrennt. Die Fraktionen, die laut Chromatografie ein blaues fluoreszierendes Signal hatten, wurden vereinigt. Dem Ansatz wurde durch die Zugabe von getrocknetem Kupfersulfat das Wasser entzogen. Das Lösungsmittel wurde wieder durch den Rotationsverdampfer entfernt. Die Reinheit des synthetisierten Allicins wurde anschließend mittels HPLC überprüft.

2.2.1.2. *Allicin-Analyse mittels HPLC*

Um die Reinheit des synthetisierten Allicins zu bestimmen, wurden 2 µl Allicin in 2 ml Methanol gelöst und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) analysiert. Für die Experimente wurde eine wässrige Lösung des Allicins angesetzt. Um die Allicin-Konzentration mittels HPLC zu bestimmen, wurde die angesetzte Allicin-Lösung bis zu 1 zu 50 in Methanol verdünnt.

2. Material und Methoden

Der Aufbau der HPLC-Anlage ist in dem Abschnitt 2.1.1 Geräte aufgelistet. Das Laufprogramm ist in Tabelle 18 dargestellt. In Abbildung 15 ist ein beispielhaftes Ergebnis der HPLC-Analyse dargestellt. Man kann sowohl die Konzentration des verdünnten Allicins (hier 8,071 mM) als auch die Reinheit (hier 98,3%) bestimmen.

Tabelle 18. HPLC-Laufprogramm für die Allicin-Konzentrationsmessung. Es sind die Änderungen der Laufmittelanteile (A: Wasser, B: Methanol) während der 25-minütigen Messung.

Laufzeit (min)	Anteil des Laufmittels A	Anteil des Laufmittels B
	(Wasser)	(Methanol)
0	56%	44%
10	53%	47%
15	7%	93%
23	56%	44%

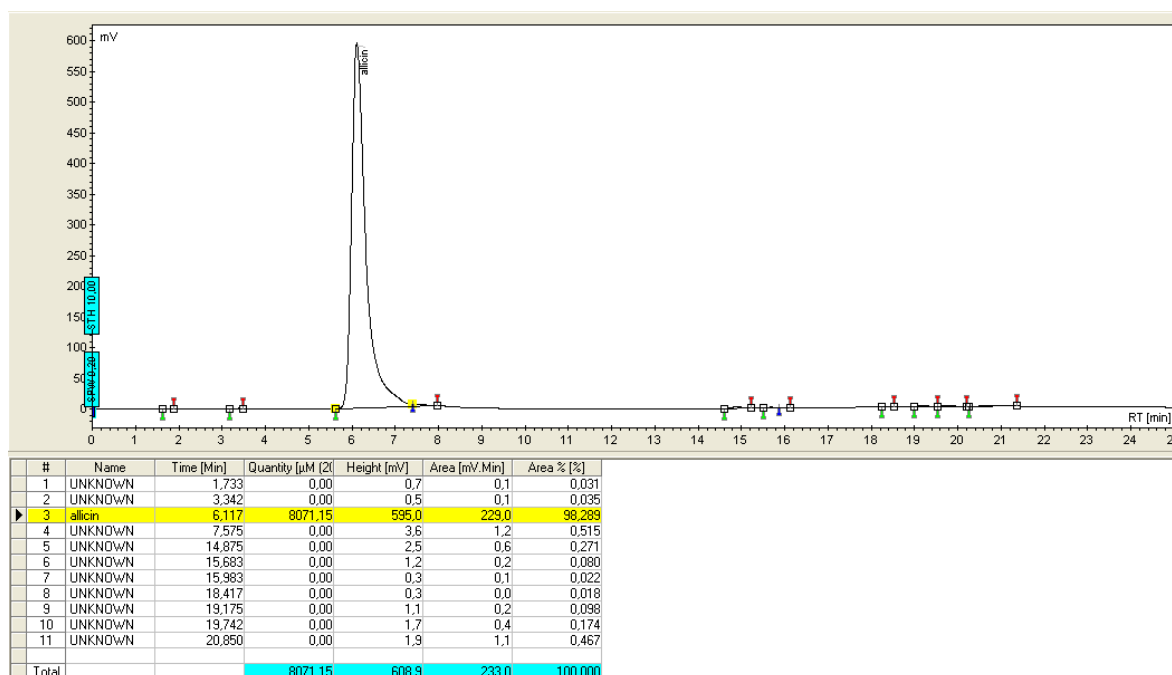


Abbildung 15. Analyse des Allicins mittels HPLC-Messung, mit der man Konzentration und Reinheit des Allicins bestimmen kann.

2.2.1.3. Herstellung der Novobiocin-Agarose-Säule für die DNA-Gyrase-Aufreinigung

Zunächst wurde die epoxy-aktivierte Agarose als Grundlage für die stationäre Phase der Affinitätssäule nach der Methode von Matsumoto et al. (1980) hergestellt. Dafür wurden 2 g Agarose mit 100 ml _{reinst} Wasser 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Die aufgequollene Agarose wurde auf Filterpapier in den Büchner-Trichter, der an einer Vakuumflasche angeschlossen war, gegeben, mit 1 l _{reinst} Wasser gewaschen und anschließend durch den Luftzug der Vakuumpumpe 1 min lang von dem überschüssigen Wasser befreit. Dabei entstand etwa 12 g in Wasser gequollene Agarose.

Zu der Agarose wurden 30 ml _{reinst}Wasser, 13 ml 2 M Natriumhydroxid, 3 ml Epichlorohydrin in einen 100 ml Kolben gegeben und 2 h bei 37°C 220 rpm inkubiert. Anschließend wurde, wie die epoxy-aktivierte Agarose, mit 1 l _{reinst} Wasser gewaschen und von dem überschüssigen Wasser befreit (s.o.).

In der nächsten Reaktion wurde Novobiocin an die epoxy-aktivierte Agarose nach der Methode von Staudenbauer & Orr (1981) gebunden. Dafür wurden 5 g epoxy-aktivierte Agarose mit 500 ml 0,3 M Natriumcarbonat-Puffer (pH-Wert 9,5) gewaschen (s.o.). Die Agarose wurde in einen 100 ml Kolben zusammen mit 500 mg Novobiocin und 15 ml 0,3 M Natriumcarbonat-Puffer gegeben und 16 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurde es zu dem Reaktionsansatz Ethanolamin in der 1 M Endkonzentration dazugegeben, um die nicht mit dem Novobiocin besetzten epoxy-Gruppen zu blockieren, und weitere 4 h bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die Novobiocin-Agarose wurde in jeweils 500 ml 0,5 M Natriumchlorid (gelöst in Natriumcarbonat-Puffer), _{reinst} Wasser, 0,5 M Natriumchlorid (gelöst in 0,1 M Natrium-Acetat-Puffer, pH-Wert 4,0) und wieder mit _{reinst} Wasser gewaschen.

Eine 10 ml Omnifix-Spritze wurde mit Glaswolle in der Spitze abgedichtet, um den Austritt der Agarose zu verhindern. Anschließend werden 10 ml Novobiocin-Agarose in die Spritze gefüllt, und abschließend wieder Glaswolle auf die Agarose gesetzt, um das Säulenmaterial nicht aufzuwirbeln. Die Novobiocin-Agarose-Säule wurde bei 7°C gelagert und einmalig für die Aufreinigung benutzt.

2.2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Die Pseudomonaden und *E. coli* wurden in LB- bzw. King's B-Nährmedien kultiviert (Tabelle 19 und Tabelle 20). Für die Herstellung wurden die Komponenten in _{reinst} Wasser gelöst und, falls erforderlich, der pH-Wert eingestellt. Das Medium wurde mit 400 ml in die 500 ml Flaschen abgefüllt und im Schnellkochtopf 20 min bei 121°C autoklaviert.

Zur Herstellung des festen Nährmediums wurde der Agar direkt in die Flaschen vor dem Autoklavieren dazugegeben. Zur Herstellung der Agarplatten wurden je 25 ml pro Petri-Schale (9 cm Durchmesser) gegossen. Bei der Herstellung von Antibiotikum-haltigen Agar-Platten wurde das Medium nach dem Erhitzen in einem Wasser-Bad auf 50°C abgekühlt, und nach der Antibiotikum-Zugabe und kräftigem Mischen in die Petri-Schalen gegossen.

Tabelle 19. King's B-Nährmedium zur Kultivierung der Pseudomonaden ohne Magnesiumsulfat-Zusatz (King et al., 1954).

Komponente	Konzentration
Pepton	20 g/l
di-Kaliumhydrogenphosphat	1,5 g/l
Glycerin	12,6 g
Agar (für Festmedium)	1,5 % (w/v)
pH-Wert (ortho-Phosphorsäure/Kaliumhydroxid)	7,2 g

Tabelle 20. Luria-Bertani (LB)-Nährmedium zur Kultivierung der *E. coli* (Bertani, 1951).

Komponente	Konzentration
Natriumchlorid	10 g/l
Trypton	10 g/l
Hefeextrakt	5 g/l
Agar (für Festmedium)	1,5 % (w/v)

Das Cetrimid-Nährmedium wurde zur Selektion der Pseudomonaden sowohl als Flüssigmedium als auch als Agar-Platten verwendet (Tabelle 21).

Tabelle 21. Cetrimid-Nährmedium zur Selektion der Pseudomonaden (Brown & Lowbury, 1965).

Komponente	Konzentration
Pepton	20 g/l
Magnesiumchlorid	1,4 g/l
Kaliumsulfat	10 g/l
Cetrimid	0,3 g/l
Glycerin	10% (v/v)
Agar (für Festmedium)	1,5% (w/v)

Bei der Untersuchung des Biofilms wurden ABM-Agar-Platten verwendet (Cha et al., 1998). Das ABM-Nährmedium wurde aus 100fach konzentrierten sterilfiltrierten Salzlösungen und 50fach konzentrierter Glukose-Lösung zusammengesetzt. Die finalen Nährstoff-Konzentrationen des ABM-Mediums sind Tabelle 22 zu entnehmen. Bei der Herstellung der ABM-Agar-Platten wurde erst Agar-Wasser autoklaviert, auf 50°C im Wasser-Bad abgekühlt und die Nährsalze dazugegeben.

Tabelle 22. ABM-Nährmedium zur Untersuchung des Biofilm-Ausbildung (Cha et al., 1998).

Komponente	Konzentration
di-Kaliumhydrogenphosphat-tri-Hydrat	3,9 g/l
Natrium-di-Hydrogenphosphat	1,15 g/l
Ammoniumchlorid	1 g/l
Magnesiumsulfat-hepta-Hydrat	0,3 g/l
Kaliumchlorid	0,15 g/l
Calciumchlorid	0,013 g/l
Eisensulfat-hepta-Hydrat	2,5 mg/l
Glukose	5 g/l

Micrococcus luteus wurde in dem Bacto® Nutrient Broth von Difco Laboratories angezogen. 3,2 g Pulver wurde in die 500 ml Flasche abgewogen (8 g/l), in 400 ml _{reinst} Wasser gelöst und 20 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung der Agarplatten wurde 1,5% (w/v) Agar vor dem Autoklavieren dazugegeben.

2. Material und Methoden

Die Pseudomonaden und *M. luteus* wurden bei 28°C und *E. coli* bei 37°C entweder im Flüssigmedium in einem Schüttler bei 220 rpm oder auf Agar-Platten in einem Inkubator kultiviert.

Die S2-Bakterien außer *Haemophilus influenzae* (s. Tabelle 15) wurden auf CASO-Blut-Agar-Platten bei 37°C in einem Inkubator kultiviert. 16 g der CASO-Agar-Pulvermischung wurden direkt in die 500 ml Flaschen gegeben, in 400 ml _{reinst} Wasser resuspendiert und 20 min bei 121°C in einem Schnellkochtopf autoklaviert. Das Medium wurde in einem 50°C-warmen Wasser-Bad temperiert, 21 ml defibriertes Schafsblut (Endkonzentration 5%) dazugegeben und kräftig gemischt. Anschließend wurden je 25 ml Nährmedium in die Petri-Schalen (9 cm Durchmesser) gegossen.

Tabelle 23. CASO-Agar-Nährmedium zur Kultivierung der S2-Bakterien.

Komponente	Konzentration
Pepton aus Casein	15 g/l
Pepton aus Soja	5 g/l
Natriumchlorid	5 g/l
Agar	15 g/l
pH-Wert	7,3±0,2

Die Kationen-adjustierte Müller-Hinton-Bouillon II (engl. *Müller-Hinton Broth II*, MHBII) wurde als flüssiges Nährmedium bei der Bestimmung der Suszeptibilität (s. Kapitel 2.2.2.6 Bestimmung MHK und MBK) verwendet. MHBII wurde als gebrauchsfertige Pulvermischung erworben und laut Anleitung mit 22 g/l für das Flüssigmedium angesetzt und in einem Schnellkochtopf 20 min bei 121°C autoklaviert.

Tabelle 24. Müller-Hinton-Bouillon II, die für den Suszeptibilität-Test verwendet wurde.

Komponente	Konzentration
Säurehydrolysat von Casein	17,5 g/l
Rindfleisch-Extrakt	3 g/l
Stärke	1,5 g/l
pH-Wert	7,3±0,2

Haemophilus influenzae-Stämme wurden in dem CDM (engl. *chemically defined media*) als flüssiges Nährmedium (Coleman et al., 2003) bei 220 rpm und 37°C kultiviert (Tabelle 25). Als festes Nährmedium wurden die sBHI-Agar-Platten (engl. *supplemented brain heart infusion*) verwendet (Johnston, 2010). Dafür wurde 52 g/l BHI-Agar autoklaviert (20 min, 121°C) und im 50°C-warmen Wasserbad abgekühlt. 1 ml/l von NAD-Stocklösung (100 mg β -NAD⁺ gelöst in 10 ml _{reinst} Wasser) und 10 ml/l Hemin-Stocklösung wurden dazugegeben, vorsichtig gemischt und in die Petrischalen gegossen. Für den 1000fach konzentrierten Hemin-Stocklösung wurde 50 mg Hemin-Chlorid in 5 ml 0,1 N Natriumhydroxid gelöst, 5 ml Ethylenglykol dazugegeben und gut gemischt. Anschließend wurde 10 ml 5fach konzentrierten TRIS-Borat-Puffer (2,7 g TRIS, 1,38 g Borsäure, gelöst in 50 ml

reinst Wasser) und 30 ml _{reinst} Wasser dazugegeben und gut gemischt. Die Hemin-Stocklösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C bis zu 2 Monate gelagert. Die sBHI-Agar-Platten wurden bei 4°C bis zu 2 Monate gelagert.

Tabelle 25. CDM-Flüssignährmedium zur Kultivierung *Haemophilus influenzae*.

Komponente	Menge
RPMI-1640 mit L-Glutamin und 25 mM HEPES (pH 7,26)	191 ml
MEM-Natriumpyruvat	2 ml
β-NAD ⁺ -Stocklösung (1 mg/ml) ¹	2 ml
Häm-Histidin-Stocklösung ²	4 ml
Uracil-Stocklösung ³	10 ml
Inosin-Stocklösung ⁴	20 ml

¹ 100 mg β-NAD⁺ gelöst in 100 ml _{reinst} Wasser, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

² 0,2 g L-Histidin (freie Säure) wurde in 200 ml _{reinst} Wasser gelöst und anschließend 0,2 g Hemin-Salzsäure, 4 ml von 1 N Natriumhydroxid dazugegeben. Die Lösung wurde im kochenden Wasserbad 5-10 min inkubiert bis die Komponenten in Lösung waren, nach der Abkühlung sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm) und bei 4°C gelagert.

³ 2 mg/ml Uracil, gelöst in 0,1 N Natriumhydroxid.

⁴ 20 mg/ml Inosin, gelöst in _{reinst} Wasser, sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm).

Der Hefepilz *Candida albicans* wurde in dem Flüssig-Nährmedium RPMI-1640 bzw. auf den YPD-Agar-Platten (Tabelle 26) bei 37°C kultiviert. Die Komponenten für YPD-Nährmedium wurden abgewogen, in _{reinst} Wasser gelöst und je 400 ml in 500 ml Flaschen gefüllt. Agar wurde direkt in die Flaschen abgewogen (6 g/400 ml). Das Nährmedium wurde bei 121°C 20 min lang autoklaviert.

Tabelle 26. YPD-Nährmedium für die Kultivierung Hefepilzes *C. albicans*.

Komponente	Konzentration
Hefeextrakt	10 g/l
Pepton	20 g/l
Glukose	20 g/l
Agar (für Festmedium)	1,5% (w/v)

Alle Nährmedien wurden bei 7°C gelagert und innerhalb von 6 Monaten (mit Ausnahme von *H. influenzae* Nährmedien CDM und sBHI) verbraucht.

2.2.2.2. Antibiotika-Stammlösungen

Die Antibiotika-Stammlösungen wurden in _{reinst} Wasser (Tetracyclin in 50% Ethanol) angesetzt und sterilfiltriert. Die 400 µl Antibiotika-Aliquots wurden bei -20°C gelagert (Tabelle 27).

Tabelle 27. Arbeits- und Stocklösung-Konzentrationen der verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	Stocklösung-Konzentration	Konzentration in Agar-Platten
Ampicillin-Natriumsalz	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin-Sulfat	50 mg/ml	50 µg/ml
Gentamycin-Sulfat	20 mg/ml	20 µg/ml
Streptomycin-Sulfat	100 mg/ml	100 µg/ml
Tetracyclin-Hydrochlorid	50 mg/ml	50 µg/ml
Nalidixinsäure-Natriumsalz	50 mg/ml	100 µg/ml
Carbenicillin-Natriumsalz	50 mg/ml	50 µg/ml
Novobiocin	50 mg/ml	-
Levofloxacin	50 mg/ml	-

2.2.2.3. Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion verwendet man bei der Klonierung, um den Erfolg der Insertion eines DNA-Fragmentes in das Plasmid zu überprüfen und dadurch die Transformation mit dem Plasmid ohne Insert auszuschließen. Dafür befindet sich die *Multiple Cloning Site*, in die ein DNA-Fragment (Insert) eingefügt werden soll, im *lacZ*-Gen, das für das Enzym β -Galactosidase kodiert. Die Expression der β -Galactosidase wurde durch IPTG induziert. Dadurch wird X-Gal durch das Enzym zu 5-Brom-4-chlor-indoxyl gespalten und durch die Oxidation durch den Luftsauerstoff und Dimerisierung zu dem blauen unlöslichen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, das die Bakterien-Kolonien blau anfärbt. Bei dem Vorhandensein eines Inserts in dem Plasmid wird die kodierende Sequenz für das *lacZ*-Gen unterbrochen. In diesem Fall bleiben die Kolonien weiß.

Für die Blau-Weiß-Selektion wurde auf die Antibiotikum-haltige Agarplatte 50 µl IPTG-X-Gal-Lösung gleichmäßig ausgestrichen und 10 min trocknen gelassen. Für die Herstellung der IPTG-X-Gal-Lösung wurde 100 mg X-Gal und 12 mg IPTG zuerst in 3 ml DMSO gelöst und anschließend 5 ml Methanol und 4,5 ml _{reinst} Wasser dazugegeben. Die Aliquots wurden dunkel bei -20°C gelagert. Anschließend wurde der Transformationsansatz (s. Kap. 2.2.3.10. Transformation von *E. coli* mit Hitze-Schock-Methode und 2.2.3.12. Transformation von Pseudomonaden durch die Elektroporation) auf der Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotika (s. Tabelle 12) ausgestrichen. Weiße Kolonien enthielten das Plasmid mit Insert. Das Vorhandensein des Inserts wurde mittels PCR, Restriktionsverdau bzw. Sequenzierung überprüft.

2.2.2.4. Herstellung der Glycerin-Stocks

Zur Lagerung der Bakterien wurden Glycerin-Stocks hergestellt. Dafür wurden 2 ml frischer Übernachtskultur der jeweiligen Bakterien bei 4.000 g 5 min abzentrifugiert und in 500 µl steriler 50%igen (v/v) Glycerin-Lösung vorsichtig resuspendiert. Die Proben wurden in flüssigen Stickstoff sofort eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2.5. Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhoftest

Um die Suszeptibilität der Bakterien gegenüber einer Substanz zu bestimmen, wurde die Methode des Hemmhof-Tests benutzt. Dabei wird eine Testsubstanz in ein Loch in der Agar-Platte appliziert. Durch die Diffusion entsteht ein Konzentrationsgradient der Testsubstanz. Als Folge bildet sich eine Zone ohne bakterielles Wachstum um die Applikationsstelle herum. Durch die Größe des Hemmhofes kann man die Resistenzstärke zwischen verschiedenen Bakterienstämmen bzw. die antimikrobielle Wirksamkeit verschiedener Substanzen untereinander vergleichen.

Dafür wurde eine frische Übernachtskultur von Pseudomonaden (*Pf0-1* und *PfAR-1*) 1 zu 100 mit dem Nährmedium verdünnt und erneut bis zu optischer Dichte bei 600 nm (OD_{600}) 0,2 angezogen. Bei den S2-Stämmen wurden die Bakterien mit einer sterilen Impföse von der frischen Agarplatte in das flüssige Nährmedium übertragen und resuspendiert, bis die $OD_{600}=0,1-0,3$ (in Abhängigkeit von dem Stamm, genaue Angaben sind in Ergebnis-Teil zu finden) erreicht war. Zu den 300 μ l Bakterienkultur wurde 25 ml 50°C-warmes flüssiges Agar-Nährmedium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben, vorsichtig gemischt und zügig in eine Petrischale (9 cm Durchmesser) gegeben. Bei dem anderen Ansatz wurden die Bakterien an der Oberfläche der Agarplatte (Agarvolumen 25 ml) mit der sterilen Impföse ausgestrichen (Volumenangaben der Bakteriensuspension sind in Ergebnis-Teil zu finden). Nach dem Erstarren des Agars wurden Löcher mithilfe eines Korkbohrers (6 mm Durchmesser) ausgestanzt. 20 μ l Testsubstanz bzw. Wasser als Kontrolle wurden in die Löcher pipettiert und über Nacht inkubiert.

Um die antimikrobielle Wirkung der Testsubstanz über die Gas-Phase zu untersuchen, wurde die Substanz auf den liegenden Deckel der Petri-Schale appliziert und die Agar-Platte drüber gestellt. Um zu überprüfen, ob die Bakterien in der Zone des Hemmhofes in dem Wachstum inhibiert sind, oder ob die Allicin-Wirkung letal ist, wurden die Bakterien auf eine neue LB- bzw. King's B-Agar-Platte mittels Replikatorstempels übertragen (Abbildung 16). Die Platten wurden anschließend bei 28°C mit Pseudomonaden bzw. 37°C mit *E. coli* über Nacht inkubiert und das erneute Auftreten des Hemmhofes überprüft.



Abbildung 16. Replikatorstempel mit dem gespannten Transfertuch für die Übertragung der Bakterien von einer bewachsenen auf eine neue Agar-Platte.

2.2.2.6. Bestimmung der minimalen hemmenden Konzentration (MHK) und minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) bei Bakterien

Die Empfindlichkeitsprüfung wurde nach Vorgaben von EUCAST (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) mithilfe der Standardarbeitsanweisung des Nationalen Referenzzentrums für Streptokokken (Uniklinik RWTH Aachen) in dem Mikrotiter-Format durchgeführt. Dabei wurden die minimale Hemmkonzentration (MHK) und minimale bakterizide Konzentration (MBK) bestimmt.

S2-Stämme wurden von einer ein-Tag-alten CASO-Blut-Agar-Platte (s. Tabelle 23) mit einer sterilen Impföse in 5 ml MHBII-Flüssigmedium bis zu 1 McFarland (entspricht $OD_{600}=0,257$) resuspendiert. Die *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme wurden von einer ein-Tag-alten CASO-Agar-Platte ohne Blutzusatz bis zu 1 McFarland resuspendiert. 2,2 ml von 2fach konzentriertem MHBII, 141 µl lysiertes Pferdeblut und 10 µl von Bakterien-Suspension wurden zusammen pipettiert und auf Eis gelagert. Der Test wurde mit zwei Replikaten/Versuchstag durchgeführt.

In der 96-well-Platte wurden 50 µl Allicin-Lösung in den Konzentrationen zwischen 0,02 mM und 12,62 mM (in 2ⁿ-Verdünnungsreihe) und als Kontrolle 50 µl Wasser vorgelegt. 50 µl von der vorbereiteten Bakterien-Suspension wird in jedes well dazu pipettiert. Die Platte wurde mit luftdurchlässigem Verschlussfilm abgedeckt und 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das sichtbare Wachstum in jedem well überprüft. Die niedrigste Allicin-Konzentration ohne sichtbares Wachstum wurde als MHK bezeichnet.

Um die minimale bakterizide Konzentration (MBK) zu bestimmen, wurden 10 µl aus jedem well auf eine CASO-Blut-Agar-Platte bei S2-Organismen und auf eine CASO-Agar-Platte für Pseudomonaden pipettiert und für 18 h bei 37°C inkubiert. Die niedrigste Konzentration ohne Wachstum wurde als MBK definiert. Die MHK und MBK wurden durch mindestens Duplikate bestimmt.

2.2.2.7. Bestimmung der minimalen hemmenden (MHK) und minimalen fungiziden Konzentration (MBK) bei Pilzen

Die minimale hemmende (MHK) und fungizide (MFK) Konzentration von Testsubstanzen wurden in Mikrotiter-Format determiniert. Vor der frischen Übernachtskultur von *C. albicans* wurden fünf Kolonien mit der sterilen Impföse in 1 ml sterile Phosphat-gepufferten Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS, Tabelle 28) überführt und resuspendiert. Die Zellzahl einer 1 zu 10 Verdünnung wurde mittels Thoma-Kammer bestimmt. Die Zelldichte wurde auf $2,5 \cdot 10^6$ pro ml eingestellt. Es wurde zuerst 1 ml von 1 zu 50 Verdünnung in PBS-Lösung hergestellt und anschließend daraus 10 ml von 1 zu 20 Verdünnung in RPMI-1640-Nährmedium hergestellt. In der 96-well-Mikrotiter-Platte wurde eine 2ⁿ-Verdünnungsreihe des Allicins von 100 µM bis 50 mM mit dem Endvolumen 10 µl/well hergestellt. Als Kontrolle wurde ^{reinst} Wasser verwendet. 90 µl der Hefe-Lösung wurde dazu pipettiert. Die Endkonzentrationen des Allicins, die im Test verwendet wurden, liegen zwischen 100 µM bis 5 mM. Der Deckel wurde auf die Platte platziert und mit der Parafilm-Folie abgedichtet. Die Platte wurde 24 h bei 37°C inkubiert. Die Lösung in jedem well wurde vorsichtig durch Pipettieren gemischt und die OD_{600} in einem Platten-Lesegerät detektiert. Als

minimale hemmende Konzentration (MHK) wurde die niedrigste Allicin-Konzentration, die das sichtbare Wachstum der *C. albicans* inhibiert, definiert. Anschließend wurden 5 µl aus jedem well auf eine YPD-Platte appliziert und 24 h bei 37°C inkubiert. Als minimale fungizide Konzentration (MFK) wurde die niedrigste Allicin-Konzentration definiert, bei der kein Wachstum auf der Agarplatte sichtbar war.

Tabelle 28. Zusammensetzung der Phosphat-gepufferten Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) für *C. albicans*.

Komponente	Konzentration
Natriumchlorid (NaCl)	137 mM
Kaliumchlorid (KCl)	2,7 mM
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	10 mM
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	1,8 mM
pH-Wert (Salzsäure)	7,4

2.2.2.8. Bestimmung der bakteriellen Biofilm-Ausbildung in Flüssigkultur

Der Einfluss der Testsubstanz auf die Ausbildung des bakteriellen Biofilms wurde in Flüssigkultur in Kultur-Röhrchen untersucht. Bei der stationären Inkubation bildet sich der Biofilm an der Flüssigkeitsoberfläche an der Wand des Kultur-Röhrchens.

Die frische bakterielle Übernachtskultur von Pseudomonaden wurde in King's B-Nährmedium bis zu OD₆₀₀=0,06 verdünnt, je 2 ml in die Glas-Kulturröhrchen überführt und mit verschiedenen Allicin-Konzentrationen behandelt. Die Kulturröhrchen wurden vertikal ohne Schütteln 48 h inkubiert. Die gesamte bakterielle Kultur wurde vorsichtig durch Pipettieren entfernt und deren OD₆₀₀-Wert gemessen. Das Kultur-Röhrchen wurde dreimal mit 3 ml 1%iger Natriumchlorid-Lösung gewaschen und anschließend der Biofilm mit 4 ml 0,2%igen Kristallviolett-Lösung (gelöst in 2%iger Ethanol-Lösung) 1 min lang gefärbt. Die Färbelösung wurde vorsichtig durch Pipettieren entfernt und das Kulturröhrchen einmal mit 4 ml 1%iger Natriumchlorid-Lösung gewaschen.

2.2.2.9. Bestimmung der bakteriellen Biofilm-Ausbildung auf Agar-Platten

Die Wirkung von Allicin auf die Ausbildung des Biofilms wurde mit Biofilm-Reporter-Stämmen mittels des Hemmhof-Tests untersucht. Dabei wurden die Pseudomonaden, die mit den Biofilm-Reporter-Plasmiden pZLR4-*traG::lacZ* bzw. pJP2-*aprA::gusA* transformiert waren, verwendet. Bei der Ausbildung des Biofilms färben sich die Bakterien in Anwesenheit von X-Gal bzw. X-Gluc blau, wenn die Biofilm-Ausbildung inhibiert wurde, bleiben die Bakterien weiß.

Auf eine ABM-Agarplatte (20 ml Agar-Nährmedium pro Platte) wurden 100 µl von 8 mg/ml X-Gal (pZLR4-Reporter-Plasmid) bzw. X-Gluc (pJP2-Reporter-Plasmid) -Lösung gleichmäßig mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und die Platte 10 min unter der Sterilbank getrocknet. Die frische Übernachtskultur wurde bis zu OD₆₀₀=0,05 in King's B-Medium verdünnt und bis zur OD₆₀₀=0,4 bei

28°C und 220 rpm inkubiert. Zu den 200 µl Bakterienkultur wurden 3 ml von 50°C warmem flüssigen 0,7%igen Wasser-Agar dazugegeben und durch Schwenken gemischt. Der bakterien-haltige Wasser-Agar wurde auf einer ABM-Agarplatte gleichmäßig verteilt. Nach dem Erstarren wurde in der Mitte der Platte ein Loch von 6 mm Durchmesser mit einem Korkbohrer ausgestanzt und 20 µl Allicin-Lösung pipettiert. Für die Untersuchung der Allicin-Wirkung über die Gasphase wurde Allicin auf den Deckel der Petrischale appliziert und die Agar-Platte darüber platziert. Die Agar-Platte wurde bei 28°C über Nacht inkubiert.

2.2.2.10. Bestimmung der Biofilm-Ausbildung von *C. albicans* in 96-Mikrotiter-Format

Dieses Experiment wurde in Kooperation mit dem Institut für Mikrobielle- und Pflanzengenetik der KU Leuven (Belgien) durchgeführt. Die frische Übernachtskultur von *C. albicans* wurde mit einer sterilen Impföse von der YPD-Agar-Platte in 5 ml RPMI-1640-Medium bis zur $OD_{600}=0,1$ resuspendiert. In einer 96-well-Mikrotiter-Platte wurde 10 µl Testlösung in 10facher Konzentration in 2^n -Verdünnungsreihe (100 µM-50 mM) vorgelegt. Anschließend wurde zu jedem well 90 µl der Hefe-Suspension dazugegeben. Die Endkonzentrationen des Allicins im Test sind 10 µM bis 5 mM. Die Start- OD_{600} der Hefe-Lösung war 0,01. Die Mikrotiter-Platte wurde mit dem Deckel abgedeckt und mit Parafilm abgeklebt. Die Platte wurde 1 h bei 37°C inkubiert, dabei haften sich die Zellen an die well-Oberfläche an. Anschließend wurde das Medium vorsichtig aus jedem well durch Pipettieren entfernt und mit 100 µl PBS (Tabelle 28) vorsichtig gewaschen, um die nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Anschließend wurden je 100 µl von RPMI-1640-Nährmedium mit entsprechenden Allicin-Konzentrationen (s.o.) vorsichtig dazugegeben. Die Platte wurde mit dem Deckel abgedeckt, mit Parafilm abgedichtet und 17 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und jedes well mit je 100 µl PBS gewaschen. Die Ausbildung von Biofilm wurde anhand des Zell-Viabilität mit MTT-Test und mit CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) bestimmt. Bei dem MTT-Test wurden 100 µl 1%ige MTT-Lösung (gelöst in PBS) in jedes well appliziert und 1 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, je 100 µl Isopropanol dazugegeben und durch Pipettieren gemischt. Die Absorption bei 570 nm (Referenz-Wellenlänge 630 nm) wurde in dem Platten-Lesegerät gemessen. Bei der Verwendung von CellTiter-Blue® wurden 100 µl der Lösung pro well appliziert und 1 h bei 37°C in der Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei 590 nm (Extinktion bei 535 nm) in dem Plattenlesegerät gemessen.

Die Untersuchung der Allicin-Wirkung auf den nach einem Tag ausgebildeten Biofilm wurde wie oben beschrieben mit folgenden Änderungen durchgeführt. Nachdem die Hefe-Zellen mit der $OD_{600}=0,01$ in die 96-well-Mikrotiter-Platte ohne Zugabe von Allicin pipettiert wurden, wurden sie 24 h anstatt einer Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben mit PBS gewaschen und mit Allicin behandelt. Die Auswertung erfolgte mit MTT-Test und CellTiter-Blue® Cell Viability Assay.

2.2.2.11. *Untersuchung des Synergismus von Allicin mit verschiedenen Antibiotika bei Pseudomonaden*

In diesem Arbeitsschritt wurde die synergistische Wirkung des Allicins mit verschiedenen Antibiotika in Mikrotiter-Plattenformat untersucht. Dafür wurde die 2ⁿ-Verdünnungsreihe des Antibiotikums mit der 4fachen Konzentration mit 25 µl/well in 96-well-Mikrotiterplatten vorbereitet. 25 µl Allicin-Lösung in der 4fachen Konzentration wurde zu jedem well dazugegeben. Die frische Übernachtskultur wurde in dem Nährmedium bis zur OD₆₀₀=0,05 verdünnt und bis zur OD₆₀₀=0,26 bei 28°C und 220 rpm inkubiert. 10 µl Bakteriensuspension wurde zu 2,341 ml doppelkonzentriertem King's B-Medium dazugegeben und gemischt. 50 µl Bakteriensuspension pro well wurden dazugegeben. Als Negativkontrolle wurde _{reinst} Wasser verwendet (50 µl Bakteriensuspension und 50 µl _{reinst} Wasser). Als Kontaminationskontrolle wurde der Ansatz mit Nährmedium und _{reinst} Wasser verwendet (50 µl doppelkonzentriertes King's B-Medium und 50 µl _{reinst} Wasser). Die Platte wurde mit einer luftdurchlässigen Folie abgedichtet und mit dem Deckel abgedeckt. Die Platte wurde bei 28°C über Nacht inkubiert und die MIK bestimmt. Anschließend wurden aus jedem well 10 µl Flüssigkeit auf eine King's B Agarplatte pipettiert und bei 28°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die MBK bestimmt.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. *Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien*

Bei der Präparation der Plasmid-DNA aus den Bakterien werden die Zellen zuerst durch die Zugabe der Natronlauge und SDS lysiert. Bei alkalischen Bedingungen lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen auf. Beim nächsten Schritt der Neutralisierung durch die Zugabe von Kaliumacetat und Ameisensäure renaturiert die Plasmid-DNA aber nicht die genomische DNA, die zusammen mit bakteriellen Proteinen und Lipiden, Natronlauge und SDS ausfällt. Anschließend wird die Plasmid-DNA durch die Fällung mit Isopropanol aufkonzentriert (Bimboim & Doly, 1979; Good & Nazar, 1997).

5 ml flüssiges Nährmedium wurden mit einer sterilen Impföse von der frischen Bakterien-Agarplatte angeimpft und über 17 h bei 220 rpm in einem temperierten Schüttler inkubiert. 2 ml der Übernachtskultur wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei 4.000 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer I (Tabelle 29) gelöst. Anschließend wurden 250 µl Puffer II (Tabelle 29) dazugegeben, vorsichtig durch Invertieren gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 250 µl Puffer III (Tabelle 29) dazugegeben, vorsichtig durch Invertieren gemischt und 5 min im Eis-Wasser-Bad inkubiert. Die Proben wurden bei 14.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert. 600 µl des Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 600 µl Isopropanol dazugegeben. Die Proben wurden gemischt und erneut 30 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen (14.000 g, 10 min). Das Pellet wurde in einem Zentrifugalverdampfer getrocknet und in 30 µl TE-Puffer (Tabelle 30) resuspendiert. Um die RNA aus der Plasmidpräparation zu entfernen, wurde zu der Probe 1 µl RNase A (10 mg/ml) pipettiert

und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-Präparation wurde anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Tabelle 29. Zusammensetzung der Puffer-Lösungen für die Plasmid-Präparation aus Bakterien.

	Komponente	Konzentration
Puffer I	Glukose	50 mM
	EDTA	10 mM
	TRIS	25 mM
	pH-Wert (Salzsäure)	8,0
Puffer II	SDS	1% (w/v)
	Natronlauge	200 mM
Puffer III	Kalium-Acetat	3 M
	pH-Wert (Essigsäure)	5,2

Tabelle 30. Zusammensetzung des TE-Puffers.

Komponente	Konzentration
TRIS	10 mM
EDTA	1 mM
pH-Wert (Salzsäure)	8,0

2.2.3.2. *Präparation von genomischer DNA aus Bakterien*

Die genomische DNA wurde mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Dabei werden Verunreinigungen wie Proteine denaturiert und bleiben bei der Zentrifugation in der organischen bzw. Zwischenphase. Die DNA bleibt in der wässrigen Phase. Anschließend werden die Reste von Phenol und Chloroform durch die Alkohol-Fällung entfernt und die DNA durch das Lösen des Pellets im kleineren Volumen aufkonzentriert.

Von einer frischen bakteriellen Übernachtskultur wurde die neue Kultur in Verdünnung 1 zu 100 angeimpft. Wenn die optische Dichte bei der Wellenlänge 600 nm (OD_{600}) den Wert von 0,6 erreichte, wurden 1,5 ml der Kultur in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 5 min lang bei 4.000 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 570 µl TE-Puffer (s. Kap. 2.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien) resuspendiert. Dazu wurden 30 µl 10% (w/v) SDS und 3 µl Proteinase K (20 mg/ml) dazugegeben, gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl 5 M Natriumchlorid und 80 µl CTAB-Natriumchlorid-Lösung (10% (w/v) CTAB, 0,7 M Natriumchlorid) dazugegeben und gemischt. Nach 10 min Inkubation bei 65°C wurde zu dem Ansatz 600 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) dazugegeben und 1 min lang kräftig gemischt. Nach der Zentrifugation bei 14.000 g für 5 min wurde die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. 600 µl Chloroform-Isoamylalkohol (49:1, v/v) wurden zu dem Ansatz hinzugegeben, kräftig gemischt und 5 min bei 14.000 g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase

wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol und vorsichtiges Mischen gefällt. Die DNA wurde 30 min bei 14.000 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 min bei 14.000 g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in dem Zentrifugalverdampfer getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (s. Tabelle 30) resuspendiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.3.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) wurden die DNA-Abschnitte für die Klonierung mittels Gibson-Assemblierung hergestellt und die genetische Zusammensetzung der putativen Transformanten überprüft, z.B. durch die Anwesenheit der Resistenz-Gene.

Das Pipettierschema eines typischen PCR-Ansatzes ist in Tabelle 31 dargestellt. Es wurde das DNA-Polymerase-Enzym Phusion® High-Fidelity verwendet. Um die Arbeitsschritte zu reduzieren wurden 10 ml des Master-Mix angesetzt und je 500 µl Aliquots bei -20°C gelagert (Tabelle 32). Optional bei den DNA-Templates mit hohem GC-Gehalt wurde der Polymerase-Master-Mix mit Zugabe von 2 M Betain verwendet. Als DNA-Template wurde in TE-Puffer (s. Tabelle 30) 1 zu 100 verdünnte genomische DNA bzw. Plasmid verwendet.

Tabelle 31. Zusammensetzung eines typischen PCR-Ansatzes mit 20 µl Volumen.

Komponente	Menge
Polymerase-Master-Mix	18 µl
Primer <i>forward</i>	0,5 µl
Primer <i>reverse</i>	0,5 µl
DNA-Template	1 µl
End-Volumen	20 µl

Tabelle 32. Zusammensetzung des Polymerase-Master-Mix für PCR.

Komponente	Menge
Phusion® HF-Puffer	2 ml
Ladepuffer (Cylencyanol, Orange G, 60% (w/v) Saccharose)	1 ml
dNTPs 100 mM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	je 22 µl
optional Betain-Monohydrat	2,7 g (2 M)
Polymerase	100 µl
End-Volumen (mit reinst Wasser auffüllen)	10 ml

Für die meisten PCR-Ansätze wurde die *touch down*-PCR durchgeführt. Dabei startet die Hybridisierung-Temperatur bei 60°C und sinkt mit jedem Zyklus um 1°C 10 Zyklen lang. Anschließend läuft der Hybridisierung-Schritt 25 Zyklen lang bei 50°C. Die *touch down*-PCR sorgt für die hohe Spezifität der Primer-Bindung durch die hohe Stringenz in der ersten Phase des PCR-Programms, wodurch die Bildung der Nebenprodukte minimiert wird. Das *touch down*-PCR-Programm mit der Verwendung der Phusion®-Polymerase ist in Tabelle 33 dargestellt.

Tabelle 33. Programm für die *touch down*- PCR mit dem Polymerase-Enzym Phusion®.

Zyklenzahl	Schritt	Dauer	Temperatur
1	initiale Denaturierung	2 min	98°C
	Denaturierung	15 s	98°C
10	Hybridisierung	20 s	Start bei 60°C -1°C/Zyklus
	Elongation	30 s/1000 bp	72°C
	Denaturierung	15 s	98°C
25	Hybridisierung	20 s	50°C
	Elongation	30 s/1000 bp	72°C
1	finale Elongation	5 min	72°C
	Lagerung	∞	22°C

2.2.3.4. DNA-Gelelektrophorese

Um die Größe der DNA-Fragmente nach der PCR oder Restriktion abzuschätzen wurde die Gelelektrophorese verwendet. Dafür wurden 0,7%ige Agarose-Gele gegossen. Die Agarose wurde in TAE (TRIS-Acetate-EDTA) -Puffer (Tabelle 34) unter Erwärmen in der Mikrowelle gelöst und das Ethidiumbromid in der Endkonzentration von 0,005% (v/v) dazugegeben. Das Agarosegel wurde in die Schlittenform gegossen und die Kämme positioniert, um die Taschen für das Beladen mit der Probe zu formen. Nach dem Erstarren wurde das Agarose-Gel in die Elektrophorese-Apparatur, befüllt mit TAE-Puffer als Laufpuffer, platziert. Vor dem Beladen des Gels wurde zu den Proben DNA-Ladepuffer, falls es nicht in dem Reaktionspuffer schon enthalten war, dazugegeben. Als Größenmarker wurde der GeneRuler 1 kb DNA-Größenmarker (Invitrogen) verwendet (Abbildung 17). Die Agarosegel-Elektrophorese wurde bei 100 V elektrischer Spannung etwa 30 min lang durchgeführt, bis die Lauffront des DNA-Ladepuffers kurz vor dem Ende des Agarosegels gelaufen war.

Tabelle 34. TAE-Puffer für die Agarosegel-Elektrophorese, 50fach konzentriert.

Komponente	Konzentration
TRIS	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA-Natriumsalz	50 mM

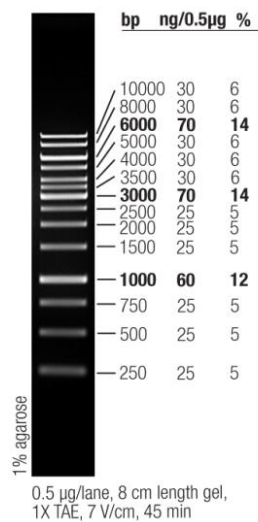


Abbildung 17. GeneRuler 1 kb DNA-Größenmarker von Invitrogen.

2.2.3.5. Aufkonzentrierung und Aufreinigung der DNA aus dem PCR-Ansatz

Um die DNA aus einer Lösung aufzureinigen und aufzukonzentrieren, wie z.B. bei einem PCR-Produkt, wurde zu der Lösung Natriumchlorid in der Endkonzentration von 200 mM und 2,5faches Volumen von 100%igem Ethanol dazugegeben und kräftig gemischt, wodurch die DNA ausfällt. Die Probe wurde bei 14.000 g 30 min lang zentrifugiert und anschließend das DNA-Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen (14.000 g, 10 min). Das Pellet wurde in dem Zentrifugalverdampfer getrocknet und in TE-Puffer (Tabelle 30) resuspendiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.3.6. Restriktion der DNA

Durch die Restriktion der DNA-Fragmente z.B. eines PCR-Produktes oder eines Plasmides werden die DNA-Fragmente für die anschließende Ligation und Klonierung vorbereitet, bzw. kann man die ersten Indizien zur Richtigkeit bzw. Identifikation der DNA-Sequenz gewinnen. In der Tabelle 35 ist das Pipettierschema eines typischen Restriktion-Ansatzes dargestellt. Der Restriktionsansatz wurde bei 37°C 1 h lang inkubiert und anschließend inaktiviert (Temperatur und Inkubationszeit sind Restriktionsenzym-spezifisch).

Tabelle 35. Zusammensetzung eines typischen DNA-Restriktion-Ansatzes mit 20 µl Volumen.

Bestandteil	Menge
DNA	0,2-1 µg
Restriktionsenzym	1 µl
Reaktionspuffer, 10fach	2 µl
Endvolumen (mit reinst Wasser auffüllen)	20 µl

2.2.3.7. *Ligation eines DNA-Fragments in einem Vektor*

Durch die Ligation werden der Vektor und das Insertionsstück mit den komplementären Überhängen mit Hilfe des Enzyms Ligase zusammengefügt. Die Pipettierschema eines typischen Ligation-Ansatzes ist in Tabelle 36 dargestellt. Es wurde die T4 DNA Ligase aus dem Bakteriophagen T4 verwendet. Der Ligation-Ansatz wurde bei Raumtemperatur 1 h lang inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Enzym bei 65°C für 10 min inaktiviert. Für die Transformation wurden 2 µl des Ligation-Ansatzes verwendet.

Tabelle 36. Zusammensetzung eines Ligation-Ansatzes.

Komponente	Menge
linearisierter Vektor	0,1 µg
DNA-Insert	5fache molare Menge des Vektors
Reaktionspuffer, 10fach	2 µl
T4 DNA Ligase	0,5 µl
End-Volumen (auffüllen mit reinst Wasser)	20 µl

2.2.3.8. *Gibson-Assemblierung*

Die Gibson-Assemblierung ist eine Klonierungsmethode, bei der mehrere DNA-Fragmente und Plasmid-Rückgrat in einem Reaktionsansatz isothermal zusammengebaut werden (Gibson et al., 2009; Gibson, 2011). Dafür erzeugt man bei der PCR mittels Primer verschiedene DNA-Fragmente mit den sequenzidentischen Überhängen, die zu einem Plasmid zusammengebaut werden müssen. In dem Reaktionsansatz werden zuerst durch die Exonuklease die 5'-Enden des DNA-Strangs verdaut, wodurch die *sticky ends* entstehen. Die sequenzidentischen Überhänge der DNA-Fragmente lagern sich aneinander an und durch die Polymerase werden die fehlenden Nukleotide aufgefüllt. Anschließend verbindet die DNA-Ligase den DNA-Strang durch die Phosphodiester-Bindung.

Als erstes wurden die Oligonukleotide entworfen, die mit 25 Basen am 5'- bzw. 3'-Ende des gewünschten DNA-Abschnitts binden und zusätzlich 15 Basen lange Überhänge erzeugen, die sequenzidentisch zu den flankierenden Sequenzen in dem entworfenen Plasmid sind. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt (s. Kap. 2.2.3.5 Aufkonzentrierung und Aufreinigung der DNA aus dem PCR-Ansatz) und die Konzentration mittels Nanophotometer bestimmt.

2. Material und Methoden

Die Zusammensetzung des Master-Mixes für die Gibson-Assemblierung ist in Tabelle 37, und das Pipettierschema für den 5fach konzentrierten Reaktionspuffer in Tabelle 38 dargestellt. Der Master-Mix wurde in 200 µl Reaktionsgefäßen mit je 7,5 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die DNA-Fragmente wurden in dem End-Volumen von 2,5 µl zusammengemischt und zu den 7,5 µl Master-Mix dazugegeben. Dabei wurden 12 ng/1.000 bp von dem Plasmid-Rückgrat verwendet und die Insert-Fragmente in der 5fach molaren Konzentration eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 50°C inkubiert. Für die Transformation der kompetenten *E. coli* wurde 2 µl des Reaktionsansatzes verwendet.

Tabelle 37. Zusammensetzung des Master-Mixes für die Gibson-Assemblierung.

Komponente	Menge
Reaktionspuffer, 5fach	320 µl
T5-Exonuklease (10 U/µl)	0,64 µl
Phusion® DNA-Polymerase (2 U/µl)	20 µl
Taq Ligase (40 U/µl)	160 µl
End-Volumen (auffüllen mit reinst Wasser)	1,2 ml

Tabelle 38. Zusammensetzung des 5fach konzentrierten Reaktionspuffers für die Gibson-Assemblierung.

Komponente	Endkonzentration bei der Reaktion	Menge für 6 ml
PEG-8000	25% (w/v)	1,5 g
TRIS	500 mM	3 ml von 1 M
Magnesiumchlorid	50 mM	150 µl von 2 M
DTT	50 mM	300 µl von 1 M
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	je 1 mM	je 60 µl von 100 mM
NAD	5 mM	300 µl von 100 mM
pH-Wert (Salzsäure)	7,5	7,5

2.2.3.9. Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*

Die *E. coli* besitzen keine natürliche Kompetenz, das heißt, sie nehmen keine fremde DNA wie z.B. Plasmide auf. Um *E. coli* transformieren zu können, werden die Bakterien mit Rubidiumchlorid-Lösung gewaschen, wodurch die Kompetenz chemisch verliehen wird (Hanahan, 1983; Hanahan et al., 1991).

Eine frische Übernachtskultur von *E. coli* wurde 1 zu 100 in 100 ml Nährmedium verdünnt und in einem 1 l Kolben bis zu OD₆₀₀=0,7 wachsen gelassen. Die Bakterienkultur wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und 15 min in einem Eis-Wasser-Bad inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 15 min bei 4.000 g und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Die Bakterienpellets wurden in je 10 ml der eiskalten TFB I-Lösung (engl. *transformation buffer*) (Tabelle 39) resuspendiert, in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min in einem Eis-Wasser-Bad

inkubiert. Die Bakterien wurden 15 min bei 4.000 g und 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 2 ml/Röhrchen von der eiskalten TFB II-Lösung (Tabelle 39) resuspendiert. Die Bakterien-Suspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu je 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die chemisch kompetenten *E. coli* wurden bei -80°C gelagert.

Tabelle 39. Zusammensetzung der TFB I- und der TFB II-Lösung zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* (Rubidiumchlorid-Methode).

Lösung	Komponente	Konzentration
TFB I	Kaliumacetat	30 mM
	Manganchlorid-	50 mM
	Rubidiumchlorid	100 mM
	Calciumchlorid	10 mM
	Glycerin	15% (v/v)
	pH-Wert (Salzsäure)	5,8
TFB II	MOPS	10 mM
	Calciumchlorid	75 mM
	Rubidiumchlorid	10 mM
	Glycerin	15% (v/v)
	pH-Wert (Natriumhydroxid)	7,0

2.2.3.10. Transformation von *E. coli* mit Hitze-Schock-Methode

Die chemisch kompetenten *E. coli* wurden durch die Hitze-Schock-Methode transformiert. Dafür wurden die Aliquots in einem Eis-Wasser-Bad aufgetaut und 2 µl von einem Plasmid, einem Ligations- oder von einem Gibson-Assemblierung-Ansatz zu den Bakterien pipettiert. Die Proben wurden 30 min im Eis-Wasser-Bad und anschließend 90 s bei 42°C inkubiert. Anschließend wurden sie sofort in dem Eis-Wasser-Bad heruntergekühlt. 900 µl Nährmedium wurden zu den Bakterien gegeben und diese Kultur anschließend 1 h bei 37°C in einem Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurde 100 µl Bakterienkultur auf eine Antibiotika-haltige Agarplatte ausplattiert. Der Rest der Bakterienkultur wurde 5 min bei 4.000 g pelletiert und ebenfalls auf einer Antibiotika-haltigen Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert (s. Tabelle 12. Verwendete und hergestellte Plasmide, Tabelle 14. Verwendete Bakterien-Stämme der Sicherheitsstufe S1, Tabelle 27. Arbeits- und Stocklösung-Konzentrationen der verwendeten Antibiotika.) In Abhängigkeit von der Transformationseffizienz wurden die einzelnen Kolonien von dem 100 µl Ansatz (bei hoher Effizienz) bzw. von der Platte mit der restlichen Bakterienkultur (bei geringer Effizienz) verwendet.

2.2.3.11. Herstellung von elektro-kompetenten *Pseudomonaden*

Die elektro-kompetenten *Pseudomonaden* wurden nach den Protokollen von Ausubel et al. (1987) und Miller & Nickoloff (1995) hergestellt. Die frische Übernachtskultur der *Pseudomonaden*

wurde 1 zu 100 in 100 ml King's B-Medium verdünnt und bis zu $OD_{600}=0,7$ bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurden in einem Eis-Wasser-Bad 10 min gekühlt und in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Bakterien wurden 10 min bei 4.000 g und 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und die Bakterienpellets in 10 ml eiskalter 1%en Natriumchlorid-Lösung resuspendiert und pelletiert (s.o.). Anschließend wurden die Bakterienpellets fünfmal in 20 ml eiskaltem _{reinst} Wasser und einmal in 25 ml eiskaltem 10%igen Glycerin gewaschen (s.o.). Das Bakterienpellet wurde in 300 µl eiskaltem 10%igen Glycerin resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu je 50 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden im flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3.12. *Transformation von Pseudomonaden durch die Elektroporation*

Die Transformation wurde nach den Protokollen von Ausubel et al. (1987) und Miller & Nickoloff (1995) durchgeführt. Die Bakterien wurden in einem Eis-Wasser-Bad aufgetaut. Die Elektroporationsküvetten mit einer Spaltgröße von 2 mm wurden in einem Eis-Wasser-Bad 10 min lang gekühlt. Zu 50 µl Bakterien-Aliquot wurde die zu transformierende Plasmid-DNA pipettiert, vorsichtig gemischt und 5 min in Eis-Wasser-Bad inkubiert. Für die Transformation wurde 2 µl Gibson-Assemblierung-Ansatz bzw. 1 µl Plasmid-Präparation (3,5 µg/µl) verwendet. Die Bakterien wurden vorsichtig in die Elektroporationsküvette überführt. Der Elektropuls wurde durch das Elektroporationsgerät MicroPulser™ (BioRad) mit dem Programm „Ec2“ durchgeführt. Anschließend wurden 900 µl King's B-Medium zu den Bakterien gegeben und der Transformationsansatz ins 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden 3 h bei 28°C und 300 rpm im Tisch-Thermoschüttler inkubiert und anschließend 3 min lang bei 4.000 g pelletiert, in 50 µl King's B-Medium resuspendiert und auf einer Antibiotika-haltige King's B-Agarplatte zur Selektion der Transformanten ausplattiert (s. Tabelle 12. Verwendete und hergestellte Plasmide, Tabelle 14. Verwendete Bakterien-Stämme der Sicherheitsstufe S1 und Tabelle 27. Arbeits- und Stocklösung-Konzentrationen der verwendeten Antibiotika).

2.2.3.13. *Transformation von Pseudomonaden durch triparentales Mating*

Das triparentale Mating ist eine Methode der Transformation, die auf der bakteriellen Konjugation basiert. Dabei wird das Plasmid von einem Donor-Stamm zu einem Empfänger-Stamm in Anwesenheit von einem Helfer-Stamm, der die notwendigen Gene für die Konjugation auf einem Plasmid enthält, übertragen. In dieser Arbeit wurden *Pf0-1* und *PfAR-1* mit den Plasmiden pEMG-TS1_{*Pf0-1*}-*gyrA*_{*PfAR-1*}-TS2_{*Pf0-1*} bzw. pEMG-TS1_{*PfAR-1*}-*gyrA*_{*Pf0-1*}-TS2_{*PfAR-1*} transformiert. Dabei wurden die Plasmide aus dem *E. coli* DH5α λpir in *Pf0-1* bzw. *PfAR-1* mit Hilfe von *E. coli* HB101-pRK2013 übertragen.

Dafür wurden die drei frisch kultivierten Bakterien-Stämme mit einer Impföse auf eine LB-Agarplatte (ohne Antibiotika-Zusatz) übertragen und auf etwa 1 cm²-großen Fläche untereinander gemischt. Die Platten wurden über Nacht bei 28°C inkubiert. Anschließend wurde zur Selektion der

transformierten *Pseudomonaden* eine Antibiotika-haltige Cetrimid-Agar-Platte verwendet (s. Tabelle 12. Verwendete und hergestellte Plasmide, Tabelle 14. Verwendete Bakterien-Stämme der Sicherheitsstufe S1, Tabelle 21. Cetrimid-Nährmedium zur Selektion der *Pseudomonaden*, und Tabelle 27. Arbeits- und Stocklösung-Konzentrationen der verwendeten Antibiotika).

2.2.3.14. Methode zur Herstellung von *Pseudomonas*-Mutanten mittels des pEMG-knock out -Systems

Die Methode zur gezielten Erzeugung von *knock out*-Mutanten in *Pseudomonas putida* mit Hilfe des pEMG-Plasmids wurde von Martínez-García und de Lorenzo (2011) veröffentlicht. In dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um *gyrA*-Gene zwischen *Pf0*-1 und *PfAR*-1 auszutauschen (Abbildung 18). Das Funktionsprinzip beruht auf der Fähigkeit der Bakterien zur homologen Rekombination. Das Plasmid pEMG enthält das fremde *gyrA*-Gen, das mit jeweils 400 bp langen Sequenzen TS1 und TS2 (engl. *targeted sequences*) des Zielorganismus flankiert ist. In dem ersten Schritt wird das gesamte pEMG-Plasmid in das Genom vor oder nach dem eigenen *gyrA*-Gen rekombiniert. Bei dieser Zwischenstufe enthält das bakterielle Genom sowohl ein eigenes als auch ein fremdes *gyrA*-Gen. Die TS1-*gyrA*-TS2-Sequenz ist in dem pEMG-Plasmid zwischen den Schnittstellen des Restriktionsenzym I-SceI kloniert. Das heißt, dass es bei der Anwesenheit von I-SceI zum Doppelstrangbruch der genomischen DNA führt. Um das zu initiieren wurde das Bakterium mit dem pSW-2-Plasmid, das die Gen-Sequenz für I-SceI enthält, transformiert. Der DNA-Bruch wird mit Hilfe der homologen Rekombination repariert. Dies kann durch die Rekombination über TS1 oder TS2 erfolgen, dabei wird das gesamte pEMG-Plasmid mit einem *gyrA*-Gen heraus rekombiniert. Die Wahrscheinlichkeit beträgt 50%, dass das fremde *gyrA*-Gen im Genom bleibt. Die erfolgreiche Rekombination wird durch den Verlust der Kanamycin-Resistenz, die auf dem Plasmid kodiert ist, detektiert. Durch die spezifische Restriktionsreaktion wurde im nächsten Schritt das Verbleiben vom Original *gyrA*-Gen oder das Vorhandensein des fremden Gens festgestellt. Bei der veröffentlichten Methode wurden nur die TS1- und TS2-Sequenzen auf dem pEMG-Plasmid kloniert, sodass im letzten Schritt entweder wieder Wildtyp oder die *knock out*-Mutante entstehen.

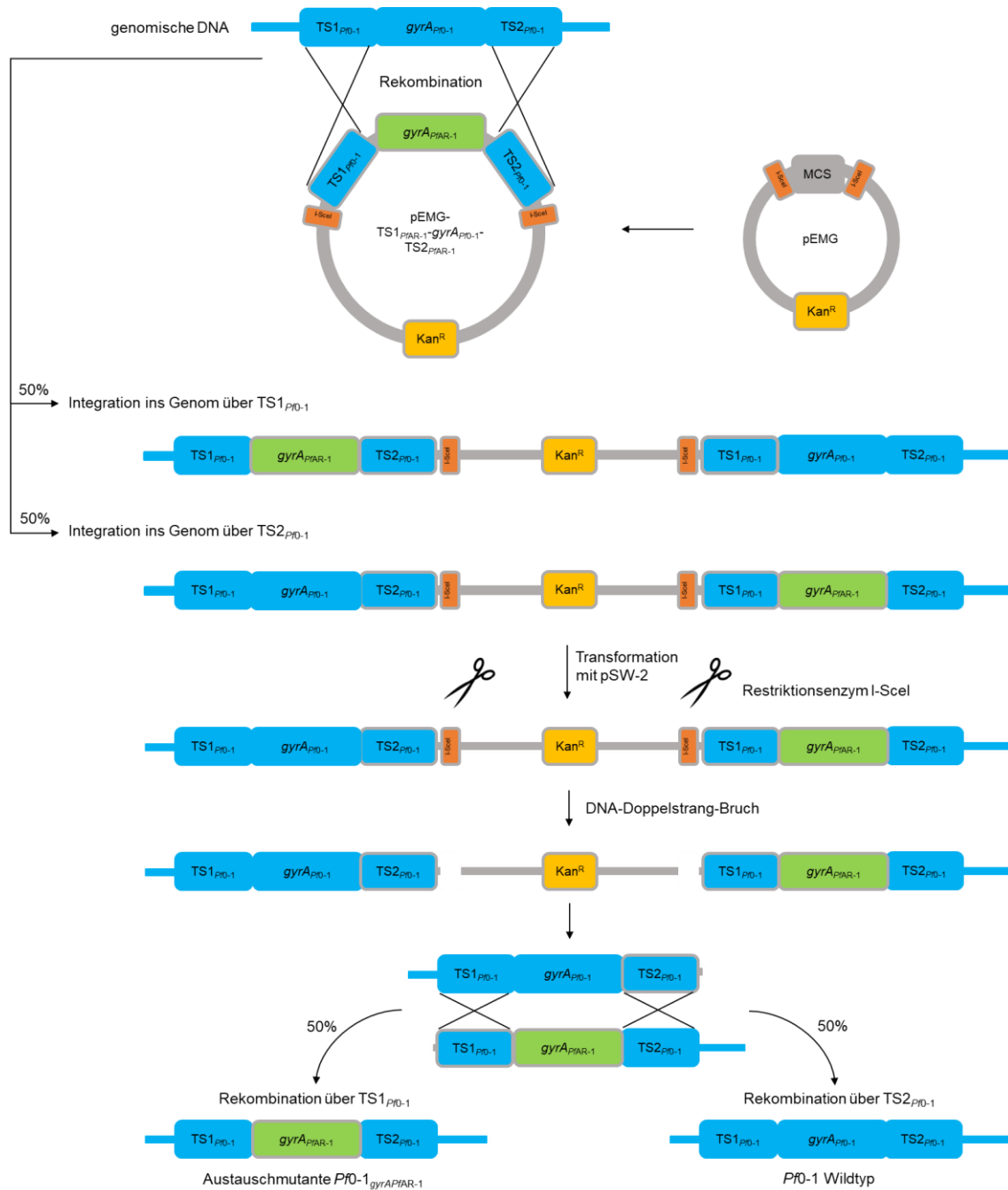


Abbildung 18. Erzeugung der *gyrA*-Austausch-Mutanten bei *Pseudomonas fluorescens* (auf dem Beispiel von $Pf0-1_{gyrAPIAR-1}$) mit Hilfe der modifizierten pEMG-knock out-Methode (nach Martinez-Garcia & de Lorenzo, 2011 und Hübbers, 2015).

Als Erstes wurden die pEMG-Plasmide für die Transformation von $Pf0-1$ und $PfAR-1$ entworfen (s. Plasmid-Karten in Abbildung 10 und Abbildung 11, S. 58). Die Fragmente des Plasmids wurden mit der PCR amplifiziert, mittels Gibson-Assemblierung kloniert und in chemisch kompetenten *E. coli* DH5 α λ pir mit der Hitze-Schock-Methode transformiert (s. Kap. 2.2.3.9 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli* und 2.2.3.10 Transformation von *E. coli* mit Hitze-Schock-Methode). Die bei der PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 40 dargestellt.

Tabelle 40. PCR-Produkte und die verwendeten Oligonukleotide, die durch die Gibson-Assemblierung zu den pEMG-Plasmiden pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} bzw. pEMG-TS1_{PfAR-1}-*gyrA*_{Pf0-1}-TS2_{PfAR-1} zusammengesetzt wurden.

Fragment-Name	Oligonukleotid-Nummer ¹	Produktgröße (bp)
pEMG	7 und 8	3.168
TS1 _{Pf0-1}	9 und 16	432
<i>gyrA</i> _{Pf0-1}	12 und 17	2.696
TS2 _{Pf0-1}	13 und 19	432
TS1 _{PfAR-1}	10 und 18	432
<i>gyrA</i> _{PfAR-1}	14 und 15	2.807
TS2 _{PfAR-1}	11 und 20	432

¹ s. Tabelle 13. Verwendete Oligonukleotide.

Im nächsten Schritt wurden die *Pf0-1* bzw. *PfAR-1* mit den Plasmiden pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} bzw. pEMG-TS1_{PfAR-1}-*gyrA*_{Pf0-1}-TS2_{PfAR-1} durch das triparentale Mating transformiert (s. Kap. 2.2.3.13 Transformation von Pseudomonaden durch triparentales Mating). Danach wurden *Pf0-1* mit dem im Genom integrierten pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} und *PfAR-1* mit dem im Genom integrierten pEMG-TS1_{PfAR-1}-*gyrA*_{Pf0-1}-TS2_{PfAR-1} elektro-kompetent gemacht und mit dem Plasmid pSW-2, das für das Restriktionsenzym I-SceI kodiert, durch die Elektroporation transformiert. Die Expression des Enzyms wurde durch die Zugabe von 3-Methylbenzoat in der Endkonzentration von 15 mM induziert. Im Folgenden wurden die mit dem Plasmid pSW-2 transformierten Bakterien auf den Verlust der Kanamycin-Resistenz untersucht, indem die einzelnen Kolonien parallel auf eine Kanamycin-haltige und eine LB-Agarplatte ohne Antibiotika-Zusatz ausplattiert wurden. Anschließend wurde durch den spezifischen Restriktionsverdau mit BamHI, dessen Schnittstelle in *gyrA* von *Pf0-1* vorhanden ist, und mit KpnI oder PvuI, dessen Schnittstellen nur in *gyrA* von *PfAR-1* vorhanden sind, *gyrA*-Austausch-Mutanten bzw. Wildtyp-Bakterien identifiziert.

2.2.3.15. Klonieren der Biofilm-Reporter-Plasmide pJP2-aprA::gusA

In Rahmen der Bachelor-Arbeit von Nadja von Salzen (2016) wurden die *Pseudomonas*-spezifischen Biofilm-Reporter-Plasmide pJP2-*aprA*::*gusA* für *Pf0-1* und *PfAR-1* kloniert. Das Enzym β -Glucuronidase wurde unter den Promoter des Enzyms alkalische Metalloprotease, das bei der Ausbildung des Biofilms exprimiert wird, kloniert (Liu et al., 2007). Bei der Ausbildung des bakteriellen Biofilms wird das Enzym β -Glucuronidase exprimiert, die 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure (X-Gluc) zu Glucuronsäure und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. Die Oxidation des Indol-Derivats durch Luftsauerstoff führt zur Färbung der Bakterien, wodurch die Ausbildung des Biofilms detektiert werden kann.

Als Promoter-Bereich des Gens alkalische Protease wurde die *upstream* DNA-Sequenz vor dem Start-Codon des Gens *aprA* in *Pf0-1* und *PfAR-1* durch den Vergleich mit dem publizierten Promotor-Bereich in dem *Pseudomonas fluorescens* 395 Stamm ausgesucht (Liu et al., 2007, Abbildung 19). Liu et al. hatten die 527 bp lange DNA-Sequenz inklusive erste 13 bp des Gens *aprX*

in den Reporter-Plasmid kloniert. Durch den Vergleich dieser Sequenz mit den Sequenzen von *Pf0-1* und *PfAR-1* wurde ein kürzerer konservierter DNA-Abschnitt ausgesucht. Bei *Pf0-1* wurde die 134 bp und bei *PfAR-1* 144 bp lange Sequenz bei der Klonierung des Reporter-Plasmides verwendet.

<i>Pf395</i>	-----GATTTCGGTGGAGGAGCGATCATCAATGCC	31
<i>Pf0-1</i>	-----CCCGCGGATCAAGAACGACACCAAGGTGTATCCGAGCCCGGAAATGATGGG	51
<i>PfAR-1</i>	GTGTGGCTGCCCTCACCCAGCCCTCTCCC-GAGGGAGAGGAGCCGATCTGCTTTGGC	59
	* * * * *	
<i>Pf395</i>	ATT-CTGGCAGGTGAAGACATGACCACTCAAGACGGCGTCAAGGTGCGGGC--CTGGCT	88
<i>Pf0-1</i>	CAAGCTGTTTCGCACTGGAAGCGATGCCGCTGAA---CATCGACCGGATCCGACGCGGGT	108
<i>PfAR-1</i>	TTTGAAGATCGGTACGACTCGGTATCCAGGTGCGGTAGATCTACATCCACTCGGT	119
	* * * * *	
<i>Pf395</i>	GGCGAAACCTCTTTGGCAGCCATGCAACAGTGTGGCTGGAGTATGTCCCAGTAATGGGGG	148
<i>Pf0-1</i>	GTGGAAACAAGATTCGTACTGGCAGCTGAAGAAAAAC---AGGCAGGGGC-----GGCA	158
<i>PfAR-1</i>	CA-----GTTCCCTCTCCCTCCGGGAGAGGGTT---AGGGTGAGGGGCTTTTGGGC	168
	* * * * *	
<i>Pf395</i>	ACAGCGCACT-TTAATAGTGCGAATAGTGGCTCTTTAATGTTGCTAATGACACCGTGACA	207
<i>Pf0-1</i>	CCACAGCCTTCGCTGATTATGTTCTGTCGGAATTACTTGATATCA---ATACACTGGCA	215
<i>PfAR-1</i>	ATGACGCGCTTTCAGGTATGACCGCAATATTACTTGATATCA---ATCCAA-----	220
	* * * * *	
<i>Pf395</i>	ATATATTGGATCCATTAAATCAAGTGGGC--CGCTCACTTAGAGTGGCTTACTTGTAT	265
<i>Pf0-1</i>	-TCGCATGTATAAGTGCAGCAAGTGAGACGTTGCTAACAAAAACAATTACCGATAT	274
<i>PfAR-1</i>	-----TATCGCGCACCGCAAGTGGACACACCTAACAAAATTCAACTTACCGATAT	274
	* * * * *	
<i>Pf395</i>	TTAATATTTAAATAGTGGTG--TGCGCAATTCGGCCACAAACGCAACGGCCCCCAAT	323
<i>Pf0-1</i>	TTAATATTTAAATAAGAAATCGTCAGACAAATTAGGCAAGGCTCAACAA-ACITACAACATT	333
<i>PfAR-1</i>	TTAATATTTAAATAGAAATCGTCAGACAAATTTCGATTCCCTGGCAACTTCAACAAT	334
	* * * * *	
<i>Pf395</i>	TAAACA-CTGCGTGCGACT---TCTTCAACTTGAACCTGCGTCAAGTGTGCGATGGA	378
<i>Pf0-1</i>	CTTTCGGCGGCACGCGCTTTGTTTACGGGAGTTTCCCGGAACAGTTCAACTTGATCTCA	393
<i>PfAR-1</i>	CTTCAACCTTCGCGCGCAATGTTTCGGGCTGTTTTCGAGCGTTCTA AACCCAATA	394
	* * * * *	
<i>Pf395</i>	AATAG ATGTAGA CGAAAGATTTC AGTGTGTCAGTTTCTTA CGCCTTCAAAAGAGGTG	438
<i>Pf0-1</i>	AAAAACGCTAGACGTAGATTTCAAATTGTGTGTCAGTTTCTTA CGCCTTCAATGGGCGA	452
<i>PfAR-1</i>	AAAAATCCTTTACGCAACATTTCCAATTGTGTGTCAGTTTCTTA CGCCTTCAATGGGCGA	453
	* * * * *	
<i>Pf395</i>	AGTGATAGGACTATCCTCGCCGCGAGGTTCTATCGAACAAAGACTGATGCATTGCAA	498
<i>Pf0-1</i>	-GTGATAGGACAATCTCGCCAGAGGTTGTGCTATCGGACAAAACCTGTTCATTGCTAA	511
<i>PfAR-1</i>	-GTGATAGGACGATCTCGCCAGGATCGTC-CTATCGGACAAAACCTGTTCATTGCTTA	511
	* * * * *	
<i>Pf395</i>	ACAAGGAAGTACGTTTATGTCAAAGCTT	527
<i>Pf0-1</i>	ACAAGGAAGTGTGTTT -----	527
<i>PfAR-1</i>	ACAAGGAAGTGTGTTT -----	527
	* * * * *	

Abbildung 19. *Upstream*-DNA-Sequenz, die von Liu et al. (2007) als Promoter-Bereich des Gens alkalische Metalloprotease *aprX* aus dem *Pseudomonas fluorescens* 395 Stamm verwendet wurde, und die entsprechende *upstream* Sequenzen des Gens *aprA* aus *Pf0-1* und *PfAR-1*. Als Promoter Bereich wurden die konservierten DNA-Abschnitte verwendet (türkis markiert). Grün markiert ist die Anfangssequenz des Gens.

Für die Klonierung wurde das Plasmid pJP2 mit dem Restriktionsenzym XbaI in der Polylinker-Region geschnitten. Der Promoter-Bereich der alkalischen Protease wurde für *Pf0-1* mit den Primern 24 und 29 und für *PfAR-1* mit den Primern 23 und 24 mittels PCR amplifiziert (s. Tabelle 13. Verwendete Oligonukleotide, S. 60). Diese Oligonukleotide besitzen 15 bp lange Sequenzen an den 5'- und 3'-Enden, die homolog zu den mit XbaI-geschnittenen Plasmid-Enden sind. Die aufgereinigten PCR-Produkte und das linearisierte Plasmid wurden mittels Gibson-Assemblierung zu den pJP2-*aprA::gusA*_{*Pf0-1*} und pJP2-*aprA::gusA*_{*PfAR-1*} kloniert und in die chemisch-kompetenten *E. coli* transformiert. Anschließend wurde die Plasmide aus *E. coli* isoliert, mittels PCR die Richtigkeit des Konstruktes überprüft und in *Pf0-1* bzw. *PfAR-1* mittels Elektroporation transformiert.

2.2.4. Methoden der Zellkultur

2.2.4.1. Nährmedien und Kultivierung

Die Nährmedien RPMI-1640 (für NIH/3T3) und DMEM mit 4,5 g/l Glukose und L-Glutamin (für Caco-2, A549 und Beas2B) mit der Zugabe von 10% fetalem Kälberserum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung wurden zur Kultivierung der tierischen/humanen Zelllinien verwendet (s. Kap. 2.1.7.4 Zelllinien).

Die adhärente Zellkultur wurde in den TC-Petrischalen (6 cm Durchmesser) bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxid und 100% Luftfeuchtigkeit in dem Zellkultur-Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden alle vier Tage bei etwa 80% Konfluenz umgesetzt. Dafür wurde das Nährmedium aus der Petrischale vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, 1 ml von 10x Trypsin dazugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die vom Boden der Petrischale abgelösten Zellen vorsichtig in 5 ml Nährmedium durch Pipettieren resuspendiert. 5 ml einer 1:10-Verdünnung wurde in die neuen Schalen überführt.

Zur Durchführung des Suszeptibilität-Tests in den TC-96-Mikrotiter-Platten wurden jeweils 100 µl Zellsuspension pro well aliquotiert und etwa 10 Tage kultiviert. Das Nährmedium (100 µl/well) wurde zweimal pro Woche gewechselt.

2.2.4.2. Herstellung der Zellkultur-Kryostocks

Nach dem Umsetzen der Zellkultur wurde die Zellsuspension vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 300 g 5 min pelletiert. Die Zellen wurden vorsichtig in 90% FBS-10% DMSO mit der Zelldichte $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml resuspendiert und je 1 ml pro Kryoröhrchen bei -20°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Kryostocks in -80°C Gefrierschrank bzw. in den Kryolagerungsgefäßen, gefüllt mit flüssigem Stickstoff, gelagert.

2.2.4.3. Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Allicin in 96-Mikrotiter-Platten

Die Zellen wurden in einer Mikrotiter-Platte kultiviert, eine Stunde lang dem Allicin-Stress ausgesetzt und anschließend 23 h zur Regeneration inkubiert. Anschließend wurde die mittlere effektive Konzentration (EK₅₀) mittels MTT-Vitalitätstest ermittelt.

Zellen wurden in einer TC-96-Mikrotiter-Platte zur Durchführung des Tests angezogen. Das Nährmedium wurde vorsichtig durch Pipettieren entfernt und durch Allicin-haltiges Nährmedium ersetzt. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Nährmedium inkubiert. Die Allicin-Konzentrationen zwischen 78 µM und 2,5 mM (in 2ⁿ-Verdünnung) wurden getestet. Als zusätzliche Behandlung wurde die Hälfte der Zellen mit dem 1 mM reduzierten Glutathion behandelt. Die Stressbehandlung dauerte 1 h und wurde durch die Zugabe von 100 µl 5 mM Cystein, gelöst in Nährmedium, für die Neutralisation des Allicins beendet. Anschließend wurden die Zellen 23 h für die Regeneration unter Normalbedingungen kultiviert. Die Vitalität der Zellen wurde durch den MTT-Test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) überprüft. Dafür wurde das Medium entfernt und je 50 µl/well 0,5%iges (w/v) MTT, gelöst in Phosphat-gepufferter Salzlösung

(PBS, Tabelle 41), dazu pipettiert und für 3 h bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 100 µl Isopropanol wurden die Zellen gelöst. Die Absorption bei 570 nm (A_{570}) und 630 nm (A_{630}) wurde mit dem Platerader gemessen. Das Verhältnis A_{570}/A_{630} wurde errechnet und die Werte der Kontroll-Behandlung als 100% der Vitalität genommen. Die Allicin-Konzentration, bei der die Vitalität der Zellen 50% erreicht hatten bzw. 50% der Zellen getötet waren, wurde als mittlere effektive Konzentration (EK_{50}) definiert.

Tabelle 41. Zusammensetzung der Phosphat-gepufferten Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) für die Zell-Kultur.

Komponente	Konzentration
Natriumchlorid	6,8 g/l
Kaliumchlorid	0,4 g/l
Natriumdihydrogenphosphat	0,125 g/l
Magnesiumsulfat	0,1 g/l
Calciumchlorid	0,2 g/l
Glucose	1 g/l
Natriumhydrogencarbonat	2,2 g/l
pH-Wert (Salzsäure)	7,4

2.2.5. Bestimmung von Suszeptibilität der Lungenschnitte aus der Ratte gegenüber Allicin

Neben der Untersuchung der Anfälligkeit der Lungenepithelzellkultur wurde die Anfälligkeit des Lungengewebes der Ratte gegenüber Allicin als realitätsnäherer Ansatz untersucht. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit in dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Uniklinik RWTH Aachen (Nadine Ruske, Prof. Christian Martin) durchgeführt. Die Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (ID: 8.87-51.05.20.10.245, 16 April 2013) genehmigt und laut EU-Verordnung 2010/63/EU des Europäischen Parlamentes durchgeführt. Die Methode ist von Rieg et al. 2011 veröffentlicht.

Die Tiere wurden durch die Injektion von Pentobarbital (als Narcoren®, 60 mg/kg) in letaler Dosis eingeschläfert. Nachdem die Tiere keine Reflexe mehr zeigten, wurde das Abdomen geöffnet und die Lunge herausgenommen. Die Lunge wurde durch die Trachea mit 37°C warmer 1,5% (w/v) Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt gefüllt, in eiskaltes PBS eingetaucht und in dem Eis-Wasser-Bad bis zum Erstarren inkubiert. Anschließend wurde die Lunge zuerst in Säulchen mit dem Durchmesser von 1 cm durch ein Korkbohrer ausgestanzt und anschließend in 250 µm dünne Scheibchen (PCLS, engl. *precision-cut lung tissue slices*) mittels eines Gewebe-Schneidegeräts (Krumdieck) geschnitten (Abbildung 20). Die Schnitte wurden in einer 24-well-Mikrotiter-Platte (je zwei Schnitte pro well) platziert. Pro Behandlung (auch für Positiv- und Negativkontrolle) wurden zwei wells für ein Tier verwendet, also zwei technische Replikate, und mit Lungenschnitten von drei Ratten, also drei biologische Replikate durchgeführt. Die Positivkontrolle wurde nur mit dem Nährmedium und die Negativkontrolle mit Triton® X100 als Detergenz behandelt.

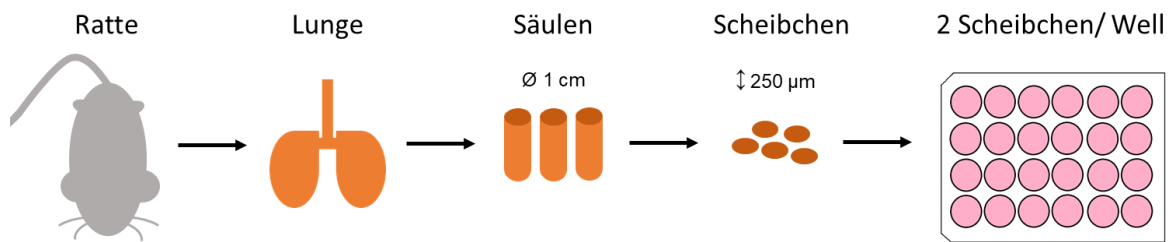


Abbildung 20. Schematische Darstellung der Präparation von 250 µm-dicken Lungenscheibchen aus der Ratte zur Testung der Anfälligkeit der Lungengewebe gegenüber Allicin im Mikrotiter-Format.

Die Schnitte wurden bei 37°C und 100% Feuchtigkeit in MEM (engl. *minimal essential medium*, s. Tabelle 9. Käuflich erworbenen Nährmedien und Zusatzstoffe, S. 55) mit Zusätzen inkubiert (Tabelle 42). Um die Agarose aus den Schnitten auszuwaschen, wurde das Nährmedium die ersten zwei Stunden jede 30 min und die nächsten zwei Stunden jede 60 min gewechselt. Nach diesen Waschschritten waren die Schnitte fertig für die Allicin-Behandlung.

Tabelle 42. Zusammensetzung der Zusatzstoffe für das MEM-Nährmedium zur Inkubation der PCLS.

Zusatzstoffe	Konzentration
Calciumchlorid	1,8 mM
Magnesiumsulfat	0,8 mM
Kaliumchlorid	5,4 mM
Natriumchlorid	116,4 mM
Glukose	16,7 mM
Natriumhydrogenkarbonat	26,1 mM
HEPES	25,17 mM
Natriumpyruvat	1 mM
Glutamin	2 mM
MEM Aminosäure-Lösung, 50fach konzentriert	20 ml/l
MEM Vitamine-Lösung, 100fach konzentriert	10 ml/l

Die Schnitte wurden 1 h lang mit Allicin in folgenden Endkonzentrationen: 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 33 µM, 100 µM, 333 µM und 1 mM (entspricht 16,2 ng/ml, 162,3 ng/ml, 1,6 µg/ml, 5,3 µg/ml, 16,3 µg/ml, 54,0 µg/ml, 162,3 µg/ml) behandelt. Die Allicin-Verdünnungen wurden in dem gebrauchsfertigen MEM-Nährmedium angesetzt. Nach der Behandlung wurden die Schnitte dreimal mit PBS gewaschen, um Allicin zu entfernen, und anschließend 23 h für die Regeneration inkubiert.

Die Viabilität der Zellen in den Lungenschnitten wurde durch den extrazellulären Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität-Assay mit Nährmedium und den WST-1-Test bestimmt.

Die Detektion des Enzyms LDH im MEM-Nährmedium, in dem die Lungenschnitte regeneriert wurden, bedeutet, dass die Zellen durch den Tod die Integrität der Zellmembranen verloren haben. Die Konzentration bzw. Aktivität der LDH in dem Nährmedium ist direkt proportional zu der

Sterberate der Zellen. Durch die Aktivität der LDH wird NAD^+ zu NADH reduziert. NADH wird bei der Reaktion der Umsetzung des gelben Tetrazolium-Salzes in ein blaues Produkt verbraucht.

Der LDH-Aktivitätstest wurde mit einem kommerziellen Test-Kit (Tabelle 10. Käuflich erworbene Kits, S. 56) durchgeführt. Zur Durchführung von 100 Tests wurden 125 μl der Katalyse-Lösung und 5,625 ml der Färbe-Lösung vorsichtig zusammengemischt und unter Lichtausschluss bis zur Verwendung gelagert. In eine neue 96-well-Mikrotiter-Platte wurde 50 μl aus jedem well der 24-well-Mikrotiter-Platte pipettiert und 50 μl der angesetzten Assay-Lösung dazugegeben. Die Assay-Platte wurde 20 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde die Absorbanz bei 490 nm und bei 600 nm als Referenzwellenlänge mit Hilfe des Plateraders gemessen.

WST-1 ist ein Tetrazolium-Salz, das in den metabolisch aktiven lebenden Zellen zu einem farbigen Derivat reduziert wird. Das WST-1-Reagenz wurde 1 zu 10 mit dem Nährmedium verdünnt und davon wurden je 250 μl pro well der 24-well-Mikrotiter-Platte auf die Lungenschnitte vorsichtig pipettiert. Die Test-Platte wurde 1 h bei 37°C, 5% Kohlenstoffdioxid und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte leicht geschüttelt und 100 μl aus jedem well in Duplikaten in eine neue 96-well-Mikrotiterplatte und die Absorption bei 450 nm und der Referenzwellenlänge 600 nm gemessen.

Bei der Auswertung der Ergebnisse der beiden Assays wurden die Absorptionswerte der Positivkontrolle als 100% der Viabilität der Lungenschnitt-Zellen und der Negativkontrolle als 0% determiniert. Die Allicin-Konzentrationen, mit denen die Viabilität auf 50% gesenkt wurde, wurden als EK_{50} definiert.

2.2.6. OxICAT-Methode

Die OxICAT-Methode (engl. *oxidative isotope-coded affinity tag*) wurde von Leichert et al. 2008 publiziert. Dies ist die modifizierte ICAT-Methode (engl. *isotope-coded affinity tag*) zur Untersuchung des Oxidationszustandes der Proteine. Das Funktionsprinzip ist in Abbildung 21 dargestellt. Der ICAT-Marker besteht aus der Iodacetamid-Gruppe, die spezifisch mit reduzierten Thiolen kovalent reagiert, einem Isotopen-Marker aus Kohlenstoff-Kette mit 9 leichten ^{12}C - bzw. 9 schweren ^{13}C -Atomen, und dem Biotin-Tag für die Aufreinigung der markierten Peptiden. Bei dem Zellaufschluss in Anwesenheit von dem leichten ^{12}C -ICAT werden reduzierte Thiole markiert, anschließend werden die oxidierten Thiole unter reduzierenden Bedingungen durch Zugabe von Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) reduziert und so für die Reaktionen mit dem schweren ^{13}C -ICAT verfügbar gemacht. Im nächsten Schritt werden Proteine tryptisch verdaut und die markierten Peptide durch Affinitätschromatografie aufgereinigt. Die Peptide werden massenspektrometrisch analysiert und der Massen/Ladung-Unterschied von 9 Da/z zwischen dem leichten und schweren ICAT-Marker detektiert. Das Verhältnis der Signalstärke des leicht- und schwer-markierten Peptids gibt das relative Verhältnis von reduzierter und oxidierte Form des Peptids wieder. Auf diese Weise kann man die Verschiebung des Redox-Zustandes verursacht durch die Allicin-Behandlung auswerten bzw. Oxidationsziele des Allicins identifizieren.

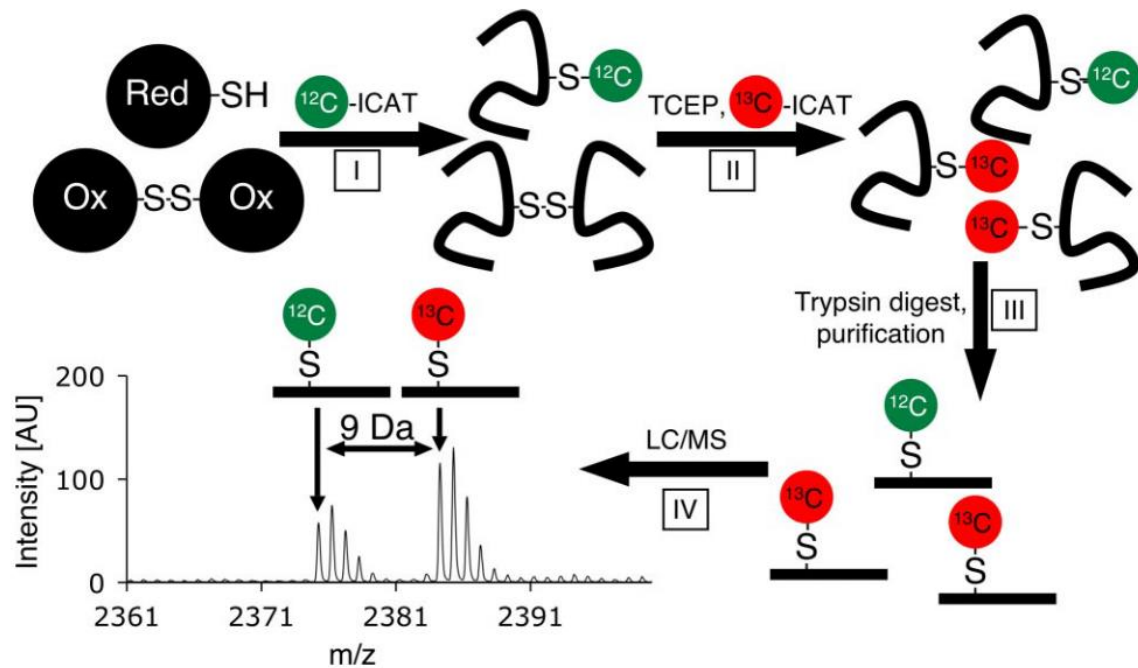


Abbildung 21. Schematische Darstellung der Funktionsweise der OxICAT-Methode zur Analyse des Oxidationszustandes des Proteoms (Leichert et al., 2008). Proteine liegen unter normalen Bedingungen vorwiegend in der reduzierten Form vor. Oxidativer Stress führt zur Oxidation der Proteine, z.B. werden die Thiolgruppen der Cysteine oxidiert. Bei dem Zellaufschluss reagiert das leichte ^{12}C -ICAT-Reagenz kovalent mit den reduzierten Thiolgruppen. (II) Im nächsten Schritt werden oxidierte Thiolgruppen durch TCEP reduziert und für die Markierung mit dem schweren ^{13}C -ICAT-Reagenz verfügbar. (III) Anschließend werden die Proteine durch Trypsin verdaut, und die ICAT-markierten Peptide mittels Affinitätschromatografie aufgereinigt. (IV) Die Peptide werden mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Massen/Ladung-Differenz zwischen dem reduzierten und dem oxidierten Peptid beträgt 9 Da/z. Bei der Auswertung werden die relativen Anteile von der reduzierten und der oxidierten Form der Peptide bestimmt.

Das OxICAT-Experiment wurde mit *Pf0-1* und *PfAR-1* jeweils dreimal durchgeführt. Das Experiment wurde im Rahmen meiner Master-Arbeit begonnen und zweimal mit *PfAR-1* durchgeführt (Reiter, 2014). In Rahmen meiner Dissertation wurde das Experiment mit *PfAR-1* ein drittes Mal und drei Experimente mit *Pf0-1* durchgeführt.

2.2.6.1. Behandlung der Bakterienkulturen mit Allicin für die anschließende OxICAT-Analyse

Eine bakterielle Übernachtskultur wurde von einer frischen Agarplatte angeimpft. Die Übernachtskultur wurde bis zu $\text{OD}_{600}=0,05$ in 60 ml King's B-Medium verdünnt und bis zur $\text{OD}_{600}=0,4$ bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Die Kultur wurde auf zwei Kolben mit jeweils 25 ml aufgeteilt. Bei der Allicin-Behandlung wurde Allicin in der Endkonzentration von 0,5 mM dazugegeben und 15 min bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Als Kontrolle wurde das gleiche Volumen an sterilem _{reinst} Wasser dazugegeben. Nach der Behandlung wurden die Kolben auf Eis abgekühlt und jeweils 2,5 ml Bakterienkultur bei 4°C und $4.000\times g$ 2 min lang pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml eiskaltem 2fach konzentrierten PBS (Tabelle 43) gewaschen. Dafür wurden die Bakterienpellets vorsichtig resuspendiert und 2 min lang bei 4°C und $4.000\times g$ zentrifugiert. Vor

der Verwendung wurde PBS mit Stickstoff begast, das Gefäß dicht verschlossen und 5 min in einem Ultraschallbad behandelt. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt, um den Sauerstoff aus der Lösung zu entfernen und damit die Oxidation der Proteine in diesem Arbeitsschritt zu verhindern.

Tabelle 43. Zusammensetzung der 2fach konzentrierten Phosphat-gepufferten Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) für Bakterienkultur.

Komponente	Konzentration
Natriumchlorid (NaCl)	274 mM
Kaliumchlorid (KCl)	5,4 mM
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	20 mM
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	3,6 mM
pH-Wert (Salzsäure)	7,4

2.2.6.2. OxICAT-Markierung

Im ersten Schritt wurden die reduzierten Thiol-Gruppen der Proteine mit dem isotopisch leichten C¹²-ICAT-Reagenz markiert. Es wurden zwei C¹²-ICAT-Reagenzien (für Kontroll-Ansatz und Allicin-Behandlung) vorbereitet. Dafür wurden zu dem Reagenz 20 µl Acetonitril und 80 µl frisch angesetzte DAB-Lösung (Tabelle 44) dazugegeben und gemischt. Die DAB-Lösung wurde vorher wie oben für die PBS-Lösung beschrieben mit Stickstoff behandelt. Pro Bakterienpellet wurden 100 µl C¹²-ICAT-Reagenz zusammen mit 100 µl Glaskügelchen (Durchmesser 0,2 mm) zugegeben. Anschließend wurden die Bakterien durch kräftiges 5 min langes Schütteln und Mischen aufgeschlossen, wobei die Proben mehrmals in einem Eis-Wasser-Bad gekühlt wurden. Anschließend wurden die Proben 2 h lang bei 37°C und 1.300 rpm im Thermoblock inkubiert. Dabei bindet C¹²-ICAT-Reagent kovalent an die reduzierten Cysteine in der Probe. Die Flüssigkeit wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 15 min bei 4°C und 13.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteine wurden durch die Zugabe von 400 µl eiskaltem Aceton und Inkubation bei -20°C über Nacht gefällt. Anschließend wurden die Proben 1 h bei 4°C und 13.000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Tabelle 44. Zusammensetzung der DAB-Lösung (engl. *denaturing alkylation buffer*).

Komponente	Konzentration
Harnstoff	6 M
TRIS	200 mM
EDTA	10 mM
SDS	0,5% (w/v)

Anschließend wurde die zweite Markierung mit dem isotopisch schweren C¹³-ICAT-Reagenz durchgeführt. Dabei wurden die oxidierten Cysteine durch die Behandlung mit TCEP reduziert und

anschließend markiert. Zu den zwei C¹³-ICAT-Reagenzien wurden jeweils 20 µl Acetonitril, 80 µl frisch angesetztes DAB und 2 µl 50 mM TCEP gegeben. Die Proteinpellets wurden in jeweils 100 µl angesetztem C¹³-ICAT-Reagenz vorsichtig gelöst und die Proben 2 h lang bei 37°C und 1.300 rpm im Thermoblock inkubiert. Zu den Proben wurden 400 µl eiskaltes Aceton dazugegeben, und die Proteine 4 h bei -20°C gefällt. Die Proteine wurden durch Zentrifugation bei 4°C und 13.000 g 60 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen.

2.2.6.3. Trypsin-Verdau

Vor der Aufreinigung der Proben wurden die Proteine tryptisch verdaut. Dafür wurde zu den Proben jeweils 80 µl denaturierender Puffer (*denaturing buffer* aus dem ICAT®-Kit, pH 8,5) und 20 µl Acetonitril dazugegeben und die Proteinpellets darin durch Pipettieren gelöst. Das Trypsin (ICAT®-Kit) wurde in 200 µl reinst Wasser gelöst und je 100 µl pro Probe dazugegeben. Der Verdau wurde bei 37°C 15 h im Thermoblock inkubiert.

2.2.6.4. Kationenaustausch- und Affinitätschromatografie

In den nächsten Schritten wurden die mit ICAT-Reagenzien markierten Peptide mittels Kationenaustausch- und anschließend Affinitätschromatografie aufgereinigt.

Die Kationenaustauschsäule wurde in dem Säulenhalter fixiert. An dem Säulen-Eingang wurde die Luer-Lock-Adapter für den Anschluss der Spritzen, mit deren Hilfe die Probe bzw. Laufmittel zugegeben wurden, angebracht. An den Säulen-Ausgang wurde der Ausgangsadapter angebracht. Die Säule wurde mit 2 ml CEB-*Load*-Lösung (engl. *cation exchange buffer*, ICAT®-Kit) äquilibriert. Zu der ersten Probe wurden 4 ml CEB-*Load*-Lösung appliziert, gemischt und auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit 1 ml CEB-*Load*-Lösung gespült. Die Probe wurde mit 500 µl CEB-*Elute*-Lösung (ICAT®-Kit) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert und auf Eis bis zum nächsten Aufreinigungsschritt gelagert. Anschließend wurde die Säule mit 1 ml CEB-*Clean*-Lösung gespült. Danach wurde die Säule mit 2 ml CEB-*Load*-Lösung äquilibriert und die Aufreinigung der zweiten Probe wie oben beschrieben durchgeführt. Nach der letzten Probe wurde die Säule mit 2 ml CEB-*Storage*-Lösung (ICAT®-Kit) gespült und bei 7°C gelagert.

Als nächstes wurde die Avidin-Säule analog zur Kationenaustauscher-Säule aufgebaut. Die Säule wurde mit 2 ml frisch angesetzter AB-*Load*-Lösung (engl. *affinity buffer*, Tabelle 45) äquilibriert. Zu der Probe wurden 500 µl AB-*Load*-Lösung dazugegeben und auf die Säule appliziert. Die Säule wurde nacheinander mit je 1 ml AB-*Wash* 1-, AB-*Wash* 2-Lösung (ICAT®-Kit) und reinst Wasser gespült. Anschließend wurde die Probe mit 800 µl AB-*Elute*-Lösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert, wobei die ersten 50 µl verworfen wurden. Die Säule wurde dann mit 2 ml AB-*Elute*-Lösung gespült und die zweite Probe wie beschrieben aufgereinigt. Nach der letzten Probe wurde die Säule mit je 2 ml AB-*Elute*- und AB-*Storage*-Lösung gespült und die Säule bei 7°C gelagert.

Tabelle 45. Zusammensetzung der AB (engl. *affinity buffer*) -Load-Lösung für Affinitätschromatografie.

Komponente	Menge
Acetonitril	3 ml
reinst Wasser	7 ml
Trifluoressigsäure	40 µl

2.2.6.5. Entfernen des Biotin-Markers

Biotin, ein Bestandteil des ICAT-Markers, der für die spezifische Aufreinigung der markierten Peptide mittels Avidin-Säule notwendig ist, wurde nach der Affinitätschromatografie wieder entfernt. Dadurch wird verhindert, dass bei der Massenspektrometrie-Analyse das Biotin mit den ICAT-markierten Peptiden konkurriert.

Die Proben wurden im Zentrifugalverdampfer eingetrocknet und in je 90 µl Trifluoressigsäure-*Cleavage Buffer* (ICAT®-Kit) (95:5 v/v) gelöst. Die Proben wurden 2 h bei 37°C und 300 rpm im Thermoblock inkubiert und anschließend wieder im Zentrifugalverdampfer eingetrocknet. Das Pellet wurde in 60 µl 1% Trifluoressigsäure resuspendiert und bis zur MS-Analyse bei -80°C gelagert.

2.2.6.6. Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie-Analyse wurde an dem Institut für Biochemie und Pathobiochemie der Ruhr-Universität Bochum (Prof. Lars Leichert) durchgeführt. Die Analyse wurde mit Hilfe einer Nano-Ultrahochdruck-Flüssigchromatografie-Elektrospray-Ionisation-MS/MS-Anlage (Tabelle 4, S. 49) durchgeführt (Wenzel et al., 2013).

2.2.6.7. Datenanalyse

Die Daten der Massenspektrometrie-Analyse wurden mit Computer-Programmen MaxQuant, Excel und Mass++ ausgewertet. Der Auswertungsprozess wurde von Frank Albrecht (2018) entwickelt. Das Flussdiagramm der Datenauswertung ist in Abbildung 22 zusammengefasst.

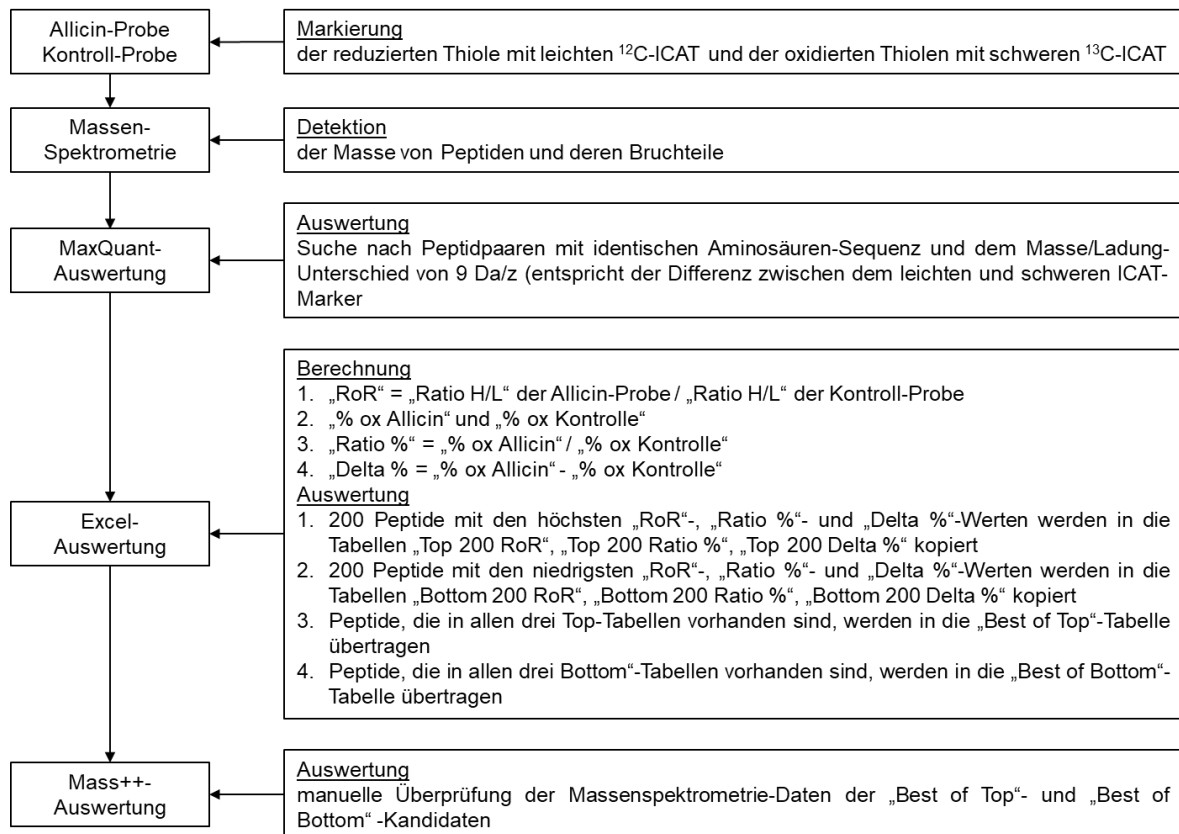


Abbildung 22. Auswertung der OxICAT-Daten nach der Massenspektrometrie. Die MS-Daten wurden mit Hilfe von Computer-Programme MaxQuant, Excel und Mass++ analysiert.

MaxQuant-Auswertung

Die Rohdaten nach der MS-Analyse im „raw“-Format wurden als erstes mit dem Programm MaxQuant (Tabelle 5) analysiert. Dafür wurden die „raw“-Dateien aus der Kontroll- und Allicin-Behandlung in separate Ordner mit den entsprechenden Namen kopiert, in dem Programm geladen und die folgenden Änderungen bei den Standardeinstellungen vorgenommen. Bei den „group-specific parameters“ wurde „ICAT-0“ als leichte Markierung und „ICAT-9“ als schwere Markierung ausgewählt und die verwendete „FASTA“-Datei von Pf0-1 bzw. PfAR-1 unter „MS/MS & sequences“ geladen. Die vorausgewählten „fixed modifications“ wurden abgewählt und bei der Option „identification & quantification“ „discard unmodified counterpart peptides“ ausgewählt. Die Ergebnisse wurden nach der Durchführung der Auswertung in den vorher angelegten Ordner gespeichert.

Excel-Auswertung

Bei der weiterführenden Auswertung wurde Microsoft® Office-Programm Excel verwendet. Die Auswertung wurde von Frank Albrecht mit dem Computer-Programm OpenOffice™ (Apache Software Foundation) entwickelt. Im Rahmen meiner Master-Arbeit wurde die Auswertung fürs Excel-Programm angepasst und modifiziert (Reiter, 2014). Die „evidence.txt“-Dateien, die bei der Auswertung durch MaxQuant entstanden waren, wurden in eine Excel-Tabelle kopiert und das

Tabellenblatt „Rohdaten“ genannt. Die Daten wurden nach Spalten „MS/MS scan number“ und „raw file“ aufsteigend sortiert, dabei liegen die Daten aus der Allicin-Behandlung über den Daten aus der Kontrolle. Anschließend wurde eine neue Spalte „Probe“ eingefügt und in der zweiten Zeile „1“ als Bezeichnung für Allicin-Behandlung reingeschrieben. In den restlichen Zeilen wurde durch die Verwendung der Formel

=WENN(UND(**Probe2=1,MS/MS Scan Number3>=MS/MS Scan Number**
2),1,WENN(**Sequence2<>""**,2,""))

bei den Datenreihen aus der Allicin-Behandlung bei der Spalte „Probe“ „1“ eingetragen, und bei den Daten aus dem Kontrollansatz „2“ eingetragen. In der Formel ist der Spaltenname und Zeilennummer fett hinterlegt (z. Bsp. **Probe2**).

Bei dem zweiten Tabellenblatt „Berechnung“ wurden die Daten aus dem ersten Tabellenblatt ohne Formelbezüge kopiert. Anschließend wurden die Daten aufsteigend nach „Sequence“, „Charge“ und „Intensity“ sortiert. Dabei wurden Peptide mit der gleichen Sequenz und Ladung aus dem Kontroll-Ansatz und aus der Allicin-Behandlung untereinandergelegt. Im nächsten Schritt wurden die „Ratio of Ratios“-Werte (RoR) für die identifizierten Peptide mit der Formel

=WENN(ISTFEHLER(WENN(UND(**Sequence2=Sequence3,Charge2=Charge3,Probe2=**
1,Probe3=2),**RatioH/L2/RatioH/L3**,WENN(UND(**Sequence2=Sequence3,Charge2=Char**
ge3,Probe2=2,Probe3=1),**Ratio H/L3/Ratio H/L2**,"")),""),WENN(UND(**Sequence2=Seque**
nce3,Charge2=Charge3,Probe2=1,Probe3=2,**Ratio H/L2>0,Ratio H/L3>0**),**Ratio H/L2/R**
atio H/L3,WENN(UND(**Sequence2=Sequence3,Charge2=Charge3,Probe2=2,Probe3=1**,
Ratio H/L2>0,Ratio H/L3>0),**Ratio H/L3/Ratio H/L2**,"")))

ausgerechnet. Dabei wird das Verhältnis von „Ratio H/L“ von Allicin-Probe zu Kontroll-Ansatz ausgerechnet, und damit die Verschiebung des Oxidationszustandes des Peptides durch die Allicin-Behandlung. „Ratio H/L“ ist das Verhältnis der Peptidmenge von schwer -markiertem (oxidierten) zu dem leicht -markiertem (reduzierten) Peptid. In dem Fall, dass in einem der Ansätze das Peptid nicht identifiziert wurde, kann der RoR-Wert nicht ausgerechnet werden und die Zeile bleibt leer. Im nächsten Schritt wurde der prozentuelle Anteil des oxidierten Peptids bei der Allicin-Behandlung „% ox Allicin“ und bei dem Kontroll-Ansatz „% ox Kontrolle“ mit den Formeln

=WENN(**Probe2=1**,(100-(100/(**Ratio H/L2+1**))),WENN(**Probe2=2**,(100-
(100/((**Ratio H/L2*RoR2**)+1)))))

und

=WENN(**Probe2=2**,(100-(100/(**Ratio H/L2+1**))),WENN(**Probe2=1**,(100-
(100/((**Ratio H/L2/RoR2**)+1)))))

ausgerechnet. Weitere Parameter, die für die Auswertung verwendet wurden, sind „Ratio %“ und „Delta %“. „Ratio %“ ist das Verhältnis von „% ox Allicin“ zu „% ox Kontrolle“ und wurde mit der Formel

=WENN(ISTFEHLER(**% ox Allicin2/% ox Kontrolle2**),""**,% ox Allicin2/% ox Kontrolle2**)

berechnet. „Delta % ist die Differenz von „% ox Allicin“ und „% ox Kontrolle“ und wurde mit der Formel

=WENN(ISTFEHLER(% ox Allicin2/% ox Kontrolle2),““,WENN(UND(% ox Allicin2>0,% ox Kontrolle2>0),% ox Allicin2-% ox Kontrolle2,0))

berechnet. In der Tabelle wurde eine neue Spalte „Vergleichsscan“ mit der Scannummer des entsprechenden Kontroll- oder Behandlung-Ansatzes eingeführt.

Die Tabelle „Berechnung“ wurde in einem neuen Tabellenblatt „Feste Werte“ ohne Formelbezüge kopiert. Die Werte der Spalten „RoR“, „Ratio %“ und „Delta %“ wurden durch die Funktion „Text in Spalten“ in Text umgewandelt, damit die leeren Zeilen bei dem weiteren Sortieren nicht berücksichtigt werden. Als nächstes wurden die Peptide mit den höchsten bzw. niedrigsten „RoR“- „Ratio %“- und „Delta %“-Wert herausgesucht und die eigenen „Top“- bzw. „Bottom“-Tabellen kopiert. Dafür wurde die Tabelle „Feste Werte“ absteigend nach der Spalte „RoR“ sortiert und die 200 oberen Datensätze in neues Tabellenblatt „Top 200 RoR“ ohne Formelbezüge kopiert. Anschließend wurde die Tabelle „Feste Werte“ aufsteigend nach der Spalte „RoR“ sortiert und die 200 oberen Datensätze in ein neues Tabellenblatt „Bottom 200 RoR“ ohne Formelbezüge kopiert. Analog wurden die Tabellen „Top 200 Ratio %“, „Bottom 200 Ratio %“, „Top 200 Delta %“ und „Bottom 200 Delta %“ erstellt.

Das neue Tabellenblatt „Best of Top“ wurde erstellt und die Peptidsequenzen aus der Tabelle „Top 200 RoR“ kopiert. Anschließend wurden mit der Formel

=SVERWEIS(Sequence2,'Top 200 Ratio %'!\$Spalte\$2:\$Spalte\$201,1,0)

die Peptidsequenzen aus der ersten Spalte in der Tabelle „Top 200 Ratio %“ gesucht und falls gefunden in die zweite Spalte kopiert. Entsprechend wurden die Sequenzen aus der ersten Spalte in der Tabelle „Top 200 Delta %“ mit der Formel

=SVERWEIS(Sequence2,'Top 200 Delta %'!\$Spalte\$2:\$Spalte\$201,1,0)

gesucht und falls gefunden in die dritte Spalte eingetragen. Falls das Peptid in allen drei „Top 200“-Tabellen vorhanden war, wurde in der vierten Spalte mit der Formel

=WENN(UND((Sequence RoR2=Sequence Ratio %2),(Sequence Ratio %2=Sequence Delta %2)), 'Top 200 RoR'!Proteinname2, ””)

der Proteinname eingetragen. Anschließend wurden die weiteren Spalten (MS/MS m/z, charge, mass, MS/MS scan nr, intensity, RoR, % ox Allicin, % ox Kontrolle, ratio %, Delta %, Vergleichsscan-Nummer, Probe) eingeführt. In der nächsten Spalte wurde mit der Formel

=WENN(UND(Sequence RoR2=Sequence Ratio %2,Sequence Ratio %2=Sequence Delta %2,Sequence RoR2<>””),Sequence RoR2,””)

die Peptid-Sequenz und mit der Formel der Protein-Name eingetragen. Analog wurde die Tabelle „Best of Bottom“ erstellt.

Die Auswertung wurde mit Hilfe des Makros durchgeführt. Dafür wurden alle Tabellenblätter erstellt, benannt, die evidence.txt-Dateien eingefügt, die Aufzeichnung des Makros gestartet, die oben beschriebenen Schritte ausgeführt, die Aufnahme des Makros gestoppt und das Makro

gespeichert. Die weiteren Experimente wurden mit den vorbereiteten Tabellen und dem gespeicherten Makro ausgewertet.

Mass++-Auswertung

Die Kandidaten-Proteine aus den Tabellen „Best of Top“ und „Best of Bottom“ wurden mit dem Programm Mass++ überprüft. Mass++ erlaubt die visuelle Analyse der einzelnen Messdaten der Massenspektrometrie-Analyse. Die Spektrum-Daten aus dem Kontroll-Ansatz und der Allicin-Behandlung wurden manuell miteinander verglichen und auf diese Weise die Ergebnisse aus der Analyse mit MaxQuant und Excel überprüft. Bei der Überprüfung wurden die m/z-Diagramme mit den Peaks von leicht- und schwer-markierten Peptiden angeschaut. Der m/z-Abstand zwischen den beiden Peaks soll 9 Da/z (der Massen-Unterschied zwischen den leichten und schweren ICAT-Reagenzien) betragen. Als zweites wurde der m/z-Abstand zwischen den einzelnen Signalen innerhalb eines Peaks überprüft. Ein Peptid-Peak besteht aus mehreren Signalen, die durch die natürliche Variation der Verteilung der C¹²- und C¹³-Atome in den Proteinen beruht, so ergeben sich die m/z-Unterschiede von 1 Da/z. Als Letztes wurde der zeitliche Auftritt einer bestimmten Peptidmasse durch die Verwendung des Massenfilters während der gesamten MS-Analyse kontrolliert. Es wurde überprüft, dass die bestimmte Masse nur einmal während der Analyse auftrat und so die Quantifizierung des Peptids nicht verfälscht wurde.

2.2.7. Methoden zur Untersuchung der DNA-Gyrase-Aktivität

2.2.7.1. *DNA-Gyrase-Aufreinigung aus P. fluorescens Pf0-1 und P. fluorescens PfAR-1*

Die DNA-Gyrase wurde im ersten Schritt durch die Ultrazentrifugation und im zweiten Schritt durch die Affinitätschromatografie mittels Novobiocin-Agarose-Säule aufgereinigt.

Die DNA-Gyrase aus den Pseudomonaden wurde nach der Methode von Benbrook & Miller (1986) aufgereinigt. Als erstes wurden 150 ml bakterielle Übernachtskultur in drei 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation bei 4.000 g und 4°C für 10 min geerntet. Jedes Pellet wurde 2-mal in 50 ml 0,9% eiskalter Natriumchlorid-Lösung resuspendiert und wieder pelletiert (s.o.). Anschließend wurden die drei Pellets durch Resuspendieren in insgesamt 12 ml 10%iger Saccharose-Lösung (gelöst in 50 mM TRIS-HCl, pH-Wert 8,0) gelöst. Für den Zellaufschluss wurde die Suspension bei -80°C eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. 1,2 ml von frisch angesetzter Lysozym-Lösung (2 mg/ml) wurde zu der Probe gegeben und 1 h in dem Eis-Wasser-Bad auf einem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Probe 30 min bei 35.000 g und 4°C zentrifugiert. Zu dem Überstand wurde Magnesiumacetat in der Endkonzentration 5 mM zugegeben, vorsichtig gemischt und 4 h bei 80.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in einem Eis-Wasser-Bad gelagert.

Der DNA-Gyrase-haltige Überstand wurde auf die mit dem Puffer A (Tabelle 46) äquilibrierte Novobiocin-Agarose-Säule (s. Kap. 2.2.1.3 Herstellung der Novobiocin-Agarose-Säule für die DNA-Gyrase-Aufreinigung) gegeben und mit 50 ml Puffer A solange gewaschen, bis die OD₂₈₀ sich nicht

mehr veränderte. Anschließend wurde die DNA-Gyrase mit 5 M Harnstoff, gelöst in Puffer A, eluiert und in 1,5 ml-Fractionen gesammelt. Jede Fraktion wurde bei OD₂₈₀ gemessen und die Fractionen mit den höchsten Werten vereinigt. Bei der Aufreinigung der DNA-Gyrase aus *Pf0*-1 waren das 15 ml bei dem höchsten OD₂₈₀-Wert von 0,1. Bei der Aufreinigung aus *PfAR*-1 waren das 45 ml mit dem höchsten OD₂₈₀-Wert von 0,03.

Tabelle 46. Zusammensetzung des Puffers A für die Säulen-Aufreinigung der DNA-Gyrase.

Komponente	Konzentration
Kaliumchlorid	0,2 M
DTT	5 mM
TRIS	50 mM
Glycerin	10% (w/v)
pH-Wert (Salzsäure)	8,0

Die Probe wurde mit Hilfe eines Zentrifugationsfilters, der die Moleküle größer als 100 kDa zurücklässt, auf 500 µl durch die Zentrifugation bei 4.000 g und 4°C eingengt. Anschließend wurde der Harnstoff aus der DNA-Gyrase-Probe entfernt. Dazu wurden zu 500 µl DNA-Gyrase in dem Zentrifugationsfilter 2 ml von 4 M Harnstoff, gelöst in Puffer A, gegeben und bis zum Endvolumen von 500 µl zentrifugiert (s.o.). Die Waschschrirte wurden mit 3 M, 2 M 1 M Harnstoff und mit Puffer A ohne Harnstoff-Zugabe wiederholt. Am Schluss wurden 5 ml von dem DNA-Gyrase-Lagerungspuffer (Tabelle 47, entspricht der Zusammensetzung des Lagerungspuffers von *E. coli*) auf den Filter gegeben und bis auf ein Endvolumen von 150 µl eingengt (s.o.). Die Protein-Konzentration der aufgereinigten DNA-Gyrase wurde mittels Bradford-Assay bestimmt.

Tabelle 47. Zusammensetzung des DNA-Gyrase-Lagerungspuffers.

Komponente	Konzentration
Kaliumchlorid	50 mM
TRIS	10 mM
EDTA	0,1 mM
DTT	2 mM
Glycerin	50% (w/v)
pH-Wert (Salzsäure)	7,5

2.2.7.2. Bradford-Assay

Das Bradford-Assay wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet (Bradford, 1976). Die Zusammensetzung des Bradford-Reagenz ist in Tabelle 48 dargestellt. Als Proteinstandard wurde Albuminfraktion V verwendet. Dafür wurde eine 1 mg/ml Stammlösung aus einer 10 mg/ml Lösung angesetzt. Es wurde die Verdünnungsreihe mit Proteinkonzentration von 0,5 µg-10 µg/10 µl hergestellt. Der Assay wurde in 96- Mikrotiter-Format durchgeführt. Für die

2. Material und Methoden

Messung wurden 90 µl Bradford-Reagenz und 10 µl Protein-Lösung dazugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei der Wellenlängen 590 nm (A_{590}) und 470 nm (A_{470}) in dem Plattenlese-Gerät bestimmt und der Koeffizient A_{590}/A_{470} berechnet. Die Messung wurde in Triplikaten durchgeführt und der Mittelwert gebildet (Tabelle 49).

Tabelle 48. Zusammensetzung des Bradford-Reagenz.

Komponente	Konzentration
Coomassie-Brillant-Blau G-250	0,1‰ (w/v)
Ethanol	5% (w/v)
ortho-Phosphorsäure	10% (v/w)

Tabelle 49. Kalibration-Messung für Bradford-Assay. Es wurden Proteinmengen 0,5-10 µg in 96-well-Plattenformat bei der Wellenlänge 590 nm (Referenz-Wellenlänge 450 nm) gemessen und der Quotient A_{590}/A_{470} gebildet.

Messung	Proteinmenge (µg)											
	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0,5	0
1	2,67	2,52	2,53	2,47	2,38	2,17	2,00	1,78	1,33	1,08	1,01	0,89
2	2,24	2,54	2,54	2,65	2,36	2,28	1,96	1,84	1,34	1,07	1,05	0,88
3	2,58	2,54	2,51	2,60	2,47	2,33	2,05	1,76	1,38	1,07	1,00	0,88
Mittelwert	2,62	2,53	2,53	2,57	2,40	2,26	2,00	1,79	1,35	1,07	1,02	0,88

Die Kalibrationskurve ist in Abbildung 23 dargestellt. Der lineare Bereich liegt zwischen den Proteinmengen von 0 bis 5 µg (Abbildung 24). Die Gleichung $y=0,286x+0,8495$ beschreibt die Kalibrationsgerade und wurde zur Bestimmung der Proteinmenge verwendet.

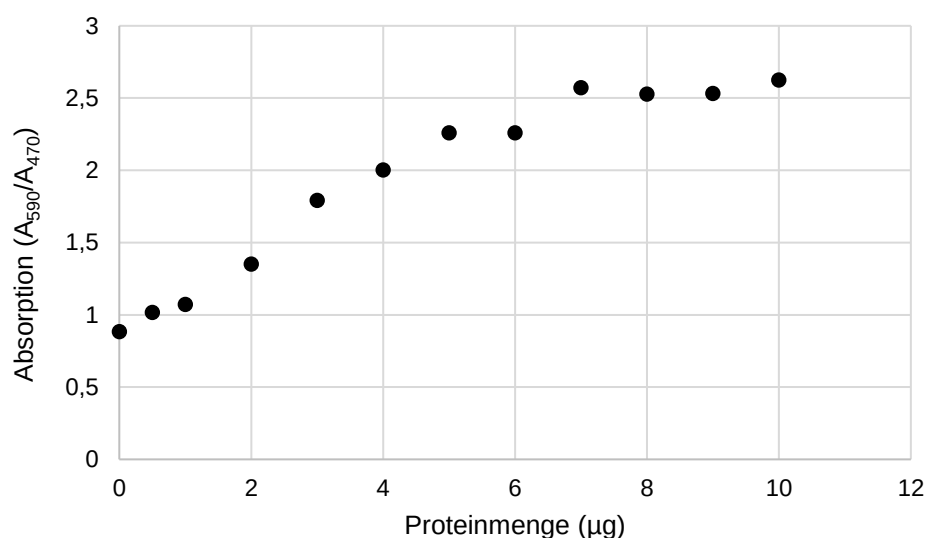


Abbildung 23. Kalibrationskurve des Bradford-Assays für Proteinmengen bis 10 µg.

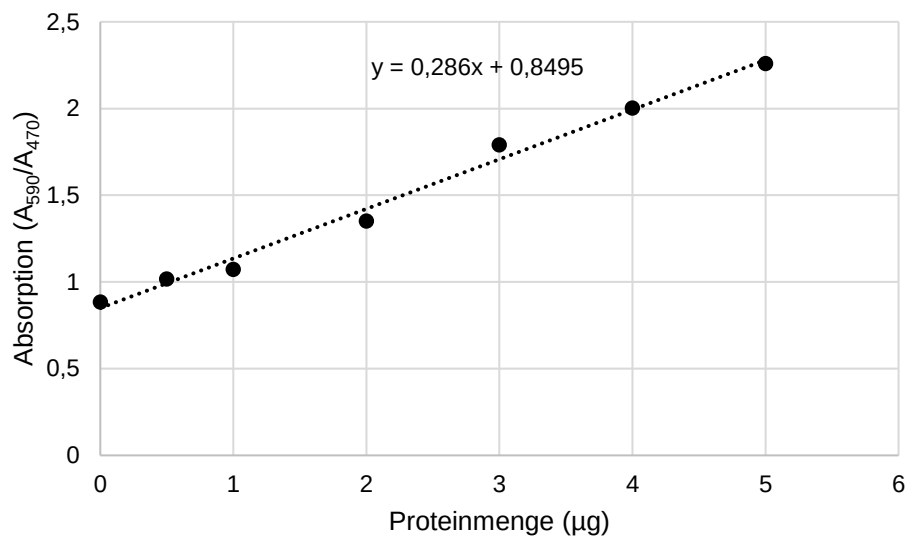


Abbildung 24. Der lineare Bereich der Kalibrationskurve des Bradford-Assay liegt zwischen der Proteinmenge 0 bis 5 µg. Kalibrationsgerade mit der Gleichung $y=0,286x+0,8495$ wurde bei der Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet.

2.2.7.3. SDS-PAGE

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) aufgetrennt. Dafür wurden BisTRIS-gepufferte Polyacrylamid-haltige Gele hergestellt. Ein Gel besteht aus zwei Schichten, dem oberen Sammel-Gel, um die Proben für die Trennung vorzubereiten, und dem eigentlichen Trenn-Gel. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 50 dargestellt. Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um die Austrocknung zu verhindern. Nach dem Aushärten wurde das Isopropanol mit dem Filterpapier entfernt, das Sammelgel gegossen und der Kamm zur Formung der Probentaschen platziert.

Tabelle 50. Zusammensetzung des BisTRIS-gepufferten Polyacrylamid-haltigen Gels zur SDS-PAGE (Mengen für zwei 1,5 mm dicke ca. 7 cm x 8 cm große Gele).

Komponente	Menge für 12%iges Trenngel	Menge für Sammelgel
reinst Wasser	5,006 ml	4,263 ml
BisTRIS-Salzsäure-Puffer, pH 6,8	4,838 ml	2,1 ml
30%ige Acrylamid (Dimer/Monomer 37,5/1)	7,031 ml	0,987 ml
10%ige Ammoniumpersulfat	67,5 µl	31,5 µl
TEMED	6,75 µl	14,7 µl

Der Laufpuffer wurde durch die Verdünnung von 5fach konzentriertem Puffer mit reinst Wasser hergestellt. Vor dem Auftragen wurden Proteinproben mit dem gleichen Volumen von Lämmli-Puffer (Tabelle 52) gemischt und 10 min bei 95°C aufgeköcht.

Tabelle 51. Zusammensetzung des 5fach konzentrierten Laufpuffer für SDS-PAGE.

Komponente	Konzentration
MES	250 mM
TRIS	250 mM
EDTA	5 mM
SDS	0,5% (w/v)

Tabelle 52. Zusammensetzung des Lämmli-Puffers.

Komponente	Konzentration
TRIS-Salzsäure	125 mM
Glycerin	20% (v/v)
SDS	140 mM
Bromphenolblau	0,2 g/l
β-Mercaptoethanol	25% (v/v)

Die Probe wurde 45 min lang bei 200 V mit Hilfe von einem Elektrophorese-Netzgerät aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel dreimal je 10 min in dem reinst Wasser auf einem Wippschüttler gewaschen und über Nacht mit der kolloidalen Coomassie-Lösung *Silver blue* (Tabelle 53, Candiano et al., 2004) unter leichtem Schwenken auf dem Wippschüttler gefärbt.

Tabelle 53. Zusammensetzung der kolloidalen Coomassie-Lösung *Silver blue* zur Färbung der Gele.

Komponente	Konzentration
Ammoniumsulfat	100 g/l
ortho-Phosphorsäure	10% (v/v)
Methanol	20% (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G-250	1,2 g/l

2.2.7.4. DNA-Gyrase-Aktivitäts-Test

Vorbereitung des Plasmids in entspannter Form

Das Plasmid pUC18, das für die DNA-Gyrase-Aktivitätstests verwendet wurde, liegt nach der Präparation zum größten Teil als *super coil* vor, und muss in die entspannte (*relaxed*) Form mit Hilfe des Enzyms Topoisomerase I überführt werden. Dafür wurde das Plasmid aus dem Bakterium isoliert (s. Kap. 2.2.3.1 Präparation von Plasmid DNA aus Bakterien) und laut dem Pipettierschema des

Topoisomerase I-Ansatzes in Tabelle 54 angesetzt. Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert, 20 min bei 65°C inaktiviert und bei -20°C gelagert.

Tabelle 54. Pipettierschema eines Topoisomerase I-Reaktionsansatzes.

Komponente	Konzentration
pUC18-Plasmid-Präparation (3,5 µg/µl)	5 µl
Reaktionspuffer, 10fach konzentriert	2,5 µl
Topoisomerase I	0,5 µl
Endvolumen (mit _{reinst} Wasser auffüllen)	25 µl

Nachweis der DNA-Gyrase-Aktivität

Der Nachweis der DNA-Gyrase-Aktivität bzw. deren Inhibition wurde nach der modifizierten Methode von Gellert et al. (1976) untersucht. Bei dem DNA-Gyrase-Aktivitäts- bzw. Inhibitionstest wurde der Topoisomerase I-Ansatz mit der DNA-Gyrase aus *E. coli* bzw. aufgereinigter DNA-Gyrase aus Pseudomonaden unter anderem bei der Anwesenheit von Antibiotika inkubiert. Das Pipettierschema ist in Tabelle 55 dargestellt. Die käuflich erworbene DNA-Gyrase aus *E. coli* wurde für den Test 1 zu 1 mit dem DNA-Gyrase-Lagerungspuffer bis zu der Endkonzentration 2.500 U/ml verdünnt und 0,5 µl pro Reaktionsansatz verwendet. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Assay bestimmt und beträgt 0,16 µg/µl. Die Proteinkonzentration der aus *Pseudomonas* aufgereinigten DNA-Gyrase betrug 1,05 µg/µl bei Pf0-1 und 1,11 µg/µl bei PfAR-1. Bei dem Assay mit der DNA-Gyrase aus Pseudomonaden wurde etwa 1 µg Protein pro Reaktion (entspricht 3 µl) angesetzt. Die Menge an Allicin- bzw. Antibiotikum-Lösung betrug bis zu 6,5 µl, abhängig von der notwendigen Test-Konzentration. Die *E. coli*-DNA-Gyrase-Ansätze wurden 2 h bei 37°C, die Pseudomonaden-DNA-Gyrase-Ansätze 18 h bei 28°C inkubiert.

Tabelle 55. Zusammensetzung des DNA-Gyrase-Reaktionsansatzes.

Komponente	Konzentration/Menge
Topoisomerase I-Ansatz	25 µl
Reaktionspuffer, 5fach konzentriert	8 µl
DNA-Gyrase aus <i>E. coli</i> /Pseudomonaden	0,5 µl / 3 µl
Allicin-/Antibiotikum	0- 6,5 µl
Endvolumen (mit _{reinst} Wasser auffüllen)	40 µl

Gelelektrophorese und Gelfärbung

Mittels Agarosegel-Elektrophorese wurden die Ergebnisse der DNA-Gyrase-Aktivitätstests ausgewertet. Dafür wurde zu den Proben DNA-Ladepuffer appliziert und ein 1% Agarosegel ohne Zusatz von Ethidiumbromid (s. Kap. 2.2.3.4 DNA-Gelelektrophorese) beladen. Die Elektrophorese

wurde bei 100 V 60 min lang durchgeführt. Anschließend wurde das Agarosegel in TAE-Puffer mit Zugabe von 0,02% Ethidiumbromid (Endkonzentration) 60 min lang gefärbt.

2.2.8. Methoden zur Simulation der Behandlung der infizierten Lunge mit Allicin

Zur Nachahmung der Behandlung der mit Mikroorganismen infizierten Lunge wurde in Kooperation mit dem Aerodynamischen Institut und dem Lehrstuhl für Strömungslehre der RWTH Aachen (AIA) die Lungen-Simulationsapparatur konzipiert, im Rahmen der Bachelor-Arbeit von Philipp Müller (2016) angefertigt, im Hinblick auf das aerodynamische Verhalten der Aerosol-Partikel bei der Behandlung ausgewertet und veröffentlicht (Dörner et al., 2019).

2.2.8.1. *Untersuchung der Beständigkeit der verschiedenen Materialien gegenüber Allicin zu Bau der Lungen-Simulationsapparatur*

Verschiedene Materialien aus Kunststoff, Metall und Glas, die als Werkstoffe für die Lungen-Simulationsapparatur in Frage kamen, wurden auf ihre Beständigkeit gegenüber Allicin getestet. Dafür wurden 20 µl von 96 mM Allicin an die mit _{reinst} Wasser gesäuberte und getrocknete Materialoberfläche appliziert und das Material anschließend in einer abgedeckter Petri-Schale, um die Verdunstung zu verlangsamen, über 18 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden 10 µl Wasser und Ethanol verwendet. Anschließend wurde die Oberfläche mit _{reinst} Wasser gesäubert und abgetrocknet. Die behandelte Oberfläche wurde makro- und mikroskopisch unter anderem mit Hilfe eines Digitalmikroskops (Keyence VHX-6000 mit DIK Universalobjektiv VH-Z100UR) angeschaut und die Beständigkeit des Materials bewertet.

2.2.8.2. *Aufbau der Lungen-Simulationsapparatur*

Die Lungen-Simulationsapparatur besteht aus dem Lungenmodell, das in einem temperierten Inkubator-Kasten platziert und über ein Anlaufrohr an den Aerosolgenerator angeschlossen wurde (Abbildung 25). Als Aerosol-Generator wurde der Kompressor PARI BOY SX und der Vernebler PARI LC SPRINT, der bei der Behandlung von Patienten verwendet wird, käuflich erworben. Der Vernebler mit dem blauen Aufsatz wurde an den Kompressor laut Herstellerangaben mit dem beiliegenden Schlauch angeschlossen. Um die natürliche Atmung, mit der die Aerosolpartikel in die Lunge gelangen, zu simulieren, wurde Zuluft an den Vernebler angeschlossen. Der Verschlussdeckel des Verneblers wurde dafür geöffnet und durch den aus POM (Polyoxymethylen) angefertigten Adapter an den Zuluft-Schlauch angeschlossen. Der Zuluft-Schlauch wurde zuerst an den Luft-Hahn, dann an das Durchfluss-Messgerät angeschlossen und eine Durchflussrate von 6 l/min eingestellt. Der Vernebler erzeugt einen zusätzlichen Luftfluss von 4,5 l/min. Somit beträgt die Gesamt-Strömung, die in das Lungen-Modell eintritt, 10,5 l/min. Die Luftzufuhrschläuche wurden mit Hilfe von Schlauchschellen abgedichtet. Die Anlaufstrecke mit dem Durchmesser von 8,3 mm geht stufenlos in das beschichtete Lungenmodell über und dient der Ausbildung der laminaren Strömung und somit der symmetrischen Behandlung des Lungenmodells.

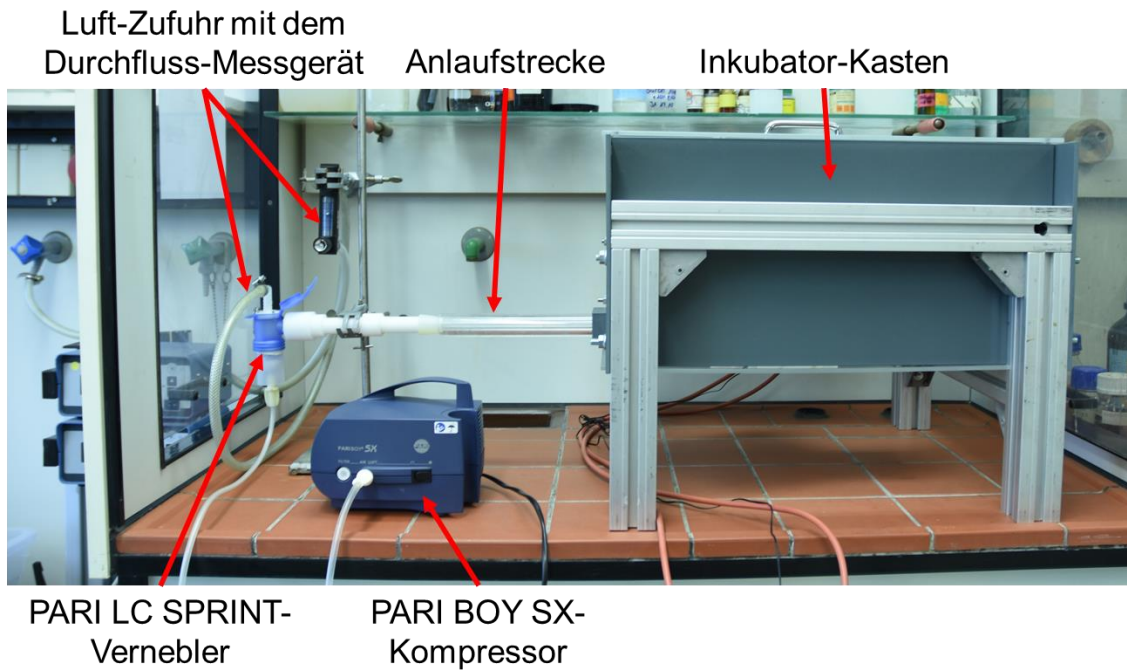


Abbildung 25. Aufbau der Lungen-Simulationsapparatur.

Der Inkubator-Kasten, in dem das Lungenmodell platziert ist, wurde durch eine Heizplatte temperiert (Abbildung 26). Die Heizplatte besteht aus einer Heizfolie, die an eine Kupferplatte geklebt wurde. Um die Wärmekapazität zu erhöhen wurden an beiden Seiten der Kupferplatte zwei Aluminiumplatten und ein Aluminium-Rippenkörper angebracht. Die Heizplatte wurde über ein Thermostat, das bei einer Temperatur unter 36,5°C die Heizfolie ein- und bei einer Temperatur über 37,5°C die Heizfolie ausgeschaltet, angeschlossen. Der Temperatursensor des Thermostates wurde am oberen Rand der Längsseite des Kastens mittig angebracht. Zur Luftzirkulation und Wärmeverteilung wurde ein Luftventilator vor der Heizplatte in 1 cm Abstand mit der Luftstrom-Richtung zur Platte hin angebracht. Der Inkubator-Kasten hat eine 1,5 cm große Abluft-Öffnung, die mit einem Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm abgedichtet wurde. Dies verhindert den Austritt von S1-Organismen aus dem Inkubator-Kasten.

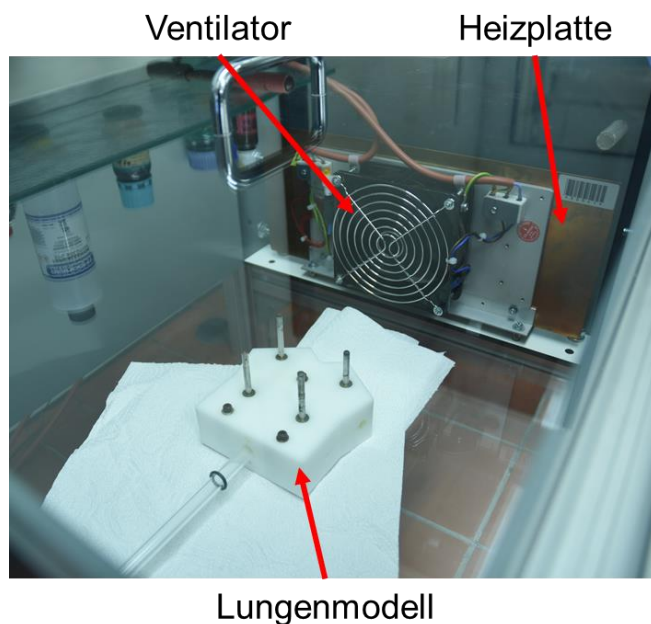


Abbildung 26. Temperierter Inkubator-Kasten mit dem Lungen-Modell. Der Inkubator-Kasten wurde mit Hilfe der Heizfolie, befestigt an der Metall-Platte, beheizt. Durch die Verwendung von einem Thermostat wurde die Temperatur bei 37°±1°C konstant gehalten. Der Ventilator sorgte für ständige Luft-Umwälzung und gleichmäßiges Temperieren des Inkubators.

2. Material und Methoden

Das Lungenmodell ist statisch und stellt die Bronchien der 2. bis 5. Generation (Trachea entspricht der 0. Generation) in der Originalgröße eines Menschen dar (Abbildung 27 A). Das Auskleiden mit Agar simuliert die Schleimhaut-Oberfläche der Bronchien und erlaubt das Anbringen der Bakterien zur Simulation der Infektion (Abbildung 27 B). Bei dem beschichteten Modell beträgt der Durchmesser der ersten Eingangs-Bronchie 8,3 mm und der letzten Ausgangs-Bronchien 3,5 mm. Entsprechend ist bei dem unbeschichteten Modell der Durchmesser der Eingangs-Bronchie 10,3 mm und der der Ausgangs-Bronchien 5,5 mm. Das Lungenmodell wurde aus POM gefräst und besteht aus zwei Halbschalen, was das Auskleiden mit dem Agar ermöglicht. Die genaue Position der beiden Halbschalen gegeneinander wurde durch die vier Passstifte fixiert und mit drei Schrauben befestigt (Abbildung 26).

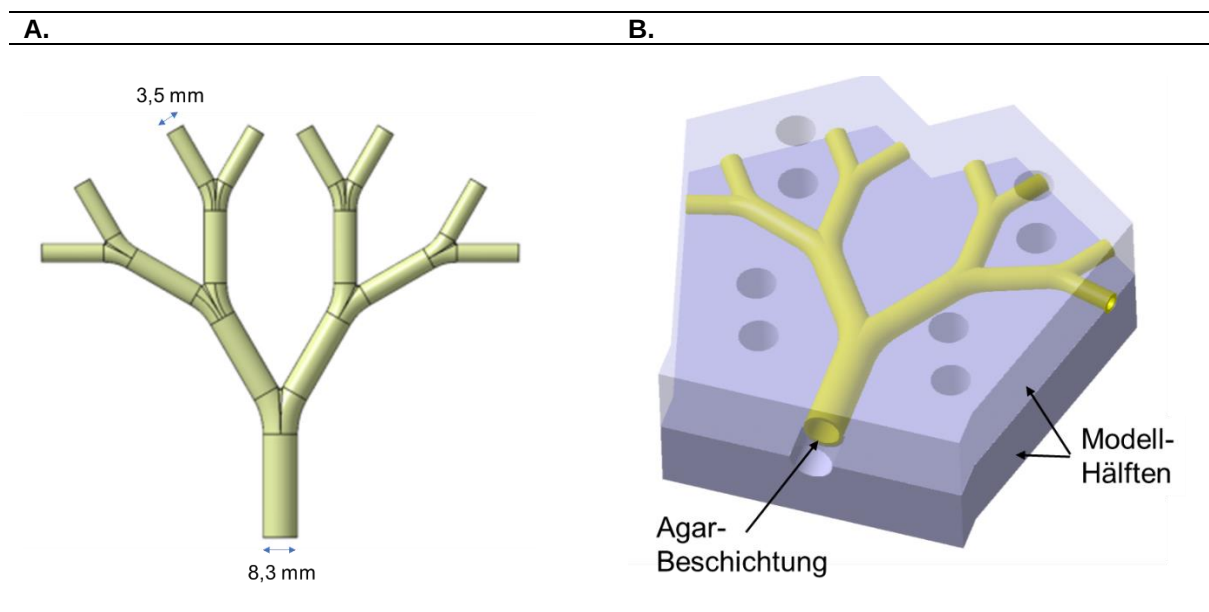


Abbildung 27. Zeichnung des Lungen-Modells (modifiziert nach Müller, 2016). (A) Das Lungen-Modell stellt den Lungenabschnitt zwischen der 2. und 5. Bronchien-Generation in Originalgröße der menschlichen Lunge dar. (B) Die Innenseite des Modells wurde mit 1 mm dickem Agar beschichtet, um die Bronchien-Oberfläche bzw. Schleimhaut zu simulieren.

Die einzelnen Bestandteile der Apparatur sowie verwendete Geräte sind in Tabelle 56 und Tabelle 57 aufgelistet.

Tabelle 56. Geräte der Lungen-Simulationsapparatur.

Bestandteil	Hersteller
PARI BOY SX Kompressor	PARI (DE)
PARI LC SPRINT Vernebler mit dem blauen Aufsatz	PARI (DE)
Heizfolie 41420 / UEHF-228-76 Kapton, 228±2 mm x 76 mm, 230V AC/882W, Innenwiderstand ca. 60 Ohm, Durchschlagsfestigkeit 2000 VRMS, max. Betriebstemperatur +175°C	uwe electronic GmbH (DE)
Universal Thermostat UT300, 230 V, 50 Hz, 16 A, IP20, T35	eQ-3 AG (DE)
Ventilator-Axiallüfter, 12 cm x 12 cm, M4, -32 UNC	ebm-papst (DE)
Durchfluss-Messgerät, MR3A15BVBN	Key Instruments (USA)

Tabelle 57. Bestandteile der Lungensimulation-Apparatur.

Bestandteil	Maße ¹	Baumaterial
Inkubator-Kasten	Innenmaße: H 25 cm / L 50 cm / B 40 cm	Seitenwände aus PVC, Boden und Deckel aus Plexiglas
Anlaufstrecke	L 47 cm, Ø _{innen} 8,3 mm	Quarz-Glas
Metallplatten für Heizplatte	L 35 cm / H 25 cm / S 0,2 cm	Kupfer
	L 24 cm / H 11,5 cm / S 0,5 cm	Aluminium
Rippenkörper	L 11,5 cm / H 5 cm / B 2,5 cm	Aluminium
Luftzufuhr-Schläuche	Ø _{innen} 8 mm	PVC
	Ø _{außen} 12 mm	
Adapter Schlauch-Vernebler	Ø _{Eingang} 9 mm	POM
Adapter Vernebler-Glasrohr	L 14,5 cm	POM
Lungenmodell	B 14,5 cm / L 14 cm / H 4 cm	POM

¹ H: Höhe, L: Länge, B: Breite, S: Stärke, Ø: Durchmesser

2.2.8.3. Beschichtung des Lungen-Modells

Zur Beschichtung des Lungenmodells mit dem Agar wurde ein Stempel aus Kunstharz gegossen. Beim Anlegen des Stempels an die Lungenmodell-Halbschale entsteht ein 1 mm dicker Hohlraum, der durch den Agar ausgefüllt wird (Abbildung 28).

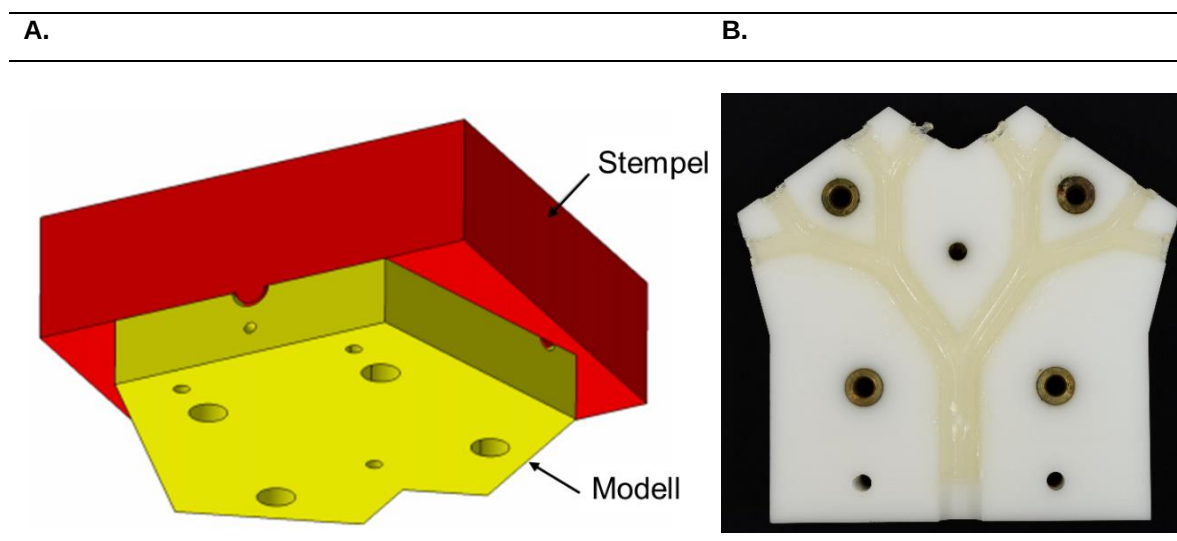


Abbildung 28. Beschichtung des Lungen-Modells mit dem bakterienhaltigen Agar. (A) Bakterienhaltiger 50°C warmer flüssiger Agar wurde auf die Modell-Halbschale gegossen und sofort mit dem Stempel abgedeckt (modifiziert nach Müller (2016)). (B) Nach dem Entfernen des Stempels bleibt eine 1 mm dicke Agar-Schicht an dem Lungenmodell zurück.

Die beiden Hälften des Lungenmodells sowie Stempel, Passstifte und Schrauben wurden durch 20 min lange UV-Licht-Bestrahlung unter einer Sterilbank keimfrei gemacht. Die Bakterienkultur von *E. coli* MegaX pRU1097 bzw. pRU1097-clone1 und das LB-Agar-Nährmedium wurden wie im Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhoftest beschrieben vorbereitet. 10 ml des 50°C warmen bakterien-haltigen LB-Agar-Mediums wurden in die Lungenmodell-Halbschale gegossen, mit dem Stempel sofort abgedeckt (Abbildung 28 A) und mit den Passstiften fixiert. Nach 5 min wurde der Stempel von der Lungen-Modell-Hälfte vorsichtig

abgelöst. Das 7 mm lange Stück Agar wurde in dem ersten Abschnitt herausgenommen, da das Glasrohr dort eingeführt wird. Anschließend wurde die zweite Modell-Hälfte mit dem LB-Agar-Medium ausgekleidet. Die beiden mit der Agar-Schicht ausgekleideten Lungen-Modell-Hälften wurden gegeneinander mit den vier Passstiften und drei Schrauben befestigt (Abbildung 28 B).

2.2.8.4. Durchführung der Behandlung

Das Lungen-Modell wurde in den 37°C warmen Inkubator-Kasten platziert und an das Glasrohr angeschlossen. Die Zuluft wurde auf 6 l/min Luftfluss eingestellt und zur Aerosol-Erzeugung der Aerosolgenerator eingeschaltet. Das Vernebler-Gefäß wurde mit 8 ml Test- bzw. Kontroll-Lösung gefüllt. Bei der Behandlung über die Gasphase wurde anstelle des Vernebler-Gefäßes die Test- bzw. Kontroll-Substanz in den Schott-Flaschen-Deckel appliziert und dicht an den Vernebler-Deckel mit Hilfe einer Laborhebebühne platziert (Abbildung 29). Die Behandlung wurde 20 min lang bis zur vollständigen Vernebelung bzw. Verdunstung der Lösung durchgeführt. Anschließend wurde das Lungen-Modell in feuchtes Papier und Aluminium-Folie eingewickelt und 18 h bei 37°C inkubiert. Zum Vitalitätsnachweis wurde MTT-Reagenz verwendet. Dafür wurde das Lungen-Modell geöffnet und die LB-Agar-Schicht mit der 0,5%igen MTT-Lösung aus der Sprühflasche besprüht. Die Modell-Hälften wurden mit Frischhalte-Folie abgedeckt und 30 min bei 37°C inkubiert. Ursprünglich ist MTT-Reagenz oxidiert und gelb gefärbt. Es wird von den lebenden Organismen bzw. Zellen aufgenommen und reduziert, was sich in einer Blaufärbung zeigt. Auf diese Weise werden lebende Bakterien blau angefärbt, die toten Bakterien bleiben farblos. Anschließend wurden die Ergebnisse fotografisch dokumentiert. Zur Dekontamination wurden die Modell-Hälften in 70%ige Ethanol-Lösung für 18 h eingelegt.



Abbildung 29. Versuchsaufbau bei der Behandlung mit dem Allicin über die Gasphase. Anstatt eines Vernebler-Gefäßes, das bei der Aerosol-Behandlung benutzt wird, wurde die Test-Lösung in einen Deckel der Schott-Flasche gefüllt und mit Hilfe der Hebebühne an die Apparatur gebracht.

3. Ergebnisse

3.1. Identifikation der Oxidationsziele des Allicins in *Pf0-1* und *PfAR-1* mittels OxICAT

3.1.1. Oxidationsziele des Allicins in *Pf0-1* und *PfAR-1* nach Allicin-Behandlung

Um den Wirkungsmechanismus des Allicins besser zu verstehen und die Angriffsorte in einem bakteriellen Proteom zu identifizieren, wurde ein OxICAT-Experiment mit dem Allicin-resistenten Stamm *PfAR-1* und Allicin-anfälligen Stamm *Pf0-1* durchgeführt (s. Kap. 2.2.6 OxICAT-Methode). Im Rahmen meiner vorhergehenden Master-Arbeit wurde das OxICAT-Experiment zweimal mit *PfAR-1* durchgeführt. Anschließend wurde das OxICAT-Experiment ein drittes Mal mit *PfAR-1* und dreimal mit *Pf0-1* durchgeführt. Die Bakterien wurden 15 min lang mit 0,5 mM Allicin bei 28°C und 220 rpm behandelt (s. Kap. 2.2.6.1 Behandlung). Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die reduzierten Proteine mit dem isotopisch-leichten ICAT-Label markiert (s. Kap. 2.2.6.2 OxICAT-Markierung). Im nächsten Schritt wurden die oxidierten Proteine in der Probe durch die Behandlung mit TCEP reduziert und mit dem isotopisch-schweren ICAT-Label markiert. In den folgenden Schritten wurden die Proteine tryptisch verdaut (s. Kap. 2.2.6.3 Trypsin-Verdau), und die ICAT-markierten Peptide aufgereinigt (s. Kap. 2.2.6.4 Kationenaustausch- und Affinitätschromatografie und Kap. 2.2.6.5 Entfernen des Biotin-Markers). Anschließend wurden die Proben massenspektrometrisch analysiert (s. Kap. 2.2.6.6 Massenspektrometrie), und die Ergebnisse mit den Computer-Programmen MassQuant, Excel und MASS++ ausgewertet (s. Kap. 2.2.6.7 Datenanalyse). Der Anzahl der identifizierten Peptide, bei denen sowohl das leicht- als auch das schwer-markierte Peptid in der Probe identifiziert war, lag zwischen 966 und 3.699 bei den sechs durchgeführten Experimenten (Tabelle 58). Durch die Auswertung der Signalstärke von leicht- und schwer-markierter Probe, kann der Oxidationszustand des Peptids berechnet werden. Die Anzahl der identifizierten Peptide, deren Oxidationszustand sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Allicin-Behandlung ausgerechnet wurde, liegt zwischen 471 und 1.705 bei *Pf0-1* und *PfAR-1*.

Tabelle 58. Anzahl der bei dem OxICAT-Experiment identifizierten Peptide bei *Pf0-1* und *PfAR-1*, bei denen der Oxidationszustand ausrechenbar ist. Anzahl der Peptide, deren Oxidationszustand sowohl bei der Kontrolle als auch bei der Allicin-Behandlung, detektiert wurde, ist in der letzten Spalte dargestellt (s. Kap. 2.2.6 OxICAT-Methode).

Anzahl der identifizierten Peptide				
		Kontrolle	Allicin-Behandlung	Schnittmenge bei der Kontrolle und Allicin-Behandlung
<i>Pf0-1</i>	1. Exp.	3.699	2.726	1.485
	2. Exp.	966	1.287	471
	3. Exp.	2.532	2.748	1.280
<i>PfAR-1</i>	1. Exp.	3.570	2.421	1.616
	2. Exp.	1.157	1.468	487
	3. Exp.	3.022	3.374	1.705

Bei der Auswertung wurde ausgerechnet, zu welchem Anteil ein bestimmtes Peptid oxidiert bzw. reduziert in der Zelle vorliegt. Der Grad der Oxidation wurde in die Kategorien 0-20%, 20-40% usw. eingeteilt und die Anzahl der Peptide, die in diese Kategorien fallen, für *Pf0-1* und *PfAR-1* bestimmt (Tabelle 59 und Tabelle 60). Die ausführlichen Daten zu der Anzahl der Proteine in den verschiedenen Kategorien des Oxidationszustandes sind im Anhang in Tabellen A1 und A2 (S. 243) zu finden.

Tabelle 59. Oxidationszustand der bei dem OxICAT-Experiment identifizierten Proteine im Allicin-anfälligen ***Pf0-1*** bei Kontroll-Bedingungen und nach Allicin-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten. Ausführliche Daten sind im Anhang Tabelle A1 (S. 243) dargestellt (s. Kap. 2.2.6 OxICAT-Methode).

Oxidationszustand der Proteine bei <i>Pf0-1</i>	Anteil der oxidierten Proteine (in %)	
	bei der Kontrolle	bei der Allicin-Behandlung
0%-20%	77,5 ± 2,6	54,0 ± 17,5
20%-40%	13,5 ± 1,5	25,4 ± 6,4
40%-60%	5,3 ± 1,2	12,7 ± 6,4
60%-80%	2,5 ± 0,7	6,2 ± 3,6
80%-100%	1,2 ± 0,4	1,8 ± 1,7

Tabelle 60. Oxidationszustand der bei dem OxICAT-Experiment identifizierten Proteine im Allicin-resistenten ***PfAR-1*** bei Kontroll-Bedingungen und nach Allicin-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten. Ausführliche Daten sind im Anhang Tabelle A2 (S. 243) dargestellt (s. Kap. 2.2.6 OxICAT-Methode).

Oxidationszustand der Proteine bei <i>PfAR-1</i>	Anteil der oxidierten Proteine (in %)	
	bei der Kontrolle	bei der Allicin-Behandlung
0%-20%	75,6 ± 3,8	66,2 ± 5,0
20%-40%	11,8 ± 1,8	20,2 ± 3,3
40%-60%	6,9 ± 0,8	8,2 ± 1,5
60%-80%	3,3 ± 1,8	3,0 ± 0,5
80%-100%	2,4 ± 1,4	2,3 ± 1,5

Die Mittelwerte der Oxidationszustände der identifizierten Proteine bei *Pf0-1* und *PfAR-1* bei der Kontrolle und nach der Allicin-Behandlung aus drei Versuchswiederholungen sind graphisch in Abbildung 30 dargestellt. Die identifizierten Proteine bei *Pf0-1* und *PfAR-1* besitzen unter Kontroll-Bedingungen einen ähnlichen Oxidationszustand. Etwa drei Viertel der identifizierten Proteine sind unter Kontroll-Bedingungen bei beiden Bakterien-Stämmen bis zu 20% oxidiert bzw. liegen mindestens zu 80% reduziert vor. 13% der Peptide bei *Pf0-1* und 12% bei *PfAR-1* sind 20-40% oxidiert und 8% der Peptide bei *Pf0-1* und 12% der Peptide bei *PfAR-1* sind höher als zu 40% oxidiert. Nach Allicin-Behandlung verringert sich die Anzahl der reduzierten Proteine bzw. vergrößert sich der Anzahl der oxidierten Proteine bei beiden Bakterien-Stämmen. Bei *Pf0-1* liegen nun 54% der identifizierten Peptide und bei *PfAR-1* 66% der identifizierten Proteine bis zu 20% oxidiert vor. Der Anteil der Proteine, die zu 20-40% oxidiert sind, hat sich bei *Pf0-1* auf 25% und bei *PfAR-1* auf 20% erhöht. Der Anteil der Proteine, die mindestens zu 40% oxidiert sind, hat sich bei *Pf0-1* auf 21%

und bei *PfAR-1* auf 13% vergrößert. Im Vergleich zu *Pf0-1* fallen die Veränderungen des Oxidationszustandes von *PfAR-1* nach Allicin-Behandlung geringer aus.

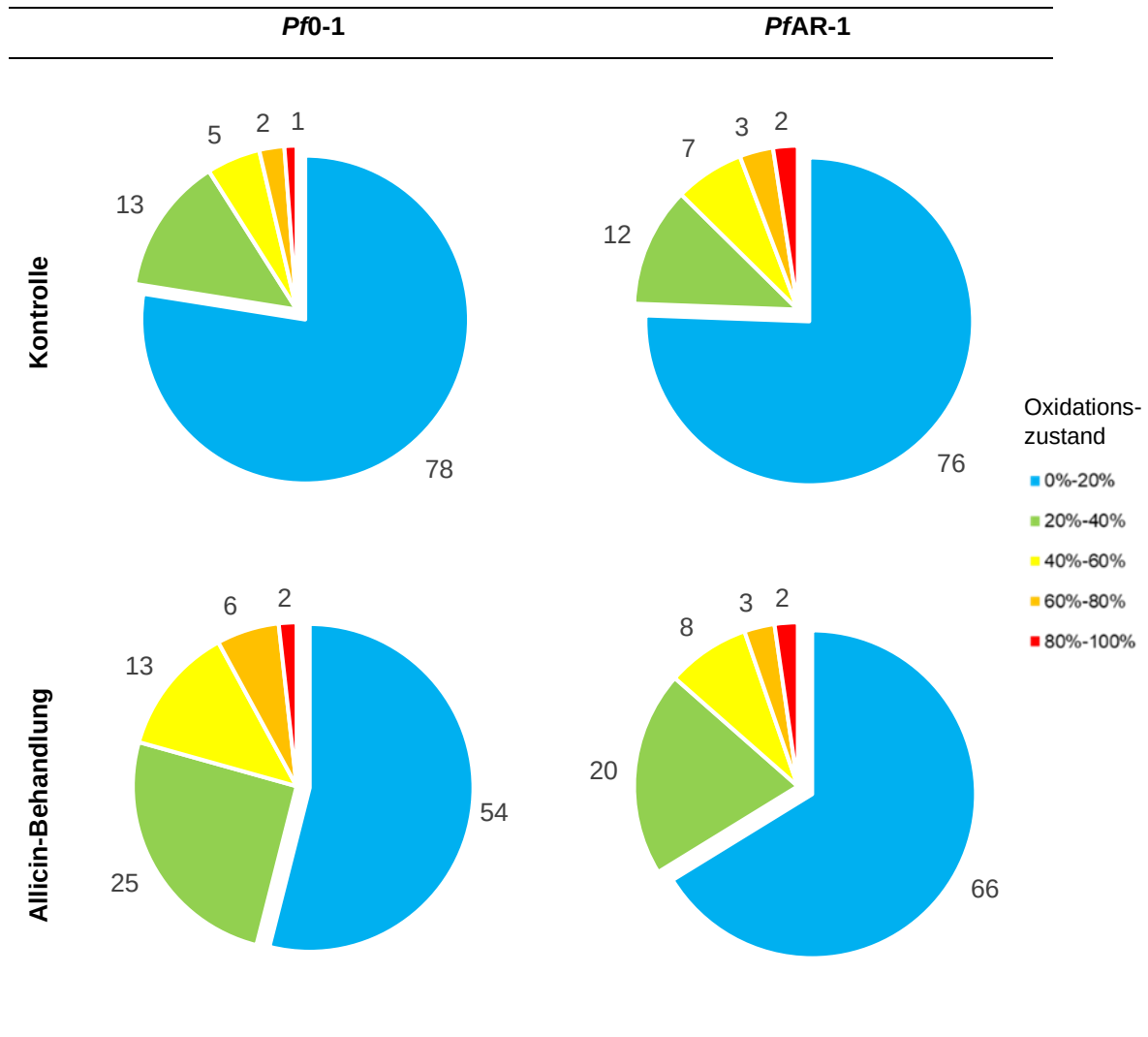


Abbildung 30. Oxidationszustand der bei OxICAT identifizierten Proteine in Allicin-anfälligen *Pf0-1* und Allicin-resistenten *PfAR-1* bei Kontroll-Bedingungen und nach Allicin-Behandlung, angegeben als prozentualer Anteil (Mittelwert aus drei Experimenten). Z.B. liegen bei *Pf0-1* bei Kontroll-Bedingungen 78% der identifizierten Proteine zu 20% oxidiert und zu 80% reduziert vor (s. Kap. 2.2.6 OxICAT-Methode).

Diese Daten wurden mittels Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) statistisch analysiert. Die Nullhypothese besagt, dass der Oxidationszustand bzw. die Anteile von wenig und stark oxidierten Proteinen bei *Pf0-1* und *PfAR-1* vor und nach der Behandlung mit Allicin gleich sind. Als erwartete Verteilung der Oxidationszustände der Proteine wurde der Mittelwert der Ergebnisse von *Pf0-1* und *PfAR-1* genommen. Bei der Auswertung wurden die Ergebnisse aus allen drei Experimenten zusammen betrachtet. Es wurden zwei Kategorien gebildet, Oxidationszustand bis zu 20% und größer als 20%. Bei der Kontroll-Behandlung unterscheiden sich die Anteile der wenig (bis zu 20% oxidiert) und stark oxidierten (höher als 20%) Proteine bei *Pf0-1* und *PfAR-1* nicht voneinander. Nach Allicin-Behandlung sind mehr Proteine bei *Pf0-1* stärker oxidiert als bei *PfAR-1* ($p < 0,001$). Die ausführliche statistische Analyse ist in Anhang in Tabellen A3 bis A10 (S. 243 ff.) zu finden.

Um die am stärksten oxidierten Proteine nach Allicin-Behandlung zu identifizieren, wurde die Auswertung mit Hilfe von drei Kriterien „Ratio of Ratios“ („RoR“), „Ratio %“ und „Delta %“ („Δ %“) durchgeführt. Der Oxidationszustand des Proteins ist im Wert „Ratio Heavy/Light“ („Ratio H/L“) enthalten. Dieser Wert ist das Verhältnis der Signalstärke von schwer-markiertem und oxidiertem Peptid zu dem leicht-markierten und reduzierten Protein. Das „RoR“-Wert ist das Verhältnis von „Ratio H/L“-Wert bei Allicin-Behandlung zu dem „Ratio H/L“-Wert bei der Kontrolle. So beschreibt der „RoR“-Wert die Verschiebung des Oxidationszustands des Proteins, hervorgerufen durch die Allicin-Behandlung. Bei einem „RoR“-Wert größer als 1, wurde das Protein durch die Allicin-Behandlung oxidiert. Bei einem „RoR“-Wert zwischen 0 und 1, wurde das Protein durch die Allicin-Behandlung reduziert. Der „Ratio %“-Wert ist das Verhältnis der Menge des oxidierten Proteins nach Allicin-Behandlung zu der Menge des oxidierten Proteins bei der Kontrolle. Je höher der „Ratio %“-Wert ist, desto stärker wird das Protein nach Allicin-Behandlung oxidiert. Der „Δ %“-Wert ist die Differenz zwischen prozentualen Anteil des oxidierten Proteins nach Allicin-Behandlung und der Kontrolle. Je höher der „Δ %“-Wert ist, desto stärker wurde das Protein durch die Allicin-Behandlung oxidiert.

Für jedes der drei Kriterien wurden die 200 Proteine mit den höchsten und 200 Proteine mit den niedrigsten Werten bzw. 200 Proteine, die nach der Allicin-Behandlung am stärksten oxidiert und reduziert wurden, ausgesucht. Bei der „Δ %“-Kategorie wurden die Proteine mit den Werten kleiner als 10% nicht berücksichtigt. Die Proteine, die in allen drei Kategorien unter 200 mit den höchsten Werten bzw. niedrigsten Werten und in allen drei Experiment-Wiederholungen vorhanden waren, wurden bei der weiteren Auswertung berücksichtigt. Im letzten Schritt wurden die massenspektroskopischen Daten der Kandidaten-Proteine mit dem Programm Mass++ manuell überprüft. Nach dieser Datenauswertung wurden bei *Pf0-1* 11 Proteine und bei *PfAR-1* acht Proteine als stark oxidierte Proteine nach der Allicin-Behandlung identifiziert (Tabelle 61). Drei Proteine haben *Pf0-1* und *PfAR-1* gemeinsam.

Tabelle 61. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-anfälligen *Pf0-1* und Allicin-resistenten *PfAR-1*, identifiziert in OxICAT-Experimenten (s. Kap. 2.2.6 OxICAT-Methode). Für das Auswahlkriterium „stark oxidierte Zustand“ mussten die Proteine bei den drei unabhängigen Versuchswiederholungen in allen drei Auswertungskriterien („RoR“- „Ratio %“- und „Δ %“-Werte) unter den 200 höchsten Werten der identifizierten Peptide liegen und der „Δ %“-Wert $\geq 10\%$ sein.

<i>Pf0-1</i>	<i>PfAR-1</i>
1 Glucose-1-Phosphat-Thymidyltransferase	
2 Ketosäure-Reduktoisomerase	
3 Phosphoglucosamin-Mutase	
4 Chaperon HscA	4 Biotin-Carboxylase der Acetyl-CoA-Carboxylase
5 DNA-Gyrase Untereinheit A	5 Chaperon GroEL
6 Leucyl-tRNA-Synthetase	6 Putative Ameisensäure-Dehydrogenase-Oxidoreduktase
7 <i>Peptide chain release factor 1</i>	7 Riboflavin-Synthase
8 RNA-Methyltransferase TrmH	8 Ribose-5-Phosphate-Isomerase A
9 Zink-Aufnahme-Regulationsprotein	
10 Hypothetisches DUF469-Domäne-haltiges Protein (HP 1791)	
11 Hypothetisches Protein - Pyrimidin/Purin-Nukleosid-Phosphorylase (HP 3952)	

Die Proteine Phosphoglucosamin-Mutase, Glucose-1-Phosphat-Thymidyl-Transferase und Ketosäure-Redukto-Isomerase wurden sowohl bei *Pf0-1* als auch bei *PfAR-1* nach Allicin-Behandlung stark oxidiert (Tabelle 62). Bei der Kontrolle liegen diese Proteine bei beiden Stämmen vorwiegend in der reduzierten Form vor und sind höchstens bis zu 5,3% oxidiert. Nach Allicin-Behandlung steigt der Anteil der oxidierten Form dieser Proteine. So wird Phosphoglucosamin-Mutase bei *PfAR-1* bis zu 46,5% und bei *Pf0-1* bis zu 57,7% oxidiert. Die Glucose-1-Phosphat-Thymidyl-Transferase wird bei *PfAR-1* bis zu 50,5% und bei *Pf0-1* bis zu 61,5% oxidiert. Die Ketosäure-Redukto-Isomerase wird bei *PfAR-1* bis zu 21,9% und bei *Pf0-1* bis zu 34,6% oxidiert. So steigt der Anteil der nach der Allicin-Behandlung oxidierten Proteine als „ Δ %“-Wert um 17,0% bis 56,2%. Bei allen drei Fällen wurden die Proteine bei *Pf0-1* stärker durch Allicin-Behandlung oxidiert als bei *PfAR-1*. Die ausführlichen Daten sind dem Anhang in Tabelle A11 (S. 247) zu entnehmen.

Tabelle 62. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-anfälligen *Pf0-1* und Allicin-resistenten *PfAR-1*, detektiert in allen drei OxICAT-Experimenten. Dargestellt sind Anteil der oxidierten Proteine nach Allicin-Behandlung und von der Kontrolle (Oxidationsgrad) und deren Differenz als „ Δ Oxidation“. Ausgerechnet sind die Mittelwerte (n=3) mit Standardabweichung.

Proteinname/ Peptidsequenz	Pf0-1		Δ Oxidation (%)	PfAR-1		Δ Oxidation (%)
	Oxidationsgrad (%)			Oxidationsgrad (%)		
	Kontrolle	Allicin		Kontrolle	Allicin	
Glucose-1-Phosphat-						
Thymidyl-Transferase	5,3±2,3	61,5±26,9	56,2±24,9	4,5±3,3	50,5±19,6	46,0±16,4
EILVISTPEDLPCFR (<i>PfAR-1</i>)						
EILIISTPEDLPCFK (<i>Pf0-1</i>)						
Ketosäure-Redukto-						
Isomerase	3,0±1,7	34,6±16,7	31,6±15,4	4,9±4,6	21,9±4,3	17,0±4,6
VAIIGYGSQGHACNLK						
Phosphoglucosamin-						
Mutase	3,8±2,3	57,7±33,0	53,9±30,9	5,4±4,2	46,5±19,0	41,1±17,8
CPQVLINVR						

Bei *Pf0-1* sind acht Proteine nach Allicin-Stress stark oxidiert, die nicht bei *PfAR-1* identifiziert wurden (Tabelle 63). Bei Kontroll-Bedingungen sind bis zu 7,3% dieser Proteine oxidiert. Nach Allicin-Behandlung liegen diese Proteine zu 39,8-91,9% oxidiert vor. So steigt der Anteil der oxidierten Proteine bei Chaperon HscA um 34,4%, bei Zink-Aufnahme-Regulationsprotein um 30,0%, bei dem hypothetischen DUF469-Domäne-haltigen Protein HP 1791 um 35,3%, bei der Leucyl-tRNA-Synthetase um 40,0%, bei der Untereinheit A der DNA-Gyrase um 49,8%, bei RNA-Methyltransferase um 49,0%, bei *Peptide chain release factor 1* um 64,8% und bei dem hypothetischen Protein HP 3952 (Pyrimidin/Purin-Nucleosid-Phosphorylase) um 84,6%. Die ausführlichen Daten sind im Anhang Tabelle A12 zu finden (S. 248).

Tabelle 63. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-anfälligen **Pf0-1** (und nicht in Allicin-resistenten *PfAR-1*), detektiert in allen drei OxICAT-Experimenten. Dargestellt sind die Anteile der oxidierten Proteine bei Allicin-Behandlung und Kontrolle und deren Differenz als „ Δ Oxidation %“-Werte. Ausgerechnet sind Mittelwerte ($n \geq 3$) mit Standardabweichung. Ausführliche Daten sind im Anhang Tabellen A12 (S. 248).

	Pf0-1 Proteinname/ Peptidsequenz	Oxidationsgrad (%)		Δ Oxidation (%)
		Kontrolle	Allicin	
4	Chaperon HscA SLLQAACAAK	5,4 $\pm$ 2,6	39,8 $\pm$ 21,6	34,4$\pm$19,9
5	DNA-Gyrase Untereinheit A AGADSCRPENLDPQYGLR	6,4 $\pm$ 2,0	56,1 $\pm$ 22,5	49,8$\pm$21,2
6	Leucyl-tRNA-Synthetase NNPELQAFIAECK	4,4 $\pm$ 3,2	44,4 $\pm$ 25,1	40,0$\pm$21,9
7	Peptide chain release factor 1 ITHIPTGTVVECQEER	5,4 $\pm$ 3,0	70,2 $\pm$ 22,0	64,8$\pm$19,0
8	RNA-Methyltransferase VACGAAEVIPLVAVTNLAR	5,0 $\pm$ 3,1	54,0 $\pm$ 30,5	49,0$\pm$27,7
9	Zink-Aufnahme-Regulationsprotein ISSLNAFVGCVHPK	5,9 $\pm$ 2,1	35,9 $\pm$ 21,4	30,0$\pm$20,0
10	HP 1791: DUF469-Domäne-haltiges Protein EAMEANGLGYVGDDFGLVCLQK	5,7 $\pm$ 2,4	40,1 $\pm$ 24,8	35,3$\pm$23,1
11	HP 3952: Pyrimidin/Purin-Nucleosid- Phosphorylase VAVDLAYLCEYRG	7,3 $\pm$ 2,0	91,9 $\pm$ 4,8	84,6$\pm$3,6

Das Chaperon GroEL, die Riboflavin-Synthase, die Biotin-Carboxylase der Acetyl-CoA-Carboxylase, die putative Ameisensäure-Dehydrogenase-Oxidoreduktase und die Ribose-5-Phosphat-Isomerase A wurden nur in *PfAR-1* stark nach der Allicin-Behandlung oxidiert und nicht in *Pf0-1* (Tabelle 64). Diese Proteine liegen bei der Kontrolle bis zu 10,0% oxidiert vor. Nach Allicin-Behandlung steigt der Anteil der oxidierten Proteine im Vergleich zur Kontrolle: bei Chaperon GroEL um 17,1%, bei putative Ameisensäure-Dehydrogenase-Oxidoreduktase um 30,3%, bei Riboflavin-Synthase um 33,6%, bei Biotin-Carboxylase der Acetyl-CoA-Carboxylase um 42,2%, und bei Ribose-5-Phosphat-Isomerase A um 49,6%. Die ausführlichen Daten sind im Anhang in der Tabelle A13 dargestellt (S. 249).

Tabelle 64. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-resistenten **PfAR-1** (und nicht in Allicin-anfälligen *Pf0-1*), detektiert in allen drei OxICAT-Experimenten. Dargestellt sind die Anteile der oxidierten Proteine nach Allicin-Behandlung und von der Kontrolle und deren Differenz als „ Δ Oxidation %“-Werte. Ausgerechnet sind die Mittelwerte ($n \geq 3$) mit Standardabweichung. Ausführlichen Daten sind im Anhang Tabellen A13 (S. 249).

	PfAR-1 Proteinname/ Peptidsequenz	Oxidationsgrad (%)		Δ Oxidation (%)
		Kontrolle	Allicin	
4	Biotin-Carboxylase der Acetyl-CoA-Carboxylase DLVRDEGFCK	4,5 $\pm$ 3,5	46,6 $\pm$ 3,0	42,2$\pm$2,4
5	Chaperon GroEL ALSKPCADFK	4,5 $\pm$ 3,2	21,6 $\pm$ 4,9	17,1$\pm$2,9
6	Putative Ameisensäure-Dehydrogenase-Oxidoreduktase GAQVVCINPLKER	10,0 $\pm$ 6,6	40,3 $\pm$ 9,8	30,3$\pm$3,3
7	Riboflavin-Synthase AVEFCIR	9,4 $\pm$ 8,3	43,1 $\pm$ 11,3	33,6$\pm$9,1
8	Ribose-5-Phosphat-Isomerase A SIVGVGTGSTANCFIDALAQHK	4,6 $\pm$ 4,4	54,2 $\pm$ 7,5	49,6$\pm$3,2

3.1.2. Sequenz-Analyse des oxidierten Peptides

Im nächsten Schritt wurde die Aminosäuresequenz in der Nähe des oxidierten Cysteins genauer untersucht, um Gemeinsamkeiten und mögliche Zusammenhänge zwischen allen Allicin-Targets zu finden.

Als erstes wurde nach möglichen konservierten Aminosäuren bei den Oxidationszielen in *E. coli*, *Pf0-1* und *PfAR-1* gesucht. Dafür wurde das Online-Tool PRALINE benutzt (www.ibivu.cs.vu.nl/programs/pralinewww/, Simossis & Heringa, 2005). Bis zu 35 Aminosäuren *downstream* und *upstream* von dem oxidierten Cystein wurden in einem multiplen Sequenzvergleich analysiert (Abbildung 31). Es wurden keine konservierten Aminosäuren in diesem Sequenzbereich gefunden, mit Ausnahme des schwach konservierten Leucins an Position 50.

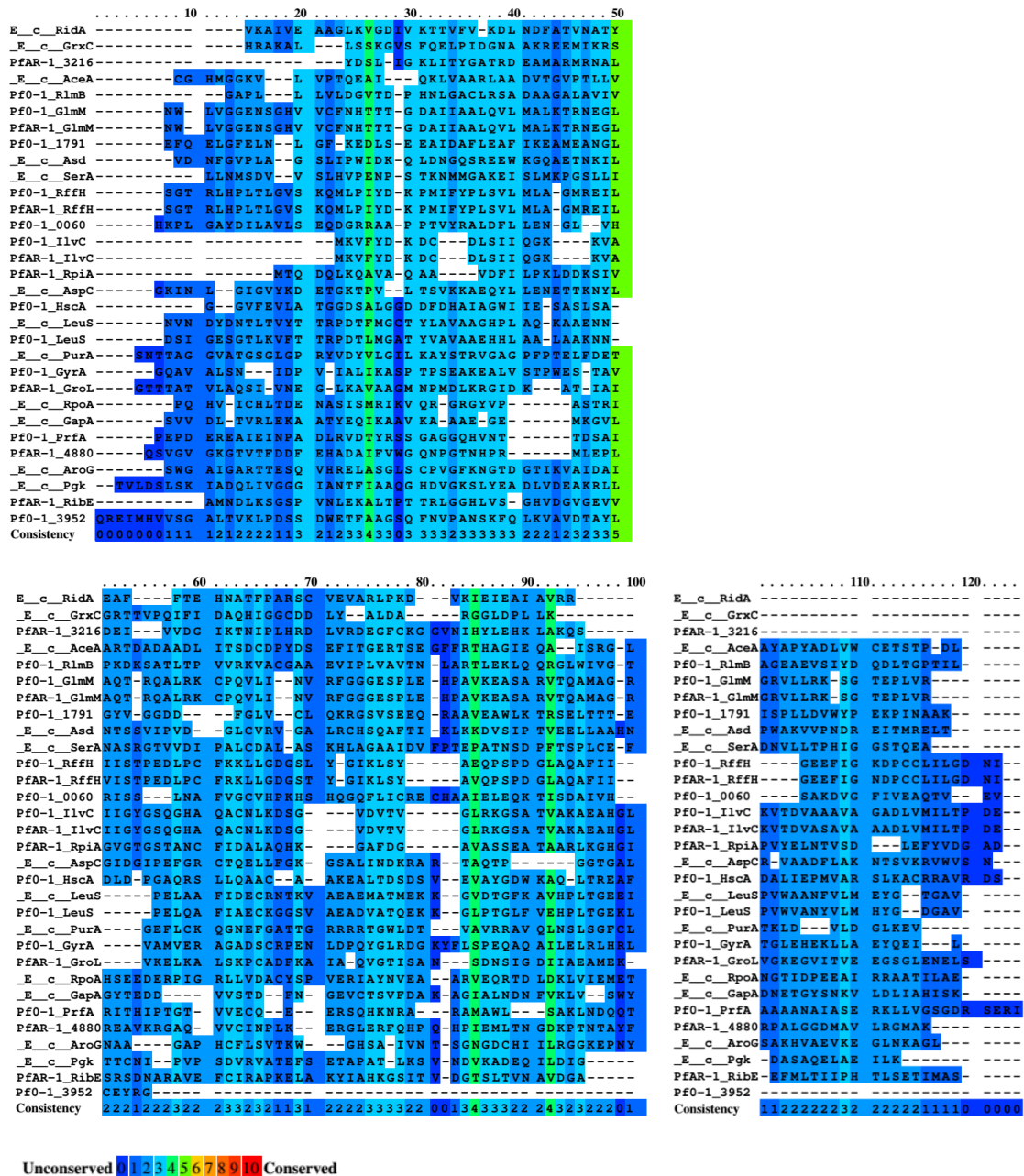


Abbildung 31. Die umgebende Aminosäuresequenz von Allicin oxidiertem Cystein ist nicht konserviert. Multipler Sequenzvergleich der Oxidationsziele in *E. coli*, *Pf0-1* und *PfAR-1* wurde mit Hilfe von Online-Tool PRALINE durchgeführt (www.ibivu.cs.vu.nl/programs/pralinewww/, Simossis & Heringa, 2005). Der Grad der Konservierung ist durch die Farbe wiedergegeben: blau - nicht konserviert, rot - sehr stark konserviert.

Im nächsten Schritt wurde die sekundäre Proteinstruktur, in der sich das oxidierte Cystein befindet, festgestellt. Für die Vorhersage der Struktur wurde das Online-Tool YASPIN verwendet (www.ibivu.cs.vu.nl/programs/yaspinwww/, Lin et al., 2004). In acht Allicin-Targets (26%) liegt oxidiertes Cystein in einem *Coil* (Bereich ohne definierte Sekundärstruktur), in 14 Fällen (45%) in einer Helix und in 9 Fällen (29%) in einem Faltblatt (Tabelle 65) vor. Das bedeutet, dass es keine bevorzugte Sekundärstruktur, in der sich das oxidierte Cystein befindet, gibt.

Tabelle 65. Sekundärstruktur, in der sich das durch Allicin-Behandlung oxidierte Cystein befindet.

<i>Pf0-1</i>	Sekundär- struktur	<i>PfAR-1</i>	Sekundär- struktur	<i>E. coli</i>	Sekundär- struktur
GlmM	<i>Coil</i>	GlmM	Faltblatt	RidA	Helix
RffH	Helix	RffH	Helix	AceA	<i>Coil</i>
IlvC	Helix	IlvC	Helix	AspC	Helix
HscA	Helix	GroL	<i>Coil</i>	RpoA	<i>Coil</i>
GyrA	<i>Coil</i>	RibE	Faltblatt	LeuS	Helix
PrfA	Faltblatt	RpiA	Helix	Asd	Faltblatt
LeuS	Helix	PflAR1_3216	Helix	AroG	Faltblatt
RlmB	<i>Coil</i>	PflAR1_4880	Faltblatt	GapA	<i>Coil</i>
Pfl01_1791	Faltblatt			GrxC	Helix
Pfl01_3952	Faltblatt			SerA	Helix
Pfl01_0060	Faltblatt			PurA	Helix
				Pgk	<i>Coil</i>

Als Nächstes wurde die chemische Polarität der zu dem Cystein benachbarten Aminosäuren angeschaut. Die Umgebung von sechs direkt benachbarten Aminosäuren wurde untersucht. Zur Auswertung wurde die Anzahl der polaren/hydrophilen (Arginin, Lysin, Aspartat, Glutamin, Asparagin, Glutamat und Histidin) und unpolaren/hydrophoben Aminosäuren (Isoleucin, Phenylalanin, Valin, Leucin und Alanin) ausgezählt (Kyte & Doolittle, 1982; Tabelle 66 und Tabelle 67)¹. Als Kontrolle wurden die Cysteine in den zu den Allicin-Targets homologen Proteinen (in *E. coli*, *Pf0-1* und *PfAR-1*) ausgesucht² und entsprechend analysiert (Tabelle 68 und Tabelle A46 im Anhang, S. 289). Wenn man die Polarität der sechs benachbarten Aminosäuren von oxidiertem Cystein und dem Cystein, das nicht durch Allicin oxidiert wurde, betrachtet, sieht man keinen Unterschied (vgl. Tabelle 67 und Tabelle 68). 37% bzw. 32% der Aminosäuren sind polar, 39% bzw. 35% der Aminosäuren sind unpolar, und 24% bzw. 32% der Aminosäuren sind neutral (beim Allicin-Target bzw. bei den nicht oxidierten Homologen). Wenn man die direkt benachbarte Aminosäure anschaut, fällt auf, dass bei *PfAR-1* ein überdurchschnittlich höherer Anteil an unpolaren Aminosäuren sowohl an dem durch Allicin oxidierten Cystein von 56%, aber auch an dem nicht oxidierten Cystein von 60% aufweist. Zusammenfassend, Cysteine, die von Allicin oxidiert werden, befinden sich nicht in einer besonders polaren oder unpolaren Umgebung.

¹ Die hydrophoben Aminosäuren Methionin und Cystein waren nicht als benachbarte Aminosäuren vorhanden.

² s. Anhang Tabellen A47 und A48, S. 290

3. Ergebnisse

Tabelle 66. Chemische Polarität der Aminosäuren, die zu dem nach Allicin-Behandlung oxidierten Cystein benachbart sind. Drei Aminosäuren rechts und links von dem Cystein (C, gelb dargestellt) sind gezeigt. Die sieben polaren/hydrophilen Aminosäuren (R: Arginin, K: Lysin, D: Aspartat, Q: Glutamin, N: Asparagin, E: Glutamat, H: Histidin) sind blau dargestellt. Die fünf unpolaren/hydrophoben Aminosäuren (I: Isoleucin, V: Valin, L: Leucin, F: Phenylalanin, A: Alanin) sind orange dargestellt.

<i>Pf0-1</i>	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	<i>PfAR-1</i>	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	<i>E. coli</i>	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3
GlmM	L	R	K	C	P	Q	V	GlmM	L	R	K	C	P	Q	V	RidA	A	R	S	C	V	E	V
RffH	D	L	P	C	F	R	K	RffH	D	L	P	C	F	R	K	AceA	T	S	D	C	D	P	Y
IlvC	A	Q	A	C	N	L	K	IlvC	A	Q	A	C	N	L	K	AspC	F	G	R	C	T	Q	E
HscA	Q	A	A	C	A	A	K	GroL	S	K	P	C	A	D	F	RpoA	V	D	A	C	Y	S	P
GyrA	A	D	S	C	R	P	E	RibE	V	E	F	C	I	R	A	LeuS	I	D	E	C	R	N	T
Pfl01 0060	F	V	G	C	V	H	P	PflAR1 3216	E	G	F	C	K	G	G	Asd	D	G	L	C	V	R	V
PrfA	V	V	E	C	Q	E	E	PflAR1 4880	Q	V	V	C	I	N	P	AroG	A	P	H	C	F	L	S
LeuS	I	A	E	C	K	G	G	RpiA	T	A	N	C	F	I	D	GapA	G	E	V	C	T	S	V
RlmB	K	V	A	C	G	A	A									GrxC	I	G	G	C	D	D	L
Pfl01 1791	G	L	V	C	L	Q	K									SerA	P	A	L	C	D	A	L
Pfl01 3952	A	Y	L	C	E	Y	R									PurA	E	F	L	C	K	Q	G
																Pgk	L	T	T	C	N	I	P

Tabelle 67. Umgebung der oxidierten Cysteine (Allicin-Targets) in Bezug auf die chemische Polarität der benachbarten Aminosäuren. Die ausgerechneten prozentualen Anteile der polaren, unpolaren und neutralen Aminosäuren (AS) sind dargestellt.

AS direkt am Cystein (-1 & +1)	Polare/hydrophile AS	Unpolare/hydrophobe AS	neutrale AS
<i>Pf0-1</i>	36%	41%	23%
<i>PfAR-1</i>	25%	56%	19%
<i>E. coli</i>	42%	33%	25%
Durchschnitt	35%	42%	23%
Benachbarte AS (-3, -2, -1, +1, +2, +3)	Polare/hydrophile AS	Unpolare/hydrophobe AS	neutrale AS
<i>Pf0-1</i>	39%	42%	18%
<i>PfAR-1</i>	40%	42%	19%
<i>E. coli</i>	33%	35%	32%
Durchschnitt	37%	39%	24%

3. Ergebnisse

Tabelle 68. Umgebung der nicht-oxidierten Cysteine (kein Allicin-Target) in Bezug auf die chemische Polarität der benachbarten Aminosäuren. Die ausgerechneten prozentualen Anteile der polaren, unpolaren und neutralen Aminosäuren (AS) sind dargestellt.

AS direkt am Cystein (-1 & +1)	Polare/hydrophile AS	Unpolare/hydrophobe AS	neutrale AS
<i>Pf0-1</i>	43%	36%	21%
<i>PfAR-1</i>	40%	60%	0%
<i>E. coli</i>	43%	36%	21%
Durchschnitt	42%	39%	18%
Benachbarten AS (-3, -2, -1, +1, +2, +3)	Polare/hydrophile AS	Unpolare/hydrophobe AS	neutrale AS
<i>Pf0-1</i>	31%	29%	40%
<i>PfAR-1</i>	33%	40%	27%
<i>E. coli</i>	33%	40%	26%
Durchschnitt	32%	35%	32%

Die umgebenden Aminosäuren wurden ebenfalls in Bezug auf die Säure-Basen-Eigenschaften untersucht (Tabelle 69). Die sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat sind in 13% der Fälle direkte Nachbarn des oxidierten Cysteins (Tabelle 70). Die basischen Aminosäuren Arginin, Tyrosin und Lysin sind mit einer ähnlichen Häufigkeit von 15% an dem oxidierten Cystein direkt benachbart. Im Fall der sechs benachbarten Aminosäuren sieht es ähnlich aus. Im Vergleich dazu sind die zu dem Nicht-Target-Cystein direkt benachbarten Aminosäuren in 24% der Fälle sauer (Tabelle 71). Die basischen Aminosäuren kommen mit der gleichen Häufigkeit bei dem Nicht-Target-Cystein wie bei dem Target-Cystein. Dies kann bedeuten, dass die sauren direkt an Cystein anliegenden Aminosäuren die Wahrscheinlichkeit der Oxidation durch das Allicin verringern können.

Tabelle 69. Säure-Basen-Eigenschaften der Aminosäuren, die zu dem nach Allicin-Behandlung oxidierten Cystein benachbart sind. Drei Aminosäuren rechts und links von Cystein (C, gelb dargestellt) sind gezeigt. Die drei basischen Aminosäuren (R: Arginin, K: Lysin, Y: Tyrosin) sind blau dargestellt. Die zwei sauren Aminosäuren (D: Aspartat, E: Glutamat) sind orange dargestellt.

<i>Pf0-1</i>	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	<i>PfAR-1</i>	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	<i>E. coli</i>	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3
GlmM	L	R	K	C	P	Q	V	GlmM	L	R	K	C	P	Q	V	RidA	A	R	S	C	V	E	V
RffH	D	L	P	C	F	R	K	RffH	D	L	P	C	F	R	K	AceA	T	S	D	C	D	P	Y
IlvC	A	Q	A	C	N	L	K	IlvC	A	Q	A	C	N	L	K	AspC	F	G	R	C	T	Q	E
HscA	Q	A	A	C	A	A	K	GroL	S	K	P	C	A	D	F	RpoA	V	D	A	C	Y	S	P
GyrA	A	D	S	C	R	P	E	RibE	V	E	F	C	I	R	A	LeuS	I	D	E	C	R	N	T
PfI01 0060	F	V	G	C	V	H	P	PfIAR1 3216	E	G	F	C	K	G	G	Asd	D	G	L	C	V	R	V
PrfA	V	V	E	C	Q	E	E	PfIAR1 4880	Q	V	V	C	I	N	P	AroG	A	P	H	C	F	L	S
LeuS	I	A	E	C	K	G	G	RpiA	T	A	N	C	F	I	D	GapA	G	E	V	C	T	S	V
RlmB	K	V	A	C	G	A	A									GrxC	I	G	G	C	D	D	L
PfI01 1791	G	L	V	C	L	Q	K									SerA	P	A	L	C	D	A	L
PfI01 3952	A	Y	L	C	E	Y	R									PurA	E	F	L	C	K	Q	G
																Pgk	L	T	T	C	N	I	P

Tabelle 70. Umgebung des oxidierten Cysteins (Allicin-Targets) in Bezug auf die Säure-Basen-Eigenschaften der benachbarten Aminosäuren. Die ausgerechneten prozentualen Anteile der sauren, basischen und neutralen Aminosäuren (AS) sind dargestellt.

AS direkt am Cystein (-1 & +1)	Basische AS	saure AS	neutrale AS
<i>Pf0-1</i>	14%	14%	73%
<i>PfAR-1</i>	13%	0%	88%
<i>E. coli</i>	17%	21%	63%
Durchschnitt	15%	13%	73%
Benachbarten AS (-3, -2, -1, +1, +2, +3)	Basische AS	saure AS	neutrale AS
<i>Pf0-1</i>	18%	12%	70%
<i>PfAR-1</i>	17%	10%	73%
<i>E. coli</i>	8%	18%	74%
Durchschnitt	14%	14%	72%

Tabelle 71. Umgebung des nicht-oxidierten Cysteins (keine Allicin-Targets) in Bezug auf die Säure-Basen-Eigenschaften der benachbarten Aminosäuren. Die ausgerechneten prozentualen Anteile der sauren, basischen und neutralen Aminosäuren (AS) sind dargestellt.

AS direkt am Cystein (-1 & +1)	Basische AS	saure AS	neutrale AS
<i>Pf0-1</i>	14%	29%	57%
<i>PfAR-1</i>	10%	30%	60%
<i>E. coli</i>	21%	14%	64%
Durchschnitt	16%	24%	61%
Benachbarten AS (-3, -2, -1, +1, +2, +3)	Basische AS	saure AS	neutrale AS
<i>Pf0-1</i>	7%	19%	74%
<i>PfAR-1</i>	13%	13%	73%
<i>E. coli</i>	7%	17%	76%
Durchschnitt	9%	17%	75%

3.1.3. Untereinheit A der DNA-Gyrase als Allicin-Target

Für weitere Untersuchungen wurde die Untereinheit A der DNA-Gyrase (GyrA) als Angriffsziel des Allicins ausgesucht, da die DNA-Gyrase ein in der Medizin etabliertes Angriffsziel für Antibiotika darstellt. Die bei dem OxICAT-Experiment detektierten Massen-Spektren den ICAT-markierten Peptide der Untereinheit A der DNA-Gyrase sind in Abbildung 32 dargestellt. Das detektierte Peptid AGADSCRPENLDPQYGLR³⁺ ist dreifach positiv geladen. Das ICAT-Label ist an dem Cystein 433 gebunden. Die Massen-Differenz zwischen den reduzierten (leichtes ICAT-Label, Peak-Masse 730,69 m/z) und den oxidierten Peptiden (schweres ICAT-Label, Peak-Masse 733,70 m/z) beträgt 9 Dalton oder 3 m/z bei der Peptid-Ladung von 3. Cys₄₃₃ in *Pf0-1* ist fast vollständig reduziert bei der Kontrolle (A) und fast vollständig oxidiert nach Allicin-Behandlung (B). In *PfAR-1* ist Cys₄₃₃ bei der Kontrolle (C) und nach Allicin-Behandlung (D) fast vollständig reduziert. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse einer der drei Versuchswiederholungen.

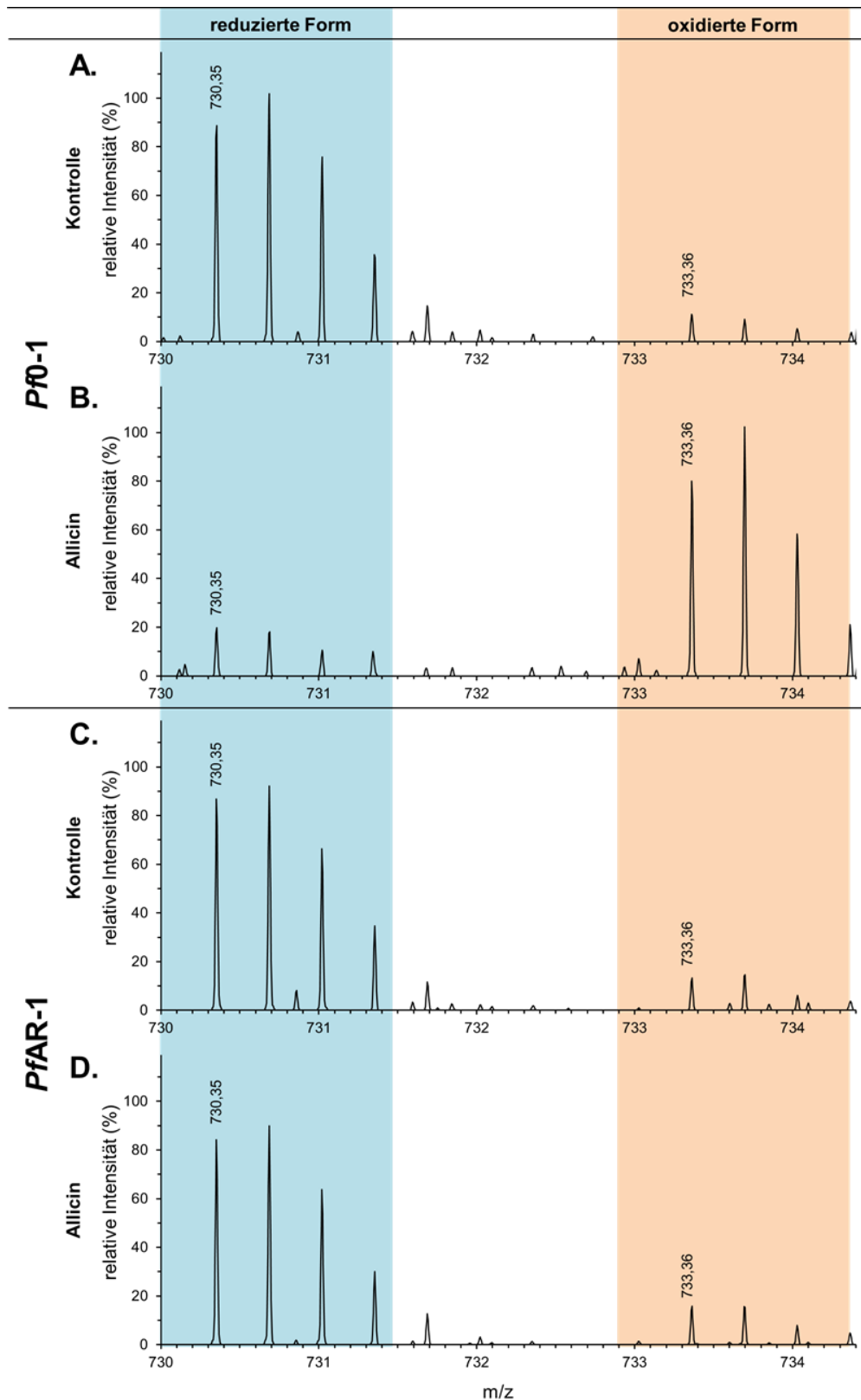


Abbildung 32. Massen-Spektren vom OxICAT-markierten DNA-Gyrase-Peptid AGADSCRPENLDPQYGLR³⁺ mit dem Cys₄₃₃ in unbehandelten und Allicin-behandelten *Pf0-1* und *PfAR-1*. Die Massen-Differenz zwischen den reduzierten (leichtes ICAT-Label, blau hinterlegt, bspw. Peak-Masse 730,69 m/z) und den oxidierten Peptiden (schweres ICAT-Label, rot hinterlegt, bspw. Peak-Masse 733,70 m/z) beträgt 9 Dalton oder 3 m/z (bei der Peptid-Ladung von 3). Cys₄₃₃ in *Pf0-1* ist fast vollständig reduziert bei der Kontrolle (A) und fast vollständig oxidiert nach Allicin-Behandlung (B). In *PfAR-1* ist Cys₄₃₃ bei der Kontrolle (C) und nach Allicin-Behandlung (D) fast vollständig reduziert. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse einer der drei Versuchswiederholungen. Die Ergebnisse der drei Versuchswiederholungen sind in der Tabelle 72 zu finden (modifiziert nach Reiter et al., 2019).

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der drei Versuchswiederholungen des OxICAT-Experiments sind in Tabelle 72 zu finden. Bei *PfAR-1* liegt GyrA bei den Kontroll-Bedingungen durchschnittlich zu 6,5% und nach Allicin-Behandlung zu 10,8% oxidiert vor. Somit verändert das Allicin den Oxidationsgrad der GyrA in *PfAR-1* um 4,3%. Bei *Pf0-1* unter Kontroll-Bedingungen ist die Untereinheit A der DNA-Gyrase zur 6,4% oxidiert. Nach Allicin-Behandlung steigt der Anteil der oxidierten GyrA um 49,8% und somit der Anteil der oxidierten GyrA auf 56,1%.

Tabelle 72. Oxidationszustand der Untereinheit A der DNA-Gyrase in Allicin-resistenten *PfAR-1* und Allicin-anfälligen *Pf0-1* bei Kontroll-Bedingungen und bei Allicin-Behandlung, ermittelt im OxICAT-Experiment. Dargestellt sind die einzelnen Werte, sowie Mittelwerte mit Standardabweichungen (StAbw.).

	<i>Pf0-1</i>			<i>PfAR-1</i>		
	Oxidationsgrad (%)		Δ Oxidation (%)	Oxidationsgrad (%)		Δ Oxidation (%)
	Kontrolle	Allicin		Kontrolle	Allicin	
1. Exp.	6,8	78,6	71,8	11,2	12,8	1,6
2. Exp.	4,2	33,7	29,5	0,9	6,3	5,4
3. Exp.	8,1	56,1	48,0	7,4	13,4	6,0
Mittelwert ± StAbw.	6,4±2,0	56,1±22,5	49,8±21,2	6,5±5,2	10,8±3,9	4,3±2,4

3.2. Einfluss des Allicins auf die Aktivität der DNA-Gyrase

In diesem Abschnitt wurde der Einfluss des Allicins auf die Aktivität der DNA-Gyrase untersucht. Dafür wurden *in vitro* Aktivitätstests mit DNA-Gyrase aus *E. coli*, *Pf0-1* und *PfAR-1* etabliert und anschließend die inhibitorische Wirkung von Allicin, Nalidixinsäure und Levofloxacin auf DNA-Gyrase-Aktivität untersucht. Anschließend wurde getestet, ob die GyrA von *PfAR-1* in Zusammenhang zu der Allicin-Resistenz steht. Dafür wurden GyrA-Austauschmutanten von *PfAR-1* und *Pf0-1* hergestellt. Es wurde das *gyrA*-Gen im Genom von *PfAR-1* durch das Gen aus *Pf0-1* ausgetauscht und dementsprechend auch die *Pf0-1* Austauschmutante mit dem *gyrA*-Gen aus *PfAR-1* hergestellt. Anschließend wurden die Allicin-, Nalidixinsäure-, Levofloxacin- und Novobiocin-Resistenz bzw. -Anfälligkeit der GyrA-Austauschmutanten untersucht.

3.2.1. Allicin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus *E. coli in vitro*

Im ersten Schritt wurde zunächst der *in vitro* Aktivitätstest für DNA-Gyrase etabliert (Abbildung 33, s. Kap. 2.2.7.4 DNA-Gyrase-Aktivitäts-Test).

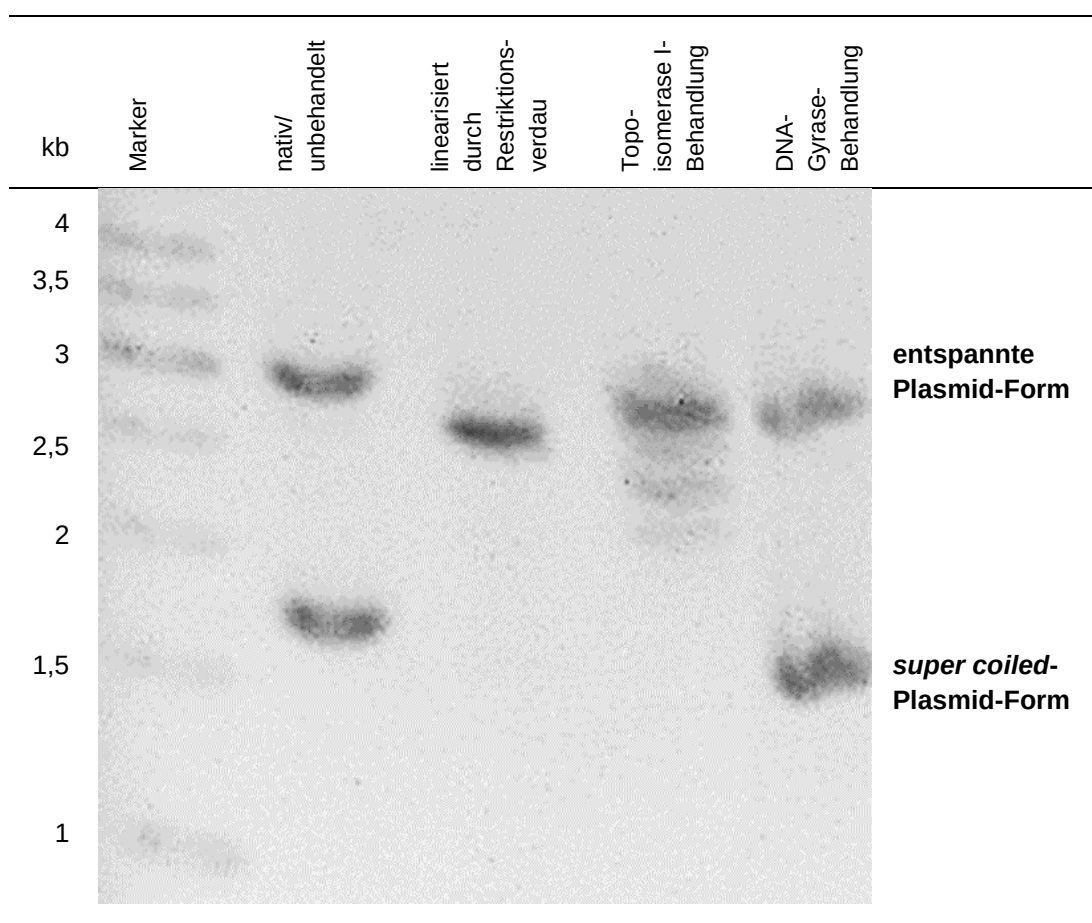


Abbildung 33. Plasmid pUC18 wird durch die Behandlung mit dem Enzym Topoisomerase I in die entspannte Form überführt und durch die Behandlung mit DNA-Gyrase aus *E. coli* wird das Plasmid aus entspannter in die *super coiled*-Form überführt (Hübbers, 2016) (s. Kap. 2.2.7.4 DNA-Gyrase-Aktivitäts-Test). Als DNA-Marker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet.

3. Ergebnisse

In dem Test wurde die Plasmid-DNA von pUC18 verwendet. Nach der Plasmid-Isolation befindet sich die Plasmid-DNA zum großen Teil in *super coiled*-Form aber auch in der entspannten Form. Um die Plasmid-DNA in die entspannte Form zu überführen, wurde sie mit dem Enzym Topoisomerase I (New England BioLabs) behandelt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in der entspannten Form durch die Behandlung mit DNA-Gyrase aus *E. coli* (New England BioLabs) in die *super coiled*-Form überführt. Die Proteinkonzentration der DNA-Gyrase aus *E. coli* wurde mithilfe des Bradford-Assays bestimmt und beträgt 0,16 µg/µl (s. Anhang Tabelle A14, S. 250, s. Kap. 2.2.7.2 Bradford-Assay).

In dem nächsten Schritt wurde die Nalidixinsäure-Konzentration bestimmt, die im *in vitro*-Assay zur Hemmung der DNA-Gyrase aus *E. coli* führt (Abbildung 34). Es wurden die Nalidixinsäure-Konzentrationen zwischen 0,1 mM und 1 mM untersucht. Die 0,1 mM Nalidixinsäure zeigte keinen Einfluss auf die Enzym-Aktivität. Bei den Konzentrationen 0,3 mM-0,5 mM ist die Aktivität der DNA-Gyrase aus *E. coli* teilweise und bei der Konzentration von 0,75 mM vollständig inhibiert.

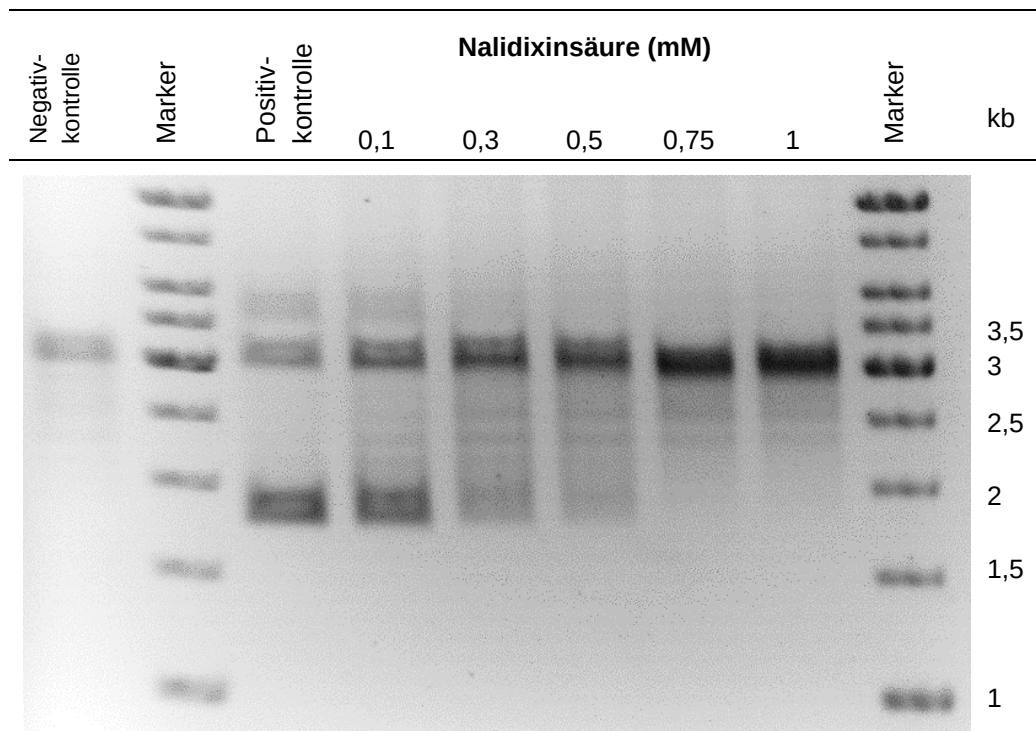


Abbildung 34. Nalidixinsäure inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus *E. coli*. Das pUC18-Plasmid in entspannter Form wird durch die Behandlung mit der DNA-Gyrase in die *super coiled* – Form überführt (Positivkontrolle). Die Nalidixinsäure in Konzentration von 0,3-0,5 mM inhibiert die DNA-Gyrase-Aktivität teilweise und ab 0,75 mM vollständig. Bei der Negativkontrolle wurde der Ansatz nach der DNA-Gyrase-Zugabe durch Hitze (20 min bei 65°C) inaktiviert (s. Kap. 2.2.7.4 DNA-Gyrase-Aktivitäts-Test). Als DNA-Marker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (modifiziert nach Reiter et al., 2019).

Nachfolgend wurde die inhibitorische Allicin-Konzentration der DNA-Gyrase aus *E. coli* bestimmt (Abbildung 35). Die Allicin-Konzentrationen von 0,1 mM und 0,3 mM zeigten keinen Einfluss auf die Aktivität der DNA-Gyrase. Ab 0,5 mM Allicin ist die Aktivität der DNA-Gyrase vollständig inhibiert.

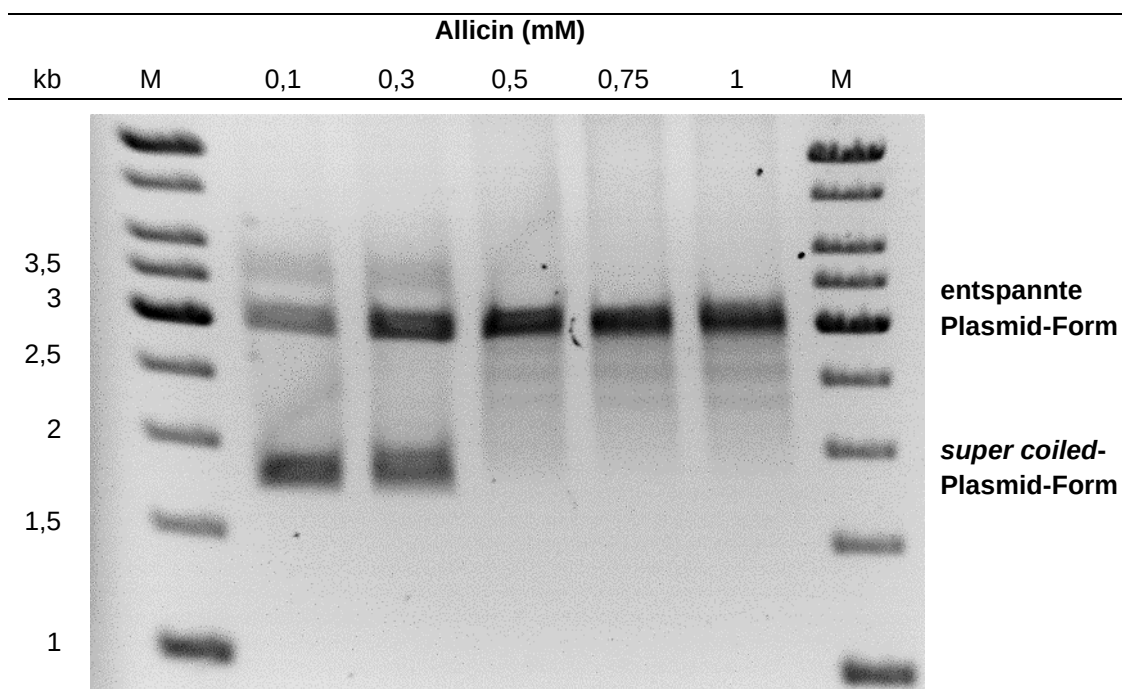


Abbildung 35. Allicin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus *E. coli*. Das pUC18-Plasmid in entspannter Form wird durch die Behandlung mit der DNA-Gyrase in die *super coiled* – Form überführt. Allicin inhibiert ab der Konzentration von 0,5 mM die DNA-Gyrase-Aktivität (s. Kap. 2.2.7.4 DNA-Gyrase-Aktivitäts-Test). Als DNA-Marker (M) wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (modifiziert nach Reiter et al., 2019).

Anschließend wurde die effektive Konzentration von Levofloxacin bestimmt (Abbildung 36). Levofloxacin ist in geringeren Konzentrationen im Vergleich zu Nalidixinsäure und Allicin wirksam und inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus *E. coli* schon bei 0,5 μ M vollständig.

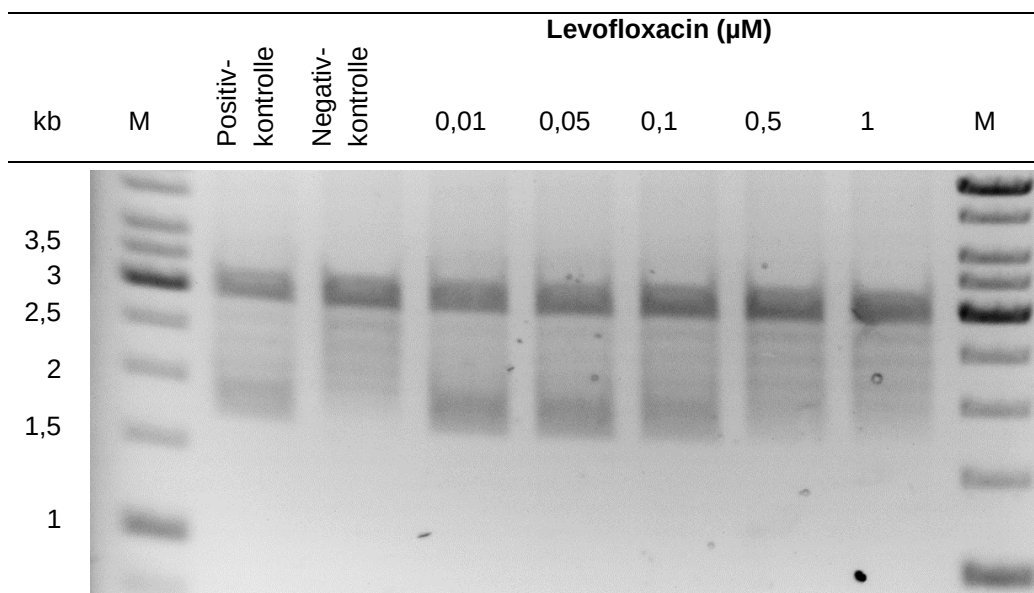


Abbildung 36. Levofloxacin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase bei *E. coli*. Das pUC18-Plasmid in entspannter Form wird durch die Behandlung mit der DNA-Gyrase in die *super coiled* – Form überführt (Positivkontrolle). Bei der Negativkontrolle wurde der Ansatz nach der DNA-Gyrase-Zugabe durch Hitze (20 min bei 65°C) inaktiviert. Levofloxacin in Konzentrationen von 0,01-0,1 μ M inhibiert die DNA-Gyrase-Aktivität teilweise und ab 0,5 μ M vollständig (s. Kap. 2.2.7.4 DNA-Gyrase-Aktivitäts-Test). Als DNA-Marker (M) wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet.

3.2.2. Allicin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus *Pf0-1* und *PfAR-1* *in vitro*

Aufreinigung

Um den Einfluss des Allicins auf die Aktivität der DNA-Gyrase aus *Pf0-1* und *PfAR-1* zu untersuchen und untereinander zu vergleichen, wurde die Aufreinigung des Enzyms aus *Pf0-1* und *PfAR-1* mittels Ultrazentrifugation und anschließender Affinitätschromatografie mittels Novobiocin-Agarose-Säule etabliert (s. Kap. 2.2.7.1 DNA-Gyrase-Aufreinigung). Die Proben aus den Aufreinigungs-Schritten und die aufgereinigte DNA-Gyrase wurde mittels SDS-PAGE (s. Kap. 2.2.7.3 SDS-PAGE) aufgetrennt (für Aufreinigung aus *PfAR-1* in Abbildung 37).

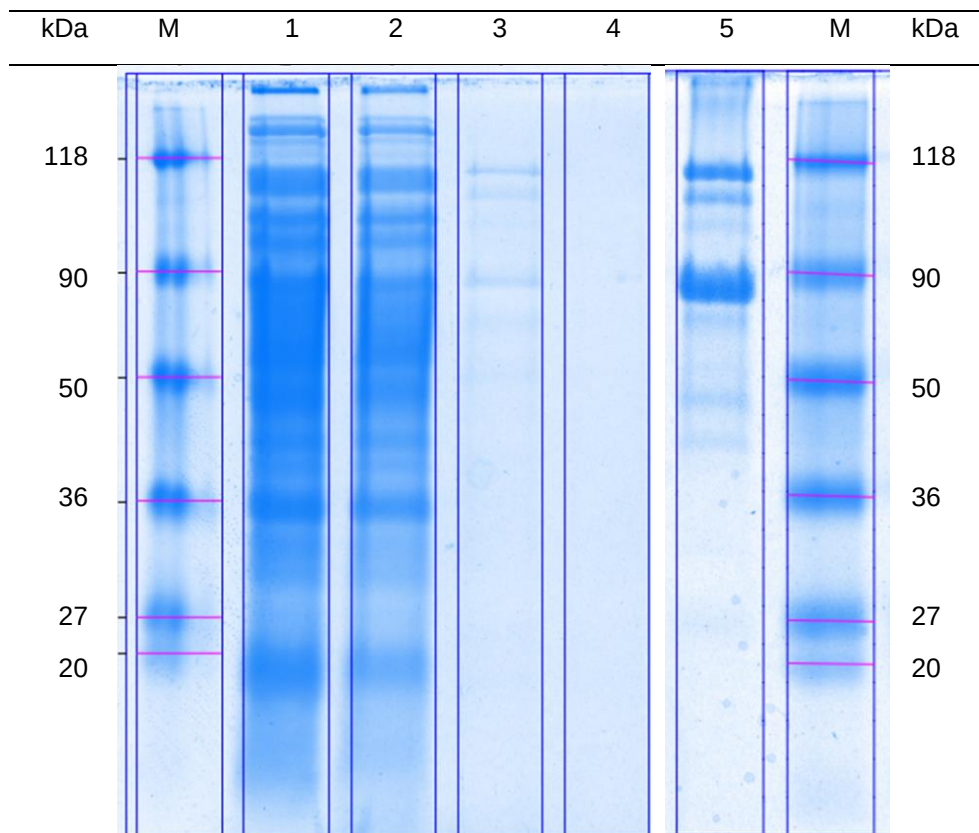


Abbildung 37. Aufreinigungsschritte der DNA-Gyrase aus *PfAR-1*, die Proben wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt. (1) Probe nach dem Schritt der Ultrazentrifugation, (2) Durchfluss durch die Novobiocin-Agarose-Säule, (3) DNA-Gyrase-haltiges Eluat der Novobiocin-Agarose-Säule, (4) Durchfluss durch die Amicon-Filter zur Aufkonzentrierung der DNA-Gyrase, (5) mittels Amicon-Filter aufkonzentrierte DNA-Gyrase. Aufgetragen sind 20 μ l bei Proben 1-4 und 5 μ l der DNA-Gyrase (Probe 5) auf ein Bis-TRIS-SDS-PAGE-Gel. Es wurde der Fermentas SM0441 als Größenmarker (M) verwendet (s. Kap. 2.2.7.3 SDS-PAGE).

Nach den zwei Aufreinigungsschritten mittels Ultrazentrifugation enthielt der Überstand mehrere Proteine in hohen Konzentrationen (Abbildung 37-1). Die meisten Proteine binden nicht auf der Novobiocin-Agarose-Säule und sind im Durchfluss zu sehen (Abbildung 37-2). Das Eluat enthielt wenige Proteine in geringeren Konzentrationen. Um die Protein-Konzentration des Eluats und somit der DNA-Gyrase zu erhöhen, wurde die Probe mit Hilfe der Amicon-Filter, die Proteine kleiner als 100 kDa durchlassen (Abbildung 37-4), aufkonzentriert (Abbildung 37-5). Auf dem Gel sind etwa acht

3. Ergebnisse

Protein-Banden deutlich zu sehen. Drei Banden davon (ca. 80 kDa, 100 kDa und 110 kDa) haben eine höhere Konzentration im Vergleich zu den anderen. Die Untereinheit A der DNA-Gyrase ist bei *Pf0-1* und *PfAR-1* ca. 100 kDa und die Untereinheit B ca. 90 kDa groß (s. Anhang Tabelle A15, S. 250). Die Gesamtgröße des Enzyms, das jeweils aus zwei Untereinheiten A und B besteht, beträgt ca. 380 kDa. Man kann nicht eindeutig sagen, welche Protein-Banden auf dem Gel den Untereinheiten A und B der DNA-Gyrase entsprechen. Vermutlich sind zwei der drei Banden die Untereinheiten der DNA-Gyrase.

Bei der Aufreinigung wurde Lysozym verwendet, das ebenfalls mit SDS-PAGE aufgetrennt wurde, um die Kontamination der aufgereinigten Probe mit Lysozym zu überprüfen (Abbildung 38). Die Größe des Lysozyms ist 14,3 kDa, was der Bandengröße entspricht.

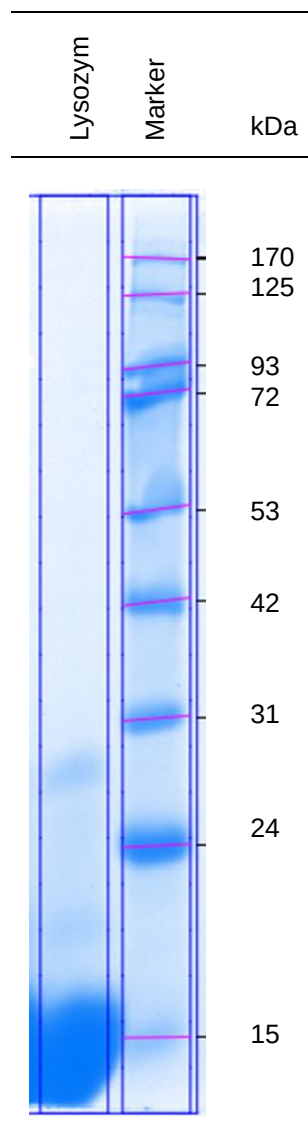


Abbildung 38. SDS-PAGE des Lysozyms, das bei der Aufreinigung der DNA-Gyrase verwendet wurde. 5 µl von 10 mg/ml Lysozym-Lösung wurde auf BisTRIS-SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Es wurde der Größenmarker BlueStar verwendet (s. Kap. 2.2.7.3 SDS-PAGE).

3. Ergebnisse

Im nächsten Schritt wurden jeweils 5 µl der aufgereinigten Proben der DNA-Gyrase aus *Pf0-1* und *PfAR-1* auf einem SDS-Gel aufgetragen (Abbildung 39). Die Protein-Konzentration der aufgereinigten Proben, die bei den weiteren Aktivitäts-Assays verwendet wurde, wurde mittels Bradford-Assay bestimmt (s. Kap. 2.2.7.2 Bradford-Assay). Die Proteinkonzentration der DNA-Gyrase-Aufreinigung aus *Pf0-1* und aus *PfAR-1* liegen nah beieinander und betragen 0,35 µg/µl bei *Pf0-1* und 0,37 µg/µl bei *PfAR-1* (s. Anhang Tabelle A14, S. 250).

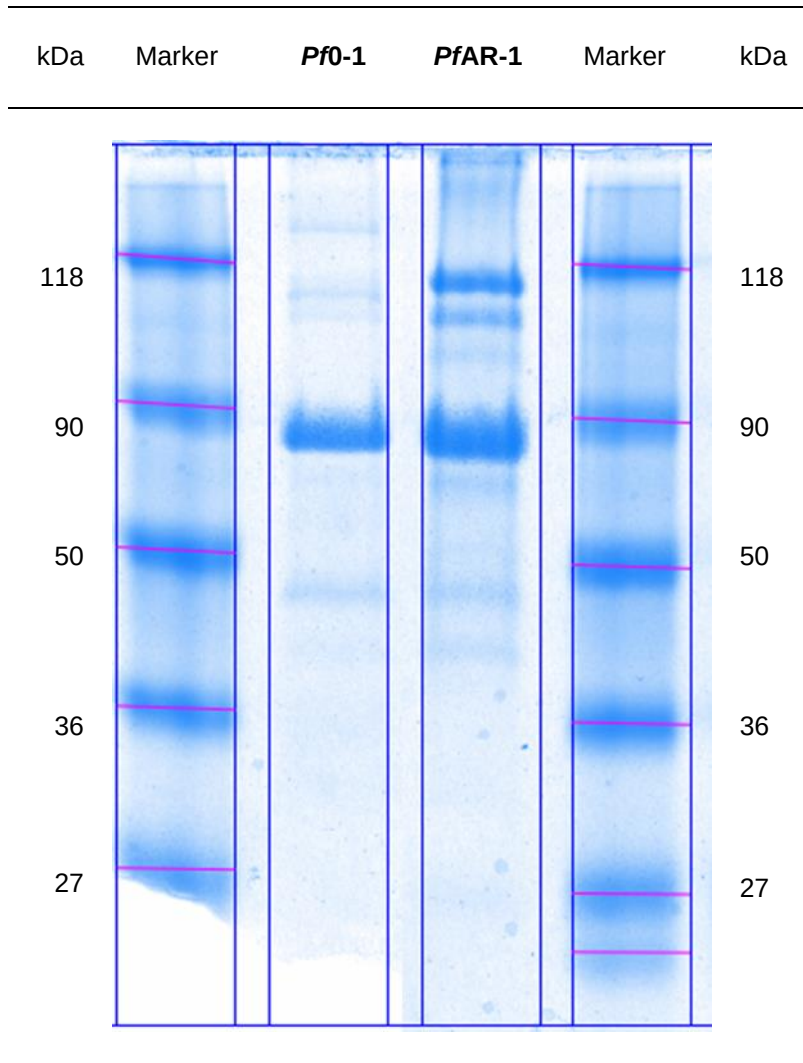


Abbildung 39. Aufgereinigte DNA-Gyrase aus *Pf0-1* und *PfAR-1*. Aufgetragen sind jeweils 5 µl der aufgereinigten Enzyme auf SDS-PAGE-Gel. Es wurde der Größenmarker BlueStar verwendet (s. Kap. 2.2.7.3 SDS-PAGE und 2.2.7.1 DNA-Gyrase-Aufreinigung).

Aktivitätstest

Die Aktivität der aus *Pf0-1* und *PfAR-1* aufgereinigten DNA-Gyrase wurde wie oben für DNA-Gyrase aus *E. coli* beschrieben untersucht: das pUC18-Plasmid in der entspannten Form wurde mit der DNA-Gyrase inkubiert und das Überführen in die *super coiled*-Form mittels Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft (s. Kap. 2.2.7.4 DNA-Gyrase-Aktivitäts-Test).

Als erstes wurde die Aktivität der aufgereinigten DNA-Gyrase aus *Pf0-1* und *PfAR-1* überprüft (Abbildung 40). Im Test wurden jeweils 3 µl des aufgereinigten Enzyms eingesetzt, was ca. 1 µg entspricht. Als Negativkontrolle wurde das in die entspannte Form überführte Plasmid pUC18 ohne Zugabe von DNA-Gyrase über 18 h bei 28°C inkubiert. Nach der Behandlung mit den aufgereinigten Enzymen wurde das Plasmid in die *super coiled*-Form überführt.

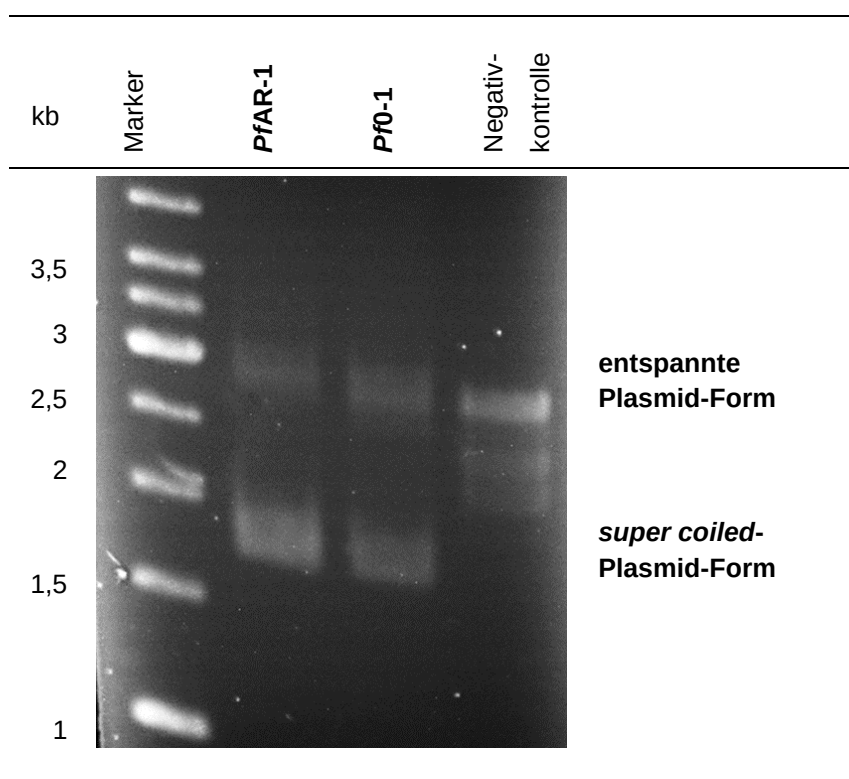


Abbildung 40. Nach der Aufreinigung weisen die DNA-Gyrase aus *Pf0-1* und *PfAR-1* enzymatische Aktivität auf, indem die DNA-Gyrase das Plasmid pUC18 aus der entspannten in die *super coiled*-Form überführt. Die Negativkontrolle ist der Ansatz ohne Enzym-Zugabe (Plasmid nach der Topoisomerase I-Behandlung in entspannter Form). Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. Kap. 2.2.7.4 DNA-Gyrase-Aktivitäts-Test).

Im nächsten Schritt wurden die wirksamen Nalidixinsäure- und Allicin-Konzentrationen, die die Enzym-Aktivität im *in vitro* Assay inhibieren, bestimmt. Dabei wurden die Konzentrationen zwischen 0,25 mM und 1,5 mM getestet. Die DNA-Gyrase aus *Pf0-1* wurde bei der Behandlung mit Allicin bei 1 mM teilweise und bei 1,5 mM vollständig inhibiert (Abbildung 41). Bei der Behandlung mit Nalidixinsäure wurde die Aktivität der DNA-Gyrase bei keiner getesteten Konzentration vollständig inhibiert, lediglich bei der Behandlung mit 1,5 mM Nalidixinsäure erfolgte eine teilweise Inhibierung.

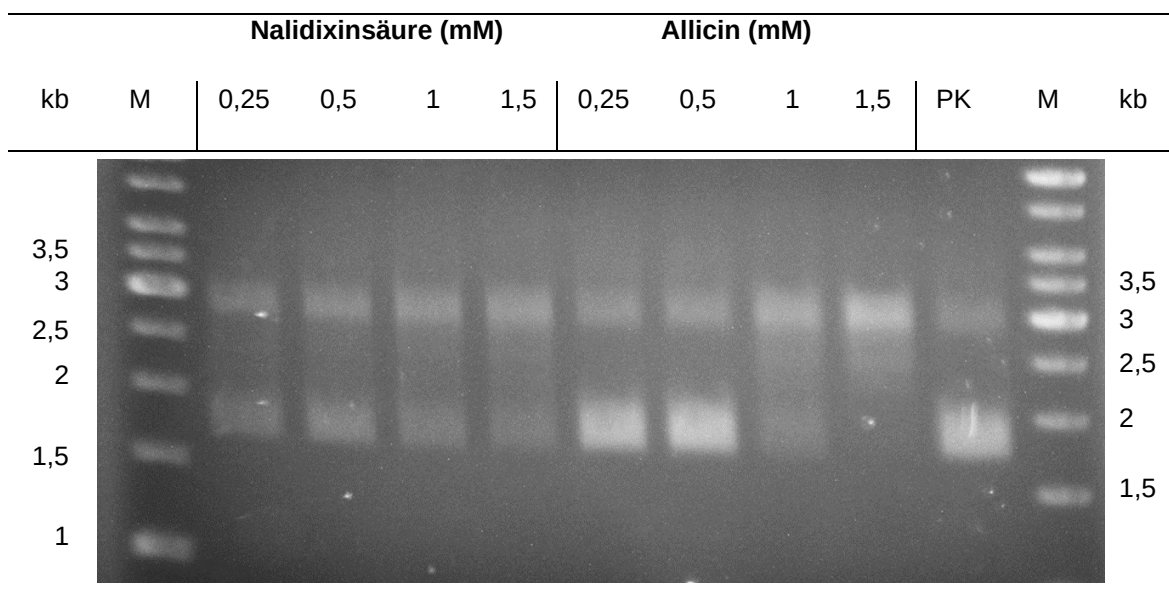


Abbildung 41. Nalidixinsäure und Allicin inhibieren die Aktivität der DNA-Gyrase aus *Pf0-1*. Nalidixinsäure inhibiert DNA-Gyrase aus *Pf0-1* ab 1 mM nur teilweise. Allicin dagegen inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase bei 1,5 mM vollständig. Als Positivkontrolle wurde das pUC18-Plasmid in entspannter Form durch die Behandlung mit der DNA-Gyrase in die *super coiled* – Form überführt (PK). Als Größenmarker (M) wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. Kap. 2.2.7.4 DNA-Gyrase-Aktivitäts-Test, modifiziert nach Reiter et al., 2019).

Die DNA-Gyrase aus *PfAR-1* wurde bei der höchsten getesteten Nalidixinsäure-Konzentration von 1,5 mM nicht inhibiert (Abbildung 42). Bei 1 mM Allicin-Behandlung dagegen wird die Aktivität der DNA-Gyrase aus *PfAR-1* vollständig inhibiert.

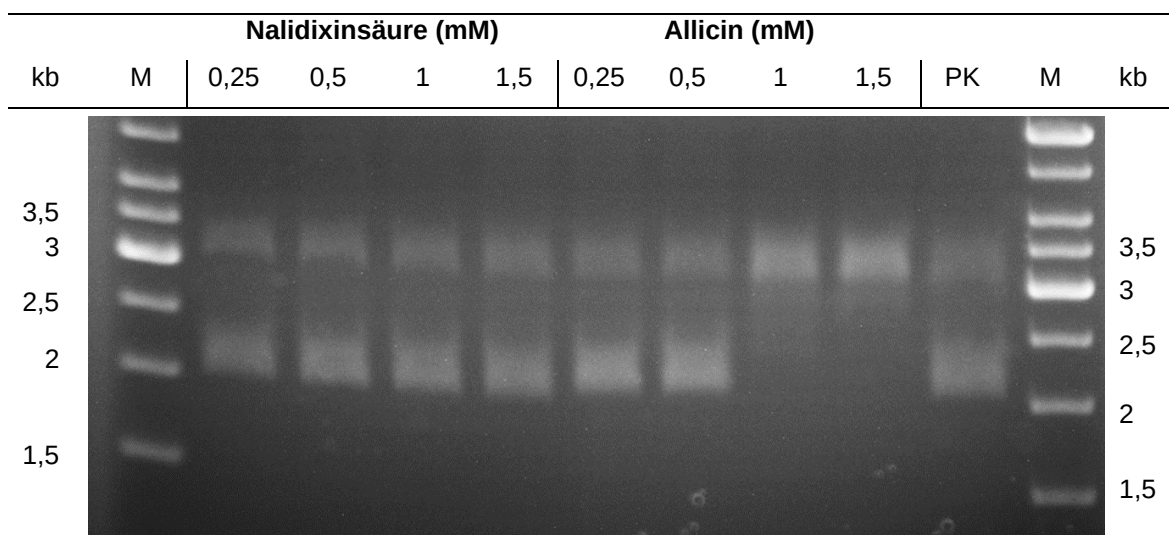


Abbildung 42. Allicin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus *PfAR-1* bei 1 mM. Nalidixinsäure besitzt keinen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität, auch bei 1,5 mM nicht. Als Positivkontrolle wurde das pUC18-Plasmid in entspannter Form durch die Behandlung mit der DNA-Gyrase in die *super coiled* – Form überführt (PK). Als Größenmarker (M) wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. Kap. 2.2.7.4 DNA-Gyrase-Aktivitäts-Test, modifiziert nach Reiter et al., 2019).

3. Ergebnisse

Als nächstes wurde die inhibitorische Konzentration von Novobiocin bei beiden DNA-Gyrasen bestimmt. Es wurden 1, 10 und 100 μM Novobiocin in dem Test eingesetzt. Die Aktivität der beiden DNA-Gyrasen wurde bei 10 und 100 μM vollständig inhibiert.

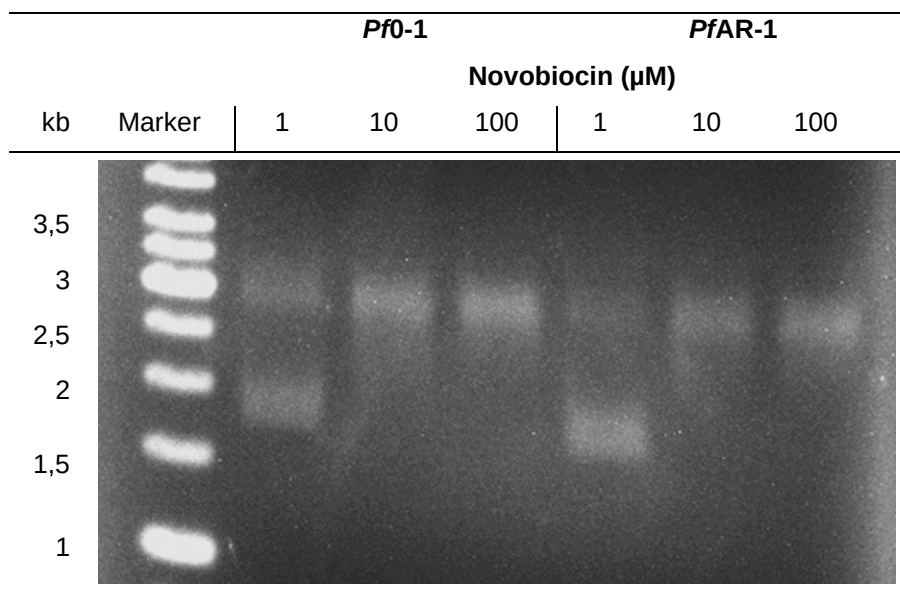


Abbildung 43. Novobiocin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus *Pf0-1* und *PfAR-1* in gleicher Konzentrationsspanne zwischen 1 und 10 μM . Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. Kap. 2.2.7.4 DNA-Gyrase-Aktivitäts-Test, modifiziert nach Reiter et al., 2019).

3.2.3. Herstellung der *gyrA*-Austauschmutanten *Pf0-1_{gyrAPfAR-1}* und *PfAR-1_{gyrAPf0-1}*

Um die Rolle der Untereinheit A der DNA-Gyrase bei der Allicin-Resistenz zu überprüfen, wurden die *GyrA*-Austauschmutanten von *Pf0-1* und *PfAR-1* erzeugt. Dabei wurde die Methode zur Erzeugung der *knock out* -Mutanten mittels pEMG-Plasmid von Martínez-García und de Lorenzo (2011) modifiziert (s. Kap. 2.2.3.14 Methode zur Herstellung von *Pseudomonas*-Mutanten mittels des pEMG-*knock out* -Systems). Die *gyrA*-Austauschmutante von *PfAR-1* wurde von Anna Hübbers in Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit hergestellt. Analog dazu wurde die *GyrA*-Austauschmutante von *Pf0-1* in Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

Als erstes wurde das pEMG-Plasmid zur Transformation von *Pf0-1* pEMG-TS1_{*Pf0-1*}-*gyrA_{PfAR-1}*-TS2_{*Pf0-1*} erzeugt. Dafür wurden die einzelnen Fragmente TS1_{*Pf0-1*}, TS2_{*Pf0-1*}, Plasmid-Rückgrat pEMG und *gyrA_{PfAR-1}* mittels PCR hergestellt (Abbildung 44 und Abbildung 45). Dabei wurden die Primer mit den 16 bp Überhängen, die homolog zu der nächstliegenden DNA-Sequenz in dem Plasmid und für die Gibson-Assemblierung notwendig sind, verwendet. Das PCR-Produkt von *gyrA_{PfAR-1}* wurde mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und KpnI überprüft. BamHI besitzt eine spezifische Schnittstelle in *gyrA* aus *Pf0-1* und keine bei *gyrA* aus *PfAR-1*. KpnI schneidet spezifisch in *gyrA* aus *PfAR-1* (2100 bp und 707 bp).

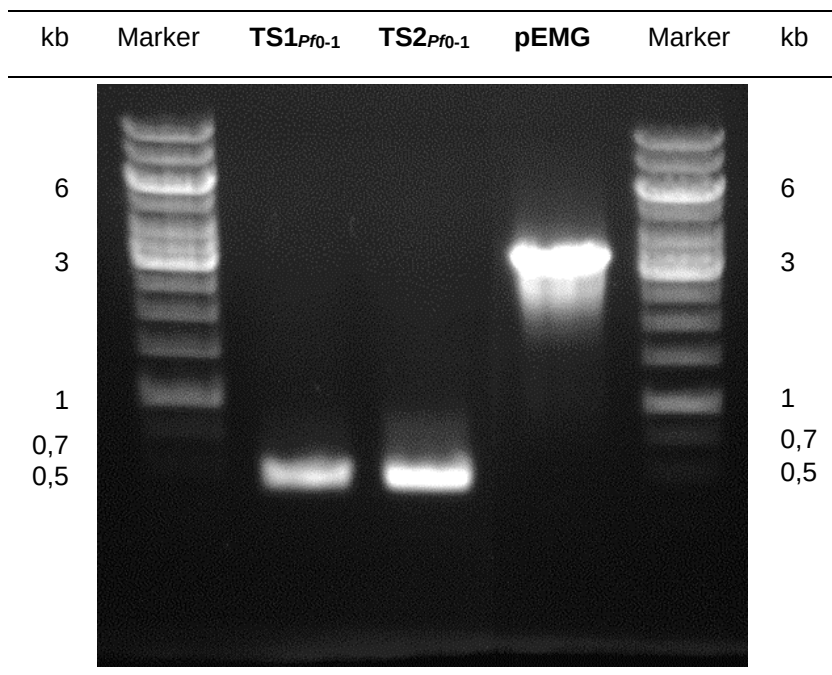


Abbildung 44. Bausteine für pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} sind PCR-Produkte mit Überhängen für die Gibson-Assemblierung. TS1_{Pf0-1} und TS2_{Pf0-1} sind jeweils 432 bp groß, das Plasmid-Rückgrat von pEMG ist 3168 bp groß. Das Plasmid pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} wird in das Genom von *Pf0-1* integriert. In den nächsten Schritten wird das Plasmid-Rückgrat mit dem Gen *gyrA*_{Pf0-1} aus dem Genom entfernt. Das Austauschgen *gyrA*_{PfAR-1} bleibt in dem *Pf0-1*-Genom, sodass die *gyrA*-Austauschmutante entsteht. Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. Kap. 2.2.3.14 Methode zur Herstellung von *Pseudomonas*-Mutanten mittels des pEMG-knock out -Systems).

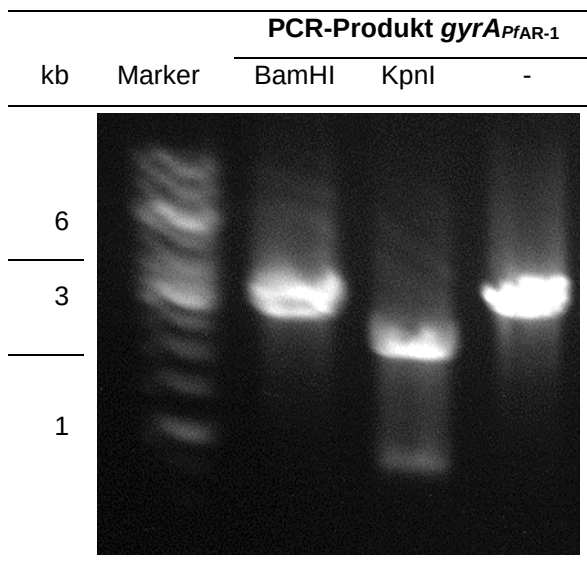


Abbildung 45. *gyrA* aus *PfAR-1* als Baustein für pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1}. Das PCR-Produkt mit Überhängen für die Gibson-Assemblierung ist 2807 bp groß. *gyrA* wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI behandelt. BamHI besitzt eine spezifische Schnittstelle in *gyrA* aus *Pf0-1* und keine bei *gyrA* aus *PfAR-1*. KpnI schneidet spezifisch in *gyrA* aus *PfAR-1* (2100 bp und 707 bp). Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. Kap. 2.2.3.14 Methode zur Herstellung von *Pseudomonas*-Mutanten mittels des pEMG-knock out -Systems).

3. Ergebnisse

Nachdem die vier PCR-Produkte erfolgreich amplifiziert worden waren, wurden sie aufgereinigt (s. Kap. 2.2.3.5 Aufkonzentrierung und Aufreinigung der DNA aus dem PCR-Ansatz), die DNA-Konzentration bestimmt, die einzelnen Fragmente mittels Gibson-Assemblierung zu einem Plasmid kloniert (s. Kap. 2.2.3.8 Gibson-Assemblierung) und in kompetente *E. coli* transformiert (s. Kap. 2.2.3.10 Transformation von *E. coli* mit Hitze-Schock-Methode). Die Transformanten wurden auf den Kanamycin-haltigen Agar-Platten selektiert (s. Kap. 2.2.2.2 Antibiotika-Stammlösungen) und anschließend das Plasmid pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} isoliert (s. Kap. 2.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien). Es wurden vier Plasmide (1, 2, 11 und 14) mittels Restriktionsverdau auf ihre Richtigkeit hin untersucht (Abbildung 46).

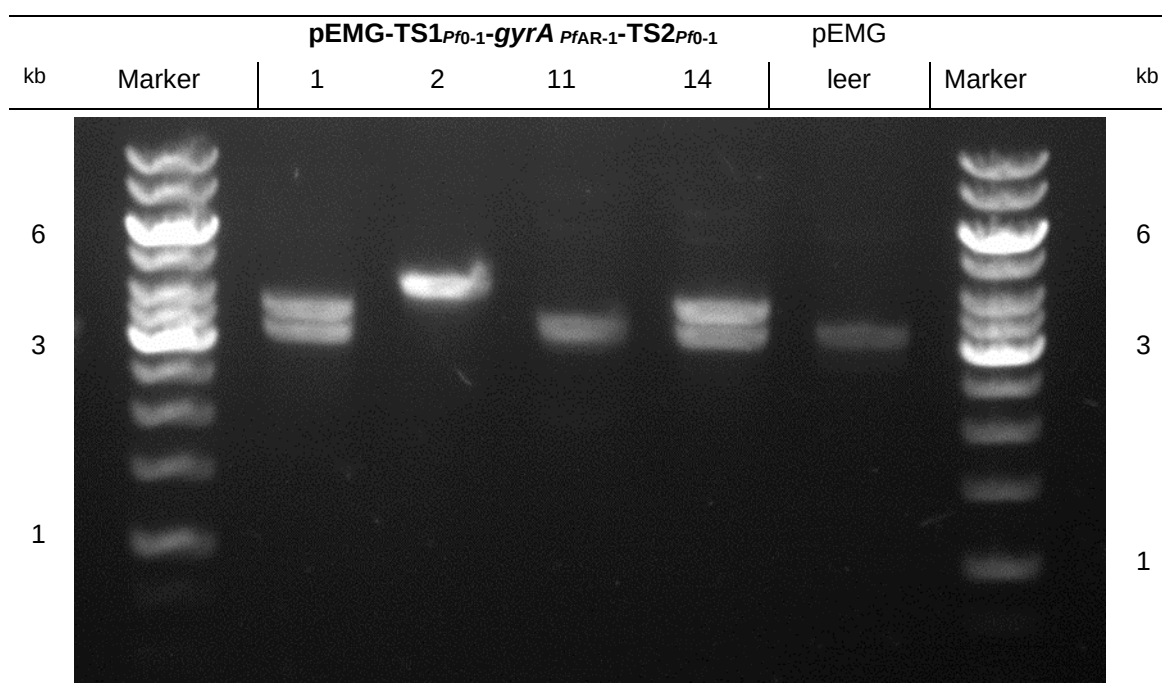


Abbildung 46. Restriktionsverdau der Plasmide pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} 1, 2, 11 und 14 nach der Gibson-Assemblierung mit dem Enzym EcoRI. Erwartete Bandengrößen 3623 bp und 3120 bp sind bei den Plasmiden 1 und 14 zu beobachten. EcoRI schneidet leeres pEMG-Plasmid (ohne Insert) einmal und es entsteht eine 3168 bp große Bande. Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. Kap. 2.2.3.6 Restriktion der DNA und 2.2.3.14 Methode zur Herstellung von *Pseudomonas*-Mutanten mittels des pEMG-knock out -Systems).

Das Restriktionsenzym EcoRI schneidet das Plasmid pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} zweimal: in dem Plasmid-Rückgrat kurz vor TS1_{Pf0-1} und am Ende der *gyrA*_{PfAR-1}. Dabei entstehen zwei 3623 bp und 3120 bp große Fragmente. Dies wurde bei den Plasmiden 1 und 14 beobachtet. EcoRI schneidet leeres pEMG-Plasmid ohne Insert einmal und es entsteht eine 3168 bp große Bande.

Im nächsten Schritt wurden die Plasmide mit zwei Restriktionsenzymen EcoRI und KpnI geschnitten. KpnI hat eine Erkennungssequenz im *gyrA*_{PfAR-1}-Gen in der für PfAR-1 spezifischen Sequenz (Abbildung 47). Die beiden Restriktionsenzyme schneiden das Plasmid pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} in vier Fragmente (3623 bp, 2496 bp, 608 bp und 16 bp). Zwei größere Banden sind bei den Plasmiden Nummer 1 und 14 zu sehen, während die zwei kleineren Fragmente auf dem

3. Ergebnisse

Gel nicht zu sehen sind. Der 16 bp Fragment ist aus dem Gel ausgelaufen, da es zu klein ist. Die 608 bp Fragment-Bande hat wahrscheinlich eine zu geringe DNA-Menge, um sichtbar zu sein. Die beiden Restriktionsenzyme schneiden leeres pEMG-Plasmid (ohne Insertion) zweimal und es entstehen 3152 bp und 16 bp Banden. Auf dem Gel ist das DNA-Fragment von 16 bp aus oben genanntem Grund nicht zu sehen.

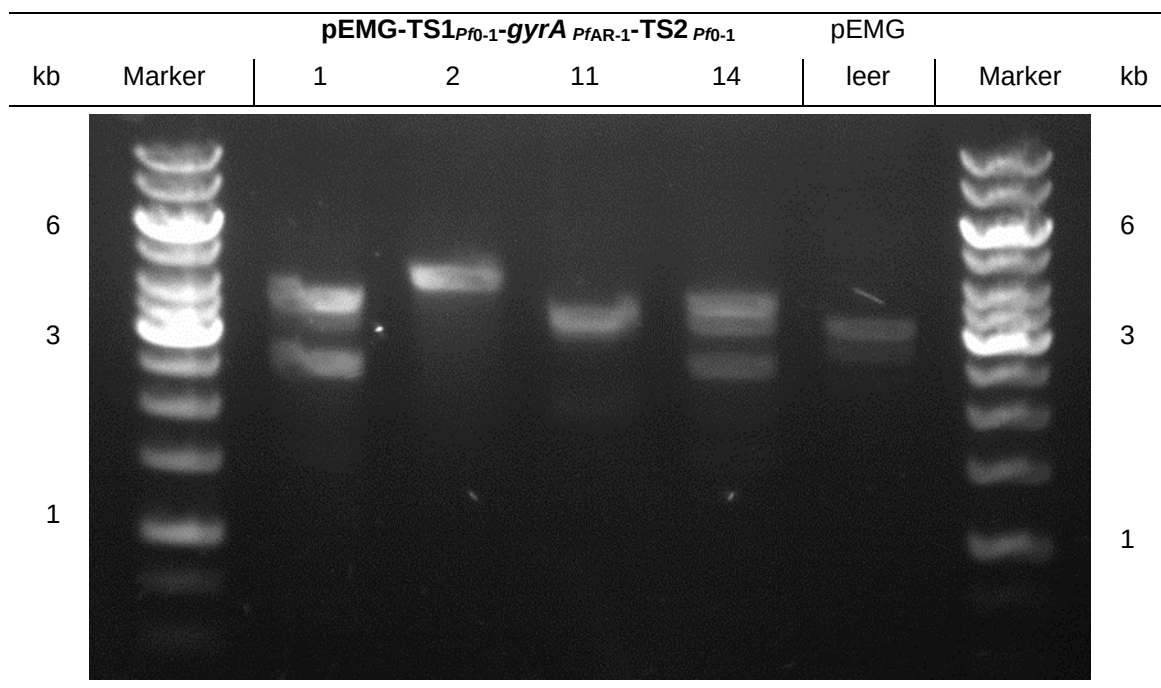


Abbildung 47. Restriktionsverdau der Plasmide pEMG-TS1_{Pf0-1}-gyrA_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} 1, 2, 11 und 14 nach der Gibson-Assemblierung mit dem Enzymen EcoRI und KpnI. Erwartete Bandengrößen 3623 bp, 2496 bp, 608 bp und 16 bp (die letzten beiden sind nicht auf dem Gel zu erkennen) sind bei den Plasmiden 1 und 14 zu beobachten. Die beiden Restriktionsenzyme schneiden leeres pEMG-Plasmid (ohne Insert) zweimal und es entstehen 3152 bp und 16 bp Banden (kleinere Bande ist auf dem Gel nicht zu sehen). Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. 2.2.3.6 Restriktion der DNA und 2.2.3.14 Methode zur Herstellung von *Pseudomonas*-Mutanten mittels des pEMG-knock out -Systems).

Anschließend wurde das DNA-Fragment TS1_{Pf0-1}-gyrA_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} von den Plasmiden 1 und 14 mittels PCR mit dem Primerpaar 60 und 61, die in TS1_{Pf0-1} und TS2_{Pf0-1} binden, amplifiziert (Abbildung 48). Das PCR-Produkt bei pEMG-TS1_{Pf0-1}-gyrA_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} ist 2872 bp groß. Als Kontrolle wurde genomische DNA vom *Pf0-1*-Wildtyp verwendet. Dabei entsteht ein 2938 bp großes PCR-Produkt. Die entstandenen Produkte wurden mittels Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und KpnI überprüft. Das Enzym BamHI hat die Erkennungssequenz nur in dem *gyrA*-Gen von *Pf0-1* und KpnI nur in dem *gyrA*-Gen von *PfAR-1*. Bei dem Restriktionsverdau wurde das PCR-Produkt von den pEMG-TS1_{Pf0-1}-gyrA_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} Plasmiden 1 und 14 nur von KpnI und nicht von BamHI geschnitten. Dies bedeutet, dass diese Plasmide das *gyrA*-Gen von *PfAR-1* enthalten. Der Kontroll-Ansatz mit dem PCR-Produkt von TS1_{Pf0-1}-gyrA_{Pf0-1}-TS2_{Pf0-1} wurde wie erwartet nur von dem Restriktionsenzym BamHI geschnitten.

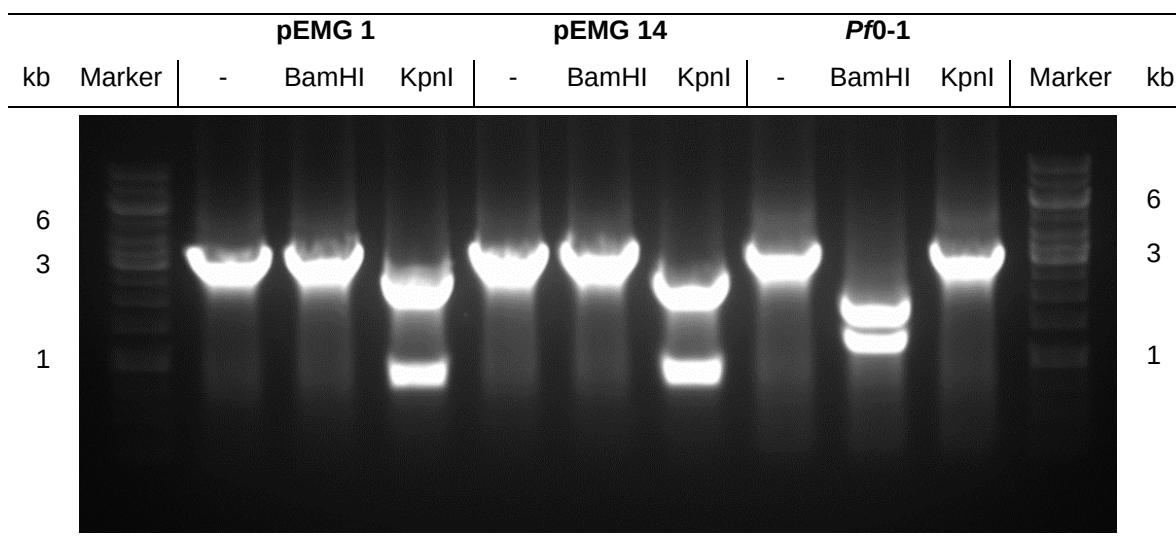


Abbildung 48. Restriktionsverdau von PCR-Produkt (Primer 60 und 61, binden in TS1 und TS2 von *Pf0-1*) mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI zeigt, dass Plasmide *gyrA* aus *PfAR-1* besitzen. Das PCR-Produkt bei pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} ist 2872 bp und bei *Pf0-1* als Template 2938 bp groß. BamHI besitzt spezifische Schnittstelle in *gyrA* aus *Pf0-1* und keine bei *gyrA* aus *PfAR-1*. Die erwarteten Bandengrößen beim PCR-Produkt aus *Pf0-1* sind 1160 bp und 1712 bp. KpnI schneidet spezifisch in *gyrA* aus *PfAR-1* (2213 bp und 770 bp). Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. Kap. 2.2.3.6 Restriktion der DNA und 2.2.3.14 Methode zur Herstellung von *Pseudomonas*-Mutanten mittels des pEMG-knock out -Systems).

Anschließend wurden die Plasmide pEMG- TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} Nummer 1 und 14 in dem Insertionsabschnitt teilweise sequenziert (s. Anhang Abbildungen A1-A5, S. 251 ff. und Kap. 2.2.3.14 Methode zur Herstellung von *Pseudomonas*-Mutanten mittels des pEMG-knock out -Systems). Bei dem Plasmid Nummer 1 erfolgte ein Nukleotid-Austausch von Guanin₂₅₂₈ zu Adenin. Diese Mutation führt zum Aminosäureaustausch Asparagin gegen Glycin (Gly₈₄₃Asp). Wegen dieser entstandenen Mutation wurde das Plasmid Nummer 1 für die weiteren Untersuchungen nicht verwendet. Bei dem Plasmid Nummer 14 wurde kein Nukleotid-Fehler bei der Sequenzierung festgestellt und so wurde dies in weiteren Klonierungsschritten verwendet.

Im nächsten Schritt wurde das Plasmid pEMG- TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} Nummer 14 in *Pf0-1* mittels triparentalem Mating transformiert (s. Kap. 2.2.3.13 Transformation von *Pseudomonaden* durch triparentales Mating). Dabei wird das gesamte Plasmid in die genomische DNA des Bakteriums durch die homologe Rekombination an den TS1- bzw. TS2-Sequenzen integriert. Die Selektion der Transformanten *Pf0-1*_{pEMG} erfolgte mittels Kanamycin-haltigen Agarplatten. Um den Erfolg der Integration zu kontrollieren, wurde die genomische DNA isoliert, die TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} bzw. TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{Pf0-1}-TS2_{Pf0-1}-Abschnitt mittels PCR (mit dem Primerpaar 60 und 61) amplifiziert und mittels Restriktionsverdau überprüft. Es wurden die Restriktionsenzyme BamHI und KpnI verwendet (s.o.) und fünf Kandidaten (*Pf0-1*_{pEMG} 5.1, 11.1, 3, 5, 7.1) untersucht. Die Transformationskandidaten sollten das gesamte Plasmid im Genom integriert haben, und so das eigene *gyrA*- und das *gyrA*-Gen aus *PfAR-1* besitzen. Alle getesteten Kandidaten (*Pf0-1*_{pEMG} 5.1, 11.1, 3, 5 und 7.1) besaßen beide *gyrA*-Gene aus *Pf0-1* und aus *PfAR-1*, da sowohl BamHI als auch KpnI das PCR-Produkt schneiden. Das Restriktionsenzym BamHI schneidet das 2872 bp große TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{Pf0-1}-TS2_{Pf0-1}-PCR-Produkt, sodass zwei Fragmente mit 1160 bp und 1712 bp entstehen. KpnI schneidet das 2983 bp große TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1}-PCR-Produkt, sodass zwei Fragmente in der Größe von 2213 bp und 770 bp entstehen.

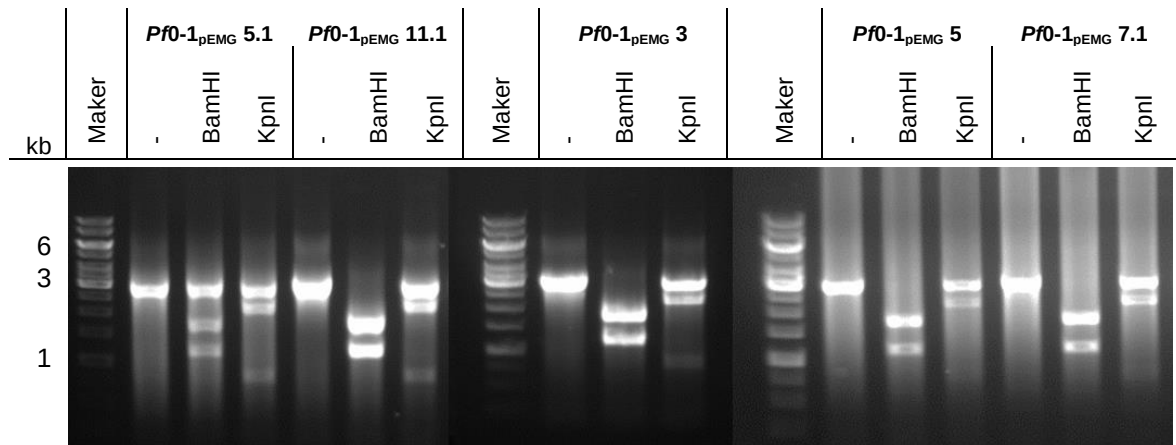


Abbildung 49. Restriktionsverdau der TS1_{Pf0-1}-*gyrA*-TS2_{Pf0-1} aus *Pf0-1_{pEMG}*-Transformanden, die das Plasmid pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA_{PfAR-1}*-TS2_{Pf0-1} in dem Genom integriert haben, mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI. *Pf0-1_{pEMG}* 5.1, 11.1, 3, 5 und 7.1 besitzen beide Gyrase-Gene aus *Pf0-1* und *PfAR-1*, da sowohl BamHI als auch KpnI das PCR-Produkt (Primer 60 und 61) schneiden. BamHI schneidet das 2872 bp große TS1_{Pf0-1}-*gyrA_{Pf0-1}*-TS2_{Pf0-1}-PCR-Produkt, sodass Fragmente in der Größe von 1160 bp und 1712 bp entstehen. KpnI schneidet das 2983 bp große TS1_{Pf0-1}-*gyrA_{PfAR-1}*-TS2_{Pf0-1}-PCR-Produkt, sodass Fragmente in der Größe von 2213 bp und 770 bp entstehen. Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. 2.2.3.6 Restriktion der DNA und 2.2.3.14 Methode zur Herstellung von *Pseudomonas*-Mutanten mittels des pEMG-knock out -Systems).

Im nächsten Schritt wurden die fünf *Pf0-1_{pEMG}*-Linien mit dem Plasmid pSW-2 mittels Elektroporation (s. Kap. 2.2.3.12 Transformation von *Pseudomonaden* durch die Elektroporation) transformiert und die Transformanden auf Gentamicin-haltigen Agarplatten selektiert (s. Kap. 2.2.2.2 Antibiotika-Stammlösungen). Das Restriktionsenzym *Sce-I*, das auf dem Plasmid pSW-2 kodiert ist, erzeugt einen Doppelstrangbruch der genomischen DNA in der pEMG-Sequenz. Durch die Reparaturmechanismen bzw. durch die homologe Rekombination an der TS1- oder TS2-Sequenz wird der DNA-Bruch beseitigt und gleichzeitig das Rückgrat des pEMG-Plasmids mit einem *gyrA*-Gen aus dem Genom entfernt (s. Kap. 2.2.3.14 Methode zur Herstellung von *Pseudomonas*-Mutanten mittels des pEMG-knock out -Systems). Durch das Entfernen des pEMG-Rückgrats aus dem bakteriellen Genom verlieren die Bakterien auch die darauf kodierte Kanamycin-Resistenz. Zusätzlich wurden die Austausch-Kandidaten auf Nalidixinsäure-haltigen Agar-Platten selektiert, da das *gyrA*-Gen aus *PfAR-1* Nalidixinsäure-Resistenz verleiht.

Im ersten Schritt wurden die einzelnen Kolonien von *Pf0-1_{pEMG}*-pSW-2 auf eine Kanamycin-haltige LB-Agar-Platte und auf eine LB-Agar-Platte ohne Antibiotika-Zusatz übertragen. Es wurden die Kolonien ausgesucht, die die Kanamycin-Resistenz verloren hatten. Dabei wurden die Kolonien ausgesucht, die auf der LB-Agar-Platte ohne Antibiotika-Zusatz wuchsen und auf der Kanamycin-haltigen Platte nicht wuchsen. Da die Wahrscheinlichkeit gleich groß ist, entweder *gyrA_{Pf0-1}* oder *gyrA_{PfAR-1}* in dem Genom von *Pf0-1* zu behalten, wurde die Identität des *gyrA*-Gens mittels Restriktionsverdau überprüft. Dafür wurde die genomische DNA isoliert und eine Test-PCR mit *PfAR-1* *gyrA*-Gen spezifischen Primern (Primerpaar 48 und 61) durchgeführt. Die erwartete Größe des PCR-Produktes beträgt 949 bp (Abbildung 50). Von den 17 untersuchten Kandidaten besaßen 12 *Pf0-1*-Linien das *gyrA*-Gen aus *PfAR-1*.

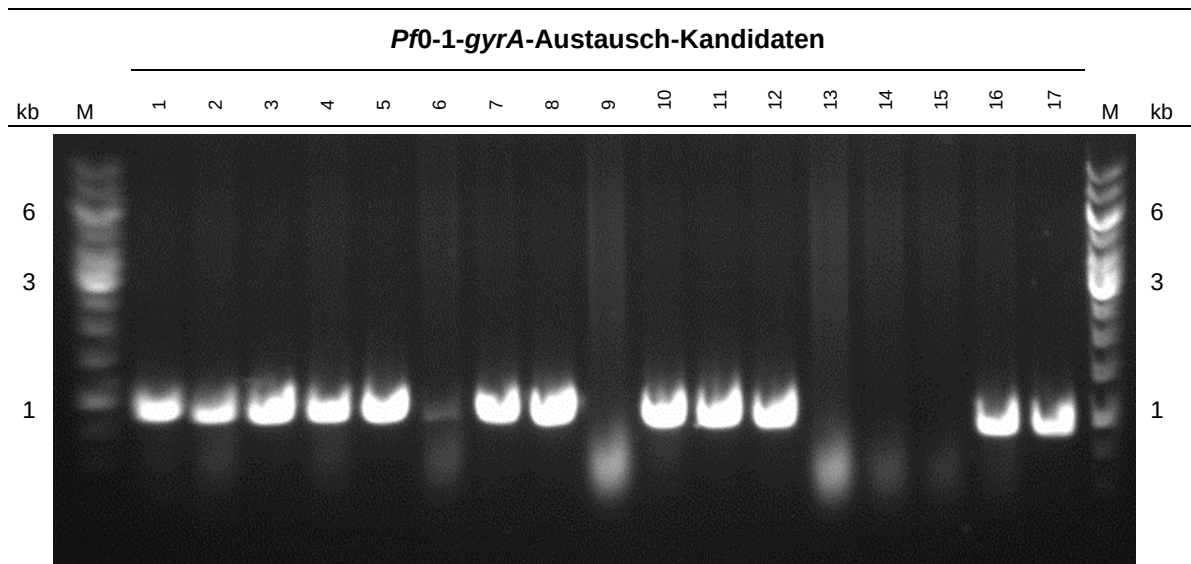


Abbildung 50. Nachweis des *gyrA*-Gens aus *PfAR-1* in dem Genom von *Pf0-1-gyrA*-Austausch-Kandidaten nach dem Verlust der Kanamycin-Resistenz (*Pf0-1* mit dem im Genom integrierten $pEMG_{gyrA/PfAR-1}$, transformiert mit dem Plasmid pSW-2). Das PCR-Produkt mit den *gyrA_{PfAR-1}*-spezifischen Primern 48 und 61 ist 949 bp groß. Kandidaten 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 16 und 17 haben *gyrA_{PfAR-1}* nach dem Ausschneiden des Plasmids pEMG im Genom behalten. Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. 2.2.3.6 Restriktion der DNA und 2.2.3.14 Methode zur Herstellung von *Pseudomonas*-Mutanten mittels des pEMG-knock out - Systems).

Im nächsten Schritt wurde der TS1_{*Pf0-1*}-*gyrA*-TS2_{*Pf0-1*}-Bereich (Primerpaar 60 und 61) amplifiziert (Abbildung 51) und anschließend das PCR-Produkt für weitere Untersuchungen aufgereinigt (s. Kap. 2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und 2.2.3.5 Aufkonzentrierung und Aufreinigung der DNA aus dem PCR-Ansatz).

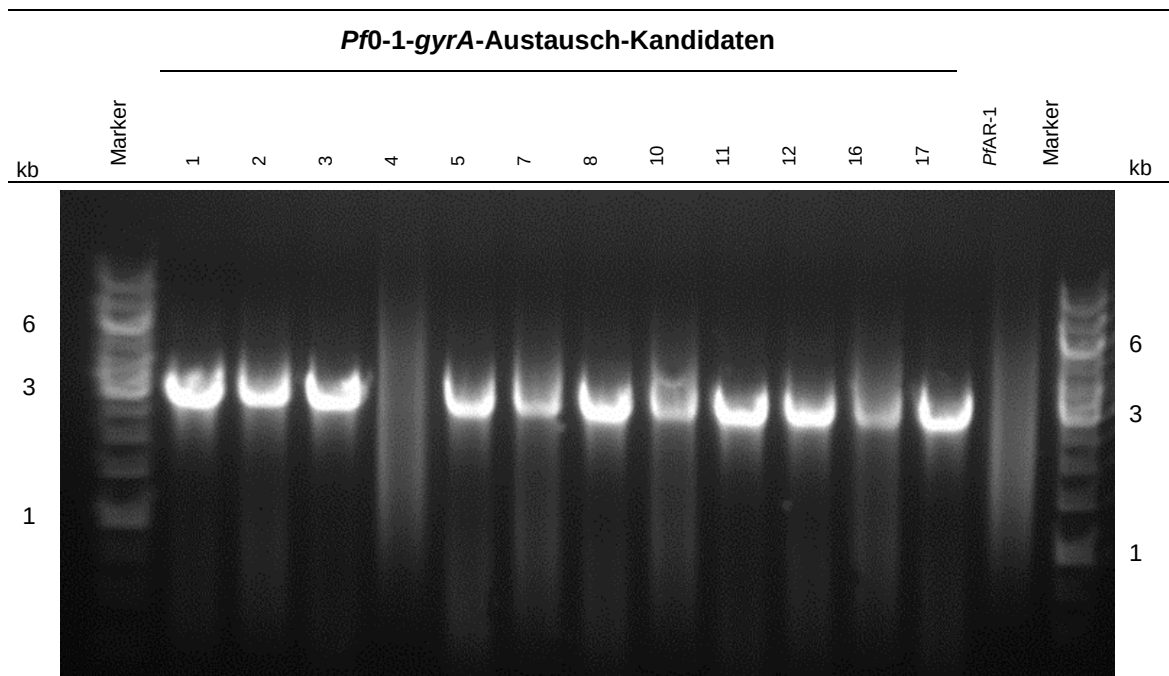


Abbildung 51. PCR mit TS1_{*Pf0-1*} und TS2_{*Pf0-1*} spezifischen Primern (Primer 60 und 61). Das erwartete PCR-Produkt von 2983 bp ist bei allen getesteten Kandidaten, außer bei Nummer 4 und *PfAR-1* als Negativkontrolle entstanden. Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. Kap. 2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und 2.2.3.5 Aufkonzentrierung und Aufreinigung der DNA aus dem PCR-Ansatz).

3. Ergebnisse

Durch Restriktionsverdau wurde untersucht, ob die mittels PCR amplifizierten TS1_{Pf0-1}-*gyrA*-TS2_{Pf0-1}-Bereiche der Austauschkandidaten (AK) das *gyrA*-Gen aus *Pf0-1* oder *PfAR-1* behalten haben. Es wurden 12 Austauschkandidaten (1, 2, 3, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 16, 17 und AK-2.3, das nicht auf Nalidixinsäure-haltigen Agar-Platten selektiert wurde) mittels Restriktionsverdau untersucht (Abbildung 52). Bei allen getesteten Austausch-Kandidaten wurde der TS1_{Pf0-1}-*gyrA*-TS2_{Pf0-1}-Bereich nur von dem Restriktionsenzym KpnI und nicht von BamHI geschnitten. BamHI schneidet das 2872 bp großes TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{Pf0-1}-TS2_{Pf0-1}-PCR-Produkt, sodass Banden in der Größe von 1160 bp und 1712 bp entstanden. KpnI schneidet das 2983 bp große TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1}-PCR-Produkt, sodass Banden in Größe von 2213 bp und 770 bp entstanden. So besaßen alle untersuchten *Pf0-1*-Linien das *gyrA*-Gen aus *PfAR-1*.

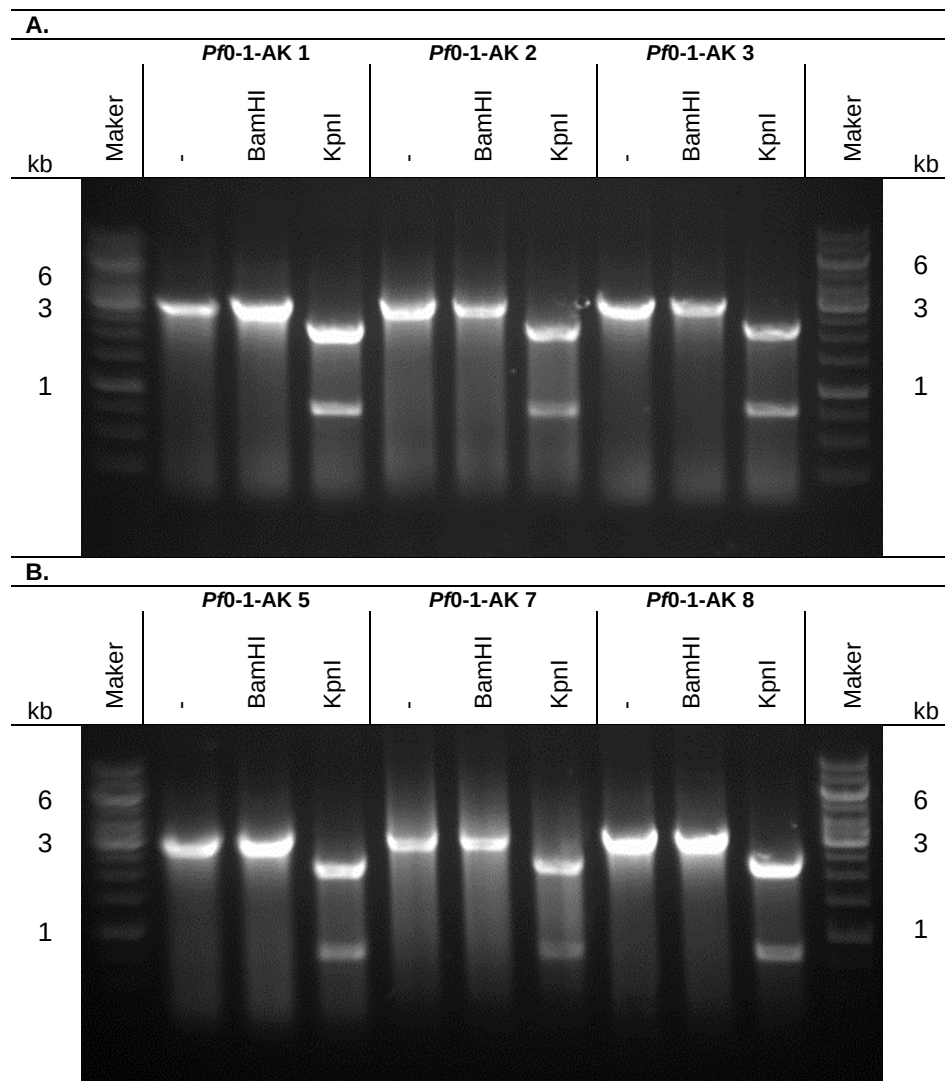


Abbildung 52. Restriktionsverdau der PCR-Produkte TS1_{Pf0-1}-*gyrA*-TS2_{Pf0-1} (Primer 60 und 61) aus *Pf0-1*-*gyrA*-Austausch-Kandidaten mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI. BamHI schneidet das 2872 bp große TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{Pf0-1}-TS2_{Pf0-1}-PCR-Produkt, sodass Fragmente in der Größe von 1160 bp und 1712 bp entstehen. KpnI schneidet das 2983 bp große TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1}-PCR-Produkt, sodass Fragmente in der Größe von 2213 bp und 770 bp entstehen. Die alle hier untersuchten Austauschkandidaten *Pf0-1*-AK (A: 1, 2, 3, B: 5, 7, 8, C: 10, 11, 12, D:16, 17 und E: 2.3) haben nur *gyrA* aus *PfAR-1* und keine aus *Pf0-1*. Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. Kap. 2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR), 2.2.3.5 Aufkonzentrierung und Aufreinigung der DNA aus dem PCR-Ansatz und 2.2.3.6 Restriktion der DNA) (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

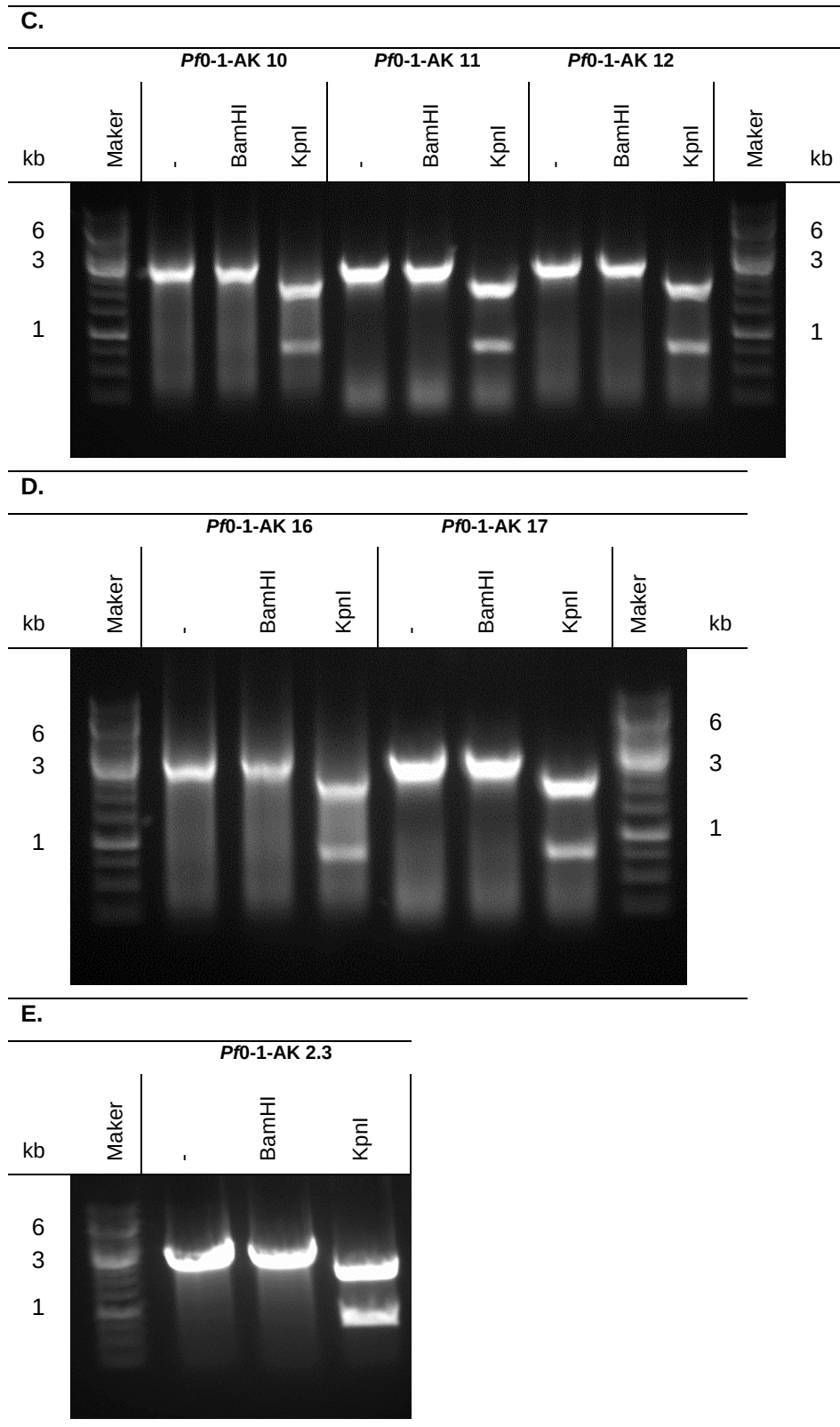


Abbildung 49 (Fortsetzung). Restriktionsverdau der PCR-Produkte $TS1_{Pf0-1}\text{-}gyrA\text{-}TS2_{Pf0-1}$ (Primer 60 und 61) aus *Pf0-1-gyrA*-Austausch-Kandidaten mit den Restriktionsenzymen BamHI und KpnI. BamHI schneidet das 2872 bp große $TS1_{Pf0-1}\text{-}gyrA_{Pf0-1}\text{-}TS2_{Pf0-1}$ -PCR-Produkt, sodass Fragmente in der Größe von 1160 bp und 1712 bp entstehen. KpnI schneidet das 2983 bp große $TS1_{Pf0-1}\text{-}gyrA_{PfAR-1}\text{-}TS2_{Pf0-1}$ -PCR-Produkt, sodass Fragmente in der Größe von 2213 bp und 770 bp entstehen. Die alle hier untersuchten Austauschkandidaten *Pf0-1-AK* (A: 1, 2, 3, B: 5, 7, 8, C: 10, 11, 12, D: 16, 17 und E: 2.3) haben nur *gyrA* aus *PfAR-1* und keine aus *Pf0-1*. Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 1 kb verwendet (s. Kap. 2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR), 2.2.3.5 Aufkonzentrierung und Aufreinigung der DNA aus dem PCR-Ansatz und 2.2.3.6 Restriktion der DNA).

Alle positiven *Pf0-1-gyrA*-Austausch-Mutanten sind aus dem *Pf0-1*_{pEMG} 5.1, das das im Genom integrierte pEMG-Plasmid und so beide Gyrase-Gene besitzt, entstanden. *Pf0-1*_{pEMG} 5.1 wurde durch die Transformation mit dem pEMG-TS1_{*Pf0-1-gyrA*}_{*PfAR-1*}-TS2_{*Pf0-1*} Nummer 14 erzeugt. Für die weiteren Tests wurden die *gyrA*-Austauschmutanten *Pf0-1*_{*gyrA*}_{*PfAR-1*} 2.3, 11 und 17 verwendet und entsprechend *Pf0-1* AM-1, -2 und -3 genannt. Die DNA-Gyrase-Sequenz aller Austauschmutanten wurde teilweise sequenziert (s. Anhang Abbildungen A6-A19, S. 255 ff.). Bei den *PfAR-1-gyrA*-Austauschmutanten 1-3 wurden keine Fehler in der DNA-Sequenz festgestellt. Bei den *Pf0-1-gyrA*-Austauschmutanten wurde ein Nukleotid-Austausch (Guanin₂₃₈₇Adenin), der auch zum Aminosäureaustausch (Arg₇₉₆His) führt, festgestellt. Auch die *intergenomic spacer*-Region bei *Pf0-1* und *PfAR-1* Wildtypen und Austauschmutanten wurde sequenziert. Es wurde bestätigt, dass die verwendeten Bakterien den entsprechenden genomischen Hintergrund von *Pf0-1* bzw. *PfAR-1* tragen (s. Anhang Abbildungen A20-A28, S. 267 ff.).

3.2.4. Anfälligkeit der *gyrA*-Austauschmutanten *Pf0-1*_{*gyrA*}_{*PfAR-1*} und *PfAR-1*_{*gyrA*}_{*Pf0-1*} gegenüber Allicin und anderen Antibiotika

In diesem Abschnitt wurde die Resistenz gegenüber Allicin, Nalidixinsäure, Levofloxacin und Novobiocin mittels Hemmhof-Tests mit den *gyrA*-Austauschmutanten von *Pf0-1* und *PfAR-1* untersucht (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhof-Test). Die Experimente wurden mit jeweils drei unabhängigen Austauschmutanten-Linien sowie Wildtypen durchgeführt. Bei dem Hemmhof-Test wurden 300 µl der Bakteriensuspension (OD₆₀₀=0,2) in 25 ml warmen noch flüssigen King's B-Agar inkorporiert. Nach dem Erstarren wurden 6 mm große Löcher in dem Agar ausgestanzt und 20 µl Test-Substanz appliziert. Die Platten wurden anschließend über 18 h bei 28°C inkubiert. Die Durchmesser der entstandenen Hemmhöfe wurden ausgemessen und statistisch ausgewertet.

Bei der Untersuchung der Allicin-Resistenz wurden 20 µl von 60 mM und 90 mM Allicin (entspricht 195 µg und 293 µg Allicin) verwendet (Abbildung 53). Die Ergebnisse der Behandlung mit 60 mM Allicin von einem Experiment mit neun Replikaten sind in Abbildung 54 dargestellt. Die gesamten Messdaten der Behandlung mit 60 mM Allicin sowie Signifikanz-Tests sind im Anhang in Tabellen A16 und A17 zu entnehmen (S. 271). Der *PfAR-1*-Wildtyp zeigt eine höhere Allicin-Resistenz als der *Pf0-1*-Wildtyp. Der durchschnittliche Hemmhof-Durchmesser bei *PfAR-1* beträgt 7,6±0,5 mm und bei *Pf0-1* 15,4±0,7 mm. Die *Pf0-1* Austauschmutanten sind geringfügig, aber signifikant anfälliger als der *Pf0-1*-WT. Die durchschnittlichen Hemmhof-Durchmesser der drei *Pf0-1*-Austauschmutanten betragen 17,2±1,0 mm, 18,7±2,1 mm und 17,7±0,9 mm. Die durchschnittlichen Hemmhof-Durchmesser der drei *PfAR-1*-Austauschmutanten betragen 8,4±0,5 mm, 8,6±0,5 mm und 8,4±0,9 mm und unterscheiden sich nicht signifikant von dem *PfAR-1* WT.

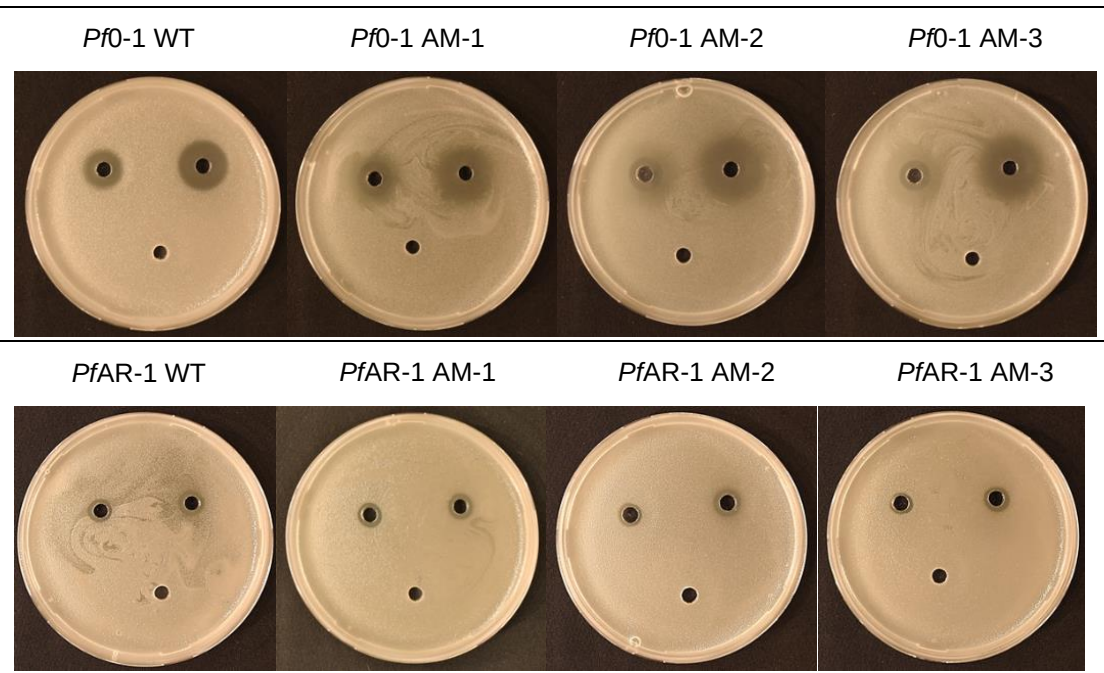


Abbildung 53. Allicin-Anfälligkeit der *Pf0-1*- und *PfAR-1*-Gyrase-Austauschmutanten wurde mittels Hemmhoftests untersucht. In das ausgestanzte Loch (Durchmesser 6 mm) wurden 20 µl von 60 mM (195 µg, jeweils Loch links oben) bzw. von 90 mM Allicin (293 µg, jeweils Loch rechts oben) appliziert. Als Negativkontrolle wurden 20 µl reines Wasser (jeweils Loch unten) verwendet (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhoftest).

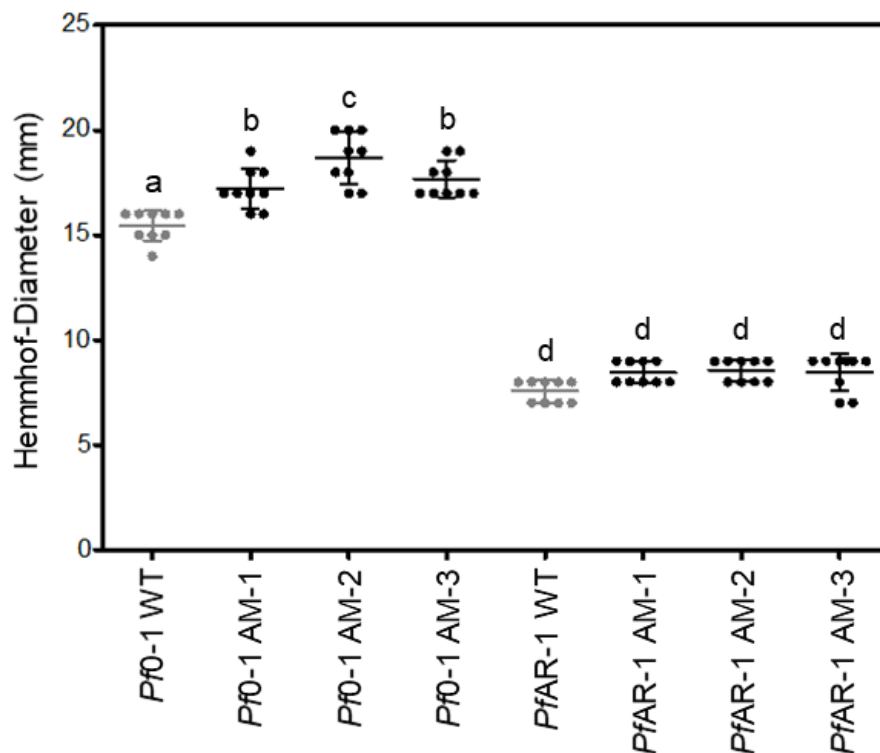


Abbildung 54. Untersuchung der Allicin-Anfälligkeit mittels Hemmhoftests mit *Pf0-1* und *PfAR-1*-Gyrase-Austausch-Mutanten. Es wurden 20 µl 60 mM Allicin (195 µg) in ein Loch im Agar mit einem Durchmesser von 6 mm appliziert (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhoftest). Dargestellt sind die Mittelwerte aus einem Experiment (n=9). Die einzelnen Messwerte sind als Punkte, die Durchschnittswerte sind als die horizontalen Linien und die Standardabweichung als die vertikalen Linien dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit Einweg-ANOVA-Tukey's Test durchgeführt. Die Messergebnisse, die mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind nicht signifikant unterschiedlich ($p \leq 0.05$) (modifiziert nach Reiter et al., 2019).

3. Ergebnisse

Im Folgenden wurde die Resistenz gegenüber Nalidixinsäure, Novobiocin und Levofloxacin mittels Hemmhoftest untersucht (Abbildung 55). Die Antibiotika Nalidixinsäure und Levofloxacin inhibieren die DNA-Gyrase-Aktivität durch die Interaktion mit der Untereinheit A, Novobiocin interagiert mit der Untereinheit B der DNA-Gyrase. Bei diesem Experiment wurden pro Loch 20 µl der 60 mM Antibiotika-Lösung appliziert. Dies entspricht einer Behandlung mit 434 µg Levofloxacin, 762 µg Novobiocin als Natrium-Salz und 305 µg Nalidixinsäure als Natrium-Salz.

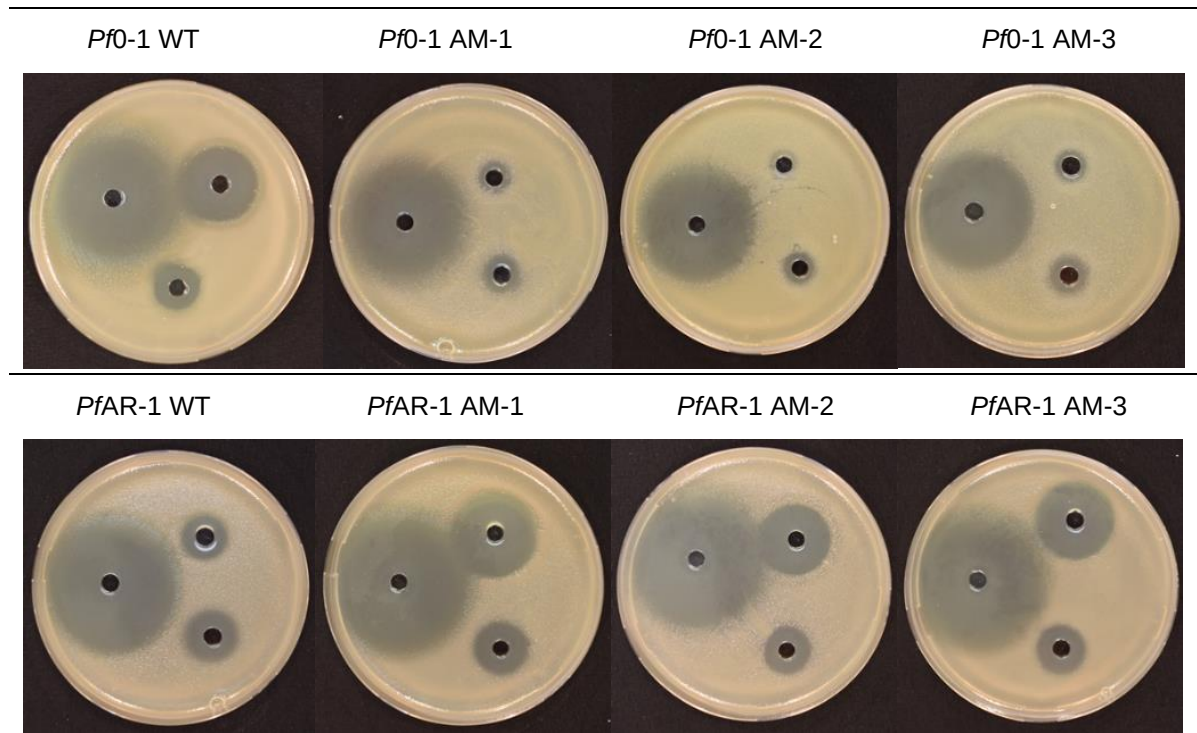


Abbildung 55. Anfälligkeit gegenüber Levofloxacin (Loch links), Novobiocin (Loch oben rechts) und Nalidixinsäure (Loch unten rechts) der *Pf0-1*- und *PfAR-1*-Gyrase-Austauschmutanten, untersucht mittels Hemmhoftests. Es wurden 20 µl 60 mM Antibiotika-Lösung (entspricht 434 µg Levofloxacin, 762 µg Novobiocin als Natrium-Salz und 305 µg Nalidixinsäure als Natrium-Salz) in ein Loch im Agar mit einem Durchmesser von 6 mm appliziert (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhoftest).

Die Ergebnisse der Nalidixinsäure-Behandlung aus zwei unabhängigen Experimenten (n=15-19) sind in Abbildung 56 dargestellt. Die ausführlichen Messdaten und die Signifikanz-Tests sind im Anhang in Tabellen A18 und A19 dargestellt (S. 272). *PfAR-1* besitzt eine natürliche Resistenz gegenüber Nalidixinsäure, die auf einer Aminosäure-Variation im *gyrA*-Gen beruht. Somit besitzen *PfAR-1*- Wildtyp und *Pf0-1*-Austauschmutanten eine höhere Nalidixinsäure-Resistenz im Vergleich zu *Pf0-1*-Wildtyp und *PfAR-1*-Austauschmutanten. Der durchschnittliche Hemmhoft-Durchmesser vom *Pf0-1*-Wildtyp beträgt $28,9 \pm 2,9$ mm und ist signifikant unterschiedlich zu den der drei *Pf0-1*-Austauschmutanten ($10,1 \pm 0,8$ mm, $7,7 \pm 3,3$ mm und $8,1 \pm 1,6$ mm) und dem *PfAR-1*-WT ($16,2 \pm 6,2$ mm). Der Hemmhoft-Durchmesser vom *PfAR-1*-Wildtyp ist signifikant unterschiedlich zu den der drei *PfAR-1*-Austauschmutanten ($29,3 \pm 8,8$ mm, $24,2 \pm 1,5$ mm und $30,6 \pm 10,2$ mm). Die erworbene Nalidixinsäure-Resistenz der *Pf0-1*-Austauschmutanten übertrifft signifikant die

Resistenz des *PfAR-1*-Wildtyps. Die erworbene Nalidixinsäure-Anfälligkeit der *PfAR-1*-Austauschmutanten entspricht der Anfälligkeit des *Pf0-1*-Wildtyps (mit der Ausnahme von AM-2).

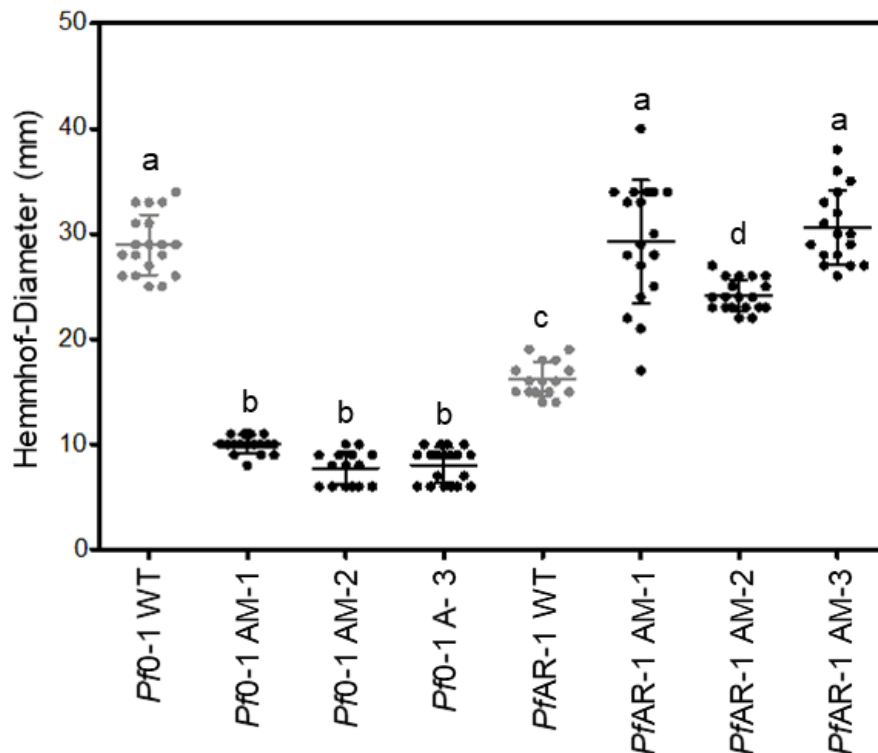


Abbildung 56. Untersuchung der Nalidixinsäure-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit *Pf0-1* und *PfAR-1*-Gyrase-Austausch-Mutanten. Es wurden 20 µl 60 mM Nalidixinsäure (305 µg) in ein Loch im Agar (Durchmesser 6 mm) appliziert (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhof-Test). Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (n=15-19). Die einzelnen Messwerte sind als Punkte, die Durchschnittswerte sind als die horizontalen Linien und die Standardabweichung als die vertikalen Linien dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit Einweg-ANOVA-Tukey's Test durchgeführt. Die Messergebnisse, die mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind nicht signifikant unterschiedlich ($p \leq 0.05$) (modifiziert nach Reiter et al., 2019).

Die Resistenz gegenüber Novobiocin wurde in zwei unabhängigen Experimenten (n=15-20) untersucht (Abbildung 57). Die Messdaten sowie die Signifikanz-Tests sind im Anhang in Tabellen A20 und A21 zu finden (S. 273). Die Wildtypen von *Pf0-1* und *PfAR-1* besitzen die gleiche Anfälligkeit gegenüber Novobiocin und die Hemmhof-Durchmesser sind nicht signifikant unterschiedlich (bei *Pf0-1* $18,8 \pm 2,5$ mm, bei *PfAR-1* $17,9 \pm 7,8$ mm). Die drei *Pf0-1*-Austauschmutanten sind signifikant resistenter gegenüber Novobiocin im Vergleich zum Wildtyp. Die durchschnittlichen Hemmhof-Durchmesser der *Pf0-1*-Austauschmutanten betragen $14,3 \pm 1,8$ mm, $13,9 \pm 3,6$ mm und $11,9 \pm 1,4$ mm. Die *PfAR-1* Austauschmutanten sind vergleichbar anfällig wie der *PfAR-1*-WT (mit der Ausnahme AM-2). Die durchschnittlichen Hemmhof-Durchmesser der *PfAR-1*-Austauschmutanten betragen $18,2 \pm 5,4$ mm, $15,6 \pm 1,3$ mm und $18,7 \pm 5,2$ mm.

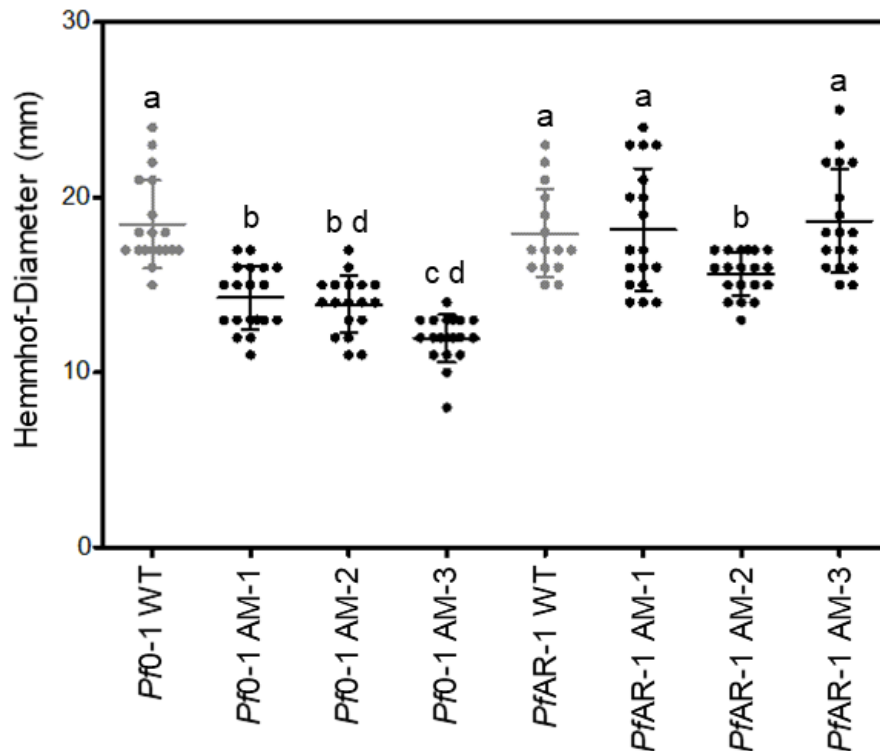


Abbildung 57. Untersuchung der Novobiocin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit *Pf0-1* und *PfAR-1*-Gyrase-Austausch-Mutanten. Es wurden 20 µl 60 mM Novobiocin (762 µg) in ein Loch im Agar mit einem Durchmesser von 6 mm appliziert (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhof-Test). Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (n=15-20). Die einzelnen Messwerte sind als Punkte, die Durchschnittswerte sind als die horizontalen Linien und die Standardabweichung als die vertikalen Linien dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit Einweg-ANOVA-Tukey's Test durchgeführt. Die Messergebnisse, die mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind nicht signifikant unterschiedlich ($p \leq 0.05$) (modifiziert nach Reiter et al., 2019).

Die Resistenz gegenüber Levofloxacin wurde in zwei unabhängigen Experimenten (n=15-18) untersucht (Abbildung 58). Die Messdaten sowie die Signifikanz-Tests sind im Anhang in Tabellen A22 und A23 zu finden (S. 274). Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der Levofloxacin-Resistenz zwischen den Wildtypen von *Pf0-1* und *PfAR-1*. Der durchschnittliche Hemmhof-Durchmesser beträgt bei *Pf0-1* $41,9 \pm 2,7$ mm und bei *PfAR-1* $43,3 \pm 16,8$ mm. Die zwei der drei *Pf0-1*-Austauschmutanten besitzen signifikant höhere Resistenz als der *Pf0-1*-Wildtyp. Die durchschnittlichen Hemmhof-Durchmesser der *Pf0-1*-Austauschmutanten betragen $37,6 \pm 2,1$ mm, $39,6 \pm 1,5$ mm und $39,0 \pm 1,2$ mm. Die *PfAR-1*-Austauschmutanten haben eine vergleichbare Anfälligkeit gegenüber Levofloxacin wie der *PfAR-1*-Wildtyp. Die durchschnittlichen Hemmhof-Durchmesser der Austauschmutanten betragen $44,4 \pm 4,5$ mm, $43,4 \pm 2,1$ mm und $46,2 \pm 11,2$ mm.

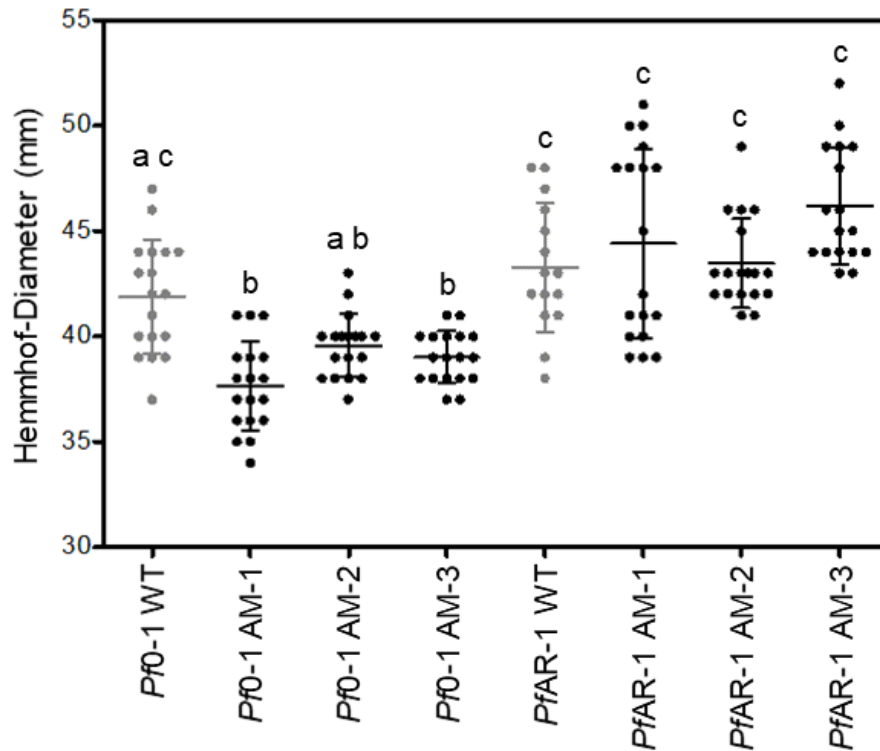


Abbildung 58. Untersuchung der Levofloxacin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit *Pf0-1* und *PfAR-1*-Gyrase-Austausch-Mutanten. Es wurden 20 µl 60 mM Levofloxacin (434 µg) in ein Loch im Agar mit einem Durchmesser von 6 mm appliziert (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhof-Test). Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (n=15-18). Die einzelnen Messwerte sind als Punkte, die Durchschnittswerte sind als die horizontalen Linien und die Standardabweichung als die vertikalen Linien dargestellt. Die statistische Analyse wurde mit Einweg-ANOVA-Tukey's Test durchgeführt. Die Messergebnisse, die mit gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind nicht signifikant unterschiedlich ($p \leq 0.05$).

Zusätzlich wurden die minimal hemmenden und bakteriziden Konzentrationen (MHK und MBK) von Allicin, Nalidixinsäure, Novobiocin und Levofloxacin der Austauschmutanten und der Wildtypen bestimmt (Tabelle 73 und Tabelle 74, s. Kap. 2.2.2.6 Bestimmung der minimalen hemmende Konzentration (MHK) und minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) bei Bakterien). Die MHK- und MBK-Werte geben die Ergebnisse des Hemmhof-Tests wieder. Die MHK vom *PfAR-1*-Wildtyp und der drei Austauschmutanten für Allicin sind gleich und betragen 1,58 mM. Der *Pf0-1*-Wildtyp ist anfälliger gegenüber Allicin als *PfAR-1*. Dabei betragen die MHK vom Wildtyp 0,79 mM und von *Pf0-1*-Austauschmutanten 0,39 mM Allicin. Durch den Austausch der *gyrA*-Gene haben die *PfAR-1*-Austauschmutanten die Nalidixinsäure-Resistenz verloren und die *Pf0-1*-Austauschmutanten haben sie erworben (Tabelle 72 und Tabelle 73). Die Sensitivität gegenüber Novobiocin und Levofloxacin ist bei *Pf0-1*-Wildtyp und *PfAR-1*-Wildtyp ähnlich und verändert sich durch den *gyrA*-Austausch nicht (für die genaue Werte s. Tabelle 72 und Tabelle 73).

Tabelle 73. Minimale hemmende Konzentration (MHK) von Allicin, Nalidixinsäure, Novobiocin und Levofloxacin bei den Gyrase-Austauschmutanten der *Pf0-1* und *PfAR-1*.

Stamm	MHK (mM)			
	Allicin	Nalidixinsäure	Novobiocin	Levofloxacin
<i>Pf0-1</i> WT	0,79	0,2	1,58	0,025
<i>Pf0-1</i> AM-1	0,39	3,16	1,58	≤0,006
<i>Pf0-1</i> AM-2	0,39	3,16	3,16	0,012
<i>Pf0-1</i> AM-3	0,39	6,31	3,16	0,012
<i>PfAR-1</i> WT	1,58	3,16	0,79	0,012
<i>PfAR-1</i> AM-1	1,58	0,2	0,79	≤0,006
<i>PfAR-1</i> AM-2	1,58	0,39	1,58	≤0,006
<i>PfAR-1</i> AM-3	1,58	0,2	0,79	≤0,006

Tabelle 74. Minimale bakterizide Konzentration (MBK) von Allicin, Nalidixinsäure, Novobiocin und Levofloxacin bei den Gyrase-Austauschmutanten der *Pf0-1* und *PfAR-1*.

Stamm	MBK (mM)			
	Allicin	Nalidixinsäure	Novobiocin	Levofloxacin
<i>Pf0-1</i> WT	0,79	0,79	3,16	n.b.
<i>Pf0-1</i> AM-1	0,79	6,31	6,31	n.b.
<i>Pf0-1</i> AM-2	0,79	6,31	≥6,31	0,1
<i>Pf0-1</i> AM-3	0,79	≥6,31	≥6,31	0,2
<i>PfAR-1</i> WT	1,58	6,31	3,16	0,025
<i>PfAR-1</i> AM-1	1,58	0,79	1,58	n.b.
<i>PfAR-1</i> AM-2	3,16	0,79	3,16	0,012
<i>PfAR-1</i> AM-3	3,16	0,79	1,58	0,012

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass der Austausch der *gyrA*-Gene zwischen *Pf0-1* und *PfAR-1* die Resistenz gegenüber Nalidixinsäure bei den Austauschmutanten in Vergleich zu den Wildtypen verändert hat. Die geringen, aber signifikanten Unterschiede wurden in der Allicin-Resistenz sowohl zwischen *Pf0-1*- Wildtyp und *Pf0-1*-Austauschmutanten als auch zwischen *PfAR-1*-Wildtyp und den *PfAR-1*-Austauschmutanten festgestellt. Es wurde kein Unterschied in der Resistenz gegenüber Novobiocin und Levofloxacin weder zwischen *Pf0-1* und *PfAR-1* noch zwischen *PfAR-1*-Wildtyp und *PfAR-1*-Austauschmutanten festgestellt. Die *Pf0-1*-Austauschmutanten besitzen eine erhöhte Novobiocin- und eine leicht erhöhte Levofloxacin-Resistenz im Vergleich zu *Pf0-1* und *PfAR-1*-Wildtyp.

3.3. Bestimmung von MHK und MBK für Allicin bei lungenpathogenen Bakterien

In diesem Arbeitsschritt wurden die minimale hemmende und minimale bakterizide Konzentration (MHK und MBK) des Allicins bei mehreren humanpathogenen Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*) unter standardisierten Bedingungen laut EUCAST (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) bestimmt. Es wurden die klinischen Isolate und die standardisierten Stämme, unter denen auch die MDR (engl. *multiple drug resistant*)- und MRSA (engl. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)-Stämme vorhanden sind, untersucht. Diese Arbeit wurde in Kooperation mit dem Nationalen Referenz-Zentrum für Streptokokken (NRZ) der Uniklinik RWTH Aachen (Natalia Levina und Dr. Mark van der Linden) durchgeführt. Das NRZ und Institut für Biologie IV der RWTH (Angewandte Mikrobiologie, iAMB) haben die getesteten Stämme zur Verfügung gestellt und das NRZ hat in die Durchführung der Resistenz-Tests eingewiesen.

Der Resistenz-Test wurde nach Vorgaben der EUCAST durchgeführt (s. Kap. 2.2.2.6 Bestimmung der minimalen hemmenden Konzentration (MHK) und minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) bei Bakterien). In diesem Test sind alle Parameter, wie die Inokulum-Menge, die Nährmedium-Zusammensetzung und die Kultivierungsbedingungen streng vorgeschrieben. Die Bakterien werden von einer ein-Tag-alten Blut-Agar-Platte im Müller-Hilton-Medium mit 5% Blut suspendiert und in einer 96-Mikrotiter-Platte mit der Zugabe von Allicin in verschiedenen Konzentrationen verteilt. Die Platte wird über 18 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch diesen Test bestimmt man zwei wichtige Größen: zum Ersten die minimale hemmende Konzentration (MHK), welche die niedrigste Antibiotika-Konzentration, die das sichtbare bakterielle Wachstum inhibiert, beschreibt; zum Zweiten die minimale bakterizide Konzentration (MBK), welche die niedrigste Antibiotika-Konzentration, die mindestens 99,9% der Bakterien abtötet, beschreibt. Dafür werden Proben aus jedem well auf eine Blut-Agar-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Allicin-Konzentrationen zwischen 5 µM und 6,31 mM (bzw. zwischen 1 µg/ml und 1024 µg/ml) wurden in 2ⁿ-Verdünnungsreihen getestet.

Die ermittelten MHK und MBK für Allicin sind in Tabelle 75 dargestellt. Bei den meisten untersuchten Isolaten wurde das Wachstum bei 0,39 mM bzw. 64 µg/ml Allicin inhibiert. Das Isolat *P. aeruginosa* DSM 2659 zeigte im Vergleich zu den anderen Isolaten erhöhte Allicin-Resistenz. Das Wachstum wurde erst bei 3,16 mM bzw. 512 µg/ml Allicin eingestellt. *Klebsiella pneumoniae*-Isolate zeigten ebenfalls hohe Allicin-Resistenzen mit MHKs von 0,79 mM bzw. 128 µg/ml Allicin. Die Werte für MBKs sind üblicherweise höher als für MHKs. Der resistente *P. aeruginosa* DSM 2659 zeigte auch einen hohen MBK-Wert von 6,31 mM bzw. 1024 µg/ml Allicin. Die gleiche Allicin-Konzentration war notwendig, um die *S. dysgalactiae*-Isolate zu töten. Bei den meisten MDR-Stämmen der *S. pneumoniae* betrug die MBK 0,79 mM bzw. 128 µg/ml Allicin. Bei den meisten klinischen Isolaten der *S. pneumoniae*, die niedrigere Resistenz gegenüber konventionellen Antibiotika aufweisen, wirkten schon 0,39 mM bzw. 64 µg/ml Allicin bakterizid.

3. Ergebnisse

Tabelle 75. Ermittelte MHKs und MBKs für Allicin bei lungenpathogenen Bakterien. Tests wurden nach standardisierten Vorschriften laut EUCAST (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) durchgeführt. Die MDR (engl. *multiple drug resistant*)-Stämme der *S. pneumoniae* und Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA) sind fett hinterlegt. Der Test wurde mindestens als Duplikat durchgeführt (s. Kap. 2.2.2.6 Bestimmung der minimalen hemmende Konzentration (MHK) und minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) bei Bakterien).

Organismus	MHK		MBK	
	µg/ml	mM	µg/ml	mM
<i>Acinetobacter baumannii</i> SNo 45541	16	0,1	32	0,2
<i>Acinetobacter baumannii</i> SNo 45757	16	0,1	32	0,2
<i>Acinetobacter baumannii</i> SNo 45760	16	0,1	32	0,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SNo 45412	128	0,79	128	0,79
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SNo 45413	128	0,79	128	0,79
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 SBUG8	64	0,39	128	0,79
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO25	64	0,39	256	1,58
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 2659	512	3,16	1024	6,31
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	32	0,2	512	3,16
<i>Staphylococcus aureus</i> SNo 68709	64	0,39	256	1,58
<i>Streptococcus pneumoniae</i> CSR¹⁴-10	64	0,39	128	0,79
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Poland^{23F}-16	64	0,39	64	0,39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> S. Africa^{9A}-13	64	0,39	128	0,79
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Spain^{23F}-1	64	0,39	128	0,79
<i>Streptococcus pneumoniae</i> SNo 23083	128	0,79	128	0,79
<i>Streptococcus pneumoniae</i> SNo 67715	64	0,39	64	0,39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> SNo 68665	64	0,39	64	0,39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> SNo 68668	32	0,2	64	0,39
<i>Streptococcus agalactiae</i> SNo 67764	64	0,39	128	0,79
<i>Streptococcus agalactiae</i> SNo 69235	64	0,39	64	0,39
<i>Streptococcus agalactiae</i> SNo 72800	64	0,39		
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> SNo 67799	64	0,39	1024	6,31
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> SNo 71818	64	0,39		
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> SNo 73742	64	0,39	1024	6,31
<i>Streptococcus pyogenes</i> SNo 67467	32	0,2	64	0,39

mM	0,01	0,01	0,02	0,05	0,10	0,20	0,39	0,79	1,58	3,16	6,31
µg/ml	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024

Diese Untersuchungen wurden mindestens mit Duplikaten durchgeführt. Die meisten Stämme wurden in zwei unabhängigen Ansätzen untersucht. Die ausführlichen Daten sind im Anhang (Tabelle A24, S. 275) zu finden.

Als nächstes wurden die effektiven wachstumsinhibierenden Allicin-Konzentrationen mit denen von konventionellen Antibiotika verglichen (Tabelle 76). Die MHKs für konventionelle Antibiotika wurden durch das NRZ ermittelt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die konventionellen Antibiotika sind in den meisten Fällen schon in geringeren Konzentrationen effektiv. Bei den klinischen Isolaten der *S. pneumoniae* waren die meisten untersuchten Antibiotika schon unter 1 µg/ml wirksam. Die MDR-Pneumokokken-Stämme waren resistent gegenüber Erythromycin und Clindamycin mit der MHK größer als 256 µg/ml. Im Vergleich dazu hemmt Allicin diese Stämme schon bei 64 µg/ml. Zwar hemmte Allicin das bakterielle Wachstum bei höheren Konzentrationen als

3. Ergebnisse

die konventionell benutzten Antibiotika, allerdings hemmte es die MDR- und MRSA-Stämme mit der gleichen Effektivität wie pathogene Stämme ohne erhöhte Resistenzen.

Tabelle 76. MHK für verschiedene Antibiotika im Vergleich zu Allicin bei lungenpathogenen Bakterien. Die Tests wurden nach standardisierten Vorschriften laut EUCAST (engl. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) durchgeführt. Die MDR-Stämme sind fett hinterlegt. Der Test wurde mit Hilfe der antibiotikahaltigen Mikrotiterplatten vom NRZ für Streptokokken (Uniklinik RWTH Aachen) einmal durchgeführt. Folgende Antibiotika wurden untersucht: Penicillin (Pen), Cefotaxim (Fot), Erythromycin (Ery), Clindamycin (Clin), Tetracyclin (Tet), Chloramphenicol (Chl), Trimethoprim/Sulfamethoxazol (Sxt), Amoxicillin (Amox), Levofloxacin (Levo), Moxifloxacin (Mxf) und Vancomycin (Van).

Organismus	Allicin	Pen	Fot	Ery	Clin	Tet	Chl	Sxt	Amox	Levo	Mxf	Van
<i>S. pneumoniae</i> Spain^{23F}-1	64	1	1,5	0,025	0,19	64	16	2/38	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> CSR¹⁴-10	64	8	1	≥256	≥256	48	32	0,25/4,75	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> S. Africa^{19A}-13	64	1,5	0,5	≥256	≥256	48	24	4/76	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> Poland^{23F}-16	64	8	4	≥256	≥256	64	16	1,5/28,5	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> SNo 67715	64	4	2	≤0,12	≤0,12	16	≤2	1/19	4	1	≤0,25	≤0,5
<i>S. pneumoniae</i> SNo 68668	32	≤0,015	≤0,015	≤0,12	≤0,12	0,25	≤2	≤0,25/4,75	≤0,015	1	≤0,25	≤0,5
<i>S. pneumoniae</i> SNo 68665	64	≤0,015	≤0,015	≤0,12	≤0,12	0,25	≤2	≤0,25/4,75	≤0,015	1	≤0,25	≤0,5
<i>S. pyogenes</i> SNo 67467	32	≤0,015	≤0,015	≥256	64	64	≤2	≤0,25/4,75	0,015	1	≤0,25	≤0,5
<i>S. dysgalactiae</i> SNo 67799	64	≤0,015	≤0,015	≤0,12	≤0,12	16	≤2	≤0,25/4,75	0,03	1	≤0,25	≤0,5
<i>S. agalactiae</i> SNo 67764	64	0,03	0,06	≤0,12	≤0,12	64	≤2	≤0,25/4,75	0,06	1	≤0,25	≤0,5

µg/ml	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
-------	-------	-------	------	-----	---	---	---	---	----	----	----	-----	-----

3.4. Auswirkung des Allicins auf die Biofilm-Ausbildung

In diesem Arbeitsschritt wurde der Einfluss des Allicins auf den bakteriellen und pilzlichen Biofilm untersucht. Dabei wurde die Allicin-Konzentration, die die Ausbildung des Biofilms hemmt und die den ausgebildeten Biofilm abtötet, bestimmt.

3.4.1. Auswirkung des Allicins auf die Biofilm-Ausbildung bei *Pf0-1* und *PfAR-1* in Flüssigkultur

Als erstes wurde die Auswirkung des Allicins auf den bakteriellen Biofilm bei dem *Pseudomonas fluorescens* Allicin-resistenten Stamm *PfAR-1* und dem Allicin-anfälligen Stamm *Pf0-1* untersucht (s. Kap. 2.2.2.8 Bestimmung der bakteriellen Biofilm-Ausbildung in Flüssigkultur). Dafür wurden jeweils 2 ml Bakterien-Suspension in Reagenzgläsern über Nacht Allicin-Stress ausgesetzt. Die Bakterien bilden den Biofilm an der Glaswand an der Flüssigkeitsoberfläche. Anschließend wurden die Röhrchen vorsichtig gespült, um die nicht adhärenen Bakterien zu entfernen, und der Biofilm wird mit 0,2%iger Kristallviolett-Lösung gefärbt. Der Allicin-anfällige *Pf0-1* Stamm bildete keinen Biofilm bei den Allicin-Konzentrationen über 0,6 mM aus. Im Gegensatz dazu konnte der resistente *PfAR-1* noch bei 1,6 mM Allicin einen Biofilm ausbilden (Abbildung 59).

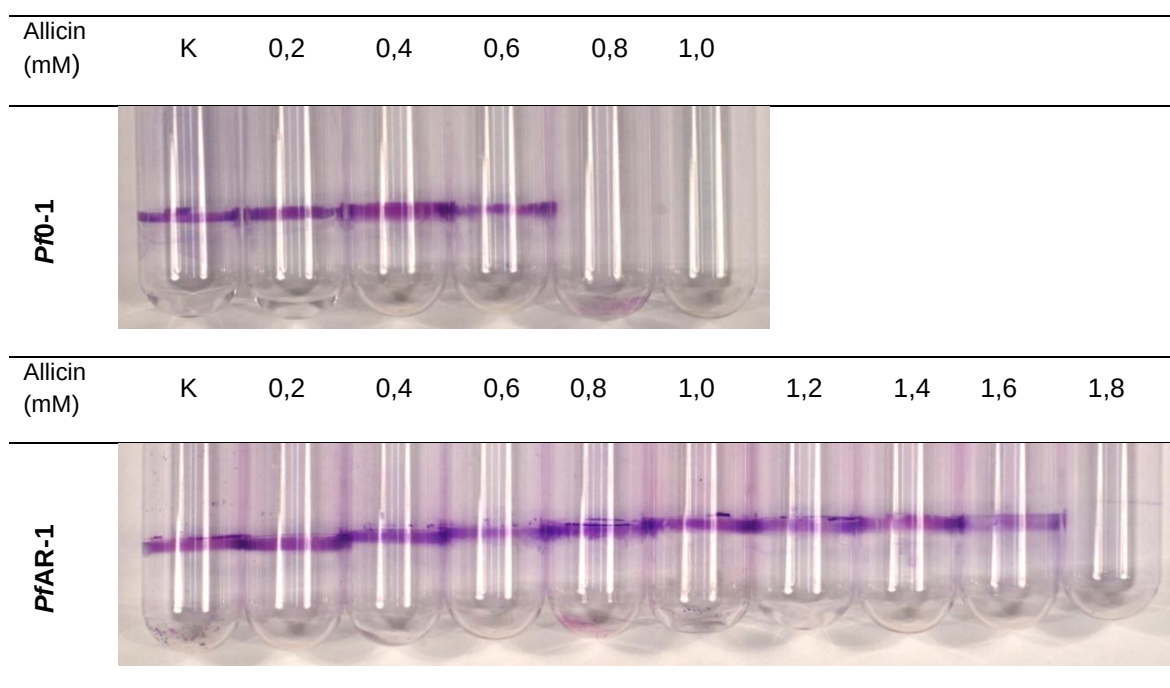


Abbildung 59. Biofilm-Ausbildung bei *Pf0-1* und *PfAR-1* bei verschiedenen Allicin-Konzentrationen. Bakterien wurden als Standkultur in King's B-Flüssigmedium 24 h bei 28°C inkubiert. Der an der Flüssigkeit-Oberfläche an der Glaswand ausgebildete Biofilm wurde mit 0,2% Kristallviolett angefärbt. Bei der Kontrolle (K) wurde kein Allicin dazugegeben (s. Kap. 2.2.2.8 Bestimmung der bakteriellen Biofilm-Ausbildung in Flüssigkultur).

Bei dieser Untersuchung ist wichtig, die Wachstums-hemmenden und die Biofilm-hemmenden Konzentrationen voneinander zu unterscheiden. So hemmte Allicin das Wachstum von *Pf0-1* bei 0,6 mM und von *PfAR-1* bei 1,6 mM fast vollständig (Abbildung 60). Diese Konzentrationen entsprechen den Biofilm-inhibierenden Konzentrationen. Das bedeutet, dass Allicin keine spezielle

Biofilm-hemmende Wirkung bei den hier untersuchten *Pseudomonas fluorescens* Stämmen besitzt. Die gesamten Daten zu diesen Experimenten sind im Anhang in Tabellen A25 und A26 dargestellt (S. 278).

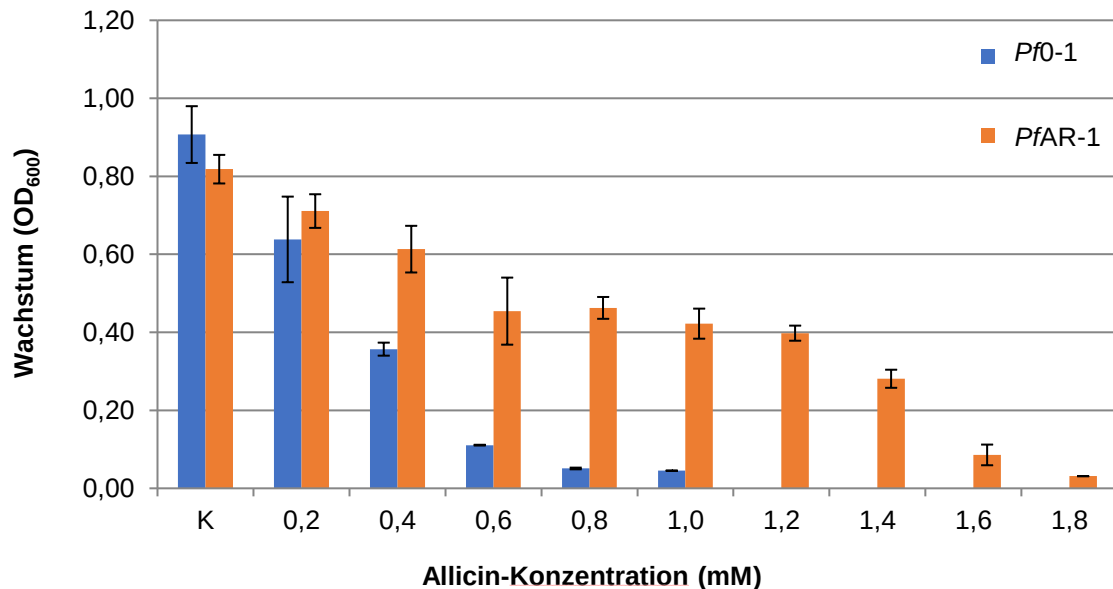


Abbildung 60. Wachstum der Bakterien *Pf0-1* und *PfAR-1* bei verschiedenen Allicin-Konzentrationen in Stand-Kultur bei der Untersuchung der Biofilm-Ausbildung. Bei der Kontrolle (K) wurde kein Allicin dazugegeben (s. Kap. 2.2.2.8 Bestimmung der bakteriellen Biofilm-Ausbildung in Flüssigkultur). Dargestellt sind die Mittelwerte (n=2). Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

3.4.2. Biofilm-Reporter-Stämme *Ps4612* mit pZLR4- *traR-traG::lacZ*-Plasmid und *PfAR-1* mit pJP2-*aprA::gusA*

Die Wirkung des Allicins auf den bakteriellen Biofilm wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Nadja von Salzen (2016) untersucht. Als erstes wurden *Pseudomonas*-Stämme *Pf0-1*, *PfAR-1* und *Ps4612* mit dem Biofilm-Reporter-Plasmid pZLR4-*traR-traG::lacZ* (Cha et al., 1998) transformiert und die Wirkung des Allicins auf die Ausbildung des Biofilms untersucht (s. Kap. 2.2.2.9 Bestimmung der bakteriellen Biofilm-Ausbildung auf Agar-Platten). In Anwesenheit der Biofilm-Signalmoleküle Homoserin-Lactone (HSL) wird die Expression der *traR*- und *traG*-Gene induziert, und somit ein an den Promotor gekoppeltes *lacZ*-Gen exprimiert. So werden die Bakterien bei der Synthese der HSL und somit bei der Ausbildung des Biofilms durch die Reaktion von β -Galactosidase und X-Gal blau angefärbt. Falls die Synthese der HSL inhibiert ist und so auch kein Biofilm ausgebildet wird, bleiben die Bakterien weiß (Cha et al., 1998; Nievas et al., 2012). Außerdem wurde ein *Pf0-1* bzw. *PfAR-1*-spezifisches Biofilm-Reporter-Plasmid pJP2-*aprA::gusA*, mit der β -Glucuronidase unter der Kontrolle der Promoter-Region des Enzyms alkalische Protease kloniert und die Wirkung des Allicins auf die Biofilm-Ausbildung untersucht (s. Kap. 2.2.3.15 Klonieren der Biofilm-Reporter-Plasmide pJP2-*aprA::gusA*).

3. Ergebnisse

Die Bakterien *Pf0-1*, *PfAR-1* und *Ps4612* wurden mit dem Reporter-Plasmid *pZLR4-traR-traG::lacZ* transformiert (s. Kap. 2.2.3.12 Transformation von Pseudomonaden durch die Elektroporation) und ein Hemmhof-Test durchgeführt (s. Kap. 2.2.2.9 Bestimmung der bakteriellen Biofilm-Ausbildung auf Agar-Platten). In Abbildung 61 ist der Hemmhof-Test mit Allicin (60 µl von 134 mM; 1,3 mg) mit *Ps4612* abgebildet. In der Mitte wurde das bakterielle Wachstum durch Allicin gehemmt und der Agar blieb durchsichtig. Angrenzend an den Hemmhof konnte eine schmale weiße Wachstumszone beobachtet werden. In diesem Bereich, der knapp unter den wachstumshemmenden Konzentrationen liegt, hemmte Allicin die Synthese der HSL und so auch die Ausbildung des Biofilms. Allerdings ist dieser Biofilm-hemmende Konzentrationsbereich sehr klein, da die weiße Wachstumszone sehr schmal ist. Anschließend kommt die blau-gefärbte Wachstumszone, in der die Bakterien den Biofilm ausbildeten. Bei den *P. fluorescens* Stämmen *Pf0-1* und *PfAR-1* mit diesem Reporter-Plasmid konnte keine Biofilm-hemmende Wirkung des Allicins mit den verwendeten Reporter-Konstrukten gezeigt werden.

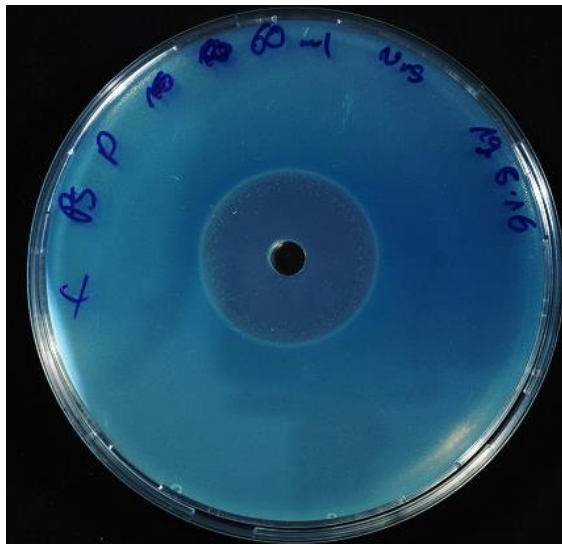


Abbildung 61. Allicin inhibiert die Ausbildung von Biofilm bei *Pseudomonas syringae* 4612. *Ps4612* wurde mit dem Biofilm-Reporter-Plasmid *pZLR4* transformiert, das ein *traG::lacZ*-Konstrukt und *traR*-Gen enthält. In Anwesenheit der Homoserin-Lactone (HSL), Biofilm-Signalmoleküle, wird die Expression des *traG*-Gens und der β -Galactosidase induziert. So werden die Bakterien in Anwesenheit von X-Gal und der Synthese der HSL blau angefärbt. Wenn die Synthese der HSL inhibiert und so auch kein Biofilm ausgebildet wird, bleiben die Bakterien weiß (von Salzen, 2016).

Anschließend wurden *Pf0-1* bzw. *PfAR-1* spezifische Biofilm-Reporter entworfen (von Salzen, 2016). Dafür wurde das Plasmid *pJP2* mit dem Reporter-Konstrukt *aprA::gusA* kloniert (s. Kap. 2.2.3.15 Klonieren der Biofilm-Reporter-Plasmide *pJP2-aprA::gusA*). Bei der Ausbildung des Biofilms wird die Expression der Gene von alkalischer Metalloprotease *AprA* induziert. In diesem Reporter-Konstrukt wurde der Promoter-Bereich des Gens *aprA* aus *Pf0-1* bzw. *PfAR-1* an die Sequenz von β -Glucuronidase kloniert. In Anwesenheit von X-Gluc führt die Biofilmbildung zu Blau-Färbung. Ist die Biofilmbildung gehemmt, bleiben die Bakterien weiß. *Pf0-1* mit dem Reporter-Plasmid *pJP2-aprA::gusA* wurde in der Bachelor-Arbeit von Nadja von Salzen hergestellt und untersucht. Dabei wurde keine Biofilm-hemmende Wirkung von Allicin gezeigt. Das entsprechende Reporter-Plasmid für *PfAR-1* wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und in *PfAR-1* transformiert. Die Ausbildung des Biofilms bei Allicin-Behandlung wurde mittels Hemmhof-Test untersucht (Abbildung 62) (s. Kap. 2.2.2.9 Bestimmung der bakteriellen Biofilm-Ausbildung auf Agar-Platten). Bei der Kontrolle bildete der Reporter-Stamm *PfAR-1 pJP2-aprA::gusA* einen Biofilm und färbte sich in Anwesenheit von X-Gluc blau. Bei der Behandlung mit Allicin (100 mM, 60 µl)

entstand ein Hemmhof ohne bakterielles Wachstum. Rund um den Hemmhof befand sich die Zone mit weiß-gefärbten Bakterien. In diesem Bereich war die Allicin-Konzentration nicht mehr wachstumshemmend, die Biofilm-Ausbildung wurde hingegen inhibiert. Anschließend an diese weiße Bakterienzone kam der Bereich, in dem sich die Bakterien blau färbten. In diesem Bereich wurde weder das Wachstum noch die Biofilm-Ausbildung inhibiert.

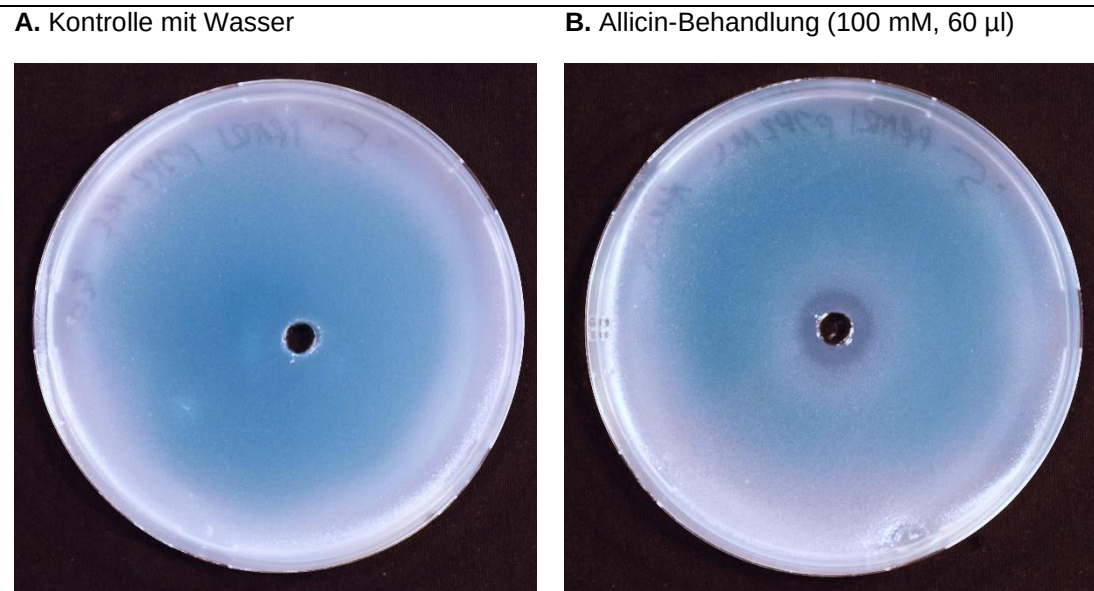


Abbildung 62. Allicin inhibiert die Ausbildung von Biofilm bei *PfAR-1*. *PfAR-1* wurde mit dem Biofilm-Reporter-Plasmid pJP2 mit dem Konstrukt *aprA::gusA* kloniert. Bei der Ausbildung des Biofilms wird die Expression der Gene von alkalischer Metalloprotease AprA induziert. In diesem Reporter-Konstrukt wurde der Promoter-Bereich von *aprA* an die Sequenz von β -Glucuronidase kloniert. In Anwesenheit von X-Gluc führt die Biofilmbildung zur Blau-Färbung. Ist die Biofilmbildung gehemmt, bleiben die Bakterien weiß (s. Kap. 2.2.3.15 Klonieren der Biofilm-Reporter-Plasmide pJP2-*aprA::gusA* und 2.2.2.9 Bestimmung der bakteriellen Biofilm-Ausbildung auf Agar-Platten).

3.4.3. Auswirkung des Allicins auf den Biofilm von *Candida albicans*

Die Wirkung des Allicins auf den Biofilm wurde auch bei dem Pilz *Candida albicans* in Kooperation mit der KU Leuven (Els Meert und Karin Thevissen) untersucht. Diese Untersuchung wurde in dem 96-Mikrotiter-Format durchgeführt. Zunächst wurde die minimale hemmende und fungizide Allicin-Konzentration für die *C. albicans*-Kultur (Zellen in dem Biofilm als auch die freischwebenden Zellen) bestimmt (s. Kap. 2.2.2.7 Bestimmung der minimalen hemmenden (MHK) und minimalen fungiziden Konzentration (MBK) bei Pilzen). Die Bestimmung der minimal hemmenden Konzentration (MHK) des Allicins erfolgte im 96-Mikrotiter-Format. Das sichtbare Wachstum wurde nach 24 h als OD₆₀₀ bestimmt. Bei der Kontrolle wurden die Zellen mit Wasser behandelt und der Mittelwert der OD₆₀₀-Werte als 100% des Wachstums genommen. Es wurde 2ⁿ-Verdünnungsreihen des Allicins mit der Höchstkonzentration von 5 mM verwendet (9,77 µM, 19,53 µM, 39,06 µM, 78,13 µM, 156,25 µM, 312,5 µM, 625 µM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM). Die MHK wurde in zwei unabhängigen Experimenten (n=6) bestimmt und beträgt 156,25 µM Allicin (Abbildung 63). Die einzelnen Messdaten zu diesem Experiment sind im Anhang in den Tabellen A27 und A28 zu finden (S. 279). Anschließend wurde die minimale fungizide Konzentration (MFK) des Allicins bestimmt.

3. Ergebnisse

Dafür wurden 5 µl aus jedem well der 96-well-Platte der MHK-Bestimmung auf eine YPD-Agar-Platte übertragen und bei 37°C 24 h inkubiert. Die niedrigste Allicin-Konzentration ohne Pilz-Wachstum ist die MFK und beträgt 312,5 µM Allicin (Abbildung 64).

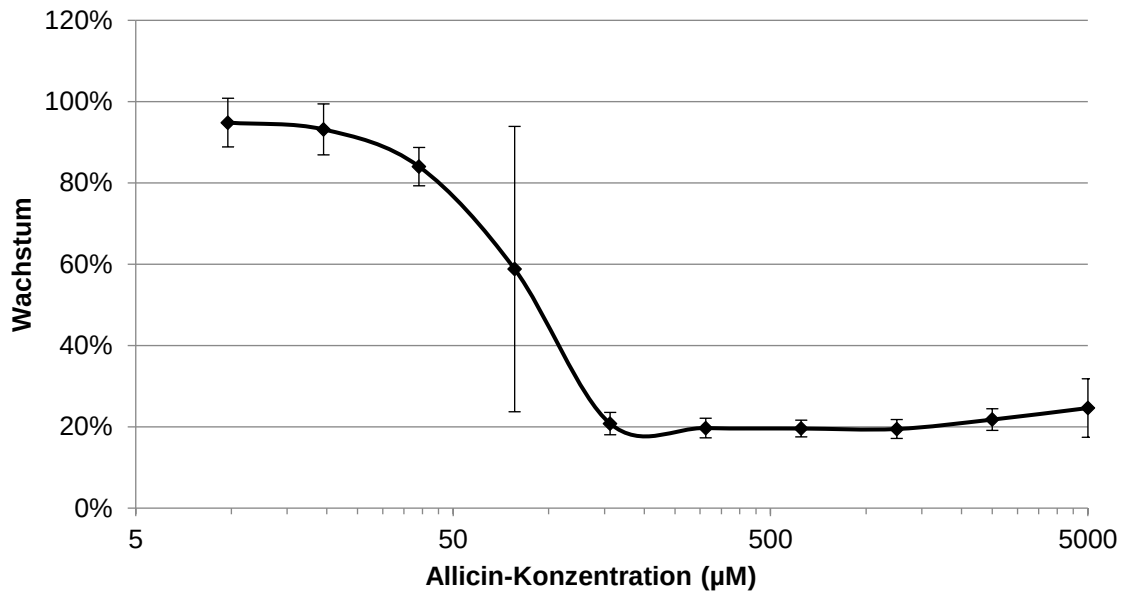


Abbildung 63. Die minimale hemmende Konzentration (MHK) des Allicins, die das sichtbare Wachstum von *C. albicans* inhibiert, beträgt 156,25 µM. Das sichtbare Wachstum wurde nach 24 h Inkubation bei 37°C als OD₆₀₀ in Mikrotiter-Format bestimmt. Bei der Kontrolle wurden die Zellen mit Wasser behandelt und der Mittelwert der OD₆₀₀-Werte als 100% des Wachstums gesetzt. Es wurde eine 2ⁿ-Verdünnungsreihe des Allicins mit der Höchstkonzentration von 5 mM verwendet (9,77 µM, 19,53 M, 39,06 µM, 78,13 µM, 156,25 µM, 312,5 µM, 625 µM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM) (s. Kap. 2.2.2.7 Bestimmung der minimalen hemmende (MHK) und minimalen fungiziden Konzentration (MBK) bei Pilzen). Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (n=6). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

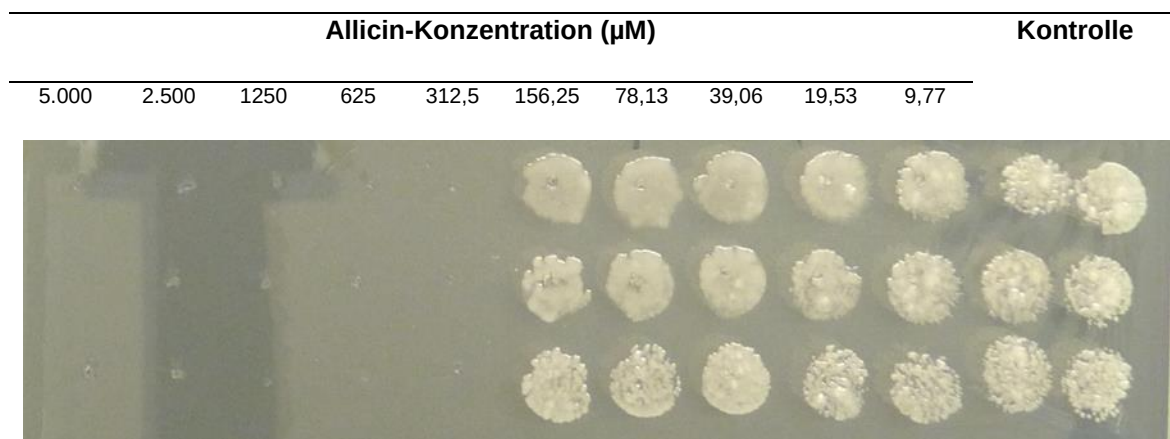


Abbildung 64. Bestimmung der minimalen fungiziden Konzentration (MFK) von Allicin bei *C. albicans*. MFK beschreibt die niedrigste Allicin-Konzentration, die nicht nur das Wachstum inhibiert, sondern auch den Pilz abtötet. Die Pilzsuspension wurde über Nacht bei 37°C und verschiedenen (9,77 µM-5 mM) Allicin-Konzentrationen in einer 96-Mikrotiter-Platte inkubiert. Anschließend wurden 5 µl aus jedem well auf eine YPD-Agar-Platte übertragen und 24 h bei 37°C inkubiert (dargestellt sind drei Replikate in Reihen). Die MFK des Allicins bei *C. albicans* beträgt 312,5 µM (s. Kap. 2.2.2.7 Bestimmung der minimalen hemmende (MHK) und minimalen fungiziden Konzentration (MBK) bei Pilzen).

Im nächsten Schritt wurde die Allicin-Konzentration, die die Biofilm-Ausbildung inhibiert, bestimmt (s. Kap. 2.2.2.10 Bestimmung der Biofilm-Ausbildung von *C. albicans* in 96-Mikrotiter-Format). Dafür wurde die frische *Candida*-Suspension für eine Stunde in der 96-well-Platte mit unterschiedlichen Allicin-Konzentrationen bei 37°C inkubiert, die Flüssigkeit abgenommen und die einzelnen wells vorsichtig gewaschen. Dadurch blieben nur die adhärenen und somit Biofilm-ausbildenden Zellen in den wells vorhanden. Die Zellen wurden weiter in dem Nährmedium bei verschiedenen Allicin-Konzentrationen über 17 h inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde als OD₆₀₀ gemessen und so die minimale Allicin-Konzentration, die die Ausbildung von Biofilm hemmt, bestimmt (Abbildung 65). Sie betrug 156,25 µM Allicin. Die einzelnen Messwerte sind im Anhang in den Tabellen A29 und A30 dargestellt (S. 280).

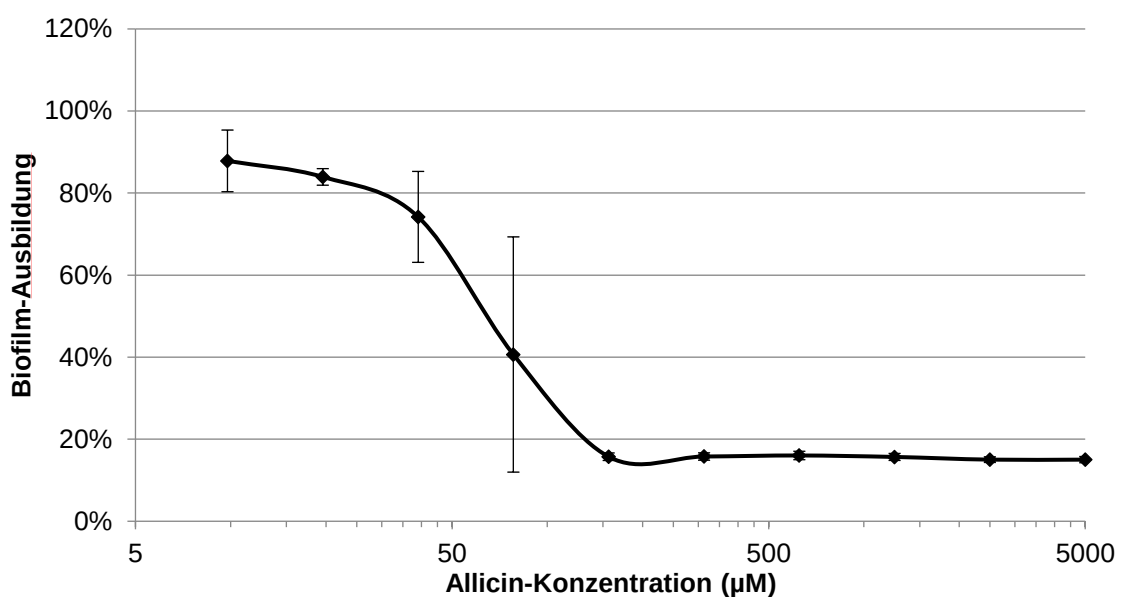
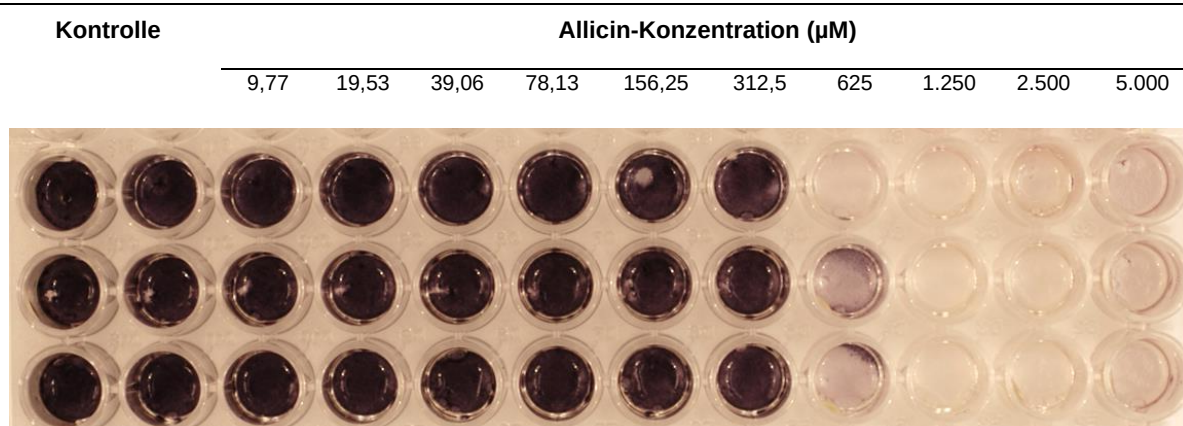


Abbildung 65. Allicin inhibiert die Ausbildung des Biofilms von *C. albicans*. Die Biofilm-Ausbildung wurde im Mikrotiter-Format untersucht. Das sichtbare Wachstum des Biofilms wurde nach 18 h als OD₆₀₀ bestimmt. Bei der Kontrolle wurden die Zellen mit Wasser behandelt und der Mittelwert der OD₆₀₀-Werte als 100% der Biofilm-Ausbildung gesetzt. Es wurde eine 2ⁿ-Verdünnungsreihe des Allicins mit der Höchstkonzentration von 5 mM verwendet (9,77 µM, 19,53 M, 39,06 µM, 78,13 µM, 156,25 µM, 312,5 µM, 625 µM, 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM) (s. Kap. 2.2.2.10 Bestimmung der Biofilm-Ausbildung von *C. albicans* in 96-Mikrotiter-Format). Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (n=6). Fehlerbalken stellen Standardabweichung dar.

Anschließend wurde die Allicin-Konzentration, die einen 1-Tag-alten Biofilm abtötet, bestimmt. Dafür wurde ein 1-Tag-alter Biofilm von *C. albicans* mit Allicin in verschiedenen Konzentrationen behandelt und die Vitalität des Biofilms nach 18 h mittels MTT-Test als Vitalitäts-Assay bestimmt (Abbildung 66 A, s. Kap. 2.2.2.10 Bestimmung der Biofilm-Ausbildung von *C. albicans* in 96-Mikrotiter-Format). Bei der Kontrolle wurden die Zellen mit Wasser behandelt und der Mittelwert der OD₅₇₀-Werte als 100% der Biofilm-Ausbildung genommen (Abbildung 66 B). Die Abtötungskonzentration des Allicins für *C. albicans*-Biofilm betrug 1,25 mM Allicin. Die einzelnen Messdaten sind im Anhang in den Tabellen A31 und A32 dargestellt (S. 281). Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die wachstumshemmende Konzentration des Allicins auf die *C. albicans*-Zellkultur und die Biofilm-Zellen nicht unterscheidet, sie beträgt 156,25 µM Allicin. Die MFK des Allicins von 313 µM ist geringer als die Allicin-Konzentration, die zur Abtötung des Biofilms notwendig ist (1,25 mM).

A.



B.

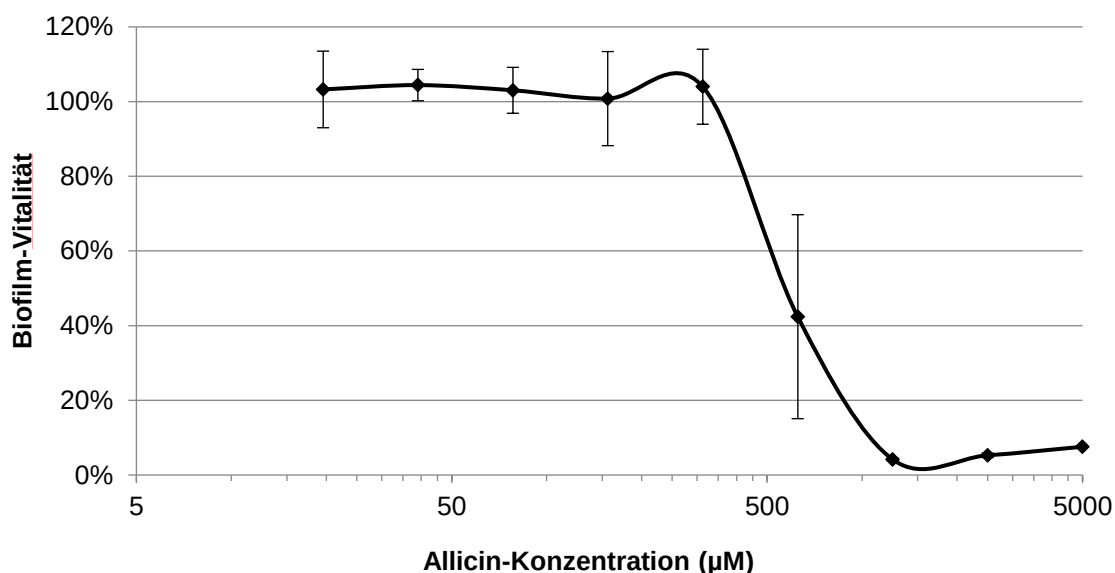


Abbildung 66. Eradikation des 1-Tag-alten Biofilms von *C. albicans* durch 1,25 mM Allicin. Die Biofilm-Vitalität wurde im Mikrotiter-Format untersucht (A, beispielhaft drei Replikate). Zu dem ein-Tag-alten Biofilm von *C. albicans* wurde Allicin in verschiedenen Konzentrationen dazugegeben und die Vitalität des Biofilms nach 18 h mittels MTT-Tests als Vitalitäts-Assay bestimmt. Bei der Kontrolle wurden die Zellen mit Wasser behandelt und der Mittelwert der OD_{570} -Werte als 100% der Biofilm-Ausbildung genommen. Es wurde eine 2^n -Verdünnungsreihe des Allicins mit der Höchstkonzentration von 5 mM verwendet (9,77 μM , 19,53 μM , 39,06 μM , 78,13 μM , 156,25 μM , 312,5 μM , 625 μM , 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM) (s. Kap. 2.2.2.10 Bestimmung der Biofilm-Ausbildung von *C. albicans* in 96-Mikrotiter-Format). (B) Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ($n=6$). Fehlerbalken stellen Standardabweichung dar.

3.5. Synergistischer Effekt des Allicins mit konventionellen Antibiotika

In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob Allicin einen synergistischen Effekt mit konventionellen Antibiotika hat, bzw., ob Allicin die wirksame Konzentration der Antibiotika bei der gemeinsamen Applikation verringern kann (s. Kap. 2.2.2.11 Untersuchung des Synergismus von Allicin mit verschiedenen Antibiotika bei Pseudomonaden). Zunächst wurden die Untersuchungen mit dem nicht-pathogenen Stamm *Pf0*-1 im Mikrotiter-Format durchgeführt. Die MHK des Allicins bei *Pf0*-1 beträgt 0,79 mM bei der Verwendung des King's B-Mediums in 96-Mikrotiter-Platte). So wurde die Allicin-Konzentration von 200 µM zu den Untersuchungen ausgewählt. Dafür wurden die MHK und MBK von Rifampicin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Levofloxacin ohne und mit Zugabe von 200 µM Allicin bestimmt (Tabelle 77). Nur im Fall von Rifampicin zeigte Allicin einen starken synergistischen Effekt: die MBK von über 513 µg/ml sank in Anwesenheit von Allicin auf 64 µg/ml. Bei den anderen Antibiotika erhöhten sich die notwendigen wirksamen Konzentrationen bei der gleichzeitigen Allicin-Applikation.

Tabelle 77. Allicin besitzt einen synergistischen Effekt mit Rifampicin bei *Pf0*-1 (grün hinterlegt). Allicin erhöht (orange hinterlegt) bzw. lässt die effektiven antimikrobiellen Konzentrationen von Chloramphenicol, Tetracyclin und Levofloxacin unverändert (gelb hinterlegt) und zeigt keinen synergistischen Effekt mit diesen konventionellen Antibiotika bei *Pf0*-1. Bei diesem Experiment wurden die Bakterien 2 Stunden mit 200 µM Allicin vorinkubiert, anschließend wurden die Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen dazu pipettiert und 18 h bei 28°C inkubiert. Das Experiment wurde einmal durchgeführt (s. Kap. 2.2.2.11 Untersuchung des Synergismus von Allicin mit verschiedenen Antibiotika bei Pseudomonaden).

Antibiotikum	MHK (µg/ml)	MHK mit 200 µM Allicin (µg/ml)	MBK (µg/ml)	MBK mit 200 µM Allicin (µg/ml)
Rifampicin	32	32	≥513	64
Chloramphenicol	128	257	≥513	≥513
Tetracyclin	0,004	0,01	0,03	0,51
Levofloxacin	0,25	1	2	4

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Allicin- und Rifampicin-Konzentrationen in Bezug auf den synergistischen Effekt untersucht. Dafür wurden die Allicin-Konzentrationen von 6,2 µM bis 6,31 mM und die Rifampicin-Konzentrationen von 0,5 µg/ml bis 32 µg/ml in 96-well-Platten mit den Bakterien *Pf0*-1 und *PfAR*-1 getestet. Das sichtbare bakterielle Wachstum wurde nach einem und nach drei Tagen ausgewertet. Bei beiden untersuchten Bakterien wurde kein synergistischer Effekt nach einem Tag Inkubation beobachtet. Das Wachstum von *Pf0*-1 wurde mit 789 µM Allicin und mit 16 µg/ml Rifampicin gehemmt (Tabelle 78). Das Wachstum von *PfAR*-1 wurde mit 1578 µM Allicin und mit 16 µg/ml Rifampicin gehemmt (Tabelle 79).

3. Ergebnisse

Tabelle 78. Allicin zeigt keinen synergistischen Effekt mit Rifampicin bei *Pf0-1* nach 24 h Inkubation. Bakterien wurden mit verschiedenen Allicin- und Rifampicin-Konzentrationen in 96-well-Platten bei 28°C 24 h inkubiert. Die Behandlungen, die das sichtbare Wachstum nicht inhibierten, sind mit „+“ gekennzeichnet und grün hinterlegt. Die Behandlungen, die zur Inhibition des bakteriellen Wachstums geführt haben, sind mit „-“ gekennzeichnet und orange hinterlegt. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt (s. Kap. 2.2.2.11 Untersuchung des Synergismus von Allicin mit verschiedenen Antibiotika bei Pseudomonaden).

		Allicin (µM)											
		6310	3155	1578	789	394	197	99	49	25	12	6	0
Rifampicin (µg/ml)	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	0	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 79. Allicin zeigt keinen synergistischen Effekt mit Rifampicin bei *PfAR-1* nach 24 h Inkubation. Bakterien wurden mit verschiedenen Allicin- und Rifampicin-Konzentrationen in einer 96-well-Platte bei 28°C 24 h inkubiert. Die Behandlungen, die das sichtbare Wachstum nicht inhibierten, sind mit „+“ gekennzeichnet und grün hinterlegt. Die Behandlungen, die zur Inhibition des bakteriellen Wachstums geführt haben, sind mit „-“ gekennzeichnet und orange hinterlegt. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt (s. Kap. 2.2.2.11 Untersuchung des Synergismus von Allicin mit verschiedenen Antibiotika bei Pseudomonaden).

		Allicin (µM)											
		6310	3155	1578	789	394	197	99	49	25	12	6	0
Rifampicin (µg/ml)	32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nach drei Tagen Inkubation wuchsen die Bakterien bei den Behandlungen mit 16 µg/ml Rifampicin/ ≤394 µM Allicin und 32 µg/ml Rifampicin/ ≤25 µM Allicin nach (Tabelle 80). So verhindern 789 µM Allicin das Nachwachsen der Bakterien bei Rifampicin-Konzentrationen von 8-32 µg/ml und 49 µM-394 µM Allicin das Nachwachsen der Bakterien bei 32 µg/ml Rifampicin. *PfAR-1* wuchs bei den Behandlungen mit 16 µg/ml Rifampicin/ ≤789 µM Allicin und 32 µg/ml Rifampicin/ ≤49 µM Allicin nach (Tabelle 81). So verhinderten 1578 µM Allicin das Nachwachsen der Bakterien bei Rifampicin-Konzentrationen von 8-32 µg/ml und 99 µM-789 µM Allicin das Nachwachsen der Bakterien bei 32 µg/ml Rifampicin.

3. Ergebnisse

Tabelle 80. Synergistischer Effekt des Allicins mit Rifampicin bei *Pf0-1* nach drei Tagen Inkubation. Die Behandlungen, die das sichtbare Wachstum nicht inhibierten, sind mit „+“ gekennzeichnet und grün hinterlegt. Die Behandlungen, die zur Inhibition des bakteriellen Wachstums geführt haben, sind mit „-“ gekennzeichnet und orange hinterlegt. Dieser Versuch wurde einmal wiederholt. Die Behandlungen, bei denen die Bakterien nach drei Tagen Inkubation nachgewachsen waren, sind mit „+“ gekennzeichnet und gelb hinterlegt. Die Behandlungen, bei denen die Bakterien nicht nachgewachsen sind und der synergistische Effekt zu beobachten war, sind rot hinterlegt (s. Kap. 2.2.2.11 Untersuchung des Synergismus von Allicin mit verschiedenen Antibiotika bei Pseudomonaden).

		Allicin (µM)											
		6310	3155	1578	789	394	197	99	49	25	12	6	0
Rifampicin (µg/ml)	32	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	16	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 81. Synergistischer Effekt des Allicins mit Rifampicin bei *PfAR-1* nach drei Tagen der Inkubation. Die Behandlungen, die das sichtbare Wachstum nicht inhibierten, sind mit „+“ gekennzeichnet und grün hinterlegt. Die Behandlungen, die zu Inhibition des bakteriellen Wachstums geführt haben, sind mit „-“ gekennzeichnet und orange hinterlegt. Dieser Versuch wurde einmal wiederholt. Die Behandlungen, bei denen die Bakterien nach drei Tagen Inkubation nachgewachsen waren, sind mit „+“ gekennzeichnet und gelb hinterlegt. Die Behandlungen, bei denen die Bakterien nicht nachgewachsen sind und der synergistische Effekt zu beobachten war, sind rot hinterlegt (s. Kap. 2.2.2.11 Untersuchung des Synergismus von Allicin mit verschiedenen Antibiotika bei Pseudomonaden).

		Allicin (µM)											
		6310	3155	1578	789	394	197	99	49	25	12	6	0
Rifampicin (µg/ml)	32	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	16	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Weitere Untersuchungen wurden mit zwei Stämmen der humanpathogenen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 SBUG8 und DSM 2659 durchgeführt. Der synergistische Effekt von Allicin wurde mit mehreren konventionellen Antibiotika (Tetracyclin, Chloramphenicol, Levofloxacin, Ampicillin, Cefotaxim, Carbenicillin, Gentamicin und Rifampicin) in drei unabhängigen

3. Ergebnisse

Experimenten untersucht. Bei *P. aeruginosa* PAO1 zeigte Allicin einen synergistischen Effekt zusammen mit Rifampicin (Tabelle 82).

Tabelle 82. Allicin zeigt einen synergistischen Effekt mit Rifampicin und keinen Effekt mit den restlichen getesteten konventionellen Antibiotika bei *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 SBUG8. Die Experimente wurden bis zu dreimal wiederholt. Felder, wo Allicin die effektive Antibiotika-Konzentration verringert und so den synergistischen Effekt zeigt, sind grün hinterlegt. Felder, wo Allicin keinen Einfluss auf die effektiven Antibiotika-Konzentrationen besitzt, sind gelb hinterlegt. Felder, wo Allicin die effektive Antibiotika-Konzentration erhöht, sind orange hinterlegt (s. Kap. 2.2.2.11 Untersuchung des Synergismus von Allicin mit verschiedenen Antibiotika bei Pseudomonaden).

Antibiotikum		MHK (µg/ml)	MHK mit 200 µM Allicin (µg/ml)	MBK (µg/ml)	MBK mit 200 µM Allicin (µg/ml)
Tetracyclin	1. Exp.	16	16		
	2. Exp.	16	32	512	512
	3. Exp.	16	32	512	512
Chloramphenicol	1. Exp.	32	32		
	2. Exp.	64	32		
	3. Exp.	32	32	257	257
Levofloxacin	1. Exp.	0,5	0,5		
	2. Exp.	0,5	0,5		
	3. Exp.	0,125	0,125	0,25	0,5
Ampicillin	1. Exp.	2048	1024		
	2. Exp.	2048	2048	2048	4096
Cefotaxim	1. Exp.	16	32		
	2. Exp.	8	32		
	3. Exp.	16	32	32	1024
Carbenicillin	1. Exp.	64	64		
	2. Exp.	64	128	256	2048
	3. Exp.	128	256	1024	2048
Gentamicin	1. Exp.	1	0,5		
Rifampicin	1. Exp.	16	8	32	16
	2. Exp.	16	32	64	32
	3. Exp.	32	16	128	128

In zwei von drei Versuchswiederholungen wurden die MHK und MBK in Anwesenheit von 200 µM Allicin um eine Verdünnungsstufe verringert. Bei den übrigen getesteten Antibiotika veränderte das Allicin die MHK und MBK nicht bzw. erhöhte diese (wie bei Cefotaxim und Carbenicillin). Bei den Versuchen mit *P. aeruginosa* DSM 2659 wurde in drei unabhängigen Wiederholungen kein eindeutiger synergistischer Effekt des Allicins mit den getesteten Antibiotika beobachtet (Tabelle 83). So wurde kein Einfluss, bzw. sogar eine Erhöhung der wirksamen Antibiotika-Konzentrationen beobachtet.

3. Ergebnisse

Tabelle 83. Allicin zeigt keinen synergistischen Effekt mit getesteten konventionellen Antibiotika bei *Pseudomonas aeruginosa* DSM2659. Felder, wo Allicin die effektive Antibiotika-Konzentration verringert und so den synergistischen Effekt zeigt, sind grün hinterlegt. Felder, wo Allicin keinen Einfluss auf die effektiven Antibiotika-Konzentrationen besitzt, sind gelb hinterlegt. Felder, wo Allicin die effektive Antibiotika-Konzentration erhöht, sind orange hinterlegt (s. Kap. 2.2.2.11 Untersuchung des Synergismus von Allicin mit verschiedenen Antibiotika bei Pseudomonaden).

Antibiotikum		MHK (µg/ml)	MIK mit 200 µM Allicin (µg/ml)	MBK (µg/ml)	MBK mit 200 µM Allicin (µg/ml)
Tetracyclin	1. Exp.	16	16		
	2. Exp.	32	64	512	1024
	3. Exp.	32	32	1024	512
Chloramphenicol	1. Exp.	32	64		
	2. Exp.	64	257		
	3. Exp.	128	512		
Levofloxacin	1. Exp.	1	1	32	64
	2. Exp.	0,5	1		
	3. Exp.	0,5	0,5	1	2
Ampicillin	1. Exp.	2048	2048		
	2. Exp.	4096	>4096	4096	>4096
Cefotaxim	1. Exp.	8	16		
	2. Exp.	64	64	1024	>2048
	3. Exp.	256	64	4096	1024
Carbenicillin	1. Exp.	64	>64		
	2. Exp.	256	256	2048	>2048
	3. Exp.	1024	256	4096	2048
Gentamicin	1. Exp.	2	0,5	64	64
	2. Exp.			512	512
Rifampicin	1. Exp.	8	16		
	2. Exp.	32	32		
	3. Exp.	32	64	64	64

3.6. Einfluss des Allicins auf tierische Zellen

In diesem Arbeitsschritt wurden die toxischen Allicin-Konzentrationen auf die Säugetier- und humanen Zelllinien in Zellkultur und auf das Lungengewebe aus der Ratte bestimmt.

3.6.1. Sensitivität der tierischen Zellen in der Zellkultur gegenüber Allicin

Zunächst wurden zwei Lungen-Epithel-Zelllinien (A549 und Beas-2B), die Darm-Epithel-Zelllinie (Caco-2) und Fibroblasten-Zellkultur (NIH/3T3) mit Allicin gestresst (s. Kap. 2.1.7.4 Zelllinien und 2.2.4.3 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Allicin in 96-Mikrotiter-Format). Dafür wurden zwei Wochen alte Zellkulturen in 96-well-Platten für eine Stunde mit Allicin-Konzentrationen von 78,125 μ M bis 2,5 mM in einer 2ⁿ-Verdünnungsreihe inkubiert. Anschließend wurde Cystein-Lösung (6 mM) hinzugegeben, um das Allicin zu neutralisieren bzw. auszutitrieren, und die Platten weiter 23 Stunden für die Regeneration der Zellen inkubiert. In einer zusätzlichen Behandlung wurde 1 mM GSH zugegeben, um die natürliche GSH-Anwesenheit im Blut zu simulieren. Die Vitalität der Zelllinien wurde mittels eines MTT-Tests bestimmt. Die Suszeptibilität der Zellen wurde durch die mittlere effektive Konzentration (EK₅₀) bestimmt. Der EK₅₀-Wert beschreibt die Konzentration des Wirkstoffes, bei der die Vitalität der Zellen auf 50% des Kontrollwertes absinkt und so die Hälfte der Population abstirbt. Die Experimente wurden in zwei unabhängigen Experimenten (n=8) durchgeführt.

Die EK₅₀ des Allicins betrug bei der Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 130 μ M (Abbildung 67). Durch die Zugabe von 1 mM Glutathion stieg die EK₅₀ des Allicins auf 450 μ M. Die ausführlichen Messdaten sind im Anhang in Tabellen A33-A35 zu entnehmen (S. 282 ff.).

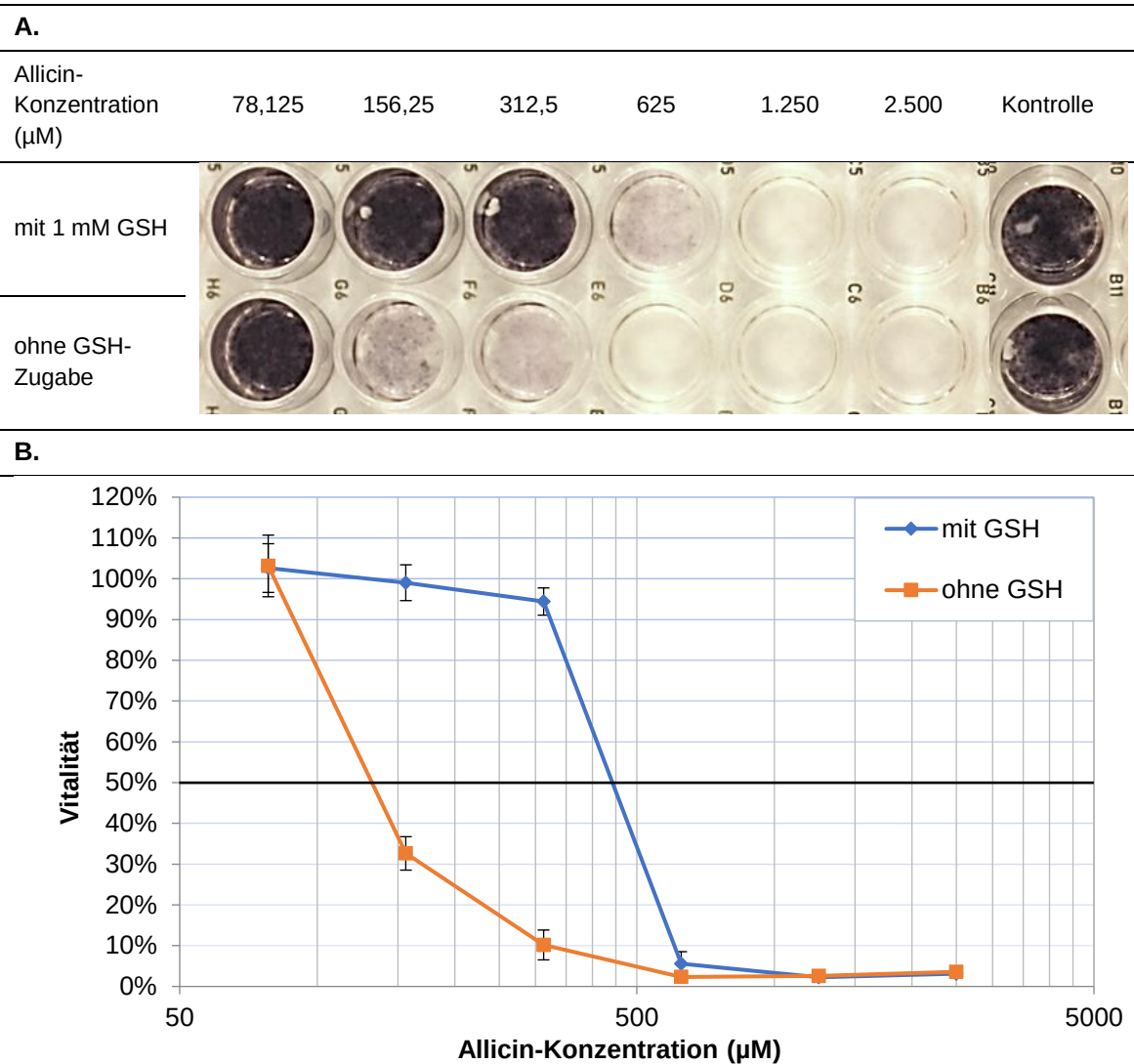


Abbildung 67. Suszeptibilität der Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit. Die Untersuchung wurde im 96-Mikrotiter-Format durchgeführt. Der EC_{50} -Wert (engl. *effective concentration*; Allicin-Konzentration, bei der 50% der Zellen überleben) beträgt 130 µM Allicin und mit 1 mM GSH 450 µM. Die Zellen wurden eine Stunde lang mit Allicin in verschiedenen Konzentrationen mit und ohne Zusatz von 1 mM reduziertem Glutathion inkubiert. Anschließend wurde Allicin durch die Zugabe von Cystein neutralisiert und die Zellen 23 h regeneriert. Danach wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT-Tests untersucht (s. Kap. 2.2.4.3 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Allicin in 96-Mikrotiter-Format). In dem Diagramm sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten ($n=8$) dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

3. Ergebnisse

Bei der Darmepithel-Zelllinie Caco-2 betrug die EC_{50} des Allicins 120 μM (Abbildung 68). Die Zugabe von 1 mM Glutathion führte zur Erhöhung der EC_{50} des Allicins auf 450 μM . Die Messdaten sind im Anhang in Tabelle A36-A38 zu finden (S. 283 ff.).

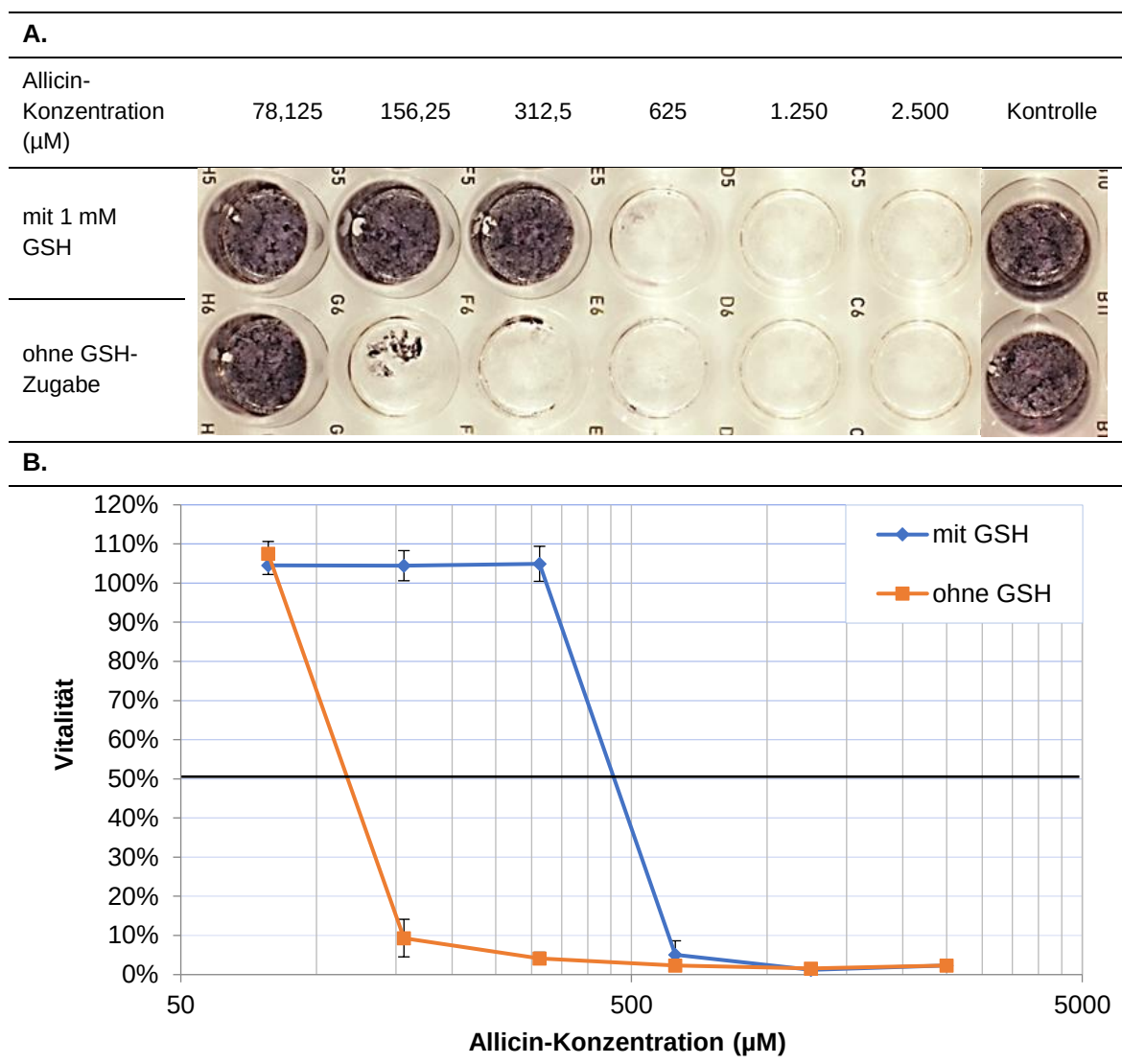
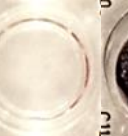


Abbildung 68. Suszeptibilität der Darmepithel-Zelllinie Caco-2 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion. Die Untersuchung wurde im 96-Mikrotiter-Format durchgeführt. Der EC_{50} -Wert (engl. *effective concentration*; Allicin-Konzentration, bei der 50% der Zellen überleben) beträgt 120 μM Allicin und mit 1 mM GSH 450 μM . Die Zellen wurden eine Stunde lang mit Allicin in verschiedenen Konzentrationen mit und ohne Zusatz von 1 mM reduziertem Glutathion inkubiert. Anschließend wurde Allicin durch die Zugabe von Cystein neutralisiert und die Zellen 23 h regeneriert. Dann wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT-Tests untersucht (s. Kap. 2.2.4.3 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Allicin in 96-Mikrotiter-Format). In dem Diagramm sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten ($n=8$) dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

3. Ergebnisse

Bei der Lungenepithel-Zelllinie A549 betrug die EC_{50} des Allicins 210 μM (Abbildung 69) und bei der Zugabe von 1 mM Glutathion stieg die EC_{50} des Allicins auf 500 μM (Messdaten siehe im Anhang in Tabellen A39-A41, S. 285 ff.).

A.

Allicin-Konzentration (μM)	78,125	156,25	312,5	625	1.250	2.500	Kontrolle
mit 1 mM GSH							
ohne GSH-Zugabe							

B.

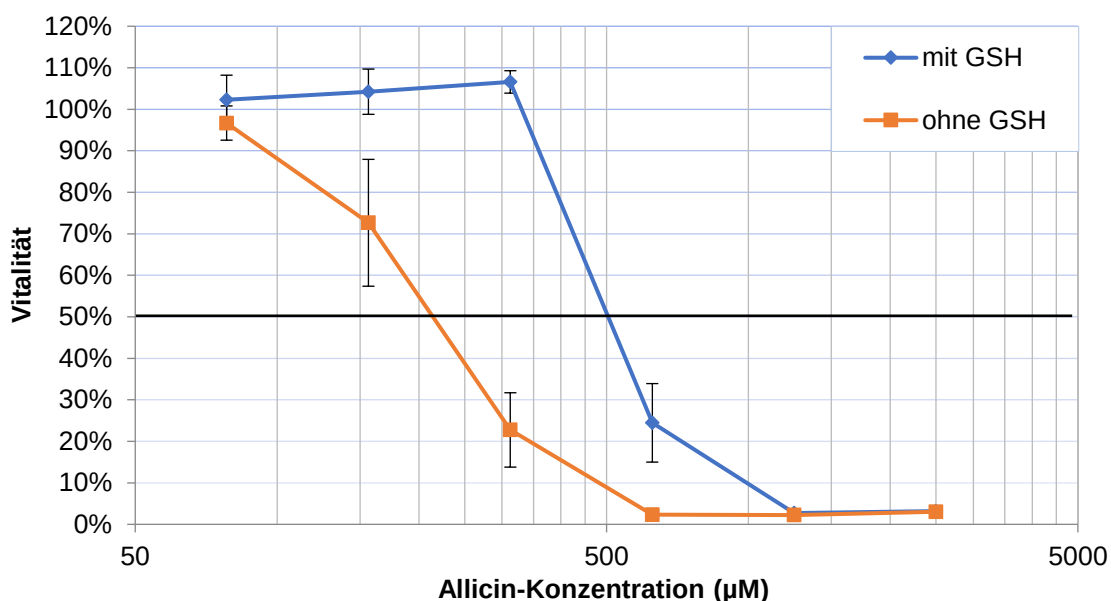


Abbildung 69. Suszeptibilität der Lungenepithel-Zelllinie A549 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion. Die Untersuchung wurde im 96-Mikrotiter-Format durchgeführt. Der EC_{50} -Wert (engl. *effective concentration*; Allicin-Konzentration, bei der 50% der Zellen überleben) beträgt 210 μM Allicin und mit 1 mM GSH 500 μM . Die Zellen wurden eine Stunde lang mit Allicin in verschiedenen Konzentrationen mit und ohne Zusatz von 1 mM reduziertem Glutathion inkubiert. Anschließend wurde Allicin durch die Zugabe von Cystein neutralisiert und die Zellen 23 h regeneriert. Dann wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT-Tests untersucht (s. Kap. 2.2.4.3 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Allicin in 96-Mikrotiter-Format. In dem Diagramm sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten (n=8) dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

3. Ergebnisse

Bei der Lungen-Bronchiengewebe-Zelllinie Beas-2B betrug die EK_{50} des Allicins 460 μM (Abbildung 70). Durch die Zugabe von 1 mM Glutathion erhöhte sich die EK_{50} des Allicins auf 800 μM . Die ausführlichen Messdaten sind dem Anhang in Tabellen A42-A44 zu entnehmen (S. 286 ff.).

Bei allen vier untersuchten Zelllinien stieg die EK_{50} durch die Glutathion-Zugabe von 1,7- bis zu 3,8-Fachen.

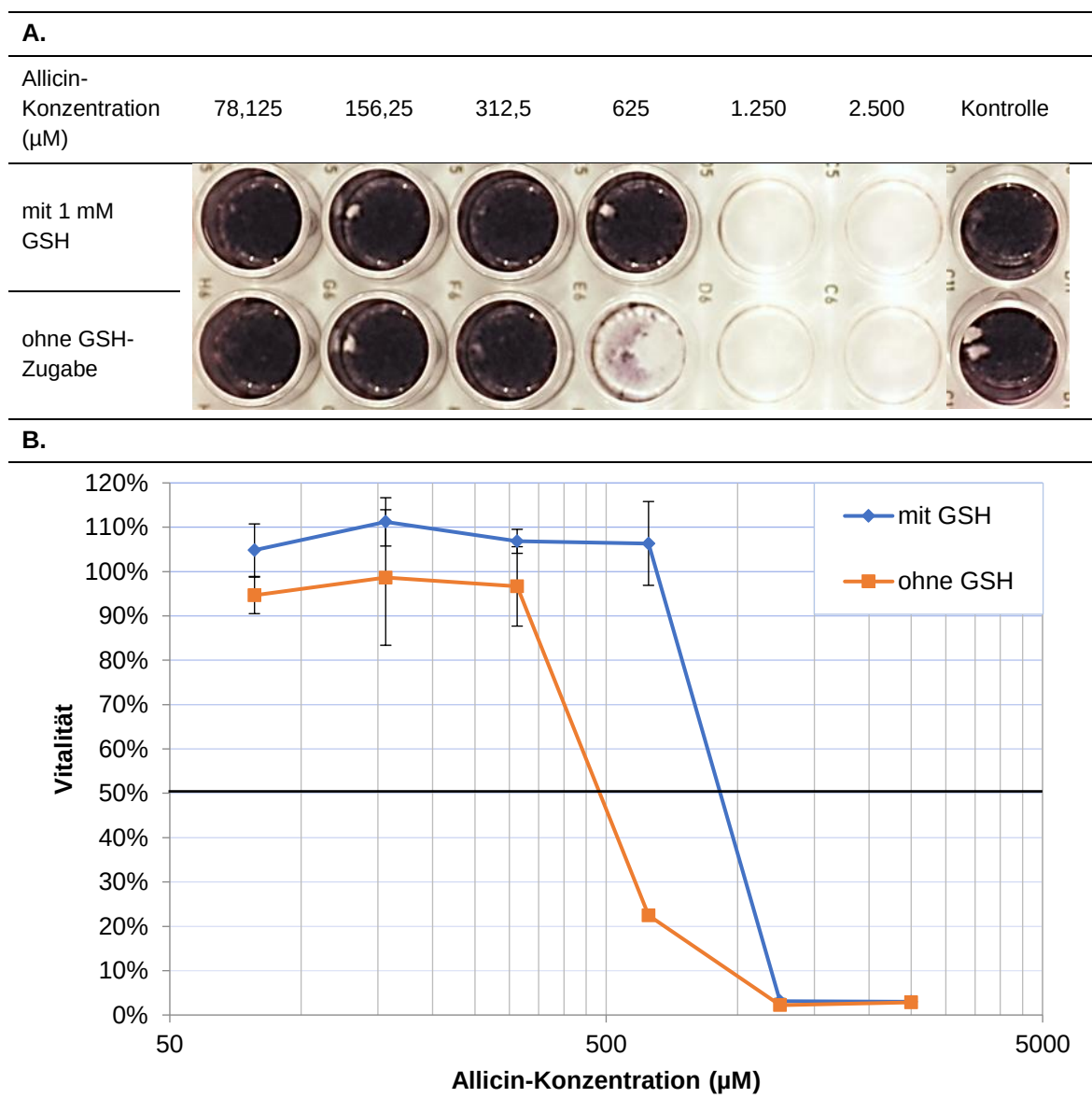


Abbildung 70. Suszeptibilität der Lungen-Bronchiengewebe-Zelllinie Beas-2B gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit. Die Untersuchung wurde im 96-Mikrotiter-Format durchgeführt. Der EK_{50} -Wert (engl. *effective concentration*; Allicin-Konzentration, bei der 50% der Zellen überleben) beträgt 460 μM Allicin und mit 1 mM GSH 800 μM . Die Zellen wurden eine Stunde lang mit Allicin in verschiedenen Konzentrationen mit und ohne Zusatz von 1 mM reduziertem Glutathion inkubiert. Danach wurde Allicin durch die Zugabe von Cystein neutralisiert und die Zellen 23 h regeneriert. Anschließend wurde die Vitalität der Zellen mittels MTT-Tests untersucht (s. Kap. 2.2.4.3 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Allicin in 96-Mikrotiter-Format). In dem Diagramm sind die Mittelwerte aus zwei Experimenten ($n=8$) dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

3.6.2. Sensitivität von Lungengewebeschnitten der Ratte gegenüber Allicin

In diesem Arbeitsschritt wurde die Sensitivität der Lungengewebe aus der Ratte bestimmt (s. Kap. 2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität der Lungenschnitte aus der Ratte gegenüber Allicin). Der Allicin-Einfluss auf Lungengewebeschnitte der Ratte wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Uniklinik RWTH Aachen (Nadine Ruske, Prof. Christian Martin) untersucht. Dafür wurden 250 µm dünne Lungenschnitte (PCLS, engl. *precision-cut lung slices*) für eine Stunde mit Allicin inkubiert. Nach mehreren Waschschritten und 23 Stunden Regeneration wurde die Vitalität der Gewebe durch zwei Tests festgestellt. Der erste ist der Lactat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivitätstest. LDH ist in hohen Konzentrationen im Zytoplasma vorhanden. Durch die Zellschädigung wird LDH freigesetzt, sodass deren Aktivität im Umgebungsmedium nachgewiesen werden kann. Der WST-Test detektiert die metabolische Aktivität der Mitochondrien, indem ein Tetrazolium-Salz (engl. *water soluble tetrazolium*, WST) seine Farbe durch Reduktion verändert. Die beiden durchgeführten Tests zeigen EK_{50} Werte von etwa 14,5 µM Allicin (Tabelle 84). Durch Zugabe von GSH erhöhte sich der EK_{50} -Wert auf 655,9 µM bei dem LDH-Test und auf 314,8 µM bei dem WST-Test. Experimente wurden mit Gewebe aus drei Tieren durchgeführt. Die Detektion der EK_{50} des Allicins ohne Glutathion-Zugabe wurde in zwei unabhängigen Experimenten (n=10 bei LDH- und WST-Test) durchgeführt. Die Untersuchung der EK_{50} des Allicins mit Glutathion-Zugabe wurde in einem Experiment (n=6 bei LDH-Test, n=4 bei WST-Test) durchgeführt. Die ausführlichen Messdaten sind im Anhang in Tabelle A45 dargestellt (S. 288).

Tabelle 84. Die Anfälligkeit des Lungen-Gewebes der Ratte gegenüber Allicin verringert sich durch die Glutathion-Zugabe. Die Lungengewebe-Schnitte der Ratte wurden 1 h mit Allicin (1 µM, 10 µM, 33 µM, 100 µM, 333 µM, 1 mM) ohne bzw. mit 1 mM Glutathion inkubiert, anschließend gewaschen und 23 h in dem Nährmedium zur Regeneration inkubiert. Die Vitalität der Zellen wurde mittels Lactat-Dehydrogenase-Aktivitäts-Assay (LDH-Test) und Mitochondrien-Aktivitäts-Assay (WST-Test) analysiert. Allicin-Konzentration, bei der die Zellen 50% der Vitalität im Vergleich zu Kontrollbedingungen zeigen, wurde als EK_{50} definiert. Die Experimente wurden mit dem Gewebe von drei Tieren durchgeführt (s. Kap. 2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität der Lungenschnitte aus der Ratte gegenüber Allicin). Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei Experimenten ohne Zugabe von GSH (n=10 bei LDH- und WST-Test) und Mittelwerte aus einem Experiment mit GSH-Zugabe (n=6 bei LDH-Test, n=4 bei WST-Test) mit entsprechenden Standardabweichungen.

	EK_{50} von Allicin (µM)	
	ohne GSH	mit 1 mM GSH
LDH-Test	14,7±2,8	655,9±237,1
WST-Test	14,4±2,2	314,8±203,0

3.7. Allicin inhibiert das Wachstum lungenpathogener Bakterien über die Gasphase

In diesem Abschnitt wurden die Untersuchungen zur antimikrobiellen Wirkung des Allicins über die Gasphase auf lungenpathogene Bakterien untersucht (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhofest). Dabei wurde Allicin auf den Deckel der Petrischale appliziert. Die lungenpathogenen Bakterien wurden entweder auf die Oberfläche der Agar-Platte ausplattiert, oder die Bakteriensuspension wurde mit dem noch flüssigen Agar vermischt und erst dann in die Petrischalen gegossen. Die Agar-Platten wurden über dem Allicin-Tropfen über Nacht inkubiert und das Wachstum der Bakterien am nächsten Tag beobachtet.

Zunächst wurde der Versuch mit dem nicht-pathogenen grampositiven Bakterium *Micrococcus luteus* durchgeführt (Abbildung 71). Die Bakterien wurden in den Agar inkorporiert und über dem 20 µl großen Allicin-Tropfen in Konzentrationen von 5 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM und 80 mM (entspricht 16,25 µg, 32,5 µg, 65 µg, 130 µg und 260 µg Allicin) inkubiert. Die Auswertung der Hemmhöfe wurde nach 48 h durchgeführt, da das Wachstum von *M. luteus* langsamer ist als von *Pseudomonas*. Bei den Allicin-Mengen über 10 mM bzw. 32,5 µg wurde das bakterielle Wachstum über dem Allicin-Tropfen inhibiert. Mit der steigenden Allicin-Menge vergrößerte sich die Fläche des Hemmhofes.

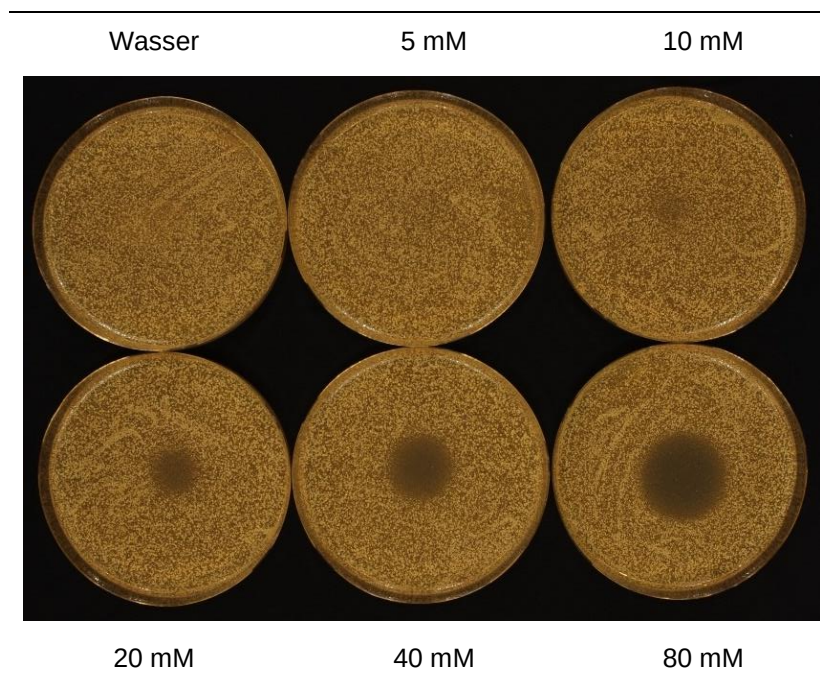


Abbildung 71. Allicin inhibiert das Wachstum von *Micrococcus luteus* über die Gasphase in konzentrationsabhängiger Weise. *M. luteus* wurde in King's B-Agar inkorporiert (300 µl, OD₆₀₀=0,2, 25 ml Agar pro Platte). 20 µl Allicin in Konzentrationen von 5, 10, 20, 40, 80 mM bzw. ^{reinst}Wasser als Kontrolle wurden auf den Deckel der Petrischale appliziert und 48 h bei 28°C inkubiert. Die Allicin-Mengen in den Ansätzen sind entsprechend 16,25 µg, 32,5 µg, 65 µg, 130 µg und 260 µg (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhofest).

Im nächsten Ansatz wurde die antimikrobielle Wirkung des Allicins auf das klinische Isolat *Staphylococcus aureus* SNo 68709 im Hemmhof-Test untersucht (Abbildung 72). Die Bakterien

3. Ergebnisse

wurden sowohl an der Oberfläche der Agar-Platte als auch in den Agar inkorporiert und Allicin auf den umgedrehten Deckel der Petrischale bzw. in das im Agar ausgestanzte Loch appliziert. Es wurden 20 µl 57 mM Allicin in dem Test verwendet. Allicin inhibierte das bakterielle Wachstum sowohl bei der Applikation in den Agar als auch über die Gasphase. Die Größe der Hemmhöfe bei beiden Applikationen war ähnlich groß.

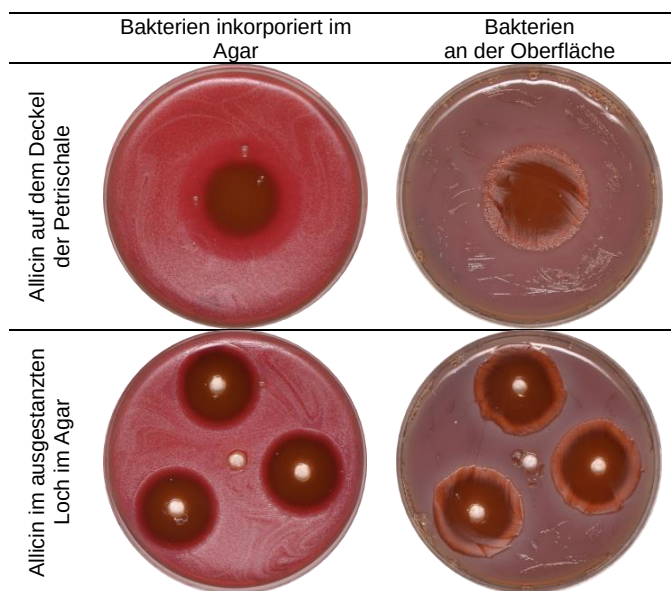


Abbildung 72. Hemmhof-Test für Allicin mit *Staphylococcus aureus* SNo 68709. Die Bakterien wurden entweder an der Oberfläche der CASO-Agar-Platte ausgestrichen (rechte Spalte, 100 µl OD₆₀₀=0,3) oder im Agar inkorporiert (linke Spalte, 300 µl OD₆₀₀=0,3). Es wurden 20 µl 57 mM Allicin (entspricht 185,25 µg) auf den Deckel der Petrischale (obere Reihe) bzw. in ein ausgestanztes Loch (untere Reihe) appliziert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ^{reinst} Wasser in das mittlere Loch gegeben (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhofest).

Die klinischen Isolate der *Klebsiella pneumoniae* SNo 45412 und SNo 45413 wurden im Agar inkorporiert und ebenfalls mit 20 µl 57 mM bzw. 185,25 µg Allicin behandelt (Abbildung 73). Bei der Allicin-Applikation direkt in den Agar wurde das bakterielle Wachstum in Form eines Hemmhofs inhibiert. Bei der Behandlung über die Gasphase entstanden bei beiden Isolaten im Vergleich zu den anderen getesteten Bakterien kleine Hemmhöfe. Bei dem Isolat SNo 45413 war der Hemmhof nur ansatzweise zu sehen bzw. die Bakteriendichte in diesem Bereich war geringer.

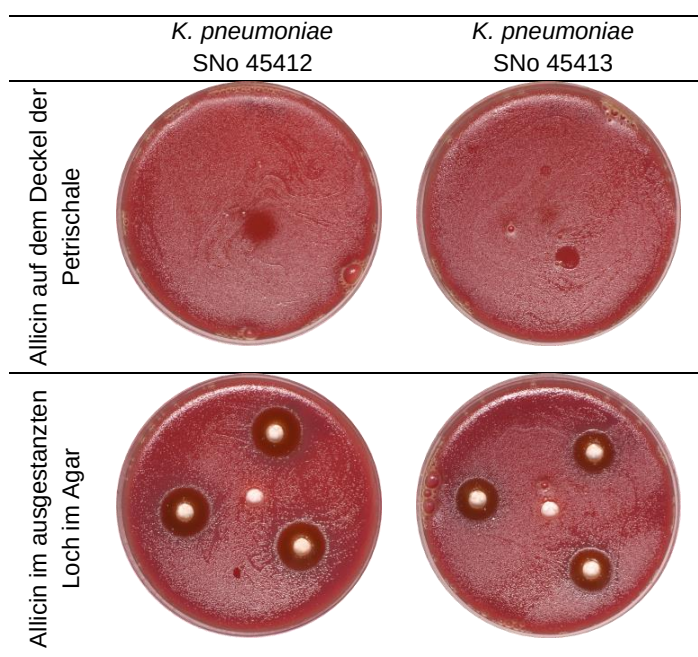


Abbildung 73. Hemmhof-Test für Allicin mit *Klebsiella pneumoniae* SNo 45412 und SNo 45413. Die Bakterien wurden im Agar inkorporiert (300 µl, OD₆₀₀=0,3). Es wurden 20 µl 57 mM Allicin (entspricht 185,25 µg) auf den Deckel der Petrischale (obere Reihe) bzw. in ein ausgestanztes Loch (untere Reihe) appliziert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde ^{reinst} Wasser in das mittlere Loch gegeben (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhofest).

3. Ergebnisse

Anschließend wurde jeweils ein Isolat von *S. pyogenes*, *S. agalactiae* und *S. dysgalactiae* untersucht (Abbildung 74). Die Bakteriensuspension wurde an der Oberfläche der Agar-Platte bzw. in den Agar inkorporiert und 357 µg Allicin (20 µl 110 mM) auf den umgedrehten Deckel der Petrischale bzw. in das im Agar ausgestanzte Loch appliziert. Bei allen drei Isolaten wurde das Wachstum durch Allicin sowohl über die Gasphase als auch über die Diffusion im Agar inhibiert.

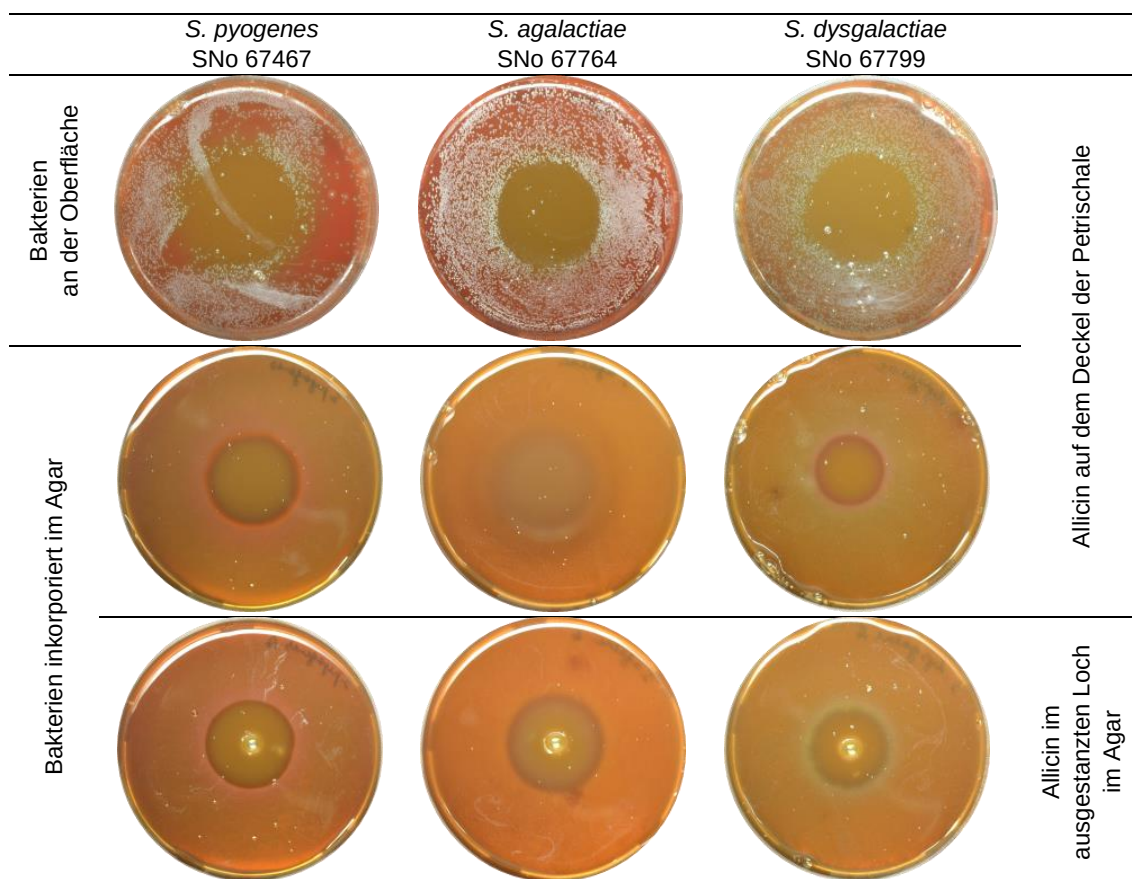


Abbildung 74. Hemmhof-Test für Allicin mit *Streptococcus pyogenes* (SNo 67467), *Streptococcus agalactiae* (SNo 67764) und *Streptococcus dysgalactiae* (SNo 67799). Die Bakterien wurden entweder an der Oberfläche der CASO-Agar-Platte ausgestrichen (obere Reihe, 200 µl, OD₆₀₀=0,2) oder im Agar (300 µl, OD₆₀₀=0,2) inkorporiert. Es wurden 20 µl 110 mM Allicin (entspricht 357 µg) auf den Deckel der Petrischale (obere zwei Reihen) bzw. in ein ausgestanztes Loch (untere Reihe) appliziert und über Nacht bei 37°C inkubiert (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhof-Test).

Die *P. aeruginosa*-Stämme PAO1 SBUG1 und PAO25 bildeten in dem Hemmhof-Test mit Allicin deutliche Hemmhöfe bei beiden Arten der Allicin-Applikation aus (Abbildung 75). Der Stamm DSM 2659 mit erhöhter Allicin-Resistenz bildete bei der Behandlung über die Gasphase keine Hemmhöfe aus.

In dem nächsten Versuchsansatz wurden zwei MDR-Stämme (²³F-1 Spain und ²³F 16 Poland) und zwei klinische Isolate (SNo 68665, SNo 68668) von *S. pneumoniae* untersucht (Abbildung 76). Die Bakterien wurden in den Agar inkorporiert und mit 130 µg (20 µl 40 mM) Allicin behandelt. Bei allen getesteten Isolaten zeigte Allicin wachstumshemmende Wirkung sowohl über die Gasphase als auch bei der Diffusion im Agar.

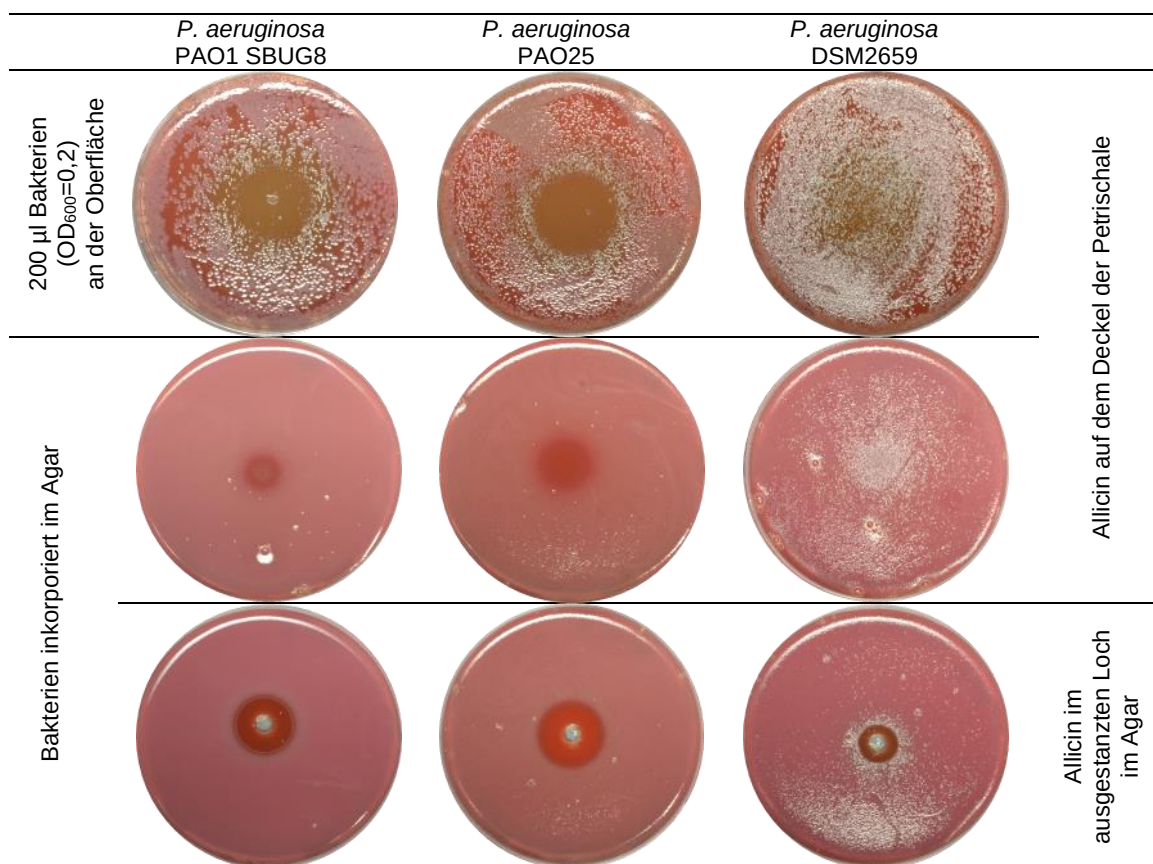


Abbildung 75. Hemmhof-Test für Allicin mit drei Stämmen von *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1 SBUG8, PAO25 und DSM2659). Die Bakterien wurden entweder an der Oberfläche der CASO-Agar-Platte ausgestrichen (obere Reihe, 200 µl, OD₆₀₀=0,2) oder im Agar (300 µl, OD₆₀₀=0,2) inkorporiert. Es wurden 20 µl 110 mM Allicin (entspricht 357 µg) auf den Deckel der Petrischale (obere zwei Reihen) bzw. in ausgestanztes Loch (untere Reihe) appliziert und über Nacht bei 37°C inkubiert (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhofest).

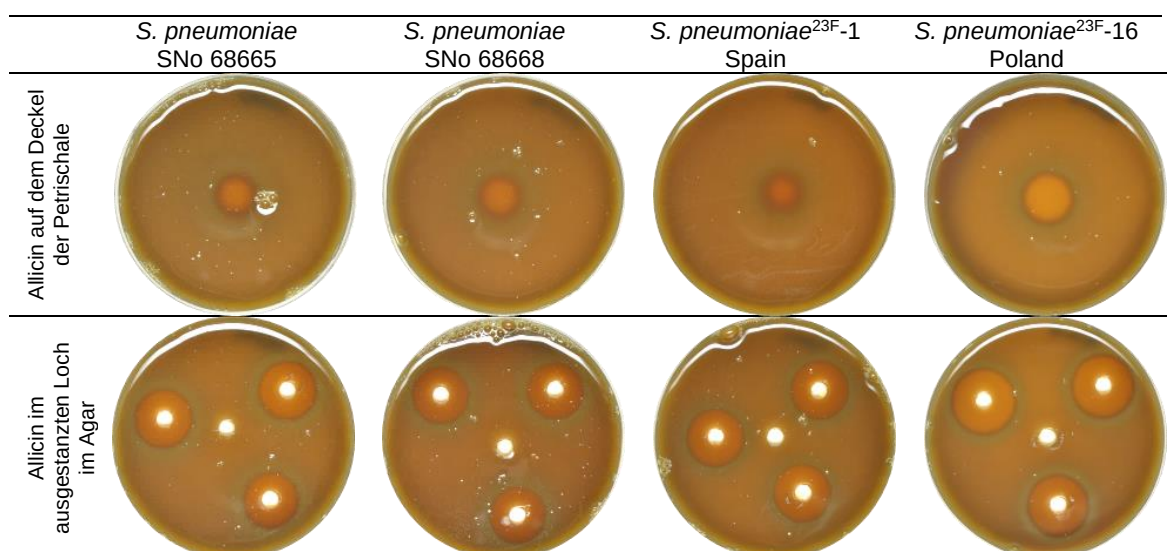


Abbildung 76. Hemmhof-Test für Allicin mit *Streptococcus pneumoniae* (klinische Isolate SNo 68665, SNo 68668 und MDR-Stämme *S. pneumoniae*^{23F}-1 Spain und -16 Poland). Die Bakterien wurden entweder an der Oberfläche der CASO-Agar-Platte ausgestrichen (obere Reihe, 100 µl, OD₆₀₀=0,3) oder im Agar (300 µl, OD₆₀₀=0,3) inkorporiert. Es wurden 20 µl 40 mM Allicin (entspricht 130 µg) auf den Deckel der Petrischale (obere zwei Reihen) oder in ausgestanztes Loch (untere Reihe) bzw. reines Wasser als Kontrolle (Mitte) appliziert und über Nacht bei 37°C inkubiert (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhofest).

3. Ergebnisse

Die antimikrobielle Wirkung des Allicins wurde ebenfalls bei den lungenpathogenen *Haemophilus influenzae*-Stämmen 2019, R2866 und 86-028 NP im Hemmhof-Test untersucht (Abbildung 77). Die Bakterien-Suspension wurde im Agar inkorporiert und 20 µl 5 mM, 20 mM und 80 mM Allicin (entspricht 16,25 µg, 65 µg und 260 µg Allicin) in die ausgestanzten Löcher im Agar appliziert. Das Wachstum aller Isolate wurde in dem konzentrationsabhängigen Verhältnis inhibiert, d. h. je höher die Allicin-Menge, desto größer ist der Hemmhof-Fläche.



Abbildung 77. Hemmhof-Test für Allicin mit *Haemophilus influenzae*-Stämmen 2019, R2866 und 86-028 NP. 100 µl Bakterienkultur ($OD_{600}=0,1$) wurden an der Oberfläche der sBHI-Agarplatten ausgestrichen. 20 µl Allicin in Konzentrationen von 5 (rechts), 20 (links) und 80 mM (oben) wurden in die ausgestanzten Löcher im Agar appliziert und 17 h bei 37°C inkubiert. Die Allicin-Mengen in den Ansätzen sind entsprechend 16,25 µg, 65 µg und 260 µg (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhofest).

Die antimikrobielle Wirkung des Allicins über die Gasphase wurde mit zwei *H. influenzae*-Stämmen untersucht. Der Test wurde mit je 20 µl 10 mM, 20 mM, 40 mM und 80 mM Allicin (entspricht 32,5 µg, 65 µg, 130 µg und 260 µg) angesetzt (Abbildung 78). Allicin inhibiert das bakterielle Wachstum in konzentrationsabhängigem Muster. Bei steigenden Allicin-Mengen vergrößerte sich die Fläche des Hemmhofes.

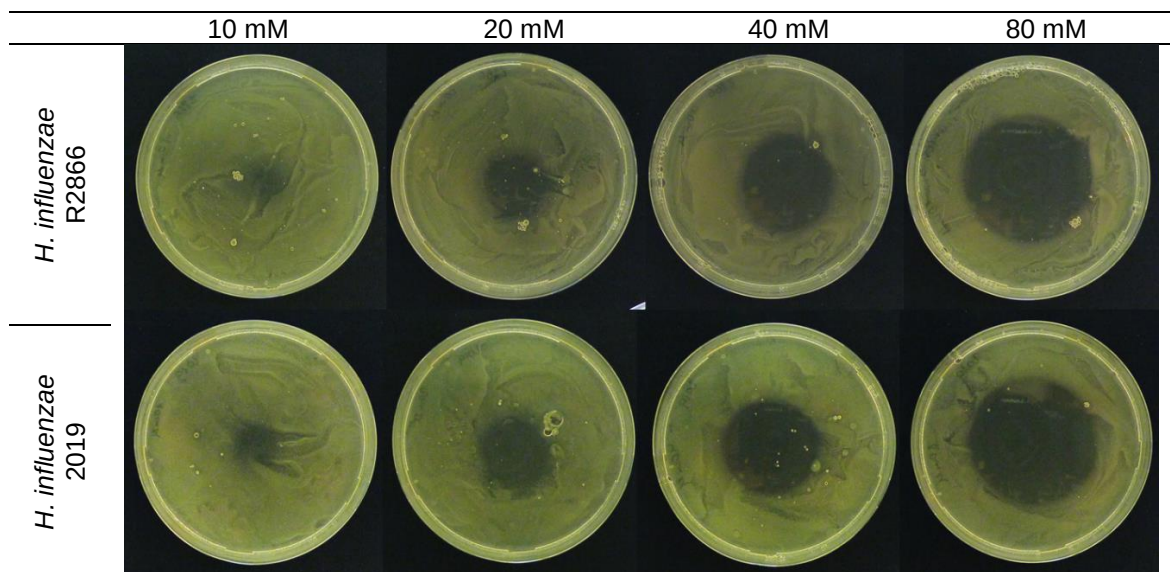


Abbildung 78. Hemmhof-Test für Allicin mit *Haemophilus influenzae*-Stämmen R2866 und 2019. 100 µl Bakterienkultur ($OD_{600}=0,1$) wurden an der Oberfläche der sBHI-Agarplatten ausgestrichen. 20 µl Allicin in Konzentrationen von 10, 20, 40 und 80 mM wurden auf den Deckel der Petrischale appliziert und 17 h bei 37°C inkubiert. Die Allicin-Mengen in den Ansätzen sind entsprechend 32,5 µg, 65 µg, 130 µg und 260 µg (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhofest).

3. Ergebnisse

Allgemein ist die Größe der Hemmhöfe vergleichbar, wenn man die Allicin-Wirkung über die Gasphase und über die Diffusion im Agar betrachtet. Eine Ausnahme stellt *P. aeruginosa* DSM 2659 dar, der keinen Hemmhof bei dem Test über die Gasphase bei der verwendeten Allicin-Menge ausgebildet hat. In diesem Fall ist die Hemmhof-Fläche nach der Applikation in das ausgestanzte Loch sehr gering.

Im nächsten Ansatz wurde überprüft, ob das Allicin die ausgebildeten Bakterien-Kolonien über die Gasphase abtöten kann. Dafür wurde eine ein-Tag-alte mit *E. coli* bewachsene Agar-Platte über dem Allicin-Tropfen (575 µg) über Nacht inkubiert (Abbildung 79, links, Original-Platte). Anschließend wurde der Bakterienrasen auf eine neue Agar-Platte (Abbildung 79, rechts, Replika-Platte) überstempelt und wieder über Nacht inkubiert. Auf der Replika-Platte entstand ein Hemmhof ohne bakterielles Wachstum. Dieser Versuch wurde auch mit *Pf0-1* und *PfAR-1* durchgeführt (Abbildung 80). Ebenfalls tötet Allicin den ausgebildeten 1-Tag-alten Bakterien-Rasen von *Pf0-1* und *PfAR-1* über die Gasphase ab.

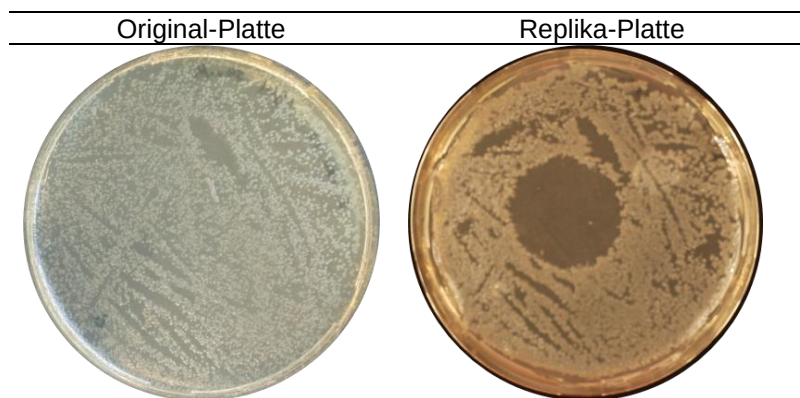


Abbildung 79. Allicin tötet ausgebildeten Bakterienrasen von *E. coli* DH5 α über die Gasphase. 100 µl einer 10^{-5} -Verdünnung der Bakterienkultur ($OD_{600}=0,2$) wurden auf eine CASO-Agar-Platte ausgestrichen und 18 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 60 µl 59 mM Allicin (575 µg) auf den Petrischalen-Deckel appliziert und weitere 18 h bei 37°C inkubiert. Die Platte wurde auf eine neue King's B-Agar-Platte überstempelt und 18 h bei 37°C inkubiert (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhofest).

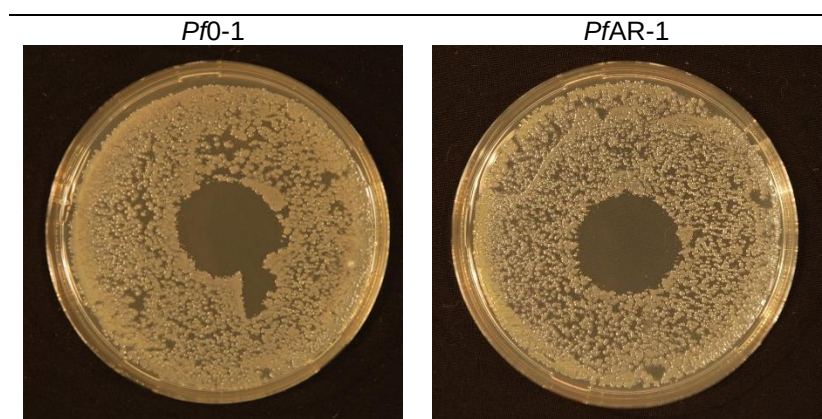


Abbildung 80. Allicin tötet ausgebildeten Bakterienrasen von *Pf0-1* und *PfAR-1* über die Gasphase. Dargestellt sind Replika-Platten. Die Bakterienkulturen wurden bis zu $OD_{600}=0,2$ wachsen gelassen und bis zu 10^{-6} mit sterilem Wasser verdünnt. 200 µl Bakterienlösung wurden ausplattiert und 48 h bei 28°C wachsen gelassen. Anschließend wurden 20 µl 88 mM (286 µg) Allicin auf den Petrischalen-Deckel appliziert und weitere 48 h bei 28°C inkubiert. Mit Hilfe des Replika-Stempels wurde der Bakterien-Rasen auf eine neue King's B-Agar-Platte übertragen und über Nacht bei 28°C inkubiert. Die Stelle, bei der das Allicin die Bakterien abgetötet hat, ist als Hemmhof auf der Replika-Platte zu sehen (s. Kap. 2.2.2.5 Bestimmung von Suszeptibilität gegenüber Substanzen mittels Hemmhofest).

3.8. Lungen-Simulationsmodell

Dieser Arbeitsschritt wurde in Zusammenarbeit mit dem Aerodynamischen Institut und dem Lehrstuhl für Strömungslehre der RWTH Aachen (AIA) (Dr.-Ing. Michael Klaas, Philipp Dörner, Philipp Müller) durchgeführt. Die Lungensimulationsapparatur wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Philipp Müller konzipiert, die die mit den lungenpathogenen Bakterien infizierte Lunge und deren Behandlung mit dem Allicin simulieren sollte, und veröffentlicht (Dörner et al., 2019). Die weiterführenden Untersuchungen wurden von Reiter et al. (2020) veröffentlicht.

3.8.1. Beständigkeit der Baumaterialien gegenüber Allicin

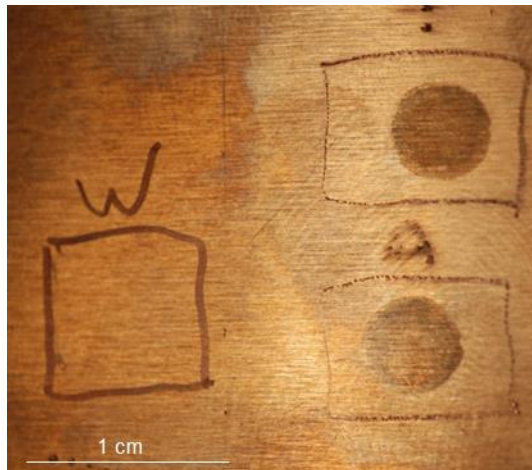
Zunächst wurden die für das Modell in Frage kommenden Materialien auf die Allicin-Beständigkeit überprüft (s. Kap. 2.2.8.1 Untersuchung der Beständigkeit der verschiedenen Materialien gegenüber Allicin zu Bau der Lungen-Simulationsapparatur). Dafür wurden 20 µl einer 96 mM Allicin-Lösung auf die Materialoberfläche appliziert, mit einem Petrischalen-Deckel abgedeckt, und über 18 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Oberfläche mit nassem Papiertuch abgewischt und mit Hilfe einer Kamera bzw. einem Mikroskop fotografiert (Abbildung 81-Abbildung 85).

Zunächst wurden die Metalle Aluminium und Edelstahl sowie Glas als wichtige potenzielle Baumaterialien auf die Allicin-Beständigkeit überprüft. Bei Aluminium haben sich dunkle Verfärbungen, die sich auch nicht entfernen ließen, an der Oberfläche nach der Behandlung, ausgebildet (Abbildung 81). Nach der Behandlung von Edelstahl und Kalk-Natron-Glas wurden keine Änderungen an der Oberflächen-Farbe und -Struktur beobachtet (Abbildung 81).

Anschließend wurden die gängig verwendeten Kunststoffe auf die Allicin-Beständigkeit untersucht. Die meisten getesteten Kunststoffe haben sich als nicht beständig erwiesen. Das durchsichtige Polymethylmethacrylat (PMMA) wurde nach der Behandlung mit Allicin weiß-trüb verfärbt (Abbildung 82). Bei stärkerer Vergrößerung konnte man die geschmolzene Oberfläche feststellen. Das Polyetheretherketon (PEEK) war nach der Allicin-Behandlung an der Oberfläche angeraut und leicht dunkel verfärbt (Abbildung 82). Das Polyethylenterephthalat (PET) wurde in zwei Formen getestet: die Probe aus einer Getränkeflasche und eine 75 µm dicke Folie (biaxial orientierte (BO) PET-Folie von optimont® Bleher). Nach der Allicin-Behandlung wurden keine Veränderungen bei der Probe aus der Getränkeflasche beobachtet. Bei der PET-Folie wurden weiß-trübe Verfärbungen nach Allicin-Behandlung beobachtet (Abbildung 82). Die Oberflächen der zwei Kunststoffe Polystyrol und Polyvinylchlorid (PVC) wurden nach der Allicin-Behandlung vergleichsweise stark verformt bzw. geschmolzen (Abbildung 83). Die Kunststoffe Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS) und Polylactid (PLA) haben sich nach der Allicin-Behandlung weiß-trüb verfärbt (Abbildung 84).

A. Aluminium

Übersicht



Nahaufnahme

**B. Edelstahl**

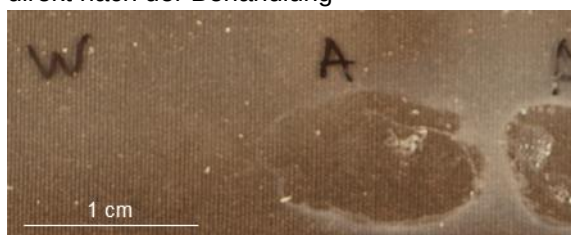
Übersicht



Nahaufnahme

**C. Glas**

direkt nach der Behandlung



gereinigt nach der Behandlung

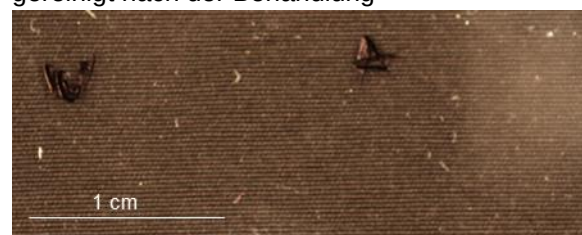


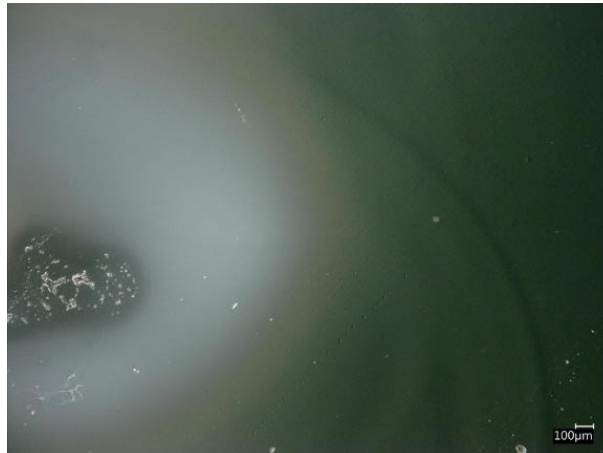
Abbildung 81. Allicin greift die Aluminium-Oberfläche an (A), im Unterschied dazu bleiben keine sichtbaren Spuren an der Edelstahl- (B) und Glas-Oberfläche (C). 20 µl einer 96 mM Allicin-Lösung wurde auf die Materialoberfläche appliziert, mit einem Petrischalen-Deckel abgedeckt, und über 18 h bei 37°C inkubiert (s. Kap. 2.2.8.1 Untersuchung der Beständigkeit der verschiedenen Materialien gegenüber Allicin zu Bau der Lungen-Simulationsapparatur). Die Oberfläche wurde mit Hilfe einer Fotokamera bzw. einem Digitalmikroskop (Keyence VHX-6000 mit DIK Universalobjektiv VH-Z100UR) aufgenommen.

A. Polymethylmethacrylat (PMMA)

Übersicht



Nahaufnahme

**B. Polyetheretherketon (PEEK)**

Übersicht



Nahaufnahme

**C. Polyethylenterephthalat (PET)**

PET-Flasche



PET-Folie

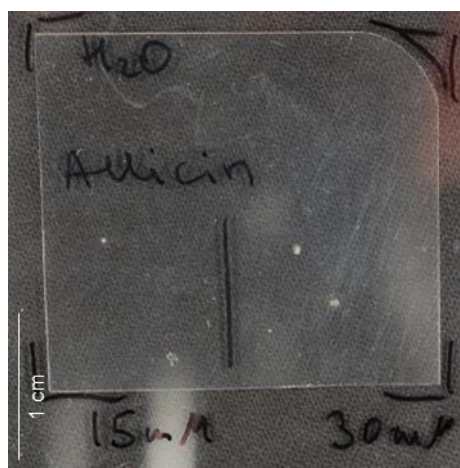
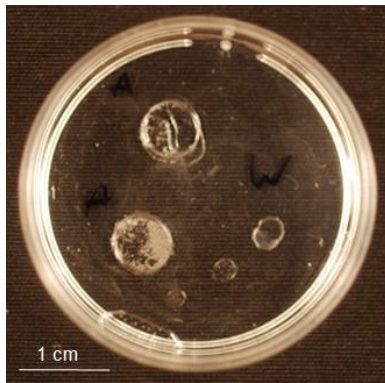


Abbildung 82. Die Kunststoffe Polymethylmethacrylat (PMMA, A) und Polyetheretherketon (PEEK, B) sind nicht beständig gegenüber Allicin. Polyethylenterephthalat (PET, C) von einer Getränkeflasche weist nach der Behandlung mit Allicin keine sichtbaren Spuren an der Oberfläche auf. Im Gegensatz dazu entstehen auf der 75 µm dicken PET-Folie weiße Verfärbungen. 20 µl einer 96 mM Allicin-Lösung (bei PET-Folie 20 µl von 15 mM bzw. 30 mM Allicin-Lösung) wurde auf die Materialoberfläche appliziert, mit einem Petrischalen-Deckel abgedeckt, und über 18 h bei 37°C inkubiert (s. Kap. 2.2.8.1 Untersuchung der Beständigkeit der verschiedenen Materialien gegenüber Allicin zu Bau der Lungen-Simulationsapparatur). Die Oberfläche wurde mit Hilfe einer Fotokamera bzw. einem Digitalmikroskop (Keyence VHX-6000 mit DIK Universalobjektiv VH-Z100UR) aufgenommen.

A. Polystyrol

Übersicht



Nahaufnahme

**B. Polyvinylchlorid (PVC)**

Übersicht



Nahaufnahme



Abbildung 83. Die Kunststoffe Polystyrol (A) und Polyvinylchlorid (PVC, B) sind nicht beständig gegenüber Allicin. 20 µl einer 96 mM Allicin-Lösung wurde auf die Materialoberfläche appliziert, mit einem Petrischalen-Deckel abgedeckt, und über 18 h bei 37°C inkubiert (s. Kap. 2.2.8.1 Untersuchung der Beständigkeit der verschiedenen Materialien gegenüber Allicin zu Bau der Lungen-Simulationsapparatur). Die Oberfläche wurde mit Hilfe einer Fotokamera bzw. einem Digitalmikroskop (Keyence VHX-6000 mit DIK Universalobjektiv VH-Z100UR) aufgenommen.

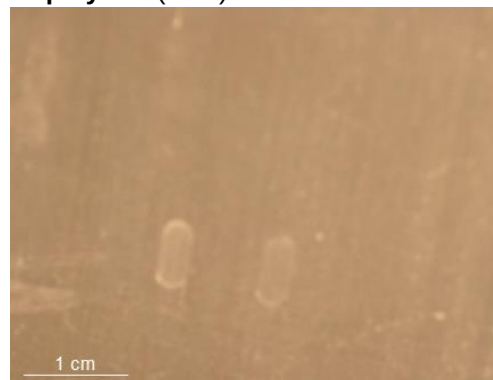
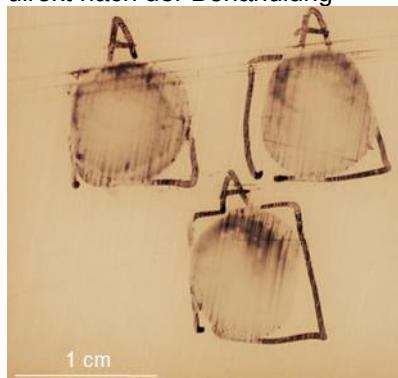
A. Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS)**B. Polylactid (PLA)**

Abbildung 84. Die Kunststoffe Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymer (ABS, A) und Polylactid (PLA, B) sind nicht beständig gegenüber Allicin. 20 µl einer 96 mM Allicin-Lösung wurde auf die Materialoberfläche appliziert, mit einem Petrischalen-Deckel abgedeckt, und über 18 h bei 37°C inkubiert (s. Kap. 2.2.8.1 Untersuchung der Beständigkeit der verschiedenen Materialien gegenüber Allicin zu Bau der Lungen-Simulationsapparatur). Die Oberfläche wurde mit Hilfe einer Fotokamera aufgenommen.

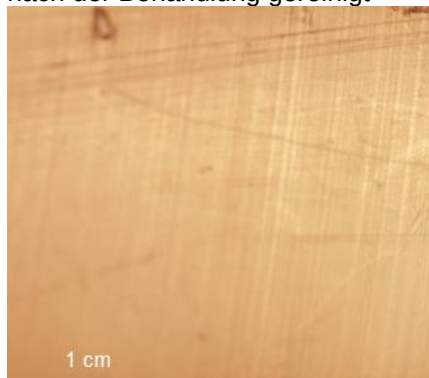
Als beständige Kunststoffe haben sich Polytetrafluorethylen (PTFE, auch Teflon genannt), Polyoxymethylen (POM) und Polyamid (auch Nylon genannt) erwiesen (Abbildung 85).

A. Polytetrafluorethylen (PTFE)

direkt nach der Behandlung

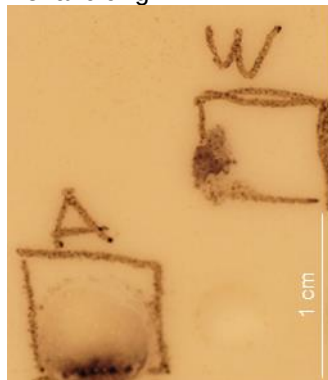


nach der Behandlung gereinigt

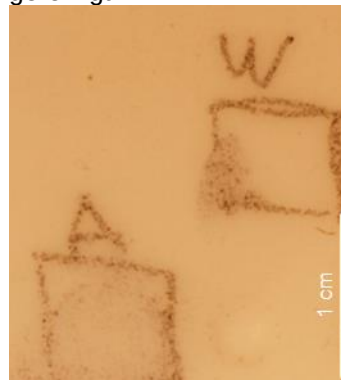


B. Polyoxymethylen (POM)

direkt nach der Behandlung



nach der Behandlung gereinigt



C. Polyamid

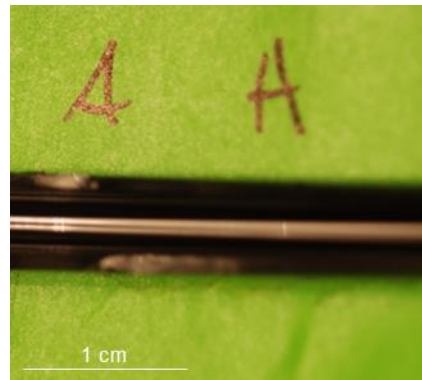


Abbildung 85. Die Kunststoffe Polytetrafluorethylen (PTFE, A), Polyoxymethylen (POM, B) und Polyamid (C) sind beständig gegenüber Allicin. 20 µl einer 96 mM Allicin-Lösung wurde auf die Materialoberfläche appliziert, mit einem Petrischalen-Deckel abgedeckt, und über 18 h bei 37°C inkubiert (s. Kap. 2.2.8.1 Untersuchung der Beständigkeit der verschiedenen Materialien gegenüber Allicin zu Bau der Lungen-Simulationsapparatur). Die Oberfläche wurde mit Hilfe einer Fotokamera aufgenommen.

Die Ergebnisse der Beständigkeit der getesteten Materialien ist in Tabelle 85 zusammengefasst.

Tabelle 85. Liste der getesteten Allicin-beständigen und nicht beständigen Materialien.

nicht Allicin-beständige Materialien	Allicin-beständige Materialien
Acrylnitril-Butadien-Styrol-Copolymere (ABS)	Edelstahl
Aluminium	Glas
Polyethylenterephthalat (PET) als Folie	Polyethylenterephthalat (PET) aus Getränkeflasche
Polylactid (PLA)	Polyamid
Polymethylmethacrylat (PMMA, Plexiglas)	Polyoxymethylen (POM)
Polyetheretherketon (PEEK)	Polytetrafluorethylen (PTFE)
Polystyrol	
Polyvinylchlorid (PVC)	

3.8.2. Vorversuche zur Beschichtung des Modells

In diesem Abschnitt wurden die Vorversuche zur Beschichtung des Lungenmodells in Kooperation mit dem Aerodynamischen Institut und dem Lehrstuhl für Strömungslehre der RWTH Aachen (AIA) durchgeführt. Es wurde die Möglichkeit der Beschichtung in der gebogenen Form mit dünnem Gel und die anschließende Entformbarkeit (d.h. das Trennen des Gusses von der Gussform) sowie Gel-Stabilität überprüft. Dafür wurde ein Rohr mit dem Innendurchmesser von 10 mm aus PMMA und Metaldornen aus Edelstahl mit den Durchmessern von 6, 8 und 9 mm angefertigt (Abbildung 86 A). Damit lassen sich 0,5 mm, 1 mm und 2 mm dicke Gel-Beschichtungen herstellen. Es wurde Agarose und Agar als Gel-Basis untersucht. Die Agarose wurde in ^{reinst} Wasser und Agar im LB-Medium aufgekocht und gelöst und anschließend das warme noch flüssige Gel zwischen den Metaldorn und Röhrchen gegossen und nach dem Erstarren entformt (Abbildung 86 B und C).

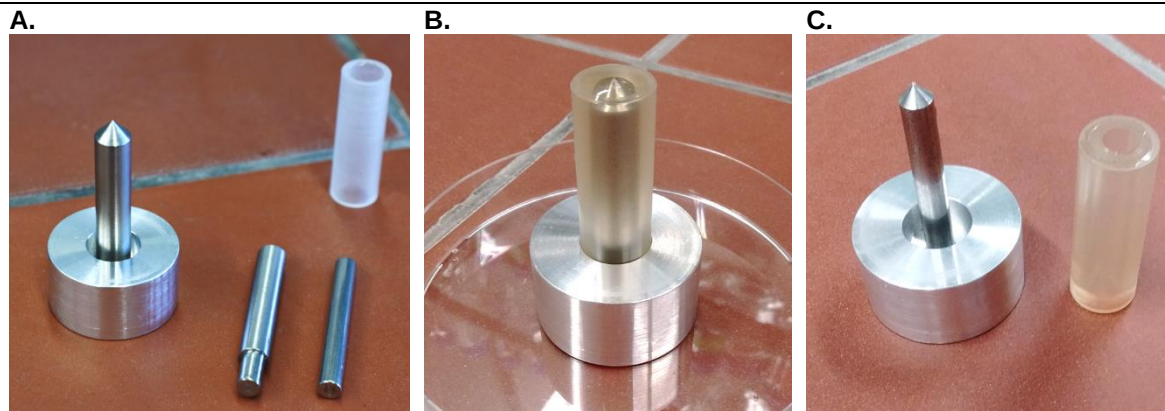


Abbildung 86. Vorversuche zur Ermittlung des Beschichtungsmaterials des Lungenmodells. Dorn aus Edelstahl in drei verschiedenen Stärken und Röhrchen aus PMMA dienen den ersten Versuchen zur Beschichtung mit Agar bzw. Agarose. Warmes noch flüssiges Gel wurde zwischen Metaldorn und Röhrchen gegossen und nach dem Erstarren entformt.

Bei dem Entformen wurde als Erstes der Metall-Dorn und anschließend das Gel aus dem Kunststoff-Röhrchen entfernt. Anschließend wurde die Leichtigkeit des Entformens und die Stabilität der Gel-Beschichtung in Abhängigkeit vom verwendeten Gel-Mittel und der Gel-Dicke bewertet (Abbildung 87).

A. 0,5% Agar-Gel



B. 0,7%ge Agarose-Gele

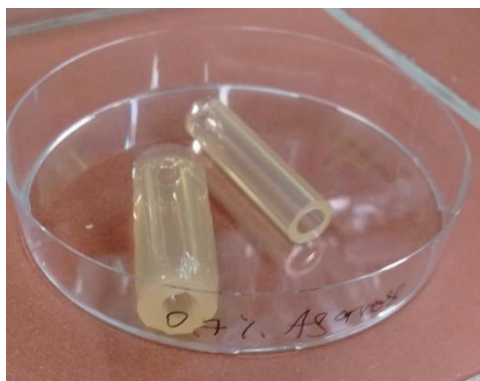


Abbildung 87. Untersuchung der Guss-Formstabilität unter Verwendung verschiedener Dorn-Stärken und verschiedener Gelkonzentrationen. Durch die Verwendung der Dornen in verschiedenen Stärken wurden eine 0,5 mm, 1 mm und 2 mm dicke Gelschicht hergestellt. Ebenso wurden 0,7%ge Agarose und 0,5%, 1% und 1,5%ge LB-Agar-Gele untersucht. Als Beispiel sind ein 0,5 mm dickes 0,5% Agar-Gel (A) und 1 mm, bzw. 2 mm dicke 0,7%ge Agarose-Gele (B) nach dem Entformen aus dem Röhrrchen dargestellt.

Es wurden Beschichtungen mit 0,7%ge Agarose und 0,5%, 1%, 1,5%ge LB-Agar in drei Dicken hergestellt (Tabelle 86). Das Entformen aller Beschichtungsansätze war leicht durchführbar: zuerst wurde der Metall-Dorn vorsichtig entfernt und anschließend das Gel aus dem Rohr herausgedrückt. Die Form aller Beschichtungen in allen drei Dicken mit Ausnahme von 0,5%gem LB-Agar blieben nach dem Entformen stabil. Zur Beschichtung des Lungenmodells wurde die Gel-Stärke von 1 mm und die 1,5%ge Agar-Konzentration gewählt.

Tabelle 86. Stabilität und Entformbarkeit der Beschichtung der Vorversuchsform mit Agarose und Agar.

Beschichtung	Stabilität und Entformbarkeit
0,7% Agarose-Wasser	+
0,5% LB-Agar	-
1% LB-Agar	+
1,5% LB-Agar	++

3.8.3. Aufbau des Lungen-Simulationsmodells

Die Lungen-Simulationsapparatur wurde in Kooperation mit AIA entwickelt, im Rahmen der Bachelor-Arbeit von Philipp Müller (2016) angefertigt und in der Werkstatt der Biologie modifiziert. Der ausführliche Aufbau der Apparatur ist in Methoden-Kapitel 2.2.8.2 Aufbau der Lungen-Simulationsapparatur beschrieben.

Die Lungen-Simulationsapparatur besteht aus dem Lungen-Modell, das in einem temperierbaren Inkubationskasten platziert wurde, der Anlaufstrecke, die an den Aerosol-Generator (Vernebler und Kompressor) und an Zuluft als Simulation der Atmung angeschlossen wurde (s. Abbildung 25. Aufbau der Lungen-Simulationsapparatur, S. 110). Die gesamte Lungen-Simulationsapparatur wurde unter einem Abzug platziert, um bei der Behandlung mit Allicin die Geruchsbelästigung zu vermeiden. Die Anlaufstrecke dient der Ausbildung der laminaren

Luftströmung, was für die gleichmäßige bzw. symmetrische Behandlung des Lungen-Modells verantwortlich ist. Das Anlaufrohr geht stufenlos in das mit Agar beschichtete Lungen-Modell über und wurde auf der Eingangsseite durch einen Kunststoff-Adapter an den Vernebler (PARI) angeschlossen. Es wurde ein Vernebler mit blauem Aufsatz für die Experimente verwendet, der die Aerosolpartikel mit einem medialen Durchmesser von 3,5 µm generiert, und für die Behandlung der oberen Luftwege (entsprechend dem Lungenmodell) verwendet wurde. Der rote Vernebler-Aufsatz stellt die Aerosolpartikel mit einem medialen Durchmesser von 2,2 µm her, die in dem Lungen-Modell nicht abgelagert werden und durchfliegen würden. Dieser Aufsatz wird für die Behandlung der unteren Luftwege verwendet. An den Vernebler wurde der Verbindungsschlauch zu dem Kompressor laut Herstellervorgaben angeschlossen.

Der Inkubator-Kasten dient zur Aufrechterhaltung der konstanten Temperatur bei der Versuchsdurchführung und schützt vor externen Luftströmen, die das Bewegungsverhalten des Aerosols in dem Modell verändern könnten (s. Abbildung 26. Temperierter Inkubator-Kasten mit dem Lungen-Modell, S. 110). An der Seite gegenüber dem Eingangsrohr wurde eine vertikale Heizplatte mit einem Thermostat zur Temperierung des Inkubator-Kastens mit einem Luft-Ventilator angebracht. Der Luftstrom des Ventilators richtet sich zu der Heizplatte hin, um das Luftstrom-Verhalten in dem Lungen-Modell bei der Behandlung nicht zu beeinflussen. Unter diesen Bedingungen wurde die Temperatur bei $37\pm 1^\circ\text{C}$ während der experimentellen Durchführung konstant gehalten. Die Abluftöffnung erlaubt das Ausweichen der Luft aus dem Inkubator-Kasten. Der an die Öffnung angebrachte Membranfilter verhindert den Austritt des eventuell mit den S1-Bakterien kontaminierten Aerosols in den Abzug.

Das Lungenmodell ist statisch und stellt den Lungenabschnitt zwischen der 2. und 5. Generation der Bronchien in Originalgröße dar. Das Lungenmodell wurde mit einer 1 mm dicken Schicht eines bakterien-haltigen Agars ausgekleidet, was die infizierte Oberfläche der Lunge darstellen soll. Das Modell besteht aus zwei Hälften, die getrennt voneinander mit der Agar-Schicht ausgekleidet wurden und anschließend miteinander durch Passstifte und Schrauben befestigt wurden (s. Abbildung 27. Zeichnung des Lungen-Modells, S. 111).

3.8.4. Beschichtung des Lungen-Simulationsmodells mit dem bakterienhaltigen Agar

Um den Befall mit lungenpathogenen Bakterien zu simulieren, wurden die Bakterien in Agar eingebettet (s. Kap. 2.2.8.3 Beschichtung des Lungen-Modells). Die Experimente werden mit S1-nichtpathogenen Bakterien durchgeführt. Dafür wurde die Bakteriensuspension von *Escherichia coli* MegaX DH10B T1R (transformiert mit pRU1097) in 50°C warmen flüssigen Agar gegeben, gemischt und in die Lungenmodell-Hälfte gegossen. Die Lungenmodell-Hälfte wurde mit der Stempel-Form abgedeckt, um die 1 mm dicke Agar-Schicht zu formen (Abbildung 88 A). Nach der Beschichtung der beiden Modell-Hälften wurden sie miteinander verschraubt. Um die Austrocknung des Agars zu verhindern, wurde das Modell zuerst in feuchte Papiertücher und dann in Aluminiumfolie eingewickelt und anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert.

A. Lungen-Modell beschichtet mit dem *E. coli*-haltigen LB-Agar



B. nach der Färbung mit MTT-Lösung



C. Vergrößerte Ansicht

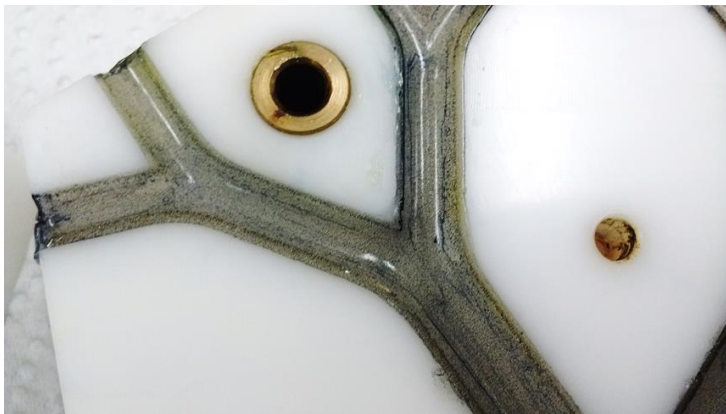


Abbildung 88. Lungen-Modell beschichtet mit *E. coli*-haltigem LB-Agar nach 18 h Inkubation bei 37°C (A) wurde zur Detektion lebender Bakterien mit MTT-Lösung behandelt (B). Lebende Bakterien reduzieren gelbes MTT zu blauem Formazan und erscheinen dunkelblau (C) (s. Kap. 2.2.8.3 Beschichtung des Lungen-Modells und 2.2.8.4 Durchführung der Behandlung).

3. Ergebnisse

Um das Wachstum der Bakterien sichtbar zu machen, wurde der Agar mit einer 0,5% MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Lösung besprüht und 30 min bei 37°C inkubiert (Abbildung 88 B, s. Kap. 2.2.8.4 Durchführung der Behandlung). MTT wird als Nachweisreagenz für die metabolische Aktivität der Zellen und so auch für Zell-Viabilität verwendet. In den lebenden metabolisch aktiven Zellen wird gelbes wasserlösliches MTT zu dem wasserunlöslichen blauen Formazan reduziert. Man kann eine gleichmäßige blaue Färbung des Agars beobachten, was auf die gleichmäßige Bakterien-Verteilung und eine vergleichbare Vitalität der Bakterien in der gesamten Agar-Beschichtung hindeutet (Abbildung 88 B und C).

Bei der Färbung der lebenden Zellen mit MTT-Lösung korreliert die Stärke der Färbung mit der Menge der lebenden Zellen. Bei der Inkorporation der doppelten Menge an Bakterien-Suspension in Agar erscheint die Färbung dunkler als bei der einfachen Menge (Abbildung 89).

A. 1x Bakterienmenge



B. 2x Bakterienmenge



Abbildung 89. Stärke der Blau-Färbung durch MTT-Lösung korreliert mit der Menge der Bakterien im Agar. Je mehr Bakterien im LB-Agar vorhanden sind, desto dunkler erscheint die Färbung mit MTT-Lösung. Es wurden 300 µl (A) und 600 µl (B) Bakterien-Kultur ($OD_{600}=0,2$) in 20 ml LB-Agar inkorporiert (s. Kap. 2.2.8.3 Beschichtung des Lungen-Modells und 2.2.8.4 Durchführung der Behandlung, modifiziert nach Reiter et al., 2020).

Als Negativkontrolle wurde ein Teil des bakterienhaltigen Agars direkt nach der Beschichtung mit Aluminiumfolie abgedeckt und 15 min lang der UV-Strahlung unter der Sterilbank ausgesetzt (Abbildung 90 A). Nach der Inkubation und der Anfärbung mit MTT-Lösung konnte man die dem UV-Licht ausgesetzten Stellen wiedererkennen (Abbildung 90 B). Sie erscheinen heller als die nicht belichteten Agar-Abschnitte, da die Bakterien durch das UV-Licht abgetötet wurden.

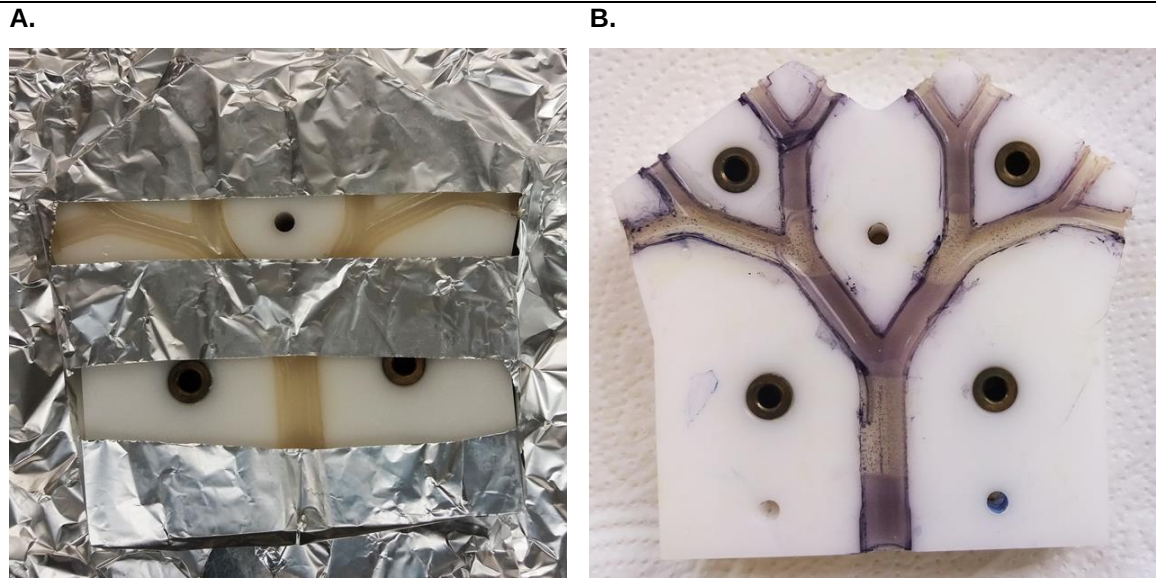


Abbildung 90. Die durch UV-Behandlung abgetöteten Bakterien erscheinen nach der Färbung mit MTT hell in der LB-Agar-Beschichtung. Das beschichtete Lungen-Modell wurde teilweise mit Aluminium-Folie abgedeckt (A) und 20 min unter der Sterilbank mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurde das Modell über 18 h bei 37°C inkubiert und die lebenden Bakterien mit MTT-Lösung angefärbt (s. Kap. 2.2.8.3 Beschichtung des Lungen-Modells und 2.2.8.4 Durchführung der Behandlung, modifiziert nach Reiter et al., 2020).

3.8.5. Behandlung des beschichteten Lungen-Simulationsmodells mit Allicin und konventionellen Antibiotika

Für die Experimente zur Behandlung des beschichteten Lungenmodells wurden zwei *E. coli* MegaX-Linien (transformiert mit pRU1097 bzw. pRU1097-clone1) mit unterschiedlicher Allicin-Resistenz verwendet, die von Dr. Jan Borlinghaus (Institut für Pflanzenphysiologie der RWTH Aachen, Borlinghaus et al., 2019) zur Verfügung gestellt wurden. Das Plasmid pRU1097-clone1 beinhaltet eine genomische DNA-Sequenz aus *PfAR-1*, die zur Erhöhung der Allicin-Resistenz führt. *E. coli* mit dem leeren Vektor pRU1097 dient zur Kontrolle. Zusätzlich besitzen die beiden Stämme die Gentamicin-Resistenz, welches auf pRU1097 codiert ist.

Als Erstes wurde die MHK und MBK des Allicins und des Gentamicins für die beiden Bakterien-Linien bestimmt (s. Kap. 2.2.2.6 Bestimmung der minimalen hemmenden Konzentration (MHK) und minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) bei Bakterien). Dafür wurde die verdünnte Bakteriensuspension in einer 96-well Platte mit einer 2ⁿ-Verdünnungsreihe des Gentamicins über 18 h bei 37°C inkubiert und die geringste Antibiotika-Konzentration ohne sichtbares bakterielles Wachstum als MHK bestimmt. Die MHK bei *E. coli* MegaX-pRU1097_{leer} beträgt 50 µM Allicin und MBK 100 µM. Die MHK bei *E. coli* MegaX-pRU1097-clone1 beträgt 200 µM Allicin und die MBK 390 µM. So besitzt *E. coli* MegaX-pRU1097-clone1 eine höhere Allicin-Resistenz als *E. coli* mit dem leeren Vektor. Die beiden Bakterien-Linien haben beide eine Gentamicin-Resistenz. Die MHK bei beiden Linien beträgt 1,58 mM Gentamicin und die MBK 3,16 mM.

Anschließend wurde das Lungenmodell mit den Bakterien beschichtet und mit in _{reinst} Wasser gelöstem Allicin in verschiedenen Konzentrationen bzw. mit _{reinst} Wasser als Kontrolle in Aerosol-Form behandelt (s. Kap. 2.2.8.3 Beschichtung des Lungen-Modells und 2.2.8.4 Durchführung der Behandlung). Dafür wurde das Lungen-Modell in den auf 37°C vorgeheizten Inkubator-Kasten

platziert und an die Anlaufstrecke angeschlossen. 8 ml Test-Lösung wurde in den Vernebler-Behälter überführt, die Zuluft auf 6 l/min eingestellt und der Aerosol-Generator eingeschaltet. Die Behandlung dauerte 20 min, bis die Test-Flüssigkeit vollständig verbraucht war. Anschließend wurde das Lungen-Modell über 18 h bei 37°C inkubiert und dann mit MTT-Lösung angefärbt. Es wurden Allicin-Konzentrationen von 0,25 mM bis 5 mM getestet (Abbildung 91). Bei der Kontroll-Behandlung mit Wasser wurde ein gleichmäßiges bakterielles Wachstum über die gesamte Agar-Beschichtung beobachtet.

Bei *E. coli* MegaX pRU1097 wurde das Wachstum bei der Behandlung mit 0,25 mM Allicin nicht inhibiert. Bei der Behandlung mit 0,5 mM Allicin wurde das bakterielle Wachstum an ca. 50% der Agar-Fläche inhibiert. Dies konnte vor allem an den Innenseiten der Verzweigungen des Lungen-Modells beobachtet werden. Bei dem ersten Zweig wurde das Wachstum auf ca. 50% der Fläche in dem vorderen Bereich inhibiert. Die Verteilung der Inhibitionsstellen im Modell sah nahezu symmetrisch aus. Bei der Behandlung mit 1 mM Allicin-Lösung wurde das Wachstum im gesamten Modell fast vollständig inhibiert. An den Ausgangsöffnungen bei den letzten Verzweigungen waren teilweise noch lebende Bakterien sichtbar.

Bei dem Allicin-resistenteren *E. coli* MegaX-pRU1097-clone1 wurde das Wachstum bei der Behandlung mit 1 mM und 2 mM Allicin teilweise und bei 5 mM vollständig inhibiert. Die Inhibition bei den geringeren Allicin-Konzentrationen findet ebenfalls an den Innenseiten der Verzweigungen statt. Bei der Behandlung mit 1 mM Allicin wurde das bakterielle Wachstum im vorderen Bereich des ersten Zweiges inhibiert. So waren höhere Allicin-Konzentrationen zur vollständigen Wachstumsinhibition bei dem Allicin-resistenteren *E. coli* MegaX-pRU1097-clone1 als bei dem anfälligen *E. coli* MegaX-pRU1097 notwendig.

Im nächsten Schritt wurde das beschichtete Lungen-Modell mit dem im Wasser gelösten Gentamicin in Aerosol-Form behandelt (Abbildung 92). Es wurden 2 mM, 5 mM, 10 mM und 15 mM Gentamicin-Lösungen verwendet. Bei beiden Bakterien-Linien wurde bei der Gentamicin-Behandlung das Wachstum in gleichem Maße inhibiert. 2 mM Gentamicin inhibiert das bakterielle Wachstum auf ca. 10% der Agar-Fläche bei beiden Bakterien-Linien. Die Gentamicin-Lösung in der höchsten getesteten Konzentration von 15 mM inhibierte das bakterielle Wachstum auf ca. 50% der Agar-Fläche. Die Inhibition des bakteriellen Wachstums fand in erster Linie an den Verzweigungen statt. Mit steigender Gentamicin-Konzentration nahm die Fläche ohne bakterielles Wachstum zu.

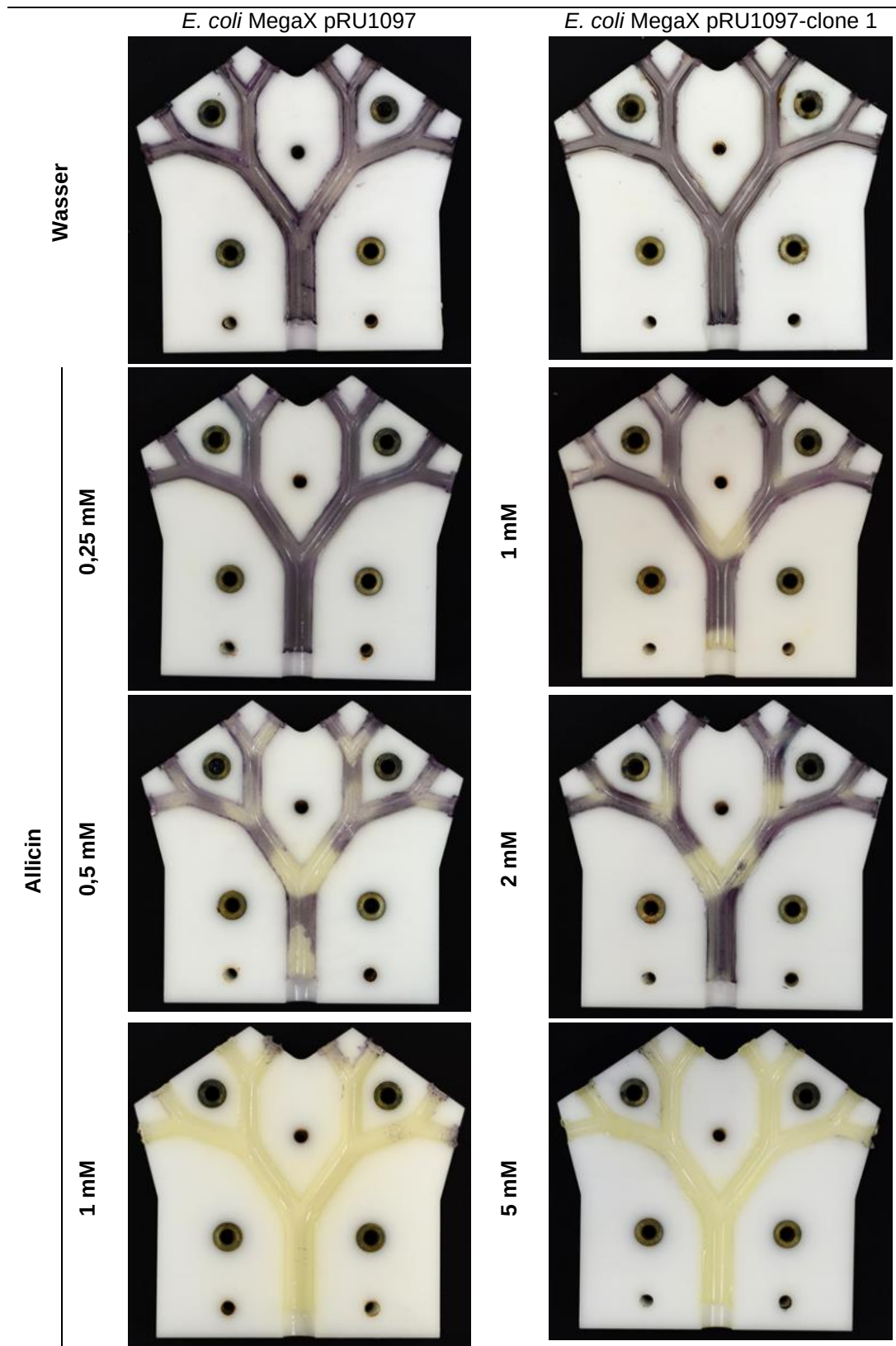


Abbildung 91. Behandlung des Lungen-Modells mit Allicin-Aerosol. Lungen-Modell wurde mit *E. coli*-haltigem LB-Agar beschichtet, mit verschiedenen Konzentrationen wässriger Allicin-Lösung in Aerosol-Form in der Lungen-Simulationsapparatur behandelt und anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden zwei Bakterien-Linien verwendet: *E. coli* MegaX transformiert mit dem leeren pRU1097-Plasmid und Linie mit dem pRU1067-clone 1, das die Allicin-Resistenz-Gene besitzt und der Linie erhöhte Allicin-Resistenz verleiht. Die lebenden Bakterien wurden durch eine MTT- Färbung als Blaufärbung sichtbar gemacht. An den Stellen, wo keine lebenden Bakterien vorhanden sind, bleibt die Agar-Beschichtung hellgelb (s. Kap. 2.2.8.3 Beschichtung des Lungen-Modells und 2.2.8.4 Durchführung der Behandlung, modifiziert nach Reiter et al., 2020).

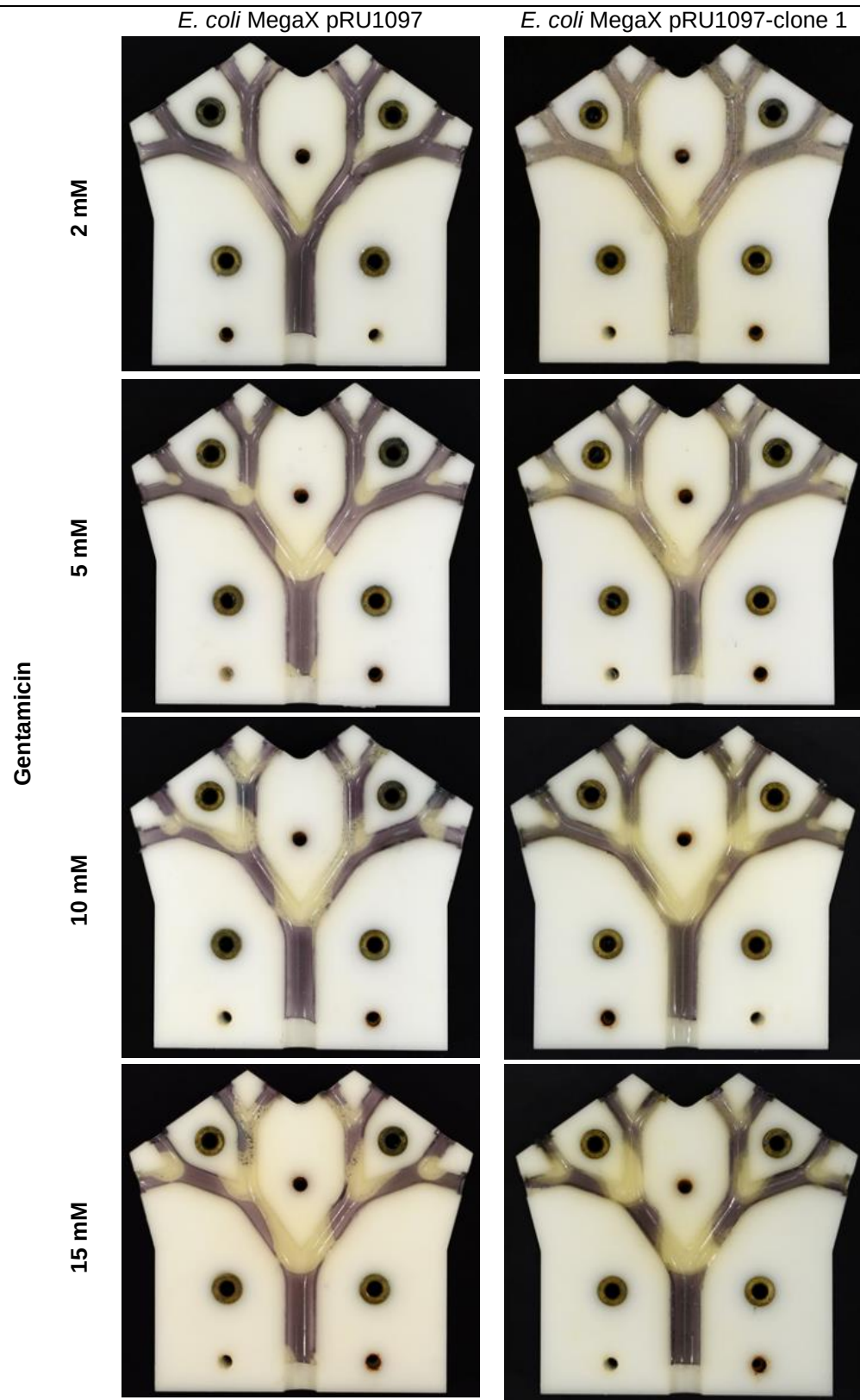


Abbildung 92. Behandlung des Lungen-Modells mit Gentamicin-Aerosol. Das Lungen-Modell wurde mit *E. coli*-haltigen LB-Agar beschichtet, mit der wässrigen Lösung des Gentamicins in verschiedenen Konzentrationen in Aerosol-Form in der Lungen-Simulationsapparatur behandelt, anschließend über Nacht bei 37°C inkubiert. Die lebenden Bakterien wurden durch die Färbung mit MTT-Lösung als Blaufärbung sichtbar gemacht. An den Stellen, wo keine lebenden Bakterien vorhanden sind, bleibt die Agar-Beschichtung hellgelb (s. Kap. 2.2.8.3 Beschichtung des Lungen-Modells und 2.2.8.4 Durchführung der Behandlung, modifiziert nach Reiter et al., 2020).

3. Ergebnisse

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Allicin nicht als Aerosol, sondern nur über die Gasphase in dem Lungen-Modell das bakterielle Wachstum inhibieren kann. Dafür wurde das gasförmige Allicin von der Oberfläche der Allicin-Lösung mit dem Luftstrom in das Lungen-Modell transportiert. Dafür wurde statt Vernebler-Gefäß die Allicin-Lösung in den umgedrehten Flaschendeckel gefüllt und dicht an den Vernebler-Deckel platziert (s. Abbildung 29). Es wurden 2 ml einer 42 mM wässrigen Allicin-Lösung in den Schott-Flaschendeckel gegeben, die Zuluft auf 6 l/min eingestellt, das mit *E. coli* MegaX-pRU1097 beschichtete Lungen-Modell in dem vorgeheizten Inkubator-Kasten an das Anlauf-Rohr angeschlossen und die Behandlung über 20 min bzw. 40 min durchgeführt. Anschließend wurde das Modell über 18 h und 37°C inkubiert und anschließend mit MTT-Lösung angefärbt. Sowohl nach 20 min als auch nach 40 min Behandlung wurde keine Inhibition des bakteriellen Wachstumes beobachtet. An der Innenseite der ersten Verzweigung führte die Behandlung besonders nach 40 min zur Austrocknung des Agars, wodurch keine Stoffwechselaktiven Bakterien vorhanden waren (Abbildung 93 A und B). Anschließend wurde die 20 min lange Behandlung mit 200 µl unverdünntem Allicin (Allicin-Konzentration 3,7 M) durchgeführt (Abbildung 93 C). Bei dieser Behandlung wurde eine geringe Inhibition des Wachstums in dem vorderen Bereich des ersten Zweigs und die Austrocknung des Agars bei der ersten Verzweigung beobachtet.

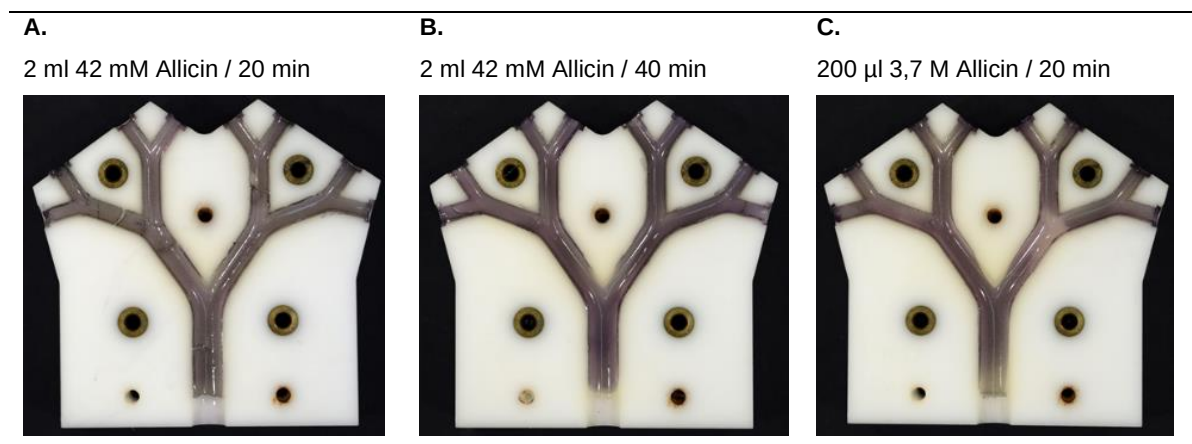


Abbildung 93. Behandlung mit wässriger Allicin-Lösung (A, B) und mit konzentriertem Allicin über die Gasphase (C) zeigt keine antimikrobielle Wirkung. 2 ml von 42 mM Allicin (gelöst in _{reinst} Wasser) wurden 20 min (A) und 40 min (B) über die Gasphase appliziert. Auch eine 20 min lange Behandlung mit 200 µl unverdünntem Allicin (Allicin-Konzentration 3,7 M) zeigt keine wachstumshemmende Wirkung. Es wurde *E. coli* MegaX pRU1097 verwendet (s. Kap. 2.2.8.3 Beschichtung des Lungen-Modells und 2.2.8.4 Durchführung der Behandlung).

Im nächsten Schritt wurde das Allicin für die Behandlung über die Gasphase im Ethanol gelöst (Abbildung 94). 100 µl unverdünntes Allicin wurden in 1,9 ml Ethanol gelöst (Allicin-Konzentration 186 mM), in den Flaschendeckel appliziert und die Behandlung des mit *E. coli* MegaX-pRU1097 beschichteten Lungen-Modells über 40 min durchgeführt (Abbildung 94 B). Bei dieser Behandlung wurde das bakterielle Wachstum im gesamten Lungen-Modell inhibiert. In Vergleich dazu wurde bei der Kontroll-Behandlung mit 100 µl Wasser (gelöst in 1,9 ml Ethanol) das bakterielle Wachstum nicht inhibiert (mit Ausnahme des ausgetrockneten Agars an der ersten Verzweigung, Abbildung 94 A). Um eine geringere Menge Allicin bei der Behandlung zu verwenden, wurden 10 µl unverdünntes Allicin in 90 µl Wasser und 1,9 ml Ethanol gelöst (Abbildung 94 C). Die Behandlungsdauer betrug

3. Ergebnisse

20, 30 und 40 min. Die Allicin-Konzentration betrug 18,6 mM. Nach 20 min Behandlung wurde das bakterielle Wachstum teilweise an den Innenseiten der ersten und zweiten Verzweigung gehemmt, wohingegen nach 30 min Behandlung das bakterielle Wachstum in dem ersten Eingangszweig und sowohl im zweiten Zweig als auch an den zweiten Verzweigungen fast vollständig inhibiert. Bei diesen zwei Behandlungen nahm die Intensität der blauen Färbung in den inhibierten Bereichen ab, nach 40 min stärker als nach 20 min Behandlung. Nach 40 min Behandlung war das bakterielle Wachstum vollständig in den ersten, zweiten und teilweise in den dritten Zweigen inhibiert. Das bakterielle Wachstum wurde in den mittleren vierten (letzten) Zweigen stärker als in den Äußeren inhibiert.

A. 100 μ l reinstWasser + 1,9 ml Ethanol 40 min **B.** 100 μ l Allicin + 1,9 ml Ethanol 40 min



C. 10 μ l Allicin + 90 μ l reinst Wasser + 1,9 ml Ethanol

20 min

30 min

40 min



Abbildung 94. Allicin gelöst in Ethanol zeigt antimikrobielle Wirkung über die Gasphase. 100 μ l Allicin gelöst in 1,9 ml Ethanol (Allicin-Konzentration 186 mM) inhibiert bakterielles Wachstum bei 40 min langer Behandlung über die Gasphase fast vollständig (B). Im Gegensatz dazu zeigt Ethanol keine Wirkung (100 μ l reinst Wasser + 1,9 ml Ethanol) (A). 10 μ l Allicin, gelöst in 90 μ l Wasser und 1,9 ml Ethanol (Allicin-Konzentration 18,6 mM), inhibiert bakterielles Wachstum über die Gasphase und die antimikrobielle Wirkung steigt mit längerer Inkubationszeit (C) (s. Kap. 2.2.8.3 Beschichtung des Lungen-Modells und 2.2.8.4 Durchführung der Behandlung, modifiziert nach Reiter et al., 2020).

Die Allicin-Mengen, die bei den Behandlungen verbraucht wurden, sind in Tabelle 87 dargestellt. Dafür wurde nach der Behandlung die nicht verbrauchte Test-Lösung gesammelt und deren Volumen und die Allicin-Konzentration mittels HPLC bestimmt. Die Differenz von den angesetzten Allicin-Mengen und Allicin-Mengen nach der Behandlung wurde ausgerechnet. Bei der Behandlung des Lungen-Modells über die Gasphase mit der wässrigen Allicin-Lösung wurde 7,8 μ mol bzw. 109 μ mol Allicin verbraucht und dabei keine antimikrobielle Wirkung festgestellt. Bei der Behandlung

3. Ergebnisse

mit in Ethanol gelöstem Allicin wurden bei 2,8 µmol Allicin eine schwache antimikrobielle Wirkung, bei 5,7 µmol eine mittlere und über 37,2 µl eine starke Inhibition des bakteriellen Wachstums beobachtet. 8 µmol Allicin wurden bei der Aerosol-Behandlung mit der wässriger Allicin-Lösung verbraucht, was zur vollständigen Inhibition des bakteriellen Wachstums geführt hat.

Tabelle 87. Allicin-Mengen, die bei der Auswahl der Behandlungen über die Gas-Phase und mit dem Aerosol verwendet wurden. Nach der Behandlung wurde die nicht verbrauchte Test-Lösung gesammelt und deren Volumen und die Allicin-Konzentration (mittels HPLC) bestimmt. Die vorhandenen Allicin-Mengen vor und nach der Behandlung sowie deren Differenz wurden ausgerechnet.

Behandlungs- art	Behandlungs- dauer	vor der Behandlung			Nach der Behandlung			Behandlungs- menge	antimikrobielle Wirkung
		Konz.	Vol.	Menge	Konz.	Vol.	Menge		
wässrige Allicin- Lösung über die Gasphase	40 min	42 mM	2 ml	84 µmol	51,6 mM	1,476 ml	76,2 µmol	7,8 µmol	keine
	20 min	3,7 M	200 µl	743 µmol	3,9 M	161 µl	634 µmol	109 µmol	keine
Allicin- Ethanol- Lösung über die Gasphase	20 min	18,6 mM	2 ml	37,2 µmol	61,7 mM	0,558 ml	34,4 µmol	2,8 µmol	schwach
	30 min	18,6 mM	2 ml	37,2 µmol	353,7 mM	0,089 ml	31,5 µmol	5,7 µmol	mittel
	40 min	18,6 mM	2 ml	37,2 µmol	-*	0 ml*	-*	max. 37,2 µmol*	stark
	40 min	186 mM	2 ml	371,6 µmol	4170,0 mM	0,065 ml	271,1 µmol	100,6 µmol	stark
wässrige Allicin- Lösung als Aerosol	20 min	1 mM	8 ml	8 µmol	-*	0 ml*	-*	max. 8 µmol	stark

* die Test-Lösung wurde bei der Behandlung vollständig verbraucht

4. Diskussion

4.1. Hintergrund und Ziele der Arbeit

Mikroorganismen haben gute Voraussetzungen, um in kurzen Zeiträumen Resistenzen zu entwickeln durch spontane DNA-Mutationen und hohe Vermehrungsraten. Der Selektionsdruck, z. B. durch Antibiotika-Anwesenheit in subletalen Konzentrationen, begünstigt die Resistenz-Entwicklung in Bakterien enorm und kommt durch die fehlerhafte Anwendung der Wirkstoffe (Martinez, 2009) häufig vor. Zum einen ist die medizinische Antibiotika-Abgabe nicht in allen Ländern per ärztlichem Rezept geregelt. Dies führt dazu, dass Antibiotika-Präparate häufiger eingesetzt werden, wo keinerlei Bedarf besteht, und auch kürzer angewandt als notwendig, was wiederum die Resistenz-Entwicklung fördert (Radyowijati & Haak, 2003; Morgan et al., 2011). Das zweite Problem ist der prophylaktische Einsatz von Antibiotika in industrieller Tierhaltung (Wegerer, 2003; Marshall & Levy, 2011). Die angewendeten Antibiotika werden zum Teil vom tierischen bzw. menschlichen Körper nur geringfügig chemisch modifiziert oder sogar unverändert ausgeschieden und gelangen so in die Umwelt. Mehrere Antibiotika (Penicillin-Derivate (Cephalosporin, Cefalexin), Sulfonamide, Tetracyclin, Trimethoprim, Lincomycin, u.a.) können in hohen Konzentrationen in der Umwelt akkumulieren (Baquero et al., 2008; Manzetti & Ghisi, 2014). Dies führt dazu, dass die beständigen und schwer abbaubaren Pharmaka-Produkte im Boden, Grund-, Ab- und Trinkwasser vermehrt nachweisbar bleiben (Nikolaou et al., 2007). Das wiederum fördert die Ausbildung von Resistenzen bei den Mikroorganismen durch Mutationen und deren schnelle Verbreitung durch Gentransfer, und somit Einsatz von weiteren Antibiotika (Davies & Davies, 2011; Berendonk et al., 2015). Um diesen Teufelskreis zu durchbrechen, ist die Entwicklung neuer antibiotisch wirkender, aber auch nicht akkumulierender Substanzen notwendig.

Es besteht also eine dringende Notwendigkeit, neue Substanzen bzw. Antibiotika-Klassen für die Entwicklung neuer Präparate zu identifizieren, insbesondere solche, die *multiple sites of action*, also mehrere Wirkungsorte, haben. Letztere Eigenschaft erschwert das spontane Auftreten der Resistenz, da dafür mehrere gleichzeitig auftretende Mutationen in einer Zelle entstehen müssen, die die Wirkungsweise eines Antibiotikums aufheben (Brötz-Oesterhelt & Brunner, 2008).

Knoblauch wird schon seit Jahrtausenden als Gewürz- und Heilpflanze verwendet. Starke natürliche antimikrobielle Eigenschaften schützen den Knoblauch vor Infektionen und Fressfeinden und haben somit ein breites Wirkungsspektrum (Curtis et al., 2004). Allicin wird direkt bei der Gewebeschädigung produziert und ist die stärkste mikrobiell wirksame Substanz im Knoblauch. Deren Wirkung basiert auf der Oxidation mehrerer zellulären Proteine und Minimierung des GSH-Pools der Zelle. Das breite Wirkungsspektrum und die *multiple sites of action* des Allicins kann man sich heutzutage bei den seit langem aufkommenden und viel diskutierten Problemen der Antibiotika-resistenten Keime nützlich machen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Allicin grundsätzlich das Potenzial besitzt als Behandlungsmittel bei einer bakteriellen Lungeninfektion eingesetzt zu werden. Dabei wurden die spezifischen Oxidationsziele des Allicins in zwei *Pseudomonas fluorescens* Stämmen Pf0-1 und PfAR-1 identifiziert (s. Kap. 4.2 Oxidationsziele des Allicins in Pf0-1 und PfAR-1) und anschließend ein identifizierter Angriffsort für die DNA-Gyrase als schon bekanntes Antibiotika-Ziel untersucht (s.

Kap. 4.3 DNA-Gyrase als Oxidationsziel des Allicins). Im nächsten Schritt wurde die antimikrobielle Wirkung des Allicins auf mehrere lungenpathogene Bakterienstämme überprüft und die wirksamen Konzentrationen (s. Kap. 4.4 MHK und MBK für Allicin bei lungenpathogenen Bakterien) bestimmt. Daraufhin wurde der Einfluss des Allicins auf den bakteriellen Biofilm (s. Kap. 4.5 Auswirkung des Allicins auf die Biofilm-Ausbildung) sowie der synergistische Effekt mit konventionellen Antibiotika (s. Kap. 4.6 Synergistischer Effekt des Allicins mit konventionellen Antibiotika) überprüft. Danach wurden die toxischen Mengen des Allicins auf tierische bzw. menschliche Lungenzellen bestimmt (s. Kap. 4.7 Einfluss des Allicins auf tierische Zellen) und die antimikrobielle Wirkung des Allicins über die Gasphase auf lungenpathogene Bakterien überprüft (s. Kap. 4.8 Allicin inhibiert das Wachstum der lungenpathogenen Bakterien über die Gasphase). Im letzten Abschnitt wurde die Allicin-Behandlung der infizierten Lunge *in vitro* mit Hilfe eines neu entwickelten Lungen-Modells simuliert (s. Kap. 4.9 Lungen-Simulationsmodell).

4.2. Oxidationsziele des Allicins in *Pf0-1* und *PfAR-1*

Pseudomonas fluorescens ist ein gramnegatives Bodenbakterium. Der Name ist durch die Eigenschaft unter dem UV-Licht zu fluoreszieren entstanden. Dafür verantwortlich sind die von Bakterien synthetisierten und nach außen freigesetzten Siderophore wie Pyoverdine (Meyer & Abdullah, 1978). *P. fluorescens* sind sog. *growth promoting bacteria*, die die Pflanzen-Wurzeln besiedeln und das Wachstum der Pflanzen-pathogenen Bakterien durch die Freisetzung antimikrobieller Substanzen (z. B. Pyrrolnitril) unterdrücken (Compant et al., 2005; Howell & Stipanovic, 1979). In der Arbeitsgruppe von Prof. Alan Slusarenko hat Dr. Andreas Wolters 2004 ein Bakterium aus einer Knoblauchzehe isoliert (Institut für Pflanzenphysiologie der RWTH Aachen). Dieses Isolat besitzt eine erhöhte Allicin-Resistenz im Vergleich zu *Escherichia coli* und *Pseudomonas syringae* 4612 und wurde als *Allicin Resistant-1* (AR-1), also *PfAR-1*, bezeichnet (Borlinghaus et al., 2019).

Die Hintergründe der erhöhten Allicin-Resistenz wurden von Jan Borlinghaus (2019) in Rahmen seiner Dissertation bearbeitet. Durch den horizontalen Gentransfer erlangte *PfAR-1* Gene von einem noch unbekannten Organismus, die zur erhöhten Allicin-Resistenz führen. Das sind etwa zehn Gene, die als Gen-Inseln dreimal im Genom von *PfAR-1* zu finden sind. Zusätzlich dazu hat *PfAR-1* das Gen für Glutathion-Reduktase dreimal im Genom. Normalerweise ist das Gen für die Glutathion-Reduktase bei Bakterien nur einmal im Genom kodiert. Glutathion-Reduktase ist ein Enzym, das das oxidierte Glutathion reduziert und somit den Redox-Puffer der Zellen regeneriert und wieder zur Verfügung stellt. Vermutlich durch die höhere Enzym-Menge ist die erhöhte Enzym-Aktivität in *PfAR-1* zu erklären, was zum stärkeren Schutz gegenüber oxidativem Stress und erhöhter Allicin-Resistenz von *PfAR-1* führt (Borlinghaus et al., 2019).

In dieser Arbeit wurden die Oxidationsziele des Allicins in dem Proteom vom Allicin-anfälligem *Pf0-1* und dem Allicin-resistenten *PfAR-1* mit Hilfe der OxICAT-Methode identifiziert (s. Kap. 3.1 Identifikation der Oxidationsziele des Allicins in *Pf0-1* und *PfAR-1* mittels OxICAT, Reiter, 2014). Dabei erhöht Allicin den Oxidationsgrad des gesamten Proteoms und der Anteil an reduzierten Proteinen verringert sich. Dabei wird das Proteom von dem anfälligen *Pf0-1* im höheren Grad oxidiert

im Vergleich zu dem Allicin-resistenten *PfAR-1* (s. Abbildung 30, S.116). Es wurden spezifische Oxidationsziele des Allicins in *Pseudomonas fluorescens* identifiziert (s. Tabelle 61, S. 117). Drei Proteine waren in beiden Stämmen stark oxidiert: Phosphoglucosamin-Mutase, Glucose-1-Phosphat-Thymidyltransferase und Ketosäure-Reduktoisomerase (s. Tabelle 62, S. 118). Außerdem zeigte *PfAR-1* noch fünf zusätzliche spezifische Oxidationsziele und *Pf0-1* acht (Tabelle 63 und Tabelle 64, S. 119).

2016 haben Müller et al. die Oxidationsziele des Allicins in *E. coli* mit Hilfe der OxICAT-Methode untersucht. Sie haben 12 Proteine identifiziert, die nach Allicin-Behandlung stark oxidiert wurden (s. Tabelle 88, S. 199). Ein gemeinsames Oxidationsziel haben *E. coli* und *Pf0-1* - Leucyl-tRNA-Synthetase bzw. -Ligase (LeuS). In den *P. fluorescens* Stämmen wurden Chaperone (HscA bei *Pf0-1* und GroEL bei *PfAR-1*) nach Allicin-Behandlung stark oxidiert. Sonst kann man keine Übereinstimmungen unter den identifizierten Allicin-Zielen in diesen drei Bakterienstämmen finden (vgl. Tabelle 88 und Tabelle 89). Es gibt keine gemeinsame biologische oder molekulare Funktion sowie keine gemeinsame Aufbaustruktur oder funktionale Gruppe unter den identifizierten Allicin-Zielen. Interessant ist, dass die Hitzeschock-Proteine ebenfalls als Allicin-Targets bei der Untersuchung der humanen Zelllinie identifiziert wurden (Gruhlke et al., 2019). Die Chaperone HSP90 and HSPA4 wurden nach der Allicin-Behandlung in den Jurkat-Zelllinien allyliert.

Bei der Betrachtung der zu dem oxidierten Cystein benachbarten Aminosäuren wurden keine Regelmäßigkeiten bezüglich der chemischen Polarität (Hydrophobizität), bevorzugte sekundäre Proteinstruktur und keine konservierten homologen Aminosäuren gefunden (s. Kap. 3.1.2 Sequenz-Analyse des oxidierten Peptides, S. 121). Bei der Betrachtung der Säure-Basen-Eigenschaften der zu dem Cystein benachbarten Aminosäuren wurde festgestellt, dass oxidiertes Cystein häufiger von den sauren Aminosäuren umgeben ist im Vergleich zu den Cysteinen in nicht-oxidierten Peptiden.

Interessant ist, dass die Peptide, die in *Pf0-1* aber nicht in *PfAR-1* durch Allicin oxidiert sind, zum größten Teil identisch sind (7 von 8) (s. Anhang Tabelle A47, S. 290). Allerdings ist nur eins von fünf Peptiden, die in *PfAR-1* aber nicht in *Pf0-1* oxidiert sind, identisch. Dies spricht dafür, dass *PfAR-1* grundlegenden unspezifischen Schutz gegenüber Allicin-Oxidation aufweisen muss, wie es von Borlinghaus et al. (2019) gezeigt wurde. Die *E. coli* Target-Peptide sind in *Pf0-1* und *PfAR-1* nicht identisch oder das entsprechende oxidierte Cystein fehlt. Das Fehlen von gemeinsamen Oxidationszielen bei *E. coli* und *P. fluorescens* ist vermutlich durch die Unterschiede in Aminosäure-Sequenzen zu erklären.

Tabelle 88. Überblick über die molekularen und physiologischen Funktionen der Oxidationsziele des Allicins in *E. coli* identifiziert von Müller et al. (2016).

Protein	Molekulare Funktion	Biologische Prozess	Cofaktor	Enzymatische Reaktion
1. RidA – Enamin/Imin-Deaminase	• Deaminase und Hydrolase • Bindung von falsch gefalteten Proteinen	• Biosynthese der verzweigtkettigen Aminosäuren • Detoxifikation		reaktive Enamine / Imine $\rightleftharpoons$ Ammoniak
2. AceA – Isocitrat-Lyase	• Lyase	• Kohlenwasserstoff-Metabolismus • Tricarbonsäure-Zyklus	Magnesium Mangan	Isocitrat $\rightleftharpoons$ Succinat + Glyoxylat
3. AspC – Aspartat-Aminotransferase	• Transaminase	• Biosynthese von L-Phenylalanin • Aminosäuren-Metabolismus	Pyridoxal-5'-Phosphat	L-Aspartat + 2-Oxoglutarat $\rightleftharpoons$ Oxaloacetat + L-Glutamat
4. RpoA – Untereinheit α der DNA-abhängigen RNA-Polymerase	• Protein-Dimerisierung • DNA-abhängige 5'-3'-RNA-Polymerase • Nucleotidyl-Transferase	• DNA-abhängige Transkription • Elongation	DNA Zink-Ione	Nucleosid-Triphosphat + RNA(n) $\rightleftharpoons$ Diphosphat + RNA(n+1)
5. LeuS – Leucin-tRNA-Ligase	• Aminoacyl-tRNA-Editierung • Leucin-tRNA-Ligase	• Leucyl-tRNA-Aminoacylation • Protein-Biosynthese	ATP Nucleotid	ATP + L-Leucin + tRNA(Leu) $\rightleftharpoons$ AMP + diphosphat + L-leucyl-tRNA(Leu)
6. Asd – Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	• Protein-Dimerisierung • Oxidoreduktase	• Biosynthese der Homoserine	NADP	L-Aspartyl-4-Phosphat $\rightleftharpoons$ L-Aspartat-Semialdehyd
7. AroG – Phospho-2-Dehydro-3-Deoxyheptonat-Aldolase	• Transferase	• Biosynthese der Chorisminsäure • Biosynthese der aromatischen Aminosäuren		Phosphoenolpyruvat + D-Erythrose-4-Phosphat $\rightleftharpoons$ Deoxy-D- Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat
8. GapA – Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase A	• Oxidoreduktase	• Glucose-Metabolismus • Oxidation-Reduktion-Prozesse	NAD NADP	Glyceraldehyd-3-Phosphat + NAD ⁺ $\rightleftharpoons$ 1,3-Bisphospho-Glycerat
9. GrxC – Glutaredoxin 3	• Elektronentransfer • Glutathion-Bindung • Protein-Disulfid-Oxidoreduktase	• Zelluläre Redox-Homeostase • Biosynthese der Deoxyribonucleotide • Elektronentransport		
10. SerA – D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	• Oxidoreduktase	• L-Serin-Biosynthese • Aminosäuren-Biosynthese	NAD Serin	3-Phospho-D-Glycerat + NAD ⁺ $\rightleftharpoons$ 3-Phosphono-Oxypyruvat + NADH + H ⁺ 2-Hydroxyglutarat + NAD ⁺ $\rightleftharpoons$ 2-Oxoglutarat + NADH + H ⁺
11. PurA – Adenylosuccinat-Synthetase	• P-loop-haltige Nucleosid-Triphosphat-Hydrolase • Ligase	• Purin-Nucleotid-Biosynthese • IMP-Metabolismus • Zelluläre Antwort auf DNA-Schaden	GTP Magnesium	GTP + IMP + L-Aspartat $\rightleftharpoons$ GDP + Phosphat + N6-(1,2-Dicarboxy-Ethyl)-AMP
12. Pgk – Phosphoglycerate-Kinase	• Kinase • Transferase	• Glykolytische Prozesse	ATP	ATP + 3-Phospho-D-Glycerate $\rightleftharpoons$ ADP + 3-Phospho-D-Glyceroyl-Phosphat

Tabelle 89. Überblick über die molekularen und physiologischen Funktionen der Oxidationsziele des Allicins in *Pseudomonas fluorescens* Stämmen Pf0-1 und PfAR-1 (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

	Protein	Molekulare Funktion	Biologische Prozess	Cofaktor	Enzymatische Reaktion
Pf0-1 / PfAR-1	GlmM – Phosphoglucosamin-Mutase	• Isomerase	• Kohlenhydrat-Metabolismus	Magnesium	α -D-Glucosamin-1-Phosphat $\rightleftharpoons$ D-Glucosamine-6-Phosphate
	RffH – Glucose-1-Phosphat-Thymidyltransferase	• Nucleotide-Diphospho-Zucker-Transferase	• Biosynthese von extrazellulären Polysacchariden	Magnesium	$dTTP + \alpha$ -D-Glucose-1-Phosphat $\rightleftharpoons$ Diphosphat + dTDP-Glucose
	IlvC – Ketosäure-Reduktoisomerase	• Oxidoreduktase	• Biosynthese von verzweigtkettigen Aminosäuren	Magnesium NADPH	(R)-2,3-Dihydroxy-3-Methylbutyrat + NADP ⁺ $\rightleftharpoons$ (S)-2-Hydroxy-2-Methyl-3-Oxobutyrtat + NADPH + H ⁺
Pf0-1	HscA – Chaperon HscA	• Bindung von falsch gefalteten Proteinen • Chaperon	• Protein-Faltung • Assemblierung von Eisen-Schwefel-Cluster	ATP	
	GyrA – Untereinheit A der DNA-Gyrase	• DNA-Topoisomerase Typ II mit ATP-Hydrolyse-Aktivität	• DNA-Replikation • Topologische DNA-Änderungen	ATP DNA	
	Regulationsprotein der Zink-Aufnahme (Pfl01_0060)	• Transkriptionsfaktor • Repressor	• DNA-abhängige Transkription • Regulation der Transkription	DNA Eisen Zink	
	PrfA – Peptidkette Releasing-Faktor 1	• <i>Releasing</i> -Faktor für die Codon-spezifische Translation	• Protein-Biosynthese		
	LeuS – Leucyl-tRNA-Synthetase	• Leucin-tRNA-Ligase • Aminoacyl-tRNA-Editierung	• Leucyl-tRNA-Aminoacylierung • Protein-Biosynthese	ATP	$ATP + L\text{-Leucin} + tRNA(\text{Leu}) \rightleftharpoons AMP + \text{Diphosphat} + L\text{-Leucyl-tRNA}(\text{Leu})$
	RlmB – RNA-Methyltransferase	• RNA-Methyltransferase	• RNA-Prozessierung	RNA S-Adenosyl-L-Methionin	$S\text{-Adenosyl-L-Methionin} + \text{Guanosin}_{2251} \text{ in } 23S \text{ rRNA} \rightleftharpoons S\text{-Adenosyl-L-Homocystein} + 2'\text{-O-Methylguanosin}_{2251} \text{ in } 23S \text{ rRNA}$

Tabelle 81 (Fortsetzung). Überblick über die molekularen und physiologischen Funktionen der Oxidationsziele des Allicins in *Pseudomonas fluorescens* Stämmen Pf0-1 und PfAR-1.

Protein	• Molekulare Funktion	• Biologische Prozess	Cofaktor	Enzymatische Reaktion
GroL – Hitzeschockprotein der Familie 60 GroEL Chaperone	• Chaperon	• Neufaltung der Proteine	ATP Magnesium	
RibE – Untereinheit α der Riboflavin-Synthase	• Ligase-Aktivität	• Biosynthese der Riboflavine	Lumazin	2-Hydroxy-3-Oxobutyl-Phosphat + 5-Amino-6-(D-Ribitylamino)-Uracil $\rightleftharpoons$ Riboflavin
Biotin-Carboxylase der Acetyl-CoA-Carboxylase	• Ligase • Transferase	• Fettsäuren-Biosynthese	ATP Metall-Ionen	Biotin + ATP + CO ₂ $\rightleftharpoons$ Carboxybiotin + ADP + Phosphat
Putative Formiat-Dehydrogenase-Oxidoreduktase	• Aminotransferase • Oxidoreduktase	• N ⁺ -Metabolismus	Molybdän Fe-S-Cluster	Formiat + NAD ⁺ $\rightleftharpoons$ CO ₂ + NADH + H ⁺ Formiat + 2 Ferricytochrom b1 $\rightleftharpoons$ CO ₂ + 2 Ferrocycytochrom b1 + 2 H ⁺
RpiA – Ribose-5-Phosphat-Isomerase A	• Isomerase	• Nicht-oxidativer Zweig der Pentose-Phosphat-Weges		D-Ribulose 5-Phosphate → D-Ribose-5-phosphat

PfAR-1

4.3. DNA-Gyrase als Oxidationsziel des Allicins

DNA-Gyrase wurde als spezifisches Oxidationsziel des Allicins für weitere Untersuchungen ausgewählt (s. Kap. 3.2 Einfluss des Allicins auf die Aktivität der DNA-Gyrase). Zu einem ist die DNA-Gyrase bereits ein Eingriffsort für konventionelle Antibiotika, sogenannte Gyrasehemmer. Außerdem ist *PfAR-1* resistent gegenüber der Nalidixinsäure im Unterschied zu *Pf0-1*. Nalidixinsäure ist der erste entdeckte Gyrasehemmer, der mit GyrA interagiert und die Enzymaktivität hemmt. So ist es möglich, dass die Allicin- und Nalidixinsäure-Resistenzen in Zusammenhang stehen. Zusätzlich unterscheiden sich die Sequenzen der Untereinheit A der DNA-Gyrase in *Pf0-1* und *PfAR-1* voneinander. So besitzt die GyrA von *PfAR-1* eine spezifische 40 AS lange Sequenz, die in *Pf0-1* fehlt. Möglicherweise wird GyrA in *PfAR-1* durch Allicin nicht oxidiert, da diese zusätzliche *PfAR-1* Sequenz die DNA-Gyrase vor der Oxidation im Unterschied zu *Pf0-1* schützt.

Somit ist die erste Hypothese, dass der unterschiedliche Grad der Oxidation der DNA-Gyrase nach Allicin-Stress bei *Pf0-1* und *PfAR-1* und somit die unterschiedlichen Resistenz-Phänotypen gegenüber Allicin auf den Unterschieden in der DNA-Sequenz der GyrA beruhen. Die zweite Hypothese ist, dass *PfAR-1* andere Schutzmechanismen gegenüber Allicin im Unterschied zu *Pf0-1* besitzt, die die Oxidation von GyrA in *PfAR-1* verhindern.

DNA-Gyrase wurde im Jahr 1976 von Gellert et al. entdeckt und gehört zu der Enzym-Klasse der Topoisomerasen, die die Topologie der DNA verändern können. Die Topoisomerasen sind essenzielle Enzyme und sind in allen lebenden Organismen vorhanden. Topoisomerasen können die DNA in die *super coiled*- Form überführen und diese entspannen, indem sie die Windungszahl des DNA-Doppelstranges erhöhen bzw. verringern. Dabei kann der DNA-Doppelstrang negativ (rechtsgängig) oder positiv (linksgängig) aufgedreht oder entspannt werden. Es gibt zwei Typen der Topoisomerasen: Typ I schneidet nur einen DNA-Strang und verdreht diesen relativ zu dem zweiten DNA-Strang der Doppelhelix ohne Energie-Verbrauch, Typ II schneidet beide DNA-Stränge und führt den anderen DNA-Doppelstrang durch den Schnitt unter Verbrauch von ATP (Tabelle 90). Typ I der Topoisomerasen in Prokaryoten ist für die Entspannung von negativer *super coiled* DNA zuständig. Der Typ II Topoisomerase in Prokaryoten ist für die Erzeugung und Entspannung von negativer *super coiled* DNA zuständig. Bei den Eukaryoten können Typ I und II Topoisomerasen sowohl positive als auch negative *super coiled* DNA entspannen (Collin et al., 2011; Reece and Maxwell, 1991). Die bakterielle Topoisomerase II (oder DNA-Gyrase genannt) ist das einzige bekannte Enzym, das negative *super coiled* DNA erzeugen kann.

Tabelle 90. Typen und die Funktionen der Topoisomerase-Enzyme.

	Typ I	Typ II
allgemein	schneidet nur einen DNA-Strang ohne Energie-Verbrauch	schneidet DNA-Doppelstrang unter Energie-Verbrauch (ATP)
Prokaryoten (Enzym-Vertreter)	Entspannung der negativen <i>super coiled</i> DNA (Topoisomerase I und III, reverse DNA-Gyrase)	Erzeugung und Entspannung der negativen <i>super coiled</i> DNA (Topoisomerase II (=DNA-Gyrase) und Topoisomerase IV)
Eukaryoten (Enzym-Vertreter)	Entspannung der negativen und positiven <i>super coiled</i> DNA (Topoisomerase I und III)	Entspannung der negativen und positiven <i>super coiled</i> DNA (Topoisomerase II α und II β)

Die DNA-Gyrase besitzt zwei Untereinheiten A und B, die ein Heterotetramer A₂B₂ bilden (Oram et al., 2006). Die Untereinheit A ist für die Bindung an der DNA und den DNA-Doppelstrang-Schnitt verantwortlich. Die Untereinheit B ist für die Bindung und die Hydrolyse von ATP zuständig (Collin et al., 2011).

Die DNA-Gyrase erzeugt die negative *super coiled* DNA in Prokaryoten und ist in Eukaryoten nicht vorhanden. Das macht die DNA-Gyrase zum attraktiven Ziel für Antibiotika (Collin et al., 2011). Die Antibiotika-Klasse Chinolone (Nalidixinsäure) und weiter-entwickelte Fluorochinolone (Ciprofloxacin und Levofloxacin) inhibieren die enzymatische Aktivität der Typ II Topoisomerasen. Chinolone interagieren mit der Untereinheit A der DNA-Gyrase (GyrA) bzw. mit der Untereinheit (ParC) der Topoisomerase IV, stabilisieren den DNA-Enzym-Komplex und verhindern den DNA-Doppel-Bruch (Robicsek & Hooper, 2006). Die Antibiotika-Klasse der Aminocumarine (z.B. Novobiocin) interagiert spezifisch mit der Untereinheit B der DNA-Gyrase an der Adenosintriphosphat (ATP)-Bindestelle, hemmt kompetitiv die ATP-Hydrolyse und verhindert somit das Ablösen des Enzyms von der DNA. Die Stabilisierung des DNA-Enzym-Komplexes führt in der Zelle zur Fragmentierung von bakteriellem Chromosom und zur Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS, Collin et al., 2011).

Die Untereinheit A der DNA-Gyrase besitzt zwei Cysteine (Cys₁₉₄ und Cys₄₃₃) bei *Pf0-1* und *PfAR-1*. Bei dem OxICAT-Experiment wurde nur Cys₄₃₃ identifiziert. Nur bei *Pf0-1* wurde Cys₄₃₃ nach Allicin-Behandlung oxidiert. Die DNA-Sequenz der *gyrA* ist bei beiden Bakterien zu 89% identisch. Die Aminosäuren-Sequenz von GyrA ist zu 93% identisch (Abbildung 95).

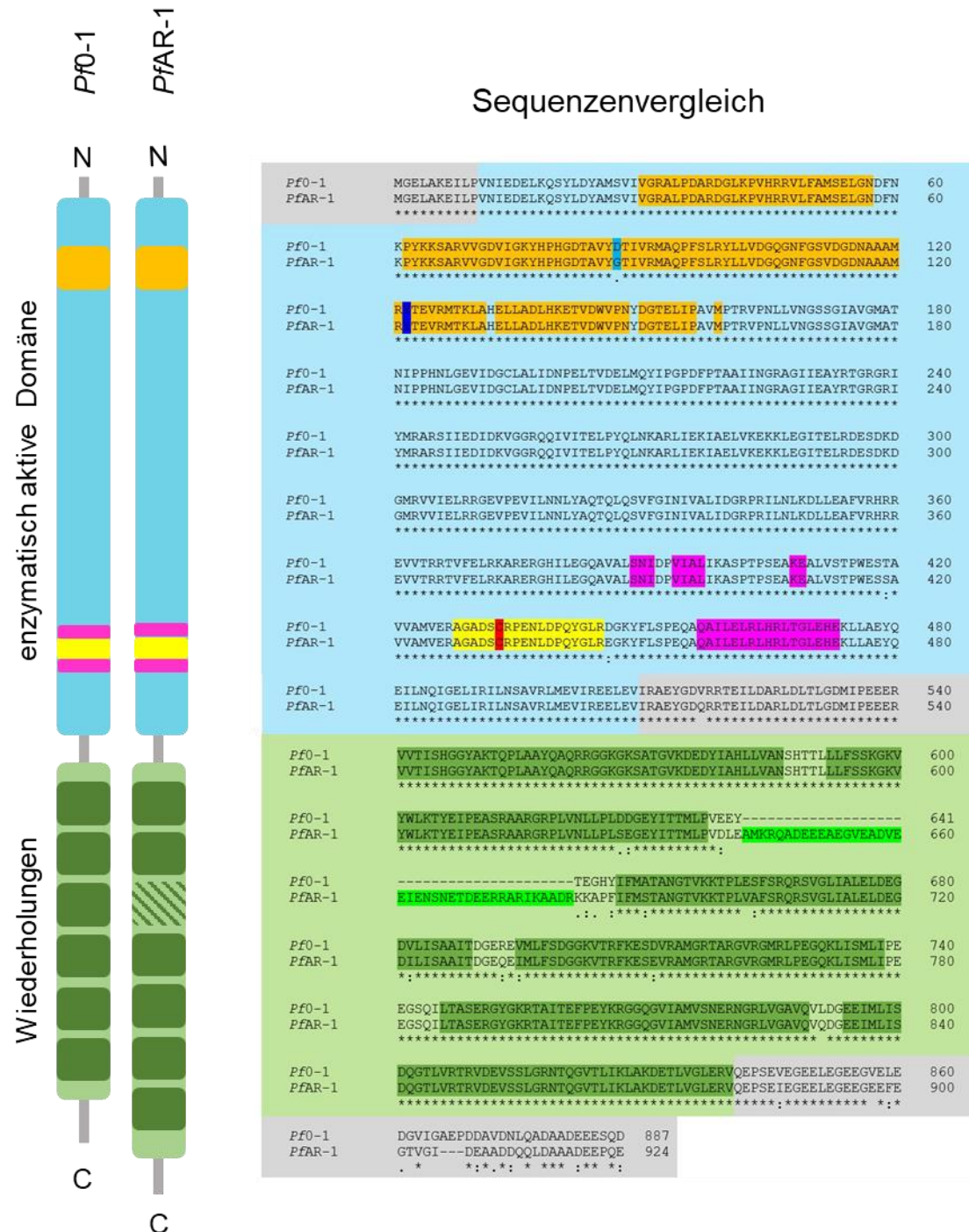


Abbildung 95. Aminosäuren-Vergleich der Untereinheit A der DNA-Gyrase bei *Pf0-1* und *PfAR-1*. Markiert sind folgende funktionalen Elemente: Enzymatisch aktive Domäne (hellblau), β -Faltblatt-Wiederholungs-Domänen (dunkelgrün), die CAP-ähnliche Domäne (orange) mit Tyrosin in dem aktiven Zentrum (dunkelblau), die konservierte Dimer-Verbindungs-Domäne (purpur), bei dem OxICAT identifizierte Peptid (gelb) mit dem Cystein 433 (rot). Die *PfAR-1* spezifische 40 Aminosäuren-lange Sequenz (hellgrün) beginnt an der Position 642. Konservierte Aminosäuren sind mit Sternchen (*), der konservative Austausch mit Doppelpunkten (:) und semi-konservativer Austausch mit Punkten (.) markiert. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Online-Tool Clustal Omega (www.ebi.ac.uk, Chojnacki et al., 2017, Madeira et al., 2019) durchgeführt. Die Domänen sind durch die Online-Tools NCBI Conserved Domains (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi, Marchler-Bauer et al., 2016) und InterPro (www.ebi.ac.uk/interpro, Mitchell et al., 2019) vorhergesagt (modifiziert nach Reiter et al., 2019).

GyrA besitzt in dem C-terminalen Abschnitt (in Abbildung 95 grün dargestellt) sechs sich wiederholende Sequenzen. Bei *Pf0-1* liegen die Wiederholungen in regelmäßigen Abständen zueinander. Die Untereinheit A der DNA-Gyrase von *PfAR-1* enthält in diesem Abschnitt einen 120 bp bzw. 40 Aminosäuren- (AS) langen zusätzlichen Abschnitt, der bei *Pf0-1* fehlt. Dadurch ist der Abstand zwischen der zweiten und dritten Wiederholung bei *PfAR-1* größer. Laut Qi et al. (2002) bilden diese sechs sich wiederholenden Abschnitte eine β -Propeller-Struktur. Die zusätzliche 40 AS lange Sequenz kann eine siebte β -Propeller-Struktur in *PfAR-1* ausbilden.

Die 40 AS lange Sequenz aus *PfAR-1* wurde bei der Sequenz-Suche durch BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) in vier weiteren *Pseudomonas* gefunden (*Pseudomonas fluorescens* strain CREA-C16 genome, *Pseudomonas granadensis* strain LMG 27940 genome assembly, chromosome: I, *Pseudomonas* sp. Z003-0.4C (8344-21) genome assembly, chromosome: I, *Pseudomonas* sp. A3(2016), complete genome) mit der Sequenz-Identität von 92-99% (s. Anhang Abbildung A29, S. 295). Interessanterweise ist dieser Abschnitt auch in *Ps1448A* vorhanden, das eine sehr hohe Anfälligkeit gegenüber Allicin aufweist (Abbildung 96).

```

Ps1448A      EILNQIGELIRILNSATRIMEVIREEEVIRSEYGDARRTEILDARLDLTGLDITEER 540
PfAR-1      EILNQIGELIRILNSAVRIMEVIREEEVIRAEYGDARRTEILDARLDLTGLDIMEER 540
*****
Ps1448A      VVTISHGGVAKTQPLAVYQARRGGKGSATGDKEDYIAHLLVANSHTTLLMFSSKGV 600
PfAR-1      VVTISHGGVAKTQPLAAYQARRGGKGSATGVKDEDYIAHLLVANSHTTLLFSSKGV 600
*****
Ps1448A      YWLKTYEIPASRAARGRPLVNLPLSDGEYITMLPVDLEAMRKRADE-EGEALLEG 659
PfAR-1      YWLKTYEIPASRAARGRPLVNLPLSDGEYITMLPVDLEAMRKRADEEAEAGV 660
*****
Ps1448A      DAENSSETEERKACIKAAADKKAPFFIMSTANGTVKKTPLVAFSRQSSGLIALE 719
PfAR-1      ESENSNETDEERRARIKAADKKAPFFIMSTANGTVKKTPLVAFSRQSSGLIALE 720
*****
Ps1448A      DILISAAITDGEQIIMLFSDDGGKVTFRKESDVRAMGRTARGVRGMRLEGGKLI 779
PfAR-1      DILISAAITDGEQIIMLFSDDGGKVTFRKESDVRAMGRTARGVRGMRLEGGKLI 780
*****
Ps1448A      EGSQILTASERGYGKRTAISEFFPEYKRGQGVIAVMSNERNGRLVGAVQVLDG 839
PfAR-1      EGSQILTASERGYGKRTAITEFFPEYKRGQGVIAVMSNERNGRLVGAVQVLDG 840
*****
Ps1448A      DQGTIVRTRVGEVSSLCRNTQGVTLIKLASDEKLVGLERVQEPSEVEGELEGE 899
PfAR-1      DQGTIVRTRVGEVSSLCRNTQGVTLIKLASDEKLVGLERVQEPSEVEGELEGE 900
*****
Ps1448A      IVDAAAEVGDAGEDLQADAAPDEDEPN 928
PfAR-1      GT----VGIDEAADQLDAADE-EPQE 924
*****

```

Abbildung 96. Vergleich der Aminosäuresequenz von GyrA von *PfAR-1* mit Allicin-anfälligem *Pseudomonas syringae* Stamm *Ps 1448A* (*Ps* pv. *phaseolicola* 1448A). *Ps1448A* besitzt ebenfalls die zusätzliche 40 AS lange Sequenz wie *PfAR-1* im Unterschied zu *Pf0-1*. AS-Vergleich wurde mit Hilfe von Online-Tool Clustal Omega (www.ebi.ac.uk, Chojnacki et al., 2017, Madeira et al., 2019) durchgeführt.

Die DNA-Sequenz der Untereinheit B der DNA-Gyrase ist zwischen *Pf0-1* und *PfAR-1* zu 94% identisch, die Aminosäuren-Sequenz ist zu 99% identisch (s. Anhang Abbildung A30, S. 295). Die Untereinheit B der DNA-Gyrase besitzt vier Cysteine (Cys₆₁, Cys₂₇₂, Cys₄₁₄, Cys₄₈₀). In OxICAT wurden bei beiden Bakterien Cysteine Cys₄₁₄ und Cys₄₈₀ gefunden, sind aber nicht signifikant nach der Allicin Behandlung oxidiert (s. Anhang Tabelle A49 und A50, S. 296 ff.).

Allicin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase

In dieser Arbeit wurde die Fragestellung aufgestellt, ob die spezifische GyrA Sequenz von *PfAR-1* für deren Allicin-Resistenz verantwortlich ist und ob die DNA-Gyrase von *PfAR-1* an sich resistenter gegenüber Allicin-Oxidation ist.

Als Erstes wurde in den *in vitro* Aktivitäts-Assays mit der DNA-Gyrase aus *E. coli* gezeigt, dass Allicin die Aktivität der DNA-Gyrase in der gleichen Konzentrationsspanne wie Nalidixinsäure hemmt

(s. Kap. 3.2.1 Allicin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus *E. coli in vitro*). Anschließend wurden die Enzyme aus *Pf0-1* und *PfAR-1* mit Hilfe von Ultrazentrifugation und anschließender Novobiocin-Agarose-Aufreinigungssäule isoliert. Die aufgereinigten Enzyme zeigten Aktivität, indem sie das Plasmid aus der entspannten Form in die *super coiled*-Form überführten (s. 3.2.2 Allicin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus *Pf0-1* und *PfAR-1 in vitro*). Die Aktivität der Enzyme wurde durch die Gyrasehemmer Nalidixinsäure, Levofloxacin und Novobiocin gehemmt. Ebenfalls hemmte Allicin die Aktivität der DNA-Gyrase aus *Pf0-1* und *PfAR-1* und zwar bei der gleichen Konzentration. Das bedeutet, dass die DNA-Gyrase aus *PfAR-1* *per se* die gleiche Anfälligkeit gegenüber Allicin wie die DNA-Gyrase aus *Pf0-1* besitzt. Somit ist die DNA-Gyrase aus *PfAR-1* nicht für seine Allicin-Resistenz verantwortlich.

In dem nächsten Schritt wurde in *in vivo* Experimenten überprüft, ob die DNA-Gyrase die Allicin-Resistenz beeinflusst. Dafür wurden die *gyrA*-Austauschmutanten von *Pf0-1* und *PfAR-1* gentechnisch mit Hilfe der modifizierten pEMG-*knock out*-Methode hergestellt (s. Kap. 3.2.3 Herstellung der GyrA-Austauschmutanten *Pf0-1_{gyrAPfAR-1}* und *PfAR-1_{gyrAPf0-1}*). Das ursprüngliche *gyrA*-Gen wurde durch das Austauschgen aus dem jeweils anderen Stamm ersetzt. Bei dem Hemmhof-Test wurde gezeigt, dass der Austausch der *gyrA* zwischen den beiden Stämmen keinen Einfluss auf die Allicin-Resistenz besitzt (s. Kap. 3.2.4 Anfälligkeit der *gyrA*-Austauschmutanten *Pf0-1_{gyrAPfAR-1}* und *PfAR-1_{gyrAPf0-1}* gegenüber Allicin und anderen Antibiotika). Die *Pf0-1*-Austauschmutanten mit dem *gyrA* aus *PfAR-1* sind nicht resistenter gegenüber Allicin geworden. Ebenso sind die *PfAR-1*-Austauschmutanten mit der *gyrA* aus *Pf0-1* nicht anfälliger gegenüber Allicin geworden. Im Gegensatz dazu wurde bei den Untersuchungen mit Nalidixinsäure gezeigt, dass *gyrA* aus *PfAR-1* für die Nalidixinsäure-Resistenz verantwortlich ist. Die *PfAR-1*-Austauschmutanten mit *gyrA* aus *Pf0-1* sind anfälliger als der *PfAR-1* WT geworden, ebenso waren die *Pf0-1*-Austauschmutanten resistenter zu Nalidixinsäure im Vergleich zum WT. Somit basiert die Nalidixinsäure-Resistenz auf dem *gyrA*-Gen von *PfAR-1*. Für die Entwicklung der Nalidixinsäure-Resistenz ist die Aminosäuremutation an Aspartat₈₇ verantwortlich (Mitscher, 2005; Ketron et al., 2014). So ist im Fall von *PfAR-1* an dieser Position Glycin vorhanden, was zur Nalidixinsäure-Resistenz führt. Bei dem Test mit Levofloxacin und Novobiocin wurden keine eindeutigen Unterschiede in der Resistenz zwischen den Austauschmutanten und dem WT festgestellt, da Levofloxacin nicht nur mit GyrA sondern auch mit der Untereinheit der Topoisomerase IV (ParC) und Novobiocin mit GyrB interagiert. In diesem Experiment wurde gezeigt, dass die Allicin-Resistenz von *PfAR-1* nicht mit der spezifischen 40 AS-längeren GyrA zusammenhängt. Das passt zu der Beobachtung, dass diese spezifische 40 AS-lange *PfAR-1* Sequenz auch in dem Allicin-anfälligen *Ps1448A* Stamm vorhanden ist (Abbildung 96, S. 205). Dies bedeutet, dass *PfAR-1* einige Schutzmechanismen gegenüber Allicin-Behandlung besitzt, die die Oxidation von GyrA in *PfAR-1* durch Allicin verhindern.

Parallel zu dieser Arbeit hat Jan Borlinghaus an den genetischen Grundlagen der Allicin-Resistenz von *PfAR-1* gearbeitet (Borlinghaus et al., 2019). Er hat die drei Kopien von genetischen Inseln in dem Genom von *PfAR-1* entdeckt. Diese genetischen Inseln beinhalten einige Gene, die gemeinsam, aber auch einzeln, zu der Erhöhung der spezifischen Allicin-Resistenz führen. Diese Gene sind für die Schutzantwort im Falle von oxidativem Stress verantwortlich, verleihen aber keine

Resistenz gegenüber dem Oxidans Wasserstoffperoxid. Dies erklärt auch, dass das *PfAR*-1 Proteom im geringeren Maß durch die Allicin-Behandlung oxidiert wurde im Vergleich zu *Pf0*-1. So ist es möglich, dass GyrA in *PfAR*-1's genetischem Hintergrund vor dem Allicin geschützt ist.

4.4. MHK und MBK für Allicin bei lungenpathogenen Bakterien

In dieser Arbeit wurde die antimikrobielle Wirkung des Allicins auf lungenpathogene Bakterien mit Hilfe von standardisierten EUCAST Suszeptibilität-Tests festgestellt (s. Kap. 3.3 Bestimmung von MHK und MBK für Allicin bei lungenpathogenen Bakterien). Dabei wurden die minimal hemmenden und bakteriziden Konzentrationen des Allicins festgestellt (MHK und MBK). Die Untersuchungen wurden mit mehreren klinischen Isolaten und auch Standard-Stämmen von *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus pyogenes* durchgeführt, unter anderem auch mit MDR-Stämmen (s. Tabelle 75, S. 153). Die durchschnittliche MHK liegt bei 0,39 mM (64 µg/ml) Allicin und MBK bei 0,79 mM (128 µg/ml) Allicin. *Acinetobacter baumannii* Stämme zeigen sich als am anfälligsten mit MBK von 0,2 mM Allicin (34 µg/ml) im Vergleich zu den anderen untersuchten Bakterien. Im Gegensatz dazu besitzen die *Streptococcus dysgalactiae* und *Pseudomonas aeruginosa* Linien eher höhere Allicin-Resistenz mit MBK von 6,31 mM Allicin (1024 µg/ml). In Rahmen der Biofilmuntersuchung wurden die MHK 0,156 mM und MFK 0,313 mM Allicin von dem lungenpathogenen Pilz *Candida albicans* bestimmt (s. Abbildung 63, Abbildung 64, S. 159, und Kap. 3.4.3 Auswirkung des Allicins auf den Biofilm von *Candida albicans*).

In der Studie von Iwalokun et al. (2004) wurde die Wirkung von wässrigem Knoblauch-Extrakt (50% Wasser : 50% Knoblauch) gegen 133 grampositive und gramnegative human-pathogene MDR-Stämme (grampositive: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*; gramnegative: *H. influenzae*, *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Shigella* spp. und *Proteus* spp.) und zehn *Candida* spp. untersucht. Der Knoblauch-Extrakt war antibiotisch wirksam gegen alle getesteten Organismen und zeigte Dosis- und Zeit-abhängige Wirkung. Die MHK betrug durchschnittlich bei grampositiven Bakterien 15,6-48,3 mg/ml und 22,9-37,2 mg/ml bei gramnegativen Bakterien und die MFK betrug 14,9 mg/ml bei *Candida* spp. Bei der Annahme, dass der Knoblauch-Saft durchschnittlich 15 mM Allicin enthält, kann man die Allicin-Konzentration in der wirksamen Dosis (MHK und MFK) des Knoblauchextraktes, der 1 zu 1 mit Wasser verdünnt war, ausrechnen. So betrug die MHK 117 µM-362 µM Allicin bei grampositiven Bakterien und 172 µM-279 µM Allicin bei gramnegativen Bakterien. Bei *Candida* spp. betrug die MFK 112 µM Allicin. Bei den Untersuchungen in dieser Arbeit liegen die meisten MHK bei Bakterien bei 100 µM-790 µM Allicin und 156 µM Allicin bei *Candida albicans*. Dies deutet darauf hin, dass zum größten Teil das Allicin für die antimikrobielle Wirkung des Knoblauchs verantwortlich ist.

Bei der Bestimmung der MHK bzw. MBK wurden Bakterien in sehr starker Verdünnung in den Test eingesetzt, somit beziehen sich die Werte auf die planktonischen (also frei schwimmenden/schwebenden) Zellen. In der Praxis bei der Behandlung der Infektion ist die

bakterielle Population in Form von einem Biofilm vorhanden (Parsek & Singh, 2003). In solchem Zustand unterscheiden sich die metabolischen und physiologischen Prozesse der Bakterien von den planktonischen Zellen während der MHK- und MBK- Bestimmungstests. Die Zellen in einem Biofilm zeigen höhere Antibiotika-Resistenz im Vergleich zur Zellsuspension. Dies heißt, dass die notwendigen Allicin-Konzentrationen, die bei der Infektionsbehandlung notwendig sind, höher ausfallen werden als ermittelten MHK und MBK.

4.5. Auswirkung des Allicins auf die Biofilm-Ausbildung

Als Erstes wurde die Biofilm-Ausbildung bei den *Pseudomonas fluorescens* Stämmen Pf0-1 und PfAR-1 untersucht (s. Kap. 3.4.1 Auswirkung des Allicins auf die Biofilm-Ausbildung bei Pf0-1 und PfAR-1 in Flüssigkultur). *P. fluorescens* kann einen Biofilm an den anorganischen Oberflächen, wie z.B. Glas oder Kunststoff, ausbilden. Dabei haften sich die freischwimmenden Zellen an die Oberfläche, vermehren sich und bilden eine bakterielle Schicht an der Oberfläche. Bei den ersten Schritten der Anhaftung an der Oberfläche ist die Neusynthese von speziellen extrazellulären Proteinen notwendig, da sie für die Interaktion mit der Oberfläche verantwortlich sind (O'Toole & Kolter, 1998). Die Bakterien, die über Nacht in dem Flüssigmedium stationär inkubiert wurden, bilden einen Biofilm an der Luft-Flüssigkeitsgrenze an der Gefäßwand. Durch die Zugabe von Allicin wurde die Biofilmbildung inhibiert (s. Abbildung 59, S. 155). Die effektive Allicin-Konzentration entspricht aber der wachstumshemmenden Konzentration: bei Pf0-1 0,8 mM und bei PfAR-1 1,8 mM. Somit zeigte Allicin bei diesen Experimenten keine spezifische Wirkung gegenüber Biofilm.

Für weitere Untersuchungen der Wirkung des Allicins auf den Biofilm wurden die Biofilm-Reporter-Stämme von PfAR-1-pJP2-*aprA::gusA* und *Pseudomonas syringae* 4612- pZLR4- *traR-traG::lacZ* kloniert: bei der Biofilm-Ausbildung färben sich die Bakterien blau, falls die Biofilmbildung inhibiert ist, bleiben die Bakterienkolonien weiß (s. Kap. 3.4.2 Biofilm-Reporter-Stämme Ps4612 mit pZLR4- *traR-traG::lacZ*-Plasmid und PfAR-1 mit pJP2-*aprA::gusA*). Die Synthese des Enzyms alkalische Metalloprotease (AprA/AprX) wird bei *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas aeruginosa* während der Biofilm-Ausbildung induziert (Liu et al., 2007; Sadikot et al., 2005). Alkalische Metalloprotease ist für die Nährstoff-Versorgung der Bakterien durch den Abbau der verfügbaren Proteine verantwortlich. Es wurde bereits gezeigt, dass in dem Pseudomonaden-Stamm *P. fluorescens* 395 der Promotor-Bereich der alkalischen Metalloprotease bei der Biofilmbildung induziert wird und als Reporter-Gen verwendet werden kann (Liu et al., 2007). Durch den Vergleich der Promotor-Sequenz von *aprX* des *P. fluorescens* 395 mit den *upstream* Sequenzen von *aprA* von Pf0-1 und PfAR-1 wurden die Promotor-Bereiche identifiziert. Das Reporter-Plasmid pZLR4- *traR-traG::lacZ* wurde von Cha et al. (1998) zur Detektion der Homoserin-Lactone bei der Biofilmbildung entwickelt. TraR ist ein Transkriptionsaktivator aus dem *Agrobacterium tumefaciens*, das während des Quorum Sensing bei der Konjugation und der Plasmid-Übertragung eine Rolle spielt. Bei der Durchführung des Hemmhof-Tests mit PfAR-1- und *P. syringae* 4612-Reporter-Linien entstanden weiße Zonen des bakteriellen Wachstums, die sich an den Hemmhof anschließen und bei denen die Biofilmbildung durch Allicin inhibiert ist (s. Abbildung 61 und Abbildung 62, S. 157). Das bedeutet, dass Allicin die Biofilmbildung bei diesen

Bakterien-Stämmen bei den geringeren wachstumshemmenden Konzentrationen inhibiert. Allerdings kann man die Biofilm-hemmende Wirkung des Allicins als gering einschätzen, da diese Konzentrationsspanne, die in der Breite der weißen Zone bei dem Hemmhof-Test wiedergespiegelt wird, gering ausfällt.

Anschließend wurde die Wirkung des Allicins auf die Ausbildung des pilzlichen Biofilms von *Candida albicans* untersucht (s. Kap. 3.4.3 Auswirkung des Allicins auf den Biofilm von *Candida albicans*). Allicin löste keine spezifische Hemmung der Biofilm-Ausbildung von *C. albicans* aus, da die MHK für planktonische Zellen und die hemmende Konzentration der Biofilm-Neuausbildung mit 0,156 mM gleich waren (s. Abbildung 65 und Abbildung 66, S. 160). Außerdem zeigen die Biofilm-Zellen des *C. albicans* sehr hohe Allicin-Resistenz im Vergleich zu den planktonischen Zellen: MFK betrug 0,313 mM und die Allicin-Konzentration, die einen ein-Tag-alten Biofilm von *Candida albicans* abtöten, betrug 1,25 mM Allicin.

Diese Untersuchungen zeigen, dass Allicin keine spezifische Wirkung auf den pilzlichen Biofilm und eine geringe hemmende Wirkung auf den bakteriellen Biofilm besitzt.

4.6. Synergistischer Effekt des Allicins mit konventionellen Antibiotika

Die aktuellen Behandlungsstrategien der Lungenentzündung basieren auf der Zugabe von β -Lactamen (Cephalosporin), Kombination von β -Lactamen (Penicillin, Cephalosporin) und Macroliden (Erythromycin) oder mit Fluorchinolonen (Moxifloxacin, Levofloxacin) (Musher et al., 2014; Postma et al., 2015; Woodhead et al., 2011). Die Tetracycline und Chloramphenicol werden selten wegen den häufigen Resistenzen eingesetzt (Woodhead et al., 2011). Rifampicin wird bei der Behandlung von MRSA und Infektionen mit *Legionella* spp. in Kombinationstherapien eingesetzt (Woodhead et al., 2011). Bei der Infektion mit resistenten *Pseudomonas aeruginosa* basiert die Behandlung auf einer gleichzeitigen Gabe von Aminoglykosiden (z.B. Gentamicin, Streptomycin, Kanamycin) und β -Lactam-Antibiotika (Mims et al., 2006).

Um die Wirksamkeit der Kombinationstherapie mit konventionellen Antibiotika und Allicin abzuschätzen wurde der synergistische Effekt des Allicins mit der Auswahl der Antibiotika bei Pseudomonaden untersucht (s. Kap. 3.5 Synergistischer Effekt des Allicins mit konventionellen Antibiotika). Als Voruntersuchung wurden vier Antibiotika (Rifampicin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Levofloxacin) auf Synergismus mit Allicin mit *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 untersucht. Dabei wurde Pf0-1 zwei Stunden mit subletalen Allicin-Mengen inkubiert und anschließend mit konventionellen Antibiotika behandelt. Nur im Falle von Rifampicin zeigte sich die Reduktion der effektiven Konzentration bei Vorinkubation mit Allicin. Bei den drei anderen Antibiotika stieg sogar die effektive Konzentration (s. Tabelle 77, S. 162). Im nächsten Schritt wurde Allicin gleichzeitig mit Rifampicin zu Pf0-1 und PfAR-1 appliziert. Erst nach dreitägiger Inkubation, also im Falle der bakteriziden und nicht wachstumshemmenden Wirkung, konnte ein synergistischer Effekt beobachtet werden (s. Tabelle 80 und Tabelle 81, S. 164). Anschließend wurde Allicin auf den synergistischen Effekt mit acht konventionellen Antibiotika (zusätzlich zu den oben genannten Ampicillin, Cefotaxim, Carbenicillin, Gentamicin) mit zwei *P. aeruginosa* Stämmen untersucht. In allen Fällen wurde keine synergistische Wirkung des Allicins beobachtet (s. Tabelle 82 und Tabelle

83, S. 165). Gleichzeitige Applikation des Allicins führt zu keiner Veränderung bzw. sogar zur Steigerung der effektiven Konzentration (MHK und MBK) der konventionellen Antibiotika. Nur bei einem von zwei untersuchten *P. aeruginosa* Stämmen konnte eine Tendenz für Synergismus mit Rifampicin beobachtet werden.

Der synergistische Effekt des Allicins mit konventionellen Antibiotika wurde in der Literatur mit den β -Lactamen gezeigt. Bei der Verwendung von einem Zehntel der MHK des Allicins zusammen mit Cefazolin, Oxacillin und Cefoperazon sinkt die notwendige effektive Konzentration um das 4-128-fache bei *Staphylococcus* spp. und *P. aeruginosa* (Cai et al., 2007). In dieser Arbeit wurde dies mit Ampicillin und Cefotaxim bei Pseudomonaden nicht beobachtet (s. Tabelle 82 und Tabelle 83).

Uneindeutig ist die synergistische Wirkung des Allicins mit den Antituberkulotika, die in der Literatur beschrieben ist. So wurde 1955 der synergistische Effekt von Allicin mit Streptomycin und Chloramphenicol gegenüber *M. tuberculosis* gezeigt (Gupta & Viswanathan, 1955). Dagegen zeigte Abbruzzese 1987, dass der Knoblauchextrakt keinen synergistischen Effekt mit den vier häufigsten Antituberkulotika (Streptomycin, Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol) bei den Experimenten mit mehreren *M. tuberculosis* Stämmen besitzt (Abbruzzese et al., 1987).

Es wurde beobachtet, dass bei der gleichzeitigen Applikation von konventionellen Antibiotika mit Allicin, die effektiven Konzentrationen der konventionellen Antibiotika sich erhöhen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass Allicin den Wirkstoff modifiziert, und somit seine Wirksamkeit verringert ist. Im Falle der Vorinkubation mit subletalen Allicin-Konzentrationen kommt noch ein zusätzlicher Faktor dazu: die Bakterien regulieren bei leichtem Allicin-Stress die metabolische Aktivität herunter und teilen sich langsamer. Somit verlieren die konventionellen Antibiotika, die nur gegen metabolisch aktive Zellen wirksam sind, ihre Wirkung, wie z.B. in dieser Arbeit die untersuchten bakteriostatischen Antibiotika Tetracyclin und Chloramphenicol.

4.7. Einfluss des Allicins auf tierische Zellen

Die Sensitivität der tierischen Zellen gegenüber Allicin wurde *in vitro* mittels Zellkultur und *ex vivo* mittels Lungengewebe aus der Ratte untersucht (s. Kap. 3.6 Einfluss des Allicins auf tierische Zellen). Dabei wurde die halbmaximale effektive Konzentration EK_{50} (engl. *half maximal effective concentration*) des Allicins bestimmt, also die Konzentration, die notwendig ist, um die Hälfte der Population zu töten. Bei den vier getesteten Zelllinien lagen die EK_{50} bei 120, 130, 210 und 460 μ M Allicin bei ein-stündiger Behandlung, dabei wurden die beiden höchsten Konzentrationen bei den beiden Lungenzelllinien detektiert (s. Abbildung 67 - Abbildung 70, S. 168 ff.). Die Zellen in den Lungengewebescheibchen waren anfälliger gegenüber Allicin im Vergleich zu der Zellkultur. Die EK_{50} betrug 14,4-14,7 μ M Allicin (s. Tabelle 84, S. 172). Allicin oxidiert die Thiolgruppen, wie z.B. der Cysteine der Enzyme und Glutathion (Rabinkov et al., 2000; Wills, 1956). Somit ist Allicin bei ausreichend hohen Konzentrationen ein Biozid, das auch die lebenden eukaryotischen Zellen abtötet. Demzufolge liegen die *in vitro* bzw. *ex vivo* bestimmten wirksamen Konzentrationen des Allicins für tierische Zellen unter bzw. in dem gleichen Konzentrationsbereich wie die MHK bzw. MBK für die pathogenen Bakterien. Wenn man die Allicin-Behandlung im lebenden Organismus durchführen würde, sind die Lungenzellen im Körper ständig mit Blut versorgt, das hohe Mengen an

den Redox-Puffer Glutathion enthält. Besonders die Lungenzellen müssen vor dem oxidativen Stress geschützt sein, da sie ständig dem atmosphärischen Sauerstoff ausgesetzt sind, im Unterschied zu den Zellen im Körperinneren. So enthält das menschliche Blut bis zu 1 mM GSH und Lungengewebe von Ratte bis zu 2 mM GSH (Halliwell & Gutteridge, 2015). Um dies zu simulieren wurde 1 mM GSH zu dem Sensitivitätstest zugefügt. Die GSH-Zugabe führte zur 1,7 bis 3,8-fachen Erhöhung des EK_{50} -Wertes: von 130 auf 450 μ M bei Fibroblasten, von 120 auf 450 bei Darm-Epithelzellen, 210 auf 500 μ M bei Lungen-Epithelzellen und von 460 auf 800 mM bei Lungen-Bronchiengewebe-Zelllinie (s. Abbildung 67 - Abbildung 70, S. 168).

Im Gegensatz zum Lungengewebe verfügen die Bakterien, die an der Gewebeoberfläche, im Mucus bzw. in den oberen Zellschichten angesiedelt sind, über keine Vorräte von Redox-Puffer. Die Bakterien werden bei Allicin-Behandlung durch die Einatmung auch als erstes in Kontakt mit Allicin kommen, im Unterschied zu den Lungenzellen. Aufgrund dieser Sachverhalte ist es möglich, dass die Lungenzellen bei Allicin-Behandlung der bakteriellen Infektionen nicht geschädigt werden. Diese Hypothese kann allerdings nur in *in vivo* Tierversuchen überprüft werden.

4.8. Allicin inhibiert das Wachstum der lungenpathogenen Bakterien über die Gasphase

Die antimikrobielle Wirkung des Knoblauchs über die Gasphase auf die Bakterien wurde zum ersten Mal 1936 von Walton et al. untersucht. In dieser Arbeit wirkte der Knoblauchextrakt gegen Sporen von *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Mycobacterium butyricum* und *M. smegmatis*. In unserem Labor wurde die antimikrobielle Wirkung des Allicins über die Gasphase von Curtis et al. (2004) gegenüber das Bakterium *Micrococcus luteus* gezeigt (s. Abbildung 9, S. 46, und Abbildung 71, S. 173). So bildet sich ein Hemmhof auf der Agarplatte, die über dem Allicin-Tropfen inkubiert wurde.

In dieser Arbeit wurde die antimikrobielle Wirkung des Allicins auf lungenpathogene Bakterienstämme untersucht (s. Kap. 3.7 Allicin inhibiert das Wachstum lungenpathogener Bakterien über die Gasphase). Mehrere klinische Isolate und die Standard-Stämme (zwei Isolate von *Streptococcus aureus*, jeweils ein Isolat von *S. pyogenes*, *S. agalactiae* und *S. dysgalactiae*, zwei Isolate von *Klebsiella pneumoniae*, drei Stämme von *Pseudomonas aeruginosa*, zwei Isolate und zwei Standard-Stämme von *Streptococcus pneumoniae*, und zwei Stämme von *Haemophilus influenzae*) wurden untersucht (s. Abbildung 72 - Abbildung 78, S. 174 ff.). Mit Ausnahme von einem *Klebsiella pneumoniae* Isolat und einem *Pseudomonas aeruginosa* Stamm hemmte Allicin über die Gasphase das bakterielle Wachstum. Außerdem wurde gezeigt, dass das bakterielle Wachstum nicht nur inhibiert ist, sondern die Bakterien auch in dem Hemmhof abgetötet wurden. Dafür wurde bei den Experimenten mit den lungenpathogenen Bakterien mit der Impföse etwas aus dem Hemmhof auf eine frische Agarplatte überstrichen, und bei den Versuchen mit *E. coli*, *Pf0-1* und *PfAR-1* wurde die Replika-Platte der Hemmhof-Test-Platte gestempelt und über Nacht inkubiert (s. Abbildung 79 und Abbildung 80, S. 178). Diese Versuche liefern die Grundlage zur

Möglichkeit der Behandlung der Lungeninfektionen durch das Einatmen von Allicin als Gas oder als Aerosol.

4.9. Lungen-Simulationsmodell

Die inhalative Applikationsform der Antibiotika bietet sich bei der Behandlung der Lungenerkrankungen an, um die systemischen Nebenwirkungen zu reduzieren (z.B. Arzneimittelfieber durch β -Lactame und Übelkeit durch Macrolide) und die effiziente Lieferung zu der Infektionsstelle zu gewährleisten (Cunha, 2001, Quon et al., 2014). Zum ersten Mal wurde die Verabreichung der Antibiotika bei Lungeninfektionen durch die Inhalation in den 1940er berichtet (Kuhn, 2001; Quon et al., 2014). Aktuell werden z.B. die Patienten mit zystischer Fibrose, die an chronischer Infektion mit *P. aeruginosa* leiden, mit Tobramycin als Aerosol, aber auch als Pulver inhalativ behandelt. Bei der ambulant erworbenen Pneumonie (engl. *community-acquired pneumonia*, CAP) oder nosokomialen (engl. *hospital-acquired pneumonia*, HAP) Lungenentzündung werden die Antibiotika gewöhnlich oral bei den frühen und intravenös bei dem späteren Krankheitsfortschritt verabreicht (Woodhead et al., 2011).

Die Verwendung von Aerosol zur Behandlung benötigt einen geeigneten Aerosol-Generator, der die Partikel in einer bestimmten Größe zwischen 1 und 5 μm erzeugt. Die Partikel größer als 5 μm erreichen die peripheren Lungenbereiche nicht, und die Partikel kleiner als 1 μm werden wieder ausgeatmet und nicht in der Lunge abgelagert. Die Verabreichung der Medikamente als Aerosol ist sehr ineffizient, da ca. 90% des Wirkstoffs verlorengeht. Die Verabreichung des Antibiotikums als Pulver (Tobramycin, Gentamicin) ist effizienter, befindet sich aber noch in der Entwicklungsphase (Westerman et al., 2007).

Da es im Rahmen dieser Arbeit keine Möglichkeit für Tierversuche gab, wurde das prinzipielle Potenzial des Allicin-Einsatzes zur Behandlung von Lungeninfektionen durch die Inhalation *in vitro* mit Hilfe eines Lungen-Modells untersucht. In Zusammenarbeit mit dem Aerodynamischen Institut der RWTH Aachen wurde eine Lungen-Simulationsapparatur entwickelt und im Rahmen der Bachelorarbeit von Philipp Müller gebaut, da solche Modelle nach unserem Wissensstand nicht vorhanden sind (s. Kap. 3.8 Lungen-Simulationsmodell). Als erstes wurden die geeigneten Baumaterialien auf die Beständigkeit gegenüber Allicin untersucht. Dafür wurden die gängigen Kunststoffe und Metalle dem Allicin über 18 h bei 37°C ausgesetzt (s. Kap. 3.8.1 Beständigkeit der Baumaterialien gegenüber Allicin). Überraschenderweise greift Allicin die Oberflächen der gängig im Labor verwendeten Kunststoffe, wie z.B. das für Petrischalen verwendetes Polystyrol, das Polymethylmethacrylat, auch Plexiglas genannt, und Polyvinylchlorid. Als Allicin-beständige Materialien haben sich die Kunststoffe das Polytetrafluorethylen, auch Teflon genannt, Polyoxymethylen (POM) und Polyamid, sowie Edelstahl und Glas erwiesen. Die mit dem Auge sichtbare Unbeständigkeit der Kunststoffe liegt vermutlich daran, dass Allicin als Sulfoxid wie ein Lösungsmittel ähnlich wie Dimethylsulfoxid (DMSO) fungiert. Dies ist besonders deutlich bei der Einwirkung des Allicins auf Polystyrol (s. Abbildung 83, S. 182). Eine andere mögliche Erklärung wäre Einwirkung des Allicins als starkem Oxidationsmittel, z. B. bei der Verfärbung des Aluminiums (s. Abbildung 81, S. 180). So wurde zum Bau vom Modell die Bestandteile, die den direkten Kontakt

mit Allicin haben aus POM (Lungen-Modell, Vernebler-Adapter) und Glas (Anlaufstrecke) angefertigt. Aus Kostengründen wurde der Inkubator-Kasten aus Plexiglas und der Ventilator und die Heizplatte-Befestigung aus Aluminium gebaut.

Das Modell stellt die Lunge im Anschnitt zwischen zweiter und fünfter Bronchiengeneration in der realen menschlichen Größe dar (s. Abbildung 27, S. 111). Das Modell ist ein planar ausgerichtetes Röhrensystem. Es ist damit möglich, die Innenoberfläche der „Bronchien“ mit der bakterien-haltigen Agarschicht auszukleiden, um den bakteriellen Befall in der Lunge zu simulieren (s. Abbildung 28, S. 112). Das Lungenmodell wurde während der Behandlung in einem temperierten Inkubator platziert und war über die Anlaufstrecke mit dem Aerosol-Generator und der zusätzlichen Luft-Zufuhr, als Simulation der Einatmung, verbunden (s. Abbildung 25, S. 110). Die Vitalität der im Agar inkorporierten Bakterien wurde durch das Besprühen mit MTT-Lösung festgestellt.

Die 20 min Behandlung des Lungen-Modells mit Allicin-Aerosol führte zur konzentrations-abhängigen Inhibierung des bakteriellen Wachstums (s. Kap. 3.8.5 Behandlung des beschichteten Lungen-Simulationsmodells mit Allicin und konventionellen Antibiotika). Durch die Verwendung von zwei *E. coli* Stämmen mit unterschiedlicher Allicin-Resistenz wurde im Vergleich zu dem Allicin-anfälligen Stamm gezeigt, dass bei dem resistenten Stamm höhere Allicin-Konzentrationen notwendig sind, um das vollständige Wachstum innerhalb des Modells zu inhibieren (s. Abbildung 91, S. 191).

Das Ablagerungsmuster des Aerosols innerhalb des Modells bei der teilweisen Wachstumsinhibition spiegelt die vorhergesagte modellierte Geschwindigkeitsverteilung während der Behandlung (Abbildung 97) wider. So ist bei dem Eintreten in das Modell in dem ersten Zweig die Geschwindigkeit maximal. Bei der ersten Verzweigung wird das Stromfluss abgebremst und verteilt sich anschließend unsymmetrisch in den zweiten Zweigen. Dabei ist an der Innenseite des Zweiges die Geschwindigkeit höher als an der Außenseite. So kann man die Aerosol-Ablagerung bei dem teilweise inhibierten Wachstum in Modell erklären. Die antibiotisch wirksamen Partikel lagern sich in erster Linie an den Verzweigungen, wo sie aufgrund der schnellen Geschwindigkeitsänderung dem Strom nicht folgen können und an die Modellwand stoßen. Dies ist an allen Verzweigungen deutlich zu beobachten (s. Abbildung 92, S. 192). Durch die unsymmetrische Geschwindigkeitsverteilung nach den Verzweigungen und zu kurze Strecken, um laminare Strömung wiederaufzubauen, haften die Aerosol-Partikel bevorzugt an der Innenseite der Zweige. Dadurch findet die Inhibition des bakteriellen Wachstums erst an der Innenseite des Modells statt.

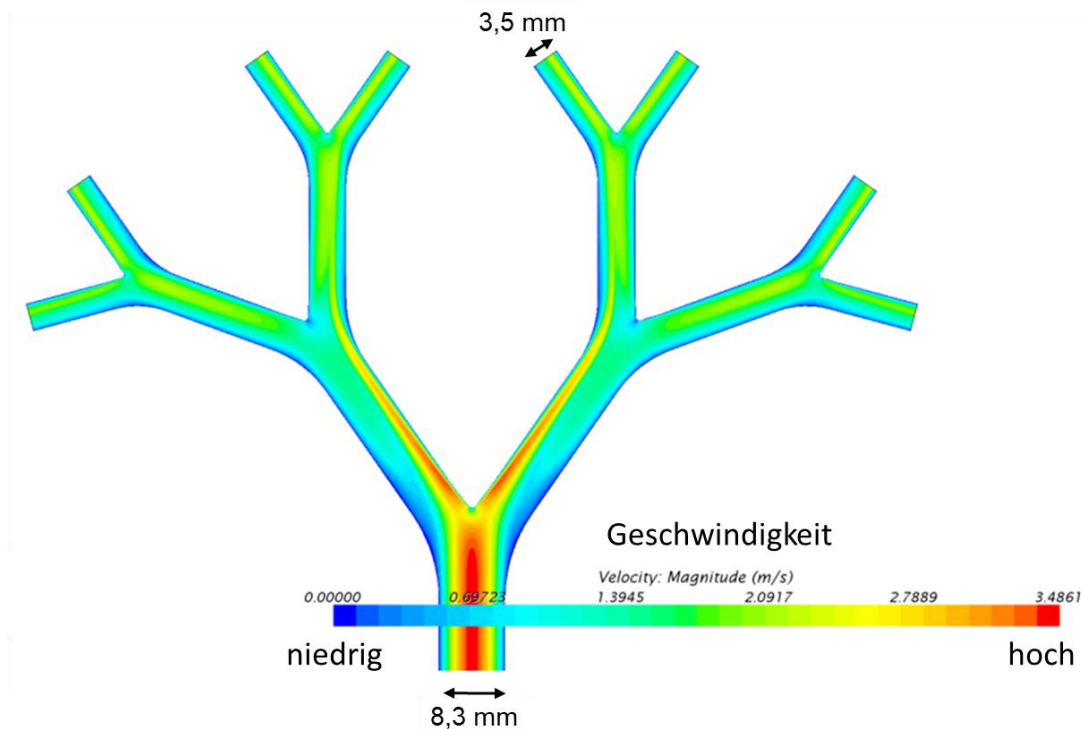


Abbildung 97. Modellierte Geschwindigkeitsverteilung innerhalb des Lungenmodells während der Behandlung. Die höchste Geschwindigkeit ist im ersten Zweig am Eingang in das Modell. Anschließend wird die Stromgeschwindigkeit durch die erste Verzweigung reduziert und wird unsymmetrisch. In den zweiten Zweigen beobachtet man die höhere Geschwindigkeit an den Modell-Innenseiten im Vergleich zu den äußeren Seiten (modifiziert nach Müller, 2016).

Ebenso wurde mit Hilfe des Lungen-Modells gezeigt, dass Allicin über die Gasphase wirksam das bakterielle Wachstum nach 40 min Behandlung inhibierte. Dabei war Allicin nur in ethanolischer, aber nicht in wässriger Lösung wirksam (s. Abbildung 94, S. 194). Die genaue Ursache dafür ist noch nicht bekannt, da vergleichbare Mengen Allicin gelöst in Wasser bzw. Ethanol unterschiedliche Wirkung auf die Bakterien zeigen (s. Tabelle 87, S. 195). Die Effektivität der Allicin-Ethanol-Lösung basiert nicht an dem besseren Übergang des Allicins in die Gasphase, sondern vermutlich an einem synergistischen Effekt zwischen Allicin und Ethanol. Dies soll in weiteren Experimenten untersucht werden.

Interessanterweise hat W.C. Minchin bei seinen Behandlungen der Tuberkulose-Kranken den Knoblauchsaff mit Ethanol und Eukalyptus-Öl gemischt (Minchin, 1927). Dabei sollte der Geruch von Knoblauch überdeckt werden, um wohl die Behandlung angenehmer für die Patienten zu gestalten. Allerdings scheint es, dass Minchin den synergistischen Effekt bei der gleichzeitigen Applikation von Allicin und Ethanol unabsichtlich ausgenutzt hat.

Das entwickelte Lungenmodell ist das *proof of principle* und stellt die Basis der Weiterentwicklung zur realistischen Lungendarstellung dar. Die Weiterentwicklung des Modells durch die Beschichtung mit Lungenepithelzellen ermöglicht zu einem Toxizitätsstudien und zum anderen die Co-Kultivierung mit pathogenen Bakterien. Dafür kann man die Lungenepithelzellen in die Nährmedium-Alginat-Schicht inkorporieren. Durch die Verwendung von einem semipermeablen bzw. porösen Material für den Bau des Modellgerüsts, kann man die Gel-Beschichtung des Modells

von außen mit „Blut-ähnlichem“ Puffer versorgen. Eine weitere Anwendung des Lungenmodells ist die Untersuchung von Medikamenten bzw. Wirkstoffen zur Behandlung nicht-infektiöser Erkrankungen, wie z.B. Asthma, chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) und Lungenkrebs. Um das Ein- und Ausatmen realistisch darzustellen, sollte der Luftstrom nicht nur in eine Richtung wie bei dem aktuellen Modell, sondern abwechselnd hin- und zurückgerichtet werden. Allerdings kann die praktische Umsetzung dieser Weiterentwicklungen aufwendig und kompliziert sein.

Dieses Lungenmodell eignet sich auch für die Experimente mit den Pilzen statt Bakterien. So kann man in dem ersten Schritt das Lungenmodell mit *Saccharomyces cerevisiae* und den S1-Stämmen von *Aspergillus* und *Candida* spp. beschichten, um die antimykotischen Eigenschaften von Allicin zu untersuchen. Die Verwendung von (z.B. biolumineszierenden) Reporter-Stämmen ermöglicht zusätzlich die Untersuchung spezifischer zellulärer Reaktionen wie oxidativer Stress, Apoptose bei Bakterien bzw. Pilzen.

Allgemein eignet sich das Lungenmodell zum Einsatz bei der Abschätzung der effektiven notwendigen Konzentrationen bzw. Wirkstoffmengen und für erste Untersuchungen zu dem Wirkmechanismus einer Substanz, ohne Ansatz von den Tierversuchen.

4.10. Allicin als Medikament

Die antimikrobielle Wirkung des Knoblauchs ist zum größten Teil auf Allicin zurückzuführen. So verliert der Knoblauchextrakt seine antimikrobiellen Eigenschaften, wenn die Allicin-Biosynthese inhibiert wird, oder der Extrakt erhitzt und somit Allicin zerstört wird (Cañizares et al., 2004; Cavalito et al., 1945). In dieser Arbeit wurde das Potenzial des reinen (>95%) chemisch-synthetisierten Allicin in Hinsicht auf die Möglichkeit seiner Anwendung bei der Behandlung der Lungeninfektionen als Antibiotikum untersucht.

Der Chemiker Christopher Lipinski formulierte 1997 das sogenannte „*rule of five*“, das die Eigenschaften eines potenziell anwendbaren Arzneimittels in Bezug auf die insbesondere orale Bioverfügbarkeit beschreibt (Lipinski et al., 1997; Lipinski, 2004). Potenzieller Wirkstoff soll ein relativ kleines (bis zu 500 Da) lipophiles ($\log P < 5$) Molekül mit weniger als fünf Wasserstoff-Akzeptoren und weniger als zehn Wasserstoff-Donatoren sein (Tabelle 91). In Tronde et al. (2003) wurden 34 auf dem Markt verfügbare inhalative Arzneimittel (vor allem Corticosteroide und β -Blocker) analysiert. Allicin erfüllt die Kriterien von Lipinski's „*rule of five*“. Wenn man aber die Richtwerte für die inhalativ-angewendeten Präparate anschaut, fällt auf, dass das Allicin-Molekül eine relativ kleine molekulare Masse und wenig Wasserstoff-Donator- und Akzeptor-Gruppen besitzt. Diese Abweichungen bedeuten, dass Allicin möglicherweise nicht optimal vom Lungengewebe aufgenommen werden kann. Dies kann vorteilhaft bei der Behandlung der Lungeninfektionen mit Allicin sein, da dies die toxische Wirkung des Allicins auf das Lungengewebe minimieren kann (s. Kap. 4.7 Einfluss des Allicins auf tierische Zellen).

Tabelle 91. Allicin erfüllt die Lipinski's „rule of five“ für die Bioverfügbarkeit der potenziellen Arzneimittel (Lipinski et al., 1997).

	Lipinski's „rule of five“¹	Inhalative Medikamente² Median (0,1 – 0,9 Quantil)	Allicin
Molekulare Masse	<500 Da	340 (225-482)	162,28 Da
Polarität (logP-Wert)	logP<5	1,3 (-1,0-4,1)	1.28±0.57 ³
Wasserstoff-Akzeptoren	<5	5 (4-11)	1
Wasserstoff-Donatoren	<10	3 (2-6)	0

¹ Lipinski et al., 1997, ² Tronde et al., 2003, ³ Gruhlke et al., 2010

Das Problem bei der Entwicklung neuer Antibiotika ist nicht, die wirksamen Substanzen zu finden, sondern deren Bioverfügbarkeit bzw. die Unfähigkeit durch die bakterielle Zellwand und Membran in die Bakterien zu gelangen (Lewis, 2012). In diesem Zusammenhang bietet sich die gleichzeitige Applikation von Antibiotika mit Allicin an, da Allicin die Integrität der Membranen stört und die Ausbildung von Poren bzw. Löchern in der Membran fördert (Gruhlke et al., 2015). Andererseits ist es unbekannt, ob die Allicin-Behandlung das Passieren der bakteriellen Zellwand begünstigt.

Vorteil von Allicin als potenziellem Antibiotikum ist die geringere Wahrscheinlichkeit der Resistenzentwicklung von der Seite der Mikroorganismen im Vergleich zu konventionellen Antibiotika. Die Resistenzentwicklung bei Allicin ist sehr viel schwieriger und unwahrscheinlicher als bei konventionellen Antibiotika, da Allicin mehrere Wirkmechanismen mit mehreren molekularen Zielen besitzt. So beruht z.B. die Allicin-Resistenz von *PfAR-1* auf der Gruppe von zehn Genen, kodiert in drei genomischen Inseln, die durch den horizontalen Gentransfer ins Genom eingebracht wurden (Borlinghaus et al., 2019).

Großes Potenzial stellen die Allicin-Derivate dar (Abbildung 98). So wurden z. B. mehrere Allicin-Derivate auf deren mikrobielle Eigenschaften und Toxizität gegenüber tierischen Zellen von Leontiev et al. (2018) untersucht. Die Derivate sind Thiosulfinate, die sich in den Seitenketten und somit in deren Polarität und Volatilität unterscheiden. So ist z.B. Dimethyl-Thiosulfinat (DMTS) weniger toxisch gegenüber der Lungenepithel-Zelllinie A459 im Vergleich zu Allicin und gleichzeitig besitzt es eine stärkere antimikrobielle Wirkung über die Gasphase. Außerdem besitzt DMTS weitere praktische Vorteile: es ist thermisch stabil und sehr gut wasserlöslich im Gegensatz zu Allicin. Ein anderes Beispiel sind die „Allicin-inspirierten“ Pyridyl-Disulfide, die eine antimikrobielle Wirkung gegenüber den Methicillin-resistenten (MRSA) und MDR-Stämmen von *Staphylococcus aureus* und auch einen synergistischen Effekt mit Vancomycin besitzen (Sheppard & Long, 2016).

A. Dimethyl-Thiosulfinat (DMTS)

B. Pyridyl-Disulfide

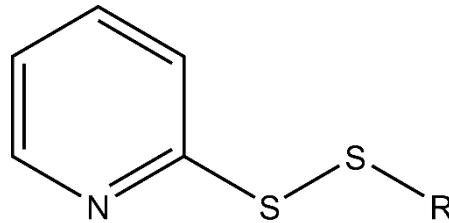
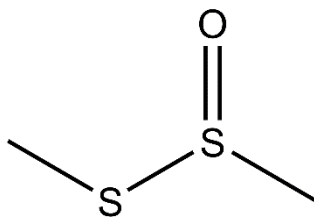


Abbildung 98. Antimikrobiell wirksame Allicin-Derivate Dimethyl-Thiosulfinat (A, Leontiev et al., 2018) und Pyridyl-Disulfide (B, Sheppard & Long, 2016).

Dadurch, dass die differenzielle Toxizität des Allicins für Bakterien und Lungenzellen gering ist, wird es schwierig die Erlaubnis für Tierversuche zumindest in Deutschland erteilt zu bekommen. Die Chancen, dass Allicin als potenzielles Arzneimittel in den präklinischen und klinischen Studien untersucht wird, stehen schlecht, da sie kostenintensiv sind und von der Industrie unterstützt werden müssen. Dies ist aber eher unwahrscheinlich, da Allicin als natürliche Substanz nicht als Wirkstoff patentiert bzw. lizenziert werden kann, damit seine wirtschaftliche Nutzung ausfällt. Dieses Problem kann man durch die Entwicklung von Allicin-Derivaten, die wiederum von den pharmazeutischen Unternehmen wirtschaftlich genutzt werden können, umgehen. Einen potenziellen Nutzen hat Allicin bei den nicht-Gewinn-orientierten und den staatlichen Gesundheitsorganisationen besonders in den ärmeren Entwicklungsländern. Mit den Mitteln wie Ethanol und Knoblauchsaff bzw. Allicin besteht die Möglichkeit auf sehr einfache und kostengünstige Behandlung von Lungeninfektionen. Allerdings sollten zunächst zusätzliche Studien zur Verträglichkeit durchgeführt werden.

4.11. Zusammenfassung und Fazit

Allicin oder Diallylthiosulfonat ist eine antimikrobiell wirksame Substanz, die bei der Verletzung des Knoblauch-Gewebes aus der Aminosäure Alliin mit dem Enzym Alliinase entsteht. Von der Pflanze wird Allisin als Phytoanticipin zum Schutz vor pathogenen Mikroorganismen und Schädlingen genutzt. Allisin zählt zu den Reaktiven Schwefel-Spezies (RSS) und oxidiert die zellulären Thiole, wie z.B. Cystein-Reste in Proteinen oder Glutathion (GSH). Durch diese Oxidation kann z.B. die enzymatische Aktivität beeinflusst bzw. Funktionalität inhibiert werden.

In Rahmen dieser Arbeit wurde das grundlegende Potenzial des Allicins zum Einsatz in der Medizin als Antibiotikum zur Behandlung der bakteriellen Lungeninfektionen untersucht.

Um den antimikrobiellen Wirkmechanismus des Allicins besser zu verstehen wurden die Oxidationsziele des Allicins mithilfe der differentiellen Isotopen-kodierten Markierungsmethode OxICAT im bakteriellen Proteom identifiziert. Es wurden zwei *Pseudomonas fluorescens* Stämme untersucht: der von einer Knoblauchzehe isolierte Allisin-resistente *PfAR-1*, und ein weniger resistenter *Pf0-1* als Referenz-Stamm. Zum Teil wurden die Oxidationsziele in *PfAR-1* in der vorhergehenden Arbeit untersucht. Diese Forschung wurde in dieser Arbeit schließlich abgeschlossen sowie um die Untersuchungen mit *Pf0-1* ergänzt. Die Bakterien wurden mit subletalen Allisin-Mengen von 0,5 mM behandelt und anschließend der Redox-Zustand der Proteome der beiden Bakterien-Stämme miteinander verglichen. Unter Kontroll-Bedingungen liegen die Proteine bei beiden Stämmen überwiegend im reduzierten Zustand vor. Die Cysteine von 77% der Proteine liegen zu max. 20% oxidiert vor. Nach Allisin-Behandlung erhöht sich der Anteil der oxidierten Proteine, und zwar in dem Allisin-anfälligen *Pf0-1* stärker als in dem Allisin-resistenten *PfAR-1*. Nur 54% der Proteine in *Pf0-1*, aber 66% der Proteine in *PfAR-1* bleiben zu weniger als 20% oxidiert. Anschließend wurden die spezifischen Oxidationsziele des Allicins identifiziert. Bei *Pf0-1* wurden 11 (Chaperon HscA, DNA-Gyrase Untereinheit A, Leucyl-tRNA-Synthetase, *Peptide chain release factor 1*, RNA-Methyltransferase TrmH, Zink-Aufnahme-Regulationsprotein, Hypothetisches DUF469-Domäne-haltiges Protein (HP 1791), Hypothetisches Protein - Pyrimidin/Purin-Nukleosid-Phosphorylase (HP 3952)) und bei *PfAR-1* acht Proteine (Biotin-Carboxylase der Acetyl-CoA-Carboxylase, Chaperon GroEL, Putative Ameisensäure-Dehydrogenase-Oxidoreduktase, Riboflavin-Synthase, Ribose-5-Phosphate-Isomerase A) nach Allisin-Behandlung stark oxidiert, von denen die Stämme drei gemeinsam haben (Glucose-1-Phosphat-Thymidyltransferase, Ketosäure-Reduktoisomerase, Phosphoglucosamin-Mutase).

Die Untereinheit A der DNA-Gyrase (GyrA) wurde als eine der spezifischen Oxidationsziele des Allicins bei dem Allisin-anfälligen *Pf0-1* aber nicht bei dem Allisin-resistenten *PfAR-1* identifiziert. Die DNA-Gyrase ist ein essenzielles bakterielles Enzym und somit ein etabliertes Ziel für Antibiotika. Allisin inhibiert die Aktivität der DNA-Gyrase aus *E. coli* in dem gleichen Konzentrationsbereich wie Nalidixinsäure bei *in vitro* Experimenten (0,5 mM Allisin, 0,75 mM Nalidixinsäure). Das aufgereinigte Enzym aus dem Allisin-resistenten *PfAR-1* und Allisin-anfälligen *Pf0-1* wurde in *in vitro* Versuchen bei ähnlichen Allisin-Konzentrationen inhibiert (1,0 mM bei *Pf0-1*, 1,5 mM bei *PfAR-1*). Zu den weiteren Untersuchungen wurden die Gyrase-Austauschmutanten *Pf0-1* und *PfAR-1* hergestellt und deren Allisin-Resistenz überprüft. Die Gyrase-Austauschmutanten von *Pf0-1* mit dem *gyrA*-Gen aus *PfAR-1* waren anfälliger gegenüber Allisin als der *Pf0-1*-Wildtyp. Dies bedeutet, dass GyrA aus

PfAR-1 keine erhöhte Allicin-Resistenz *per se* besitzt und nicht für *PfAR-1*'s Allicin-Resistenz verantwortlich ist. Die fehlende Oxidation des Enzyms in *PfAR-1* nach Allicin-Behandlung kann durch die *PfAR-1* spezifischen Schutzmechanismen gegen die Proteom-Oxidation durch Allicin *in vivo* erklärt werden.

In dem nächsten Abschnitt wurde die Wirksamkeit des Allicins gegenüber mehreren lungenpathogenen Bakterienstämmen gezeigt (*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus pyogenes*). Allicin ist wirksam gegenüber mehreren lungenpathogenen bakteriellen Stämmen, sowohl gegenüber MDR (engl. *multiple drug resistant*) - Stämmen der *S. pneumoniae* und dem Methicillin-resistenten Stamm von *S. aureus* (MRSA) als auch gegenüber klinischen Isolaten, die keine erhöhten Antibiotika-Resistenzen besitzen. Die minimale hemmende Konzentration (MHK) wurde unter standardisierten Bedingungen laut EUCAST bestimmt und liegt bei den meisten Bakterien bei 64 µg/ml bzw. 128 µg/ml. Im Vergleich zu konventionellen Antibiotika war die wirksame Allicin-Konzentration zwar deutlich höher, dafür inhibierte Allicin die pathogenen Stämme mit hoher Antibiotika-Resistenz mit der gleichen Effektivität wie Stämme ohne erhöhte Resistenzen.

Ferner wurden physiologische Folgen der Allicin-Behandlung auf die Bakterien untersucht. Zunächst wurde gezeigt, dass Allicin-Behandlung zu keiner differenzierten Inhibierung des bakteriellen (bei *P. fluorescens*, nicht pathogen) und pilzlichen (*C. albicans*, humanpathogen) Biofilms führt. Bei der Verwendung der Biofilm-Reporter-Stämme *Pseudomonas syringae* 4612 und *PfAR-1* wurde differenzierte Inhibition des Biofilms beobachtet. Dies geschah allerdings bei nahezu wachstumshemmenden Allicin-Konzentrationen. Bei der Untersuchung des synergistischen Effektes des Allicins mit konventionell verwendeten Antibiotika bei *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 und *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 wurde eine positive Wirkung mit Rifampicin gezeigt, indem die MHK und MBK des Rifampicins in Applikation zusammen mit Allicin gesenkt wurden. Mit den anderen untersuchten Antibiotika wurde teilweise eine Senkung der Effektivität der Antibiotika beobachtet. Vermutlich modifiziert Allicin die Antibiotika und verringert somit deren antimikrobielle Wirkung. Eine andere Möglichkeit wäre, dass bei der Anwesenheit von Allicin die bakteriellen Zellen in einen metabolisch-inaktiven Stress-Zustand versetzt werden und somit weniger anfällig gegenüber Antibiotika, die in den Stoffwechsel eingreifen, werden.

Die EK_{50} (halbmaximale effektive Konzentration) des Allicins für Lungenzellen in Zellkultur (*in vitro*) und für die Lungenschnitte der Ratte (*ex vivo*) liegen im gleichen Konzentrationsbereich wie MHK der Bakterien (<1 mM). Damit hat Allicin eine geringe differentielle Wirkung auf die Bakterien und Lungenzellen in *in vitro* Untersuchungen. *In vivo* ist das Lungengewebe sehr gut mit dem Blut, das den Redox-Puffer Glutathion (GSH) enthält, versorgt und somit vor oxidativem Stress geschützt. Die Zugabe von 1 mM GSH zu den Zellen in *in vitro* Experimenten verringerte die Anfälligkeit der Lungenzellen bei Allicin-Behandlung und erhöhte die EK_{50} bis auf das 3,8fache. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das differenzierte Abtöten der pathogenen Bakterien ohne Gewebeschädigung des Patienten *in vivo* möglich wäre. Dies kann allerdings nur *in vivo* durch Tierversuche überprüft werden.

Allicin als volatile Substanz zeigt auch über die Gasphase gegen lungenpathogene Bakterien (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* und *Haemophilus influenzae*) bei dem „invertierten“ Hemmhof-Test wachstumshemmende Wirkung. Dies gibt die Möglichkeit zur direkten Behandlung der infizierten Lunge durch das Einatmen des Allicins als Gas oder als Aerosols. Um die Allicin-Behandlung der infizierten Lungen zu simulieren wurde ein Lungen-Modell in Kooperation mit dem Aerodynamischen Institut der RWTH Aachen entwickelt. Das Lungenmodell stellt die menschliche Lunge von der 2. bis zu 5. Bronchien-Generation in Originalgröße dar. Die innere Fläche des Modells war mit 1 mm-dickem *E. coli*-haltigen Agar zur Simulation der bakteriellen Infektion beschichtet. Für die Behandlung wurde das Modell an die Anlaufstecke, die für den kontrollierten laminaren Lufteinstrom zuständig ist, angeschlossen und in einen 37°C-temperierten Inkubator-Schrank platziert. Das Aerosol wurde durch einen medizinisch-einsetzbaren Aerosolgenerator, der an die Anlaufstecke angeschlossen wurde, produziert. Die Vitalität der Bakterien im Agar nach der Behandlung wurde mit Hilfe von MTT-Lösung untersucht. Bei der Behandlung mit dem Allicin-Aerosol wurde eine konzentrationsabhängige Inhibition des bakteriellen Wachstums, und somit die Möglichkeit effektive Allicin-Konzentrationen zu erreichen, gezeigt. Ebenfalls inhibierte das in Ethanol gelöste Allicin das bakterielle Wachstum auch nur über die Gasphase.

Allicin- bzw. Knoblauch-Präparate haben keine realistischen Chancen in westlichen Ländern in der medizinischen Praxis eingeführt zu werden, da sie nicht patentiert und wirtschaftlich genutzt werden können. Dabei können die Allicin-Derivate eine attraktive Alternative zu Allicin für die pharmazeutischen Unternehmen darstellen. Nicht-gewinnorientierte Organisationen können besonders in ärmeren Entwicklungsländern auf kostengünstige und einfache Behandlung mit Allicin- bzw. Knoblauchsaft-Ethanol-Gemisch der Lungeninfektionen zugreifen. Allerdings müssen vorhergehende Verträglichkeitsuntersuchungen durchgeführt werden.

5. Literatur

- Abbruzzese, M. R., Delaha, E. C., Garagusi, V. F. (1987). Absence of antimycobacterial synergism between garlic extract and antituberculosis drugs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 8(2), 79-85, doi:10.1016/0732-8893(87)90153-2.
- Abubakar, E. M. M. (2009). Efficacy of crude extracts of garlic (*Allium sativum* Linn.) against nosocomial *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(4), 179-185.
- Adamou, J. E., Wizemann, T. M., Barren, P., Langermann, S. (1998). Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Infection and Immunity*, 66(2), 820-822.
- Agarwal, K. C. (1996). Therapeutic Actions of Garlic. *Medicinal Research Reviews*, 16(1), 111–124, doi: 10.1002/(SICI)1098-1128(199601)16:1<111::AID-MED4>3.0.CO;2-5.
- Albrecht, F., Leontiev, R., Jacob, C., Slusarenko, A. J. (2017). An Optimized Facile Procedure to Synthesize and Purify Allicin. *Molecules*, 22(5), 770, doi:10.3390/molecules22050770.
- Albrecht, F. (2018). Charakterisierung des Redoxproteoms von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) nach Allicin-induziertem oxidativem Stress. Ph.D. Thesis, RWTH Aachen University, doi:10.18154/RWTH-2019-00817.
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565-1574, doi:10.1021/bi5000564.
- Andes, D., Craig, W. A. (2002). Pharmacodynamics of the new fluoroquinolone gatifloxacin in murine thigh and lung infection models. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1665-1670, doi:10.1128/AAC.46.6.1665-1670.2002.
- Ankri, S., Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*, 1(2), 125–129, doi:10.1016/S1286-4579(99)80003-3.
- Ang, C. W., Jarrad, A. M., Cooper, M. A., Blaskovich, M. A. (2017). Nitroimidazoles: molecular fireworks that combat a broad spectrum of infectious diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(18), 7636-7657, doi:10.1021/acs.jmedchem.7b00143.
- Apidianakis, Y., Rahme, L. G. (2009). *Drosophila melanogaster* as a model host for studying *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Nature Protocols*, 4(9), 1285-1294, doi:10.1038/nprot.2009.124.
- Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., Shirtliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445-459, doi:10.4161/viru.2.5.17724.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, New York.

- Bae, S. W., Lee, K. W., Park, J. H., Lee, J., Jung, C. R., Yu, J., Kim, H. Y., Kim, D. H. (2018). 3D bioprinted artificial trachea with epithelial cells and chondrogenic-differentiated bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1624, doi: 10.3390/ijms19061624.
- Bakaletz, L. O., Tallan, B. M., Hoepf, T., DeMaria, T. F., Birck, H. G., Lim, D. J. (1988). Frequency of fimbriation of nontypable *Haemophilus influenzae* and its ability to adhere to chinchilla and human respiratory epithelium. *Infection and Immunity*, 56(2), 331-335.
- Baquero, F., Martínez, J. L., Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260-265, doi:10.1016/j.copbio.2008.05.006.
- Beck-Broichsitter, M., Gauss, J., Packhaeuser, C. B., Lahnstein, K., Schmeh, T., Seeger, W., Kissel, T., Gessler, T. (2009). Pulmonary drug delivery with aerosolizable nanoparticles in an *ex vivo* lung model. *International Journal of Pharmaceutics*, 367(1), 169-178, doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.09.017.
- Benbrook, D. M., Miller, R. V. (1986). Effects of norfloxacin on DNA metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29(1), 1-6, doi:10.1128/AAC.29.1.1.
- Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Science and Technology*, 37(2), 263-268, doi:10.1016/j.lwt.2003.09.001.
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M. N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 310, doi:10.1038/nrmicro3439.
- Bericht der Kommission an den Rat und das europäische Parlament (2013). Siebenter Bericht über die statistischen Angaben zur Anzahl der in den Mitgliedstaaten der Europäischen Union für Versuchs- und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. EUR-Lex, Version COM/2013/0859 final www.eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX%3A52013DC0859, letzter Zugriff am 13.10.2019.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62(3), 293.
- Bimboim, H. C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513-1523, doi:10.1093/nar/7.6.1513.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Rasmussen, T. B., Christophersen, L., Calum, H., Hentzer, M., Hougen, H.-P., Rygaard, J., Moser, C., Eberl, L., Høiby, N., Michael Givskov, M. (2005). Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*, 151(12), 3873-3880, doi:10.1099/mic.0.27955-0.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42, doi:10.1038/nrmicro3380.

- Block, E. (ed.) (2010). *Garlic and the Other Alliums. The Lore and the Science*, RSC Publishing, Cambridge.
- Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M. C., Nwachukwu, I. D., Slusarenko, A. J. (2014). Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules*, 19(8), 12591-12618, doi: 10.3390/molecules190812591.
- Borlinghaus, J. (2019). Molecular basis of allicin resistance in *Pseudomonas fluorescens* Allicin Resistant-1. Ph.D. Thesis, RWTH Aachen University, doi:10.18154/RWTH-2019-05466.
- Borlinghaus, J., Bolger, A., Schier, C., Vogel, A., Gruhlke, M. C., Slusarenko, A. J. (2019). Plant-microbe co-evolution: allicin resistance in a *Pseudomonas fluorescens* strain (PfAR-1) isolated from garlic. *bioRxiv*, 769265, doi: 10.1101/769265.
- Bosch, A. A., Biesbroek, G., Trzcinski, K., Sanders, E. A., Bogaert, D. (2013). Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathogens*, 9(1), e1003057, doi:10.1371/journal.ppat.1003057.
- Boyer, H. W., Roulland-dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 41(3), 459-472, doi:10.1016/0022-2836(69)90288-5.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254, doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Brötz-Oesterhelt, H., Brunner, N. A. (2008). How many modes of action should an antibiotic have? *Current Opinion in Pharmacology*, 8(5), 564-573, doi:10.1016/j.coph.2008.06.008.
- Brown, V. I., Lowbury, E. J. L. (1965). Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Pathology*, 18(6), 752-756, doi:10.1136/jcp.18.6.752.
- Brown-Elliott, B. A., Nash, K. A., Wallace, R. J. (2012). Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 545-582, doi:10.1128/CMR.05030-11.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (2018). Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2017, http://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/_texte/TierschutzTierforschung.html, letzter Zugriff am 29.08.2019.
- BéruBé, K., Prytherch, Z., Job, C., Hughes, T. (2010). Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models. *Toxicology*, 278(3), 311-318, doi:10.1016/j.tox.2010.04.004.
- Cady, N. C., McKean, K. A., Behnke, J., Kubec, R., Mosier, A. P., Kasper, S. H., Burz, D. S., Musah, R. A. (2012). Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. *PLoS One*, 7(6), e38492, doi:10.1371/journal.pone.0038492.

- 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*. The Journal of Antibiotics, 60(5), 335, doi:10.1038/ja.2007.45.
- Campagnari, A. A., Gupta, M. R., Dudas, K. C., Murphy, T. F., Apicella, M. A. (1987). Antigenic diversity of lipooligosaccharides of nontypable *Haemophilus influenzae*. Infection and Immunity, 55(4), 882-887.
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., Righetti, P. G. (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis, 25(9), 1327-1333, doi:10.1002/elps.200305844.
- Cañizares, P., Gracia, I., Gómez, L. A., García, A., de Argila, C. M., Boixeda, D., de Rafael, L. (2004). Thermal degradation of allicin in garlic extracts and its implication on the inhibition of the *in-vitro* growth of *Helicobacter pylori*. Biotechnology Progress, 20(1), 32-37, doi:10.1021/bp034135v.
- Cavallito, C.J.; Bailey, H.J. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum* I. Isolation, physical properties and antibacterial action. Journal of the American Chemical Society, 66, 1950–1951, doi:10.1021/ja01239a048.
- Cavallito, C. J., Bailey, J. H., Buck, J. S. (1945). The antibacterial principle of *Allium sativum*. III. Its precursor and “essential oil of garlic”. Journal of the American Chemical Society, 67(6), 1032-1033, doi:10.1021/ja01222a501.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D., Farrand, S. K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. Molecular Plant-Microbe Interactions, 11(11), 1119-1129, doi:10.1094/MPMI.1998.11.11.1119.
- Chojnacki, S., Cowley, A., Lee, J., Foix, A., Lopez, R. (2017). Programmatic access to bioinformatics tools from EMBL-EBI update: 2017. Nucleic Acids Research, 45(W1), W550-W553, doi:10.1093/nar/gkx273.
- Chua, S. L., Liu, Y., Yam, J. K. H., Chen, Y., Vejborg, R. M., Tan, B. G. C., Kjelleberg, S., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Yang, L. (2014). Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. Nature Communications, 5, 4462, doi:10.1038/ncomms5462.
- Coates, A., Hu, Y., Bax, R., Page, C. (2002). The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. Nature Reviews Drug Discovery, 1(11), 895, doi:10.1038/nrd940.
- Cockayne, O. (1864 –1866). Leechdoms, wortcunning and starcraft: being a collection of documents, for the most part never before printed, illustrating the history of science before the Norman conquest. Rolls series 35th, 3 Vols. Longman, Green, Longman, Roberts, and Green, London (UK).
- Cohn, F. (1872). Untersuchungen über Bakterien. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1, 127-224.

- Coleman, H. N., Daines, D. A., Jarisch, J., Smith, A. L. (2003). Chemically defined media for growth of *Haemophilus influenzae* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4408-4410, doi:10.1128/JCM.41.9.4408-4410.2003.
- Collin, F., Karkare, S., Maxwell, A. (2011). Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(3), 479-497, doi:10.1007/s00253-011-3557-z.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951-4959, doi:10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005.
- Compeau, G., Al-Achi, B.J., Platsouka, E., Levy, S.B. (1988). Survival of rifampin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 2432-2438.
- Cox, J., Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized ppb-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26(12), 1367, doi:10.1038/nbt.1511.
- Crane, M. J., Lee, K. M., FitzGerald, E. S., Jamieson, A. M. (2018). Surviving deadly lung infections: innate host tolerance mechanisms in the pulmonary system. *Frontiers in Immunology*, 9, 1421, doi:10.3389/fimmu.2018.01421.
- Croucher, N. J., Harris, S. R., Fraser, C., Quail, M. A., Burton, J., van der Linden, M., McGee, L., von Gottberg, A., Song, J. H., Ko, K. S., Pichon, B., Baker, S., Parry, C. M., Lambertsen, L. M., Shahinas, D., Pillai, D. R., Mitchell, T. J., Dougan, G., Tomasz, A., Klugman, K. P., Parkhill, J., William P. Hanage, W. P., Stephen D. Bentley, S. D. (2011). Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science*, 331(6016), 430-434, doi:10.1126/science.1198545.
- Cunha, B. A. (2001). Antibiotic side effects. *Medical Clinics of North America*, 85(1), 149-185, doi:10.1016/S0025-7125(05)70309-6.
- Curtis, H., Noll, U., Störmann, J., Slusarenko, A. J. (2004). Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(2), 79-89, doi:10.1016/j.pmpp.2004.11.006.
- Davies, J., Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433, doi:10.1128/MMBR.00016-10.
- de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., Hancock, R. E. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 16(5), 580-589, doi:10.1016/j.mib.2013.06.013.

- Deutscher Tierschutzbund e.V. (2019). Statistiken zu Versuchstieren, korrigierte Version vom 14.05.2019, <https://www.tierschutzbund.de/news-storage/tierversuche/040219-versuchstierzahlen-nach-bundeslaendern/>, letzter Zugriff am 28.08.2019.
- Dini, C., Fabbri, A., Geraci, A. (2011). The potential role of garlic (*Allium sativum*) against the multi-drug resistant tuberculosis pandemic: a review. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 47, 465-473, doi:10.4415/Ann_11_04_18.
- Donelli, G. (ed.). (2014). Biofilm-based healthcare-associated infections (Vol. 2). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 831, Springer, Cham Heidelberg New York Dordrecht London, doi:10.1007/978-3-319-09782-4.
- Dörner, P., Müller, P. M., Reiter, J., Gruhlke, M. C., Slusarenko, A. J., Schröder, W., & Klaas, M. (2019). Feasibility of a surface-coated lung model for the quantification of active agent deposition for preclinical studies. *bioRxiv*, 639245, doi:10.1101/639245.
- Drawz, S. M., Bonomo, R. A. (2010). Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 160-201, doi:10.1128/CMR.00037-09.
- Figurski, D. H., Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1648-1652, doi:10.1073/pnas.76.4.1648.
- Fillingham, A. J., Wood, J., Bevan, J. R., Crute, I. R., Mansfield, J. W., Taylor, J. D., Vivian, A. (1992). Avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pathovars *phaseolicola* and *pisi* confer specificity towards both host and non-host species. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 40(1), 1-15, doi:10.1016/0885-5765(92)90066-5.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10(3), 226.
- Floss, H. G., Yu, T. W. (2005). Rifamycin mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chemical Reviews*, 105(2), 621-632, doi:10.1021/cr030112j.
- Fogh, J., Trempe, G. (eds.) (1975). New human tumor cell lines. *Human Tumor Cells in vitro*, Springer, Boston (USA), 115-159, doi:10.1007/978-1-4757-1647-4_5.
- Fuchs, A. L., Weaver Jr, A. J., Tripet, B. P., Ammons, M. C. B., Teintze, M., Copié, V. (2018). Characterization of the antibacterial activity of Bald's eyesalve against drug resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One*, 13(11), e0208108, doi:10.1371/journal.pone.0208108.
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 34-40, doi:10.1016/j.tim.2004.11.010.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., Nash, H. A. (1976). DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 73(11), 3872-3876, doi:10.1073/pnas.73.11.3872.

- George, A. M., Jones, P. M., Middleton, P. G. (2009). Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. *FEMS Microbiology Letters*, 300(2), 153-164, doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01704.x.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., Parks, W. P. (1973). *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1417-1423, doi:10.1093/jnci/51.5.1417.
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison III, C. A., Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343, doi: 10.1038/nmeth.1318.
- Gibson, D. G. (2011). Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Methods in Enzymology*, 498, 349-361, Academic Press, London, Oxford, Boston, New York, San Diego, doi:10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2.
- Gilbert, P., McBain, A. J. (2001). Biofilms: their impact on health and their recalcitrance toward biocides. *American Journal of Infection Control*, 29(4), 252-255, doi:10.1067/mic.2001.115673.
- Giles, G. I., Tasker, K. M., Jacob, C. (2001). Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(10), 1279-1283, doi:10.1016/S0891-5849(01)00710-9.
- Gillum, A. M., Tsay, E. Y., Kirsch, D. R. (1984). Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae ura3* and *E. coli pyrF* mutations. *Molecular and General Genetics MGG*, 198(1), 179-182, doi:10.1007/BF00328721.
- Good, L., Nazar, R. N. (1997). Plasmid mini-preparations from culture streaks. *BioTechniques*, 22(3), 404-406, doi:10.2144/97223bm04.
- Gruhlke, M. C., Portz, D., Stitz, M., Anwar, A., Schneider, T., Jacob, C., Schlaich, N. L., Slusarenko, A. J. (2010). Allicin disrupts the cell's electrochemical potential and induces apoptosis in yeast. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(12), 1916-1924, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.019.
- Gruhlke, M. C., Hemmis, B., Noll, U., Wagner, R., Lühring, H., Slusarenko, A. J. (2015). The defense substance allicin from garlic permeabilizes membranes of *Beta vulgaris*, *Rhoeo discolor*, *Chara corallina* and artificial lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(4), 602-611, doi:10.1016/j.bbagen.2014.11.020.
- Gruhlke, M. C., Antelmann, H., Bernhardt, J., Kloubert, V., Rink, L., Slusarenko, A. J. (2019). The human allicin-proteome: S-thioallylation of proteins by the garlic defence substance allicin and its biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*, 131, doi:144-153, 10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.022.
- Guerra-Santos, L., Käppeli, O., Fiechter, A. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(2), 301-305.

- Gupta, K. C., Viswanathan, R. (1955). Combined Action of Streptomycin and Chloramphenicol with Plant Antibiotics against Tubercle Bacilli. Part I: Streptomycin and Chloramphenicol with Cepharanthine. Part II: Streptomycin and Allicin. *Antibiotics & Chemotherapy*, 5(1), 24-7.
- Haas, D., Holloway, B. W. (1976). R factor variants with enhanced sex factor activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular and General Genetics MGG*, 144(3), 243-251, doi:10.1007/BF00341722.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Vol. 5, Oxford University Press, Oxford (UK), doi:10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557–580, doi:10.1016/S0022-2836(83)80284-8.
- Hanahan, D., Jessee, J., Bloom, F. R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology*, 204, 63–114, doi:10.1016/0076-6879(91)04006-a.
- Heide, L. (2014). New aminocoumarin antibiotics as gyrase inhibitors. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(1), 31-36, doi:10.1016/j.ijmm.2013.08.013.
- Högberg, L. D., Heddini, A., Cars, O. (2010). The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(11), 509-515, doi:/10.1016/j.tips.2010.08.002.
- Højby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322-332, doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
- Holloway, B. W. (1955). Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 13(3), 572-581, doi:10.1099/00221287-13-3-572.
- Howell, C. R., Stipanovic, R. D. (1979). Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*, 69(5), 480-482.
- Hübbers, A. M. (2016). DNA-Gyrase als ein „Target“ von Allicin. Bachelor Thesis, RWTH Aachen University.
- Ilic, D., Nikolic, V., Nikolic, L., Stankovic, M., Stanojevic, L., Cakic, M. (2011). Allicin and related compounds: Biosynthesis, synthesis and pharmacological activity. *Facta universitatis - Series: Physics, Chemistry and Technology*, 9(1), 9–20, doi:10.2298/FUPCT1101009I.
- Iwalokun, B. A., Ogunledun, A., Ogbolu, D. O., Bamiro, S. B., Jimi-Omojola, J. (2004). *In vitro* antimicrobial properties of aqueous garlic extract against multidrug-resistant bacteria and *Candida species* from Nigeria. *Journal of Medicinal Food*, 7(3), 327-333, doi:10.1089/jmf.2004.7.327.
- Johnston, J. W. (2010). Laboratory growth and maintenance of *Haemophilus influenzae*. *Current Protocols in Microbiology*, 18(1), 6D-1, doi:10.1002/9780471729259.mc06d01s18.

- Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33, 300-5, doi:10.4103/joacp.JOACP_349_15.
- Kardos, N., Demain, A. L. (2011). Penicillin: the medicine with the greatest impact on therapeutic outcomes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(4), 677, doi:10.1007/s00253-011-3587-6.
- Karunakaran, R., Mauchline, T. H., Hosie, A. H., Poole, P. S. (2005). A family of promoter probe vectors incorporating autofluorescent and chromogenic reporter proteins for studying gene expression in Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 151(10), 3249-3256, doi:10.1099/mic.0.28311-0.
- Kaur, S., Singh, S. (2013). Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*, 52(1), 2-9, doi:10.3109/13693786.2013.819592.
- Kayser, F. H., Böttger, E. C., Haller, O., Deplazes, P., Roers, A. (Eds.) (2014). *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 13, ISBN: 9783134448139.
- Ketron, A. C., Aldred, K. J., Lindsey, R. H., Osheroff, N., 2014. Gyrase and topoisomerase IV as targets for antibacterial drugs. *Molecular Life Sciences: An Encyclopedic Reference*, Springer Science+Business Media, New York (USA), 1-5, doi:10.1007/978-1-4614-6436-5_146-3.
- King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Translational Research*, 44(2), 301-307.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8(6), 423, doi: 10.1038/nrmicro2333.
- Kuhn, R. J. (2001). Formulation of aerosolized therapeutics. *Chest*, 120(3), 94S-98S, doi:10.1378/chest.120.3_suppl.94S.
- Kyte, J., Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132, doi:10.1016/0022-2836(82)90515-0.
- LaFleur, M. D., Kumamoto, C. A., Lewis, K. (2006). *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), 3839-3846, doi:10.1128/AAC.00684-06.
- Laws, M., Shaaban, A., Rahman, K. M. (2019). Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(5), 490-516, doi:10.1093/femsre/fuz014.
- Lawson, L. D., Wang, Z. J. (2001). Low allicin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of alliinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2592-2599, doi:10.1021/jf001287m.
- Leichert, L. I., Gehrke, F., Gudiseva, H. V., Blackwell, T., Ilbert, M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C., Jakob, U. (2008). Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative

stress *in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(24), 8197-8202, doi:10.1073/pnas.0707723105.

Leontiev, R., Hohaus, N., Jacob, C., Gruhlke, M. C., Slusarenko, A. J. (2018). A comparison of the antibacterial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of allicin. Scientific Reports, 8(1), 6763, doi:10.1038/s41598-018-25154-9.

Levy, S. B. (1982). Microbial resistance to antibiotics. An evolving and persistent problem. Lancet, 2, 83-88.

Lewis, K. (2012). Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery. Nature, 485(7399), 439, doi:10.1038/485439a.

Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. Nature Reviews Drug Discovery, 12(5), 371, doi:10.1038/nrd3975.

Lin, K., Simossis, V. A., Taylor, W. R., Heringa, J. (2004). A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. Bioinformatics, 21(2), 152-159, doi:10.1093/bioinformatics/bth487.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L., Pier, G. B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. Clinical Microbiology Reviews, 15(2), 194-222, doi: 10.1128/CMR.15.2.194-222.2002.

Madeira, F., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A. R. N., Potter, S. C., Finn, R. D., Lopez, R. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. Nucleic acids research, 47(W1), W636-W641, doi:10.1093/nar/gkz268.

Mann, E. E., Wozniak, D. J. (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. FEMS Microbiology Reviews, 36(4), 893-916, doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00322.x.

Manzetti, S., Ghisi, R. (2014). The environmental release and fate of antibiotics. Marine Pollution Bulletin, 79(1-2), 7-15, doi:10.1016/j.marpolbul.2014.01.005.

Marchler-Bauer, A., Bo, Y., Han, L., He, J., Lanczycki, C.J., Lu, S., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, Z.W., Zhang, D., Zheng, C., Geer, L.Y., Bryant, S.H. (2016). CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. Nucleic Acids Research, 45(D1), D200-D203, doi:10.1093/nar/gkw1129.

Marshall, B. M., Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. Clinical Microbiology Reviews, 24(4), 718-733, doi:10.1128/CMR.00002-11.

Martinez, J. L. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. Environmental Pollution, 157(11), 2893-2902, doi:10.1016/j.envpol.2009.05.051.

Martínez-García, E., de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. Environmental Microbiology, 13(10), 2702-2716, doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x.

- Matsumoto, I., Seno, N., Golovtchenko-Matsumoto, A. M., Osawa, T. (1980). Amination and Subsequent Derivatization of Epoxy-Activated: Agarose for the Preparation of New Affinity Adsorbents. *The Journal of Biochemistry*, 87(2), 535-540, doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132775.
- McCormick, M. H., Stark, W. M., Pittenger, G. E., Pittenger, R. C., McGuire, J. M. (1956). *Antibiotics Annual, 1955–1956*. Medical Encyclopedia Inc., New York (USA), p. 606.
- McCullers, J. A. (2014). The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung. *Nature Reviews Microbiology*, 12(4), 252, doi:10.1038/nrmicro3231.
- Meyer, J. A., Abdallah, M. A. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology*, 107(2), 319-328, doi:10.1099/00221287-107-2-319.
- Miller, E. M., Nickoloff, J. A. (1995). *Escherichia coli* electrotransformation. *Electroporation Protocols for Microorganisms, Methods in Molecular Biology™*, Humana Press, 47, 105-113, doi: 10.1385/0-89603-310-4:105.
- Milyutina, I. A., Bobrova, V. K., Matveeva, E. V., Schaad, N. W., Troitsky, A. V. (2004) Intragenomic Heterogeneity of the 16S rRNA–23S rRNA Internal Transcribed Spacer among *Pseudomonas Syringae* and *Pseudomonas Fluorescens* Strains. *FEMS Microbiology Letters*, 239(1), 17–23, doi:10.1016/j.femsle.2004.08.010.
- Mims, C., Dockrell, H. M., Goering, R. V., Roitt, I., Wakelin, D., Zuckerman, M. (2006). *Medizinische Mikrobiologie - Infektiologie: mit Virologie, Immunologie*. Elsevier, München Jena, 2. Auflage.
- Minchin, W.D. (1927). *A Study in Tubercule Virus Polymorphism, and the Treatment of Tuberculosis and Lupus with Oleum Allii*. Bailliere, Tindall and Cox, London (UK).
- Miron, T., Rabinkov, A., Mirelman, D., Wilchek, M., Weiner, L. (2000). The mode of action of allicin: Its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1463, 20–30, doi:10.1016/S0005-2736(99)00174-1.
- Mitchell, A. L., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S.D., Chang, H.-Y., El-Gebali, S., Fraser, M. I., Gough, J., Haft, D. R., Huang, H., Letunic, I., Lopez, R., Luciani, A., Madeira, F., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Natale, D. A., Necci, M., Nuka, G., Orengo, C., Pandurangan, A. P., Paysan-Lafosse, T., Pesseat, S., Potter, S., Qureshi, M. A., Rawlings, N. D., Redaschi, N., Richardson, L. J., Rivoire, C., Salazar, G. A., Sangrador-Vegas, A., Sigrist, C. J. A., Sillitoe, I., Sutton, G. G., Thanki, N., Thomas, P. D., Tosatto, S. C. E., Yong, S.-Y., Finn, R.D. (2019). InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D351-D360, doi:10.1093/nar/gky1100.
- Mitscher, L. A. (2005). Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. *Chemical Reviews*, 105, 559–592, doi:10.1021/cr030101q.

- Mizgerd, J. P. (2012). Respiratory infection and the impact of pulmonary immunity on lung health and disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(9), 824-829, doi:10.1164/rccm.201206-1063PP.
- Moreau-Marquis, S., Redelman, C. V., Stanton, B. A., Anderson, G. G. (2010). Co-culture models of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on live human airway cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (44), e2186, doi: 10.3791/2186.
- Morgan, D. J., Okeke, I. N., Laxminarayan, R., Perencevich, E. N., Weisenberg, S. (2011). Non-prescription antimicrobial use worldwide: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(9), 692-701, doi:10.1016/S1473-3099(11)70054-8.
- Moscoso, M., García, E., López, R. (2006). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *Journal of Bacteriology*, 188(22), 7785-7795, doi:10.1128/JB.00673-06.
- Müller, A., Eller, J., Albrecht, F., Prochnow, P., Kuhlmann, K., Bandow, J.E., Slusarenko, A.J., Leichert, L. I. O. (2016). Allicin induces thiol stress in bacteria through S-allylmercapto modification of protein cysteines. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 11477–11490, doi:10.1074/jbc.M115.702308.
- Müller, P. (2016). Aufbau eines Prüfstandes zur Untersuchung, des Depositionsverhaltens eines Wirkstoffaerosols in einem statischen Lungenmodell. Bachelor Thesis, RWTH Aachen University.
- Musher, D. M., Thorner, A. R. (2014). Community-acquired pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 371(17), 1619-1628, doi:10.1056/NEJMr1312885.
- Muto, C. A., Jernigan, J. A., Ostrowsky, B. E., Richet, H. M., Jarvis, W. R., Boyce, J. M., Farr, B. M. (2003). SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 24(5), 362-386, doi:10.1086/502213.
- Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D. (2007). Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1225-1234, doi:10.1007/s00216-006-1035-8.
- Nizet, V., Colina, K. F., Almquist, J. R., Rubens, C. E., Smith, A. L. (1996). A virulent nonencapsulated *Haemophilus influenzae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 173(1), 180-186, doi:10.1093/infdis/173.1.180.
- Norrande, J., Kempe, T., & Messing, J. (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*, 26(1), 101-106, doi:10.1016/0378-1119(83)90040-9.
- Norrby, S. R., Nord, C. E., Finch, R. (2005). Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(2), 115-119, doi:10.1016/S1473-3099(05)01283-1.

- O'Toole, G. A., Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449-461, doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79, doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49.
- Oram, M., Travers, A. A., Howells, A. J., Maxwell, A., Pato, M. L. (2006). Dissection of the bacteriophage Mu strong gyrase site (SGS): significance of the SGS right arm in Mu biology and DNA gyrase mechanism. *Journal of Bacteriology*, 188(2), 619-632, doi:10.1128/JB.188.2.619-632.2006.
- Pelaez, F. (2006). The historical delivery of antibiotics from microbial natural products—can history repeat? *Biochemical Pharmacology*, 71(7), 981-990, doi:10.1016/j.bcp.2005.10.010.
- Parsek, M. R., Singh, P. K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 677-701, doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090720.
- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., Greenberg, E. P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 197-201, doi:10.1073/pnas.91.1.197.
- Peleg, A. Y., Hogan, D. A., Mylonakis, E. (2010). Medically important bacterial–fungal interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 340, doi:10.1038/nrmicro2313.
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(3), 297-308, doi:10.1586/eri.13.12.
- Postma, D. F., Van Werkhoven, C. H., Van Elden, L. J., Thijsen, S. F., Hoepelman, A. I., Kluytmans, J. A., Boersma, W. G., Compaijen, C. J., van der Wall, E., Prins, J. M., Oosterheert, J. J., Bonten, M. J. M. (2015). Antibiotic treatment strategies for community-acquired pneumonia in adults. *New England Journal of Medicine*, 372(14), 1312-1323, doi:10.1056/NEJMoa1406330.
- Powers, J. H. (2004). Antimicrobial drug development—the past, the present, and the future. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 23-31, doi:10.1111/j.1465-0691.2004.1007.x.
- Prell, J., Boesten, B., Poole, P., Priefer, U. B. (2002). The *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39 gamma-aminobutyrate (GABA) aminotransferase gene (*gabT*) is induced by GABA and highly expressed in bacteroids. *Microbiology*, 148, 615–623, doi:10.1099/00221287-148-2-615.
- Qi, Y., Pei, J., Grishin, N. V. (2002). C-terminal domain of gyrase A is predicted to have a β -propeller structure. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 47(3), 258-264, doi:10.1002/prot.10090.
- Quon, B. S., Goss, C. H., Ramsey, B. W. (2014). Inhaled antibiotics for lower airway infections. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(3), 425-434, doi:10.1513/AnnalsATS.201311-395FR.

- Rabinkov, A., Miron, T., Konstantinovski, L., Wilchek, M., Mirelman, D., Weiner, L. (1998). The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1379(2), 233–44, doi:10.1016/S0304-4165(97)00104-9.
- Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., Glozman, S., Yavin, E., Weiner, L. (2000). S-Allylmercaptogluthathione: the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1499(1-2), 144-153, doi:10.1016/S0167-4889(00)00119-1.
- Radyowijati, A., Haak, H. (2003). Improving antibiotic use in low-income countries: an overview of evidence on determinants. *Social Science & Medicine*, 57(4), 733-744, doi:10.1016/S0277-9536(02)00422-7.
- Reddel, R. R., Ke, Y., Gerwin, B. I., McMenamin, M. G., Lechner, J. F., Su, R. T., Brash, D. E., Park, J.-B., Rhim, J. S., Harris, C. C. (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Research*, 48(7), 1904-1909.
- Reece, R. J., Maxwell, A. (1991). DNA gyrase: structure and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26(3-4), 335-375, doi:10.3109/10409239109114072.
- Reiter, J. (2014). Proteomanalyse des allicin-resistenten *Pseudomonas fluorescens* Stamm/Isolat PfAR-1. Master Thesis, RWTH Aachen University
- Reiter, J., Levina, N., van der Linden, M., Gruhlke, M., Martin, C., Slusarenko, A. (2017). Diallylthiosulfinate (allicin), a volatile antimicrobial from garlic (*Allium sativum*), kills human lung pathogenic bacteria, including MDR strains, as a vapor. *Molecules*, 22(10), 1711, doi:10.3390/molecules22101711.
- Reiter, J., Hübbers, A. M., Albrecht, F., Leichert, L. I. O., Slusarenko, A. J. (2019). Allicin, a natural antimicrobial defence substance from garlic, inhibits DNA gyrase activity in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 151359, doi:10.1016/j.ijmm.2019.151359.
- Reiter, J., Borlinghaus, J., Dörner, P., Schröder, W., Gruhlke, M. C. H., Klaas, M., Slusarenko, A. J. (2020). Investigation of the deposition behaviour and antibacterial effectivity of allicin aerosols and vapour using a lung model. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19, 1541-1549, doi:10.3892/etm.2019.8387.
- Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates (2010). RICHTLINIE 2010/63/EU DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. EUR-Lex, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?qid=1567174334189&uri=CELEX:32010L0063>, letzter Zugriff am 13.10.2019.

- Rieg, A. D., Rossaint, R., Uhlig, S., Martin, C. (2011). Cardiovascular agents affect the tone of pulmonary arteries and veins in precision-cut lung slices. *PloS One*, 6(12), e29698, doi:10.1371/journal.pone.0029698.
- Robicsek, A., Jacoby, G. A., Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 6(10), 629-640, doi:10.1016/S1473-3099(06)70599-0.
- Russell, W. M. S., Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique* (Vol. 238). Methuen, London.
- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., Prince, A. S. (2005). Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(11), 1209-1223, doi:10.1164/rccm.200408-1044SO.
- Samiec, P. S., Drews-Botsch, C., Flagg, E. W., Kurtz, J. C., Sternberg Jr., P., Reed, R. L., Jones, D. P. (1998). Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(5), 699-704, doi:10.1016/S0891-5849(97)00286-4.
- Schatz, A., Waksman, S. A. (1944). Effect of Streptomycin and Other Antibiotic Substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and Related Organisms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 57(2), 244-248, doi:10.3181/00379727-57-14769.
- Schneider, P., Hawser, S., Islam, K. (2003). Iclaprim, a novel diaminopyrimidine with potent activity on trimethoprim sensitive and resistant bacteria. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13(23), 4217-4221, doi:10.1016/j.bmcl.2003.07.023.
- Seeger, W., Walmrath, D., Grimminger, F., Rosseau, S., Schotte, H., Krämer, H.-J., Ermert, L., Kiss, L. (1994). [57] Adult respiratory distress syndrome: Model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods in Enzymology*, 233, 549-584, doi:10.1016/S0076-6879(94)33060-3
- Sheppard, J. G., Long, T. E. (2016). Allicin-inspired thiolated fluoroquinolones as antibacterials against ESKAPE pathogens. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(22), 5545-5549, doi:10.1016/j.bmcl.2016.10.002.
- Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 71-109, doi:10.1128/CMR.00030-10.
- Silver, L. L. (2017). Fosfomycin: mechanism and resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(2), a025262, doi:10.1101/cshperspect.a025262.
- Simossis, V. A., Heringa, J. (2005). PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Research*, 33(suppl_2), W289-W294, doi:10.1093/nar/gki390.
- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3(3), 155-160, doi:10.1054/drup.2000.0146.

- Slusarenko, A. J., Patel, A., Portz, D. (2008). Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. In: *Sustainable Disease Management in a European Context*. Springer, Dordrecht, pp. 313-322, doi:10.1007/978-1-4020-8780-6_10.
- Smyth, A. R., Cifelli, P. M., Otori, C. A., Righetti, K., Lewis, S., Erskine, P., Elaine, D., Holland, E. D., Givskov, M., Williams, P., Cámara, M., Barrett, D. A., Knox, A. (2010). Garlic as an inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in cystic fibrosis—A pilot randomized controlled trial. *Pediatric Pulmonology*, 45, 315–416, doi:10.1002/ppul.21193.
- Staudenbauer, W. L., Orr, E. (1981). DNA gyrase: affinity chromatography on novobiocin-Sepharose and catalytic properties. *Nucleic Acids Research*, 9(15), 3589-3603, doi:10.1093/nar/9.15.3589.
- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 107-113, doi:10.1078/1438-4221-00196.
- Straus, S. K., Hancock, R. E. (2006). Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(9), 1215-1223, doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.009.
- Talbot, U. M., Paton, A. W., Paton, J. C. (1996). Uptake of *Streptococcus pneumoniae* by respiratory epithelial cells. *Infection and Immunity*, 64(9), 3772-3777.
- Tanaka, S., Fujita, Y., Parry, H. E., Yoshizawa, A. C., Morimoto, K., Murase, M., Yamada, Y., Yao, J., Utsunomiya, S., Kajihara, S., Fukuda, M., Ikawa, M., Tabata, T., Takahashi, K., Aoshima, K., Nihei, Y., Nishioka, T. Oda, Y., Tanaka, K. (2014). Mass++: A visualization and analysis tool for mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 13(8), 3846-3853, doi:10.1021/pr500155z.
- Taniguchi, D., Matsumoto, K., Tsuchiya, T., Machino, R., Takeoka, Y., Elgalad, A., Gunge, K., Takagi, K., Taura, Y., Hatachi, G., Matsuo, N., Yamasaki, N., Nakayama, K., Nagayasu, T. (2018). Scaffold-free trachea regeneration by tissue engineering with bio-3D printing. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 26(5), 745-752, doi: 10.1093/icvts/ivx444.
- Tetko, I. V., Gasteiger, J., Todeschini, R., Mauri, A., Livingstone, D., Ertl, P., Palyulin, V. A., Radchenko, E. V., Zefirov, N. S., Makarenko, A. S., Tanchuk, V. Y., Prokopenko, V. V. (2005). Virtual computational chemistry laboratory - design and description, *Journal of Computer-aided Molecular Design*, 19, 453-63, doi:10.1007/s10822-005-8694-y.
- Todaro, G. J., Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of Cell Biology*, 17(2), 299-313, doi:10.1083/jcb.17.2.299.
- Tronde, A., Nordén, B. O., Marchner, H., Wendel, A. K., Lennernäs, H., Bengtsson, U. H. (2003). Pulmonary absorption rate and bioavailability of drugs *in vivo* in rats: structure–absorption relationships and physicochemical profiling of inhaled drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(6), 1216-1233, doi:10.1002/jps.10386.

- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277.
- von Salzen, N. (2016). Auswirkung des Allicins auf Biofilmbildung bei *Pseudomonas fluorescens*. Bachelor Thesis, RWTH Aachen University.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R., Ivanova, E. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554, doi:10.3390/molecules14072535.
- Vuotto, C., Longo, F., Balice, M., Donelli, G., Varaldo, P. (2014). Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, 3(3), 743-758, doi:10.3390/pathogens3030743.
- Wallock-Richards, D., Doherty, C. J., Doherty, L., Clarke, D. J., Place, M., Govan, J. R., Campopiano, D. J. (2014). Garlic revisited: Antimicrobial activity of allicin-containing garlic extracts against *Burkholderia cepacia* complex. *PLoS One*, 9, e112726, doi:10.1371/journal.pone.0112726.
- Walters, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., Stewart, P. S. (2003). Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(1), 317-323, doi:10.1128/AAC.47.1.317-323.2003.
- Walton, L., Herbold, M., Lindegren, C. C. (1936). Bactericidal effects of vapors from crushed garlic. *Journal of Food Science*, 1(2), 163-169, doi:10.1111/j.1365-2621.1936.tb17778.x.
- Wegener, H. C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), 439-445, doi:10.1016/j.mib.2003.09.009.
- Wenzel, M., Patra, M., Senges, C. H. R., Ott, I., Stepanek, J. J., Pinto, A., Prochnow, P., Vuong, C., Langklotz, S., Metzler-Nolte, N., Bandow, J. E. (2013). Analysis of the mechanism of action of potent antibacterial hetero-tri-organometallic compounds: a structurally new class of antibiotics. *ACS Chemical Biology*, 8(7), 1442-1450, doi:10.1021/cb4000844.
- Westerman, E. M., Heijerman, H. G. M., Frijlink, H. W. (2007). Dry powder inhalation versus wet nebulisation delivery of antibiotics in cystic fibrosis patients. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 4(2), 91-94, doi:10.1517/17425247.4.2.91.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559), 1487-1487, doi:10.1126/science.295.5559.1487.
- Wills, E. D. (1956). Enzyme inhibition by allicin, the active principle of garlic. *Biochemical Journal*, 63(3), 514, doi:10.1042/bj0630514.
- Woodhead, M., Blasi, F., Ewig, S., Garau, J., Huchon, G., Ieven, M., Ortqvist, A., Schaberg, T., Torres, A., van der Heijden, G., Read, R., Verheij, T. J. M. (2011). Guidelines for the management of adult lower respiratory tract infections-Full version. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, E1-E59, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03672.x.

World Health Organisation (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/, letzter Zugriff am 13.10.2019

Zaffiri, L., Gardner, J., Toledo-Pereyra, L. H. (2012). History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. *Journal of Investigative Surgery*, 25(2), 67-77, doi:10.3109/08941939.2012.664099.

Zar, H. J., Madhi, S. A., Aston, S. J., Gordon, S. B. (2013). Pneumonia in low and middle income countries: progress and challenges. *Thorax*, 68(11), 1052-1056, doi:10.1136/thoraxjnl-2013-204247.

VII. Kooperationspartner

Aerodynamisches Institut und Lehrstuhl für Strömungslehre (AIA), RWTH Aachen

Philipp Müller, Philipp Dörner, Dr.-Ing. Michael Klaas

Nationales Referenz-Zentrum für Streptokokken (NRZ), Uniklinik RWTH Aachen

Natalia Levina, Dr. Mark van der Linden

Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Uniklinik RWTH Aachen

Nadine Ruske, Prof. Christian Martin

Institut der Biochemie und Pathobiochemie – Biochemie der Mikroorganismen, Ruhr-Universität Bochum

Prof. Lars Leichert

Institut für Mikrobielle- und Pflanzengenetik, KU Leuven (Belgien)

Els Meert, Karin Thevissen

VIII. Liste der Veröffentlichungen

- 01.2020 **Forschungspublikation (Erstautor)**
- Reiter, J.**, Borlinghaus, J., Dörner, P., Schröder, W., Gruhlke, M. C. H., Klaas, M., Slusarenko, A. J. (2020). Investigation of the deposition behaviour and antibacterial effectivity of allicin aerosols and vapour using a lung model. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19, 1541-1549, doi:10.3892/etm.2019.8387.
- 09.2019 **Forschungspublikation (Erstautor)**
- Reiter, J.**, Hübbers, A. M., Albrecht, F., Leichert, L. I. O., Slusarenko, A. J. (2019). Allicin, a natural antimicrobial defence substance from garlic, inhibits DNA gyrase activity in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 151359, doi:10.1016/j.ijmm.2019.151359.
- 05.2019 **Forschungspublikation-Preprint (Coautor)**
- Dörner, P., Müller, P. M., **Reiter, J.**, Gruhlke, M. C., Slusarenko, A. J., Schröder, W., Klaas, M. (2019). Feasibility of a surface-coated lung model for the quantification of active agent deposition for preclinical studies. *bioRxiv*, 639245.
- 10.2017 **Forschungspublikation (Erstautor)**
- Reiter, J.**, Levina, N., van der Linden, M., Gruhlke, M., Martin, C., Slusarenko, A. (2017). Diallylthiosulfinates (allicin), a volatile antimicrobial from garlic (*Allium sativum*), kills human lung pathogenic bacteria, including MDR strains, as a vapor. *Molecules*, 22(10), 1711, doi:10.3390/molecules22101711.

IX. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Jana Reiter

erkläre hiermit, dass diese Dissertation und die darin dargelegten Inhalte die eigenen sind und selbstständig, als Ergebnis der eigenen originären Forschung, generiert wurden.

Hiermit erkläre ich an Eides statt

1. Diese Arbeit wurde vollständig oder größtenteils in der Phase als Doktorand dieser Fakultät und Universität angefertigt;
2. Sofern irgendein Bestandteil dieser Dissertation zuvor für einen akademischen Abschluss oder eine andere Qualifikation an dieser oder einer anderen Institution verwendet wurde, wurde dies klar angezeigt;
3. Wenn immer andere eigene- oder Veröffentlichungen Dritter herangezogen wurden, wurden diese klar benannt;
4. Wenn aus anderen eigenen- oder Veröffentlichungen Dritter zitiert wurde, wurde stets die Quelle hierfür angegeben. Diese Dissertation ist vollständig meine eigene Arbeit, mit der Ausnahme solcher Zitate;
5. Alle wesentlichen Quellen von Unterstützung wurden benannt;
6. Wenn immer ein Teil dieser Dissertation auf der Zusammenarbeit mit anderen basiert, wurde von mir klar gekennzeichnet, was von anderen und was von mir selbst erarbeitet wurde;
7. Ein Teil oder Teile dieser Arbeit wurden zuvor veröffentlicht (s. VIII. Liste der Veröffentlichungen).

Aachen, den

(Jana Reiter)

X. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich noch meinen Dank an alle aussprechen, die mich während dieser Arbeit betreut und unterstützt haben:

Meinen herzlichen Dank an Prof. Alan Slusarenko für das interessante Projekt, die Möglichkeit am Institut Bio III diese Arbeit durchzuführen und für den großen Freiraum für viele Ideen und Experimente.

Vielen Dank an Prof. Lothar Rink und an Dr. Marlies Fabry dafür, dass sie sich als Prüfer für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Vielen Dank an Dr. Mark van der Linden (Nationales Referenz-Zentrum für Streptokokken (NRZ), Uniklinik RWTH Aachen) für die Möglichkeit mit den lungenpathogenen Bakterien zu arbeiten und an Natalia Levina für die praktische Unterstützung und die Einführung in die Handhabung mit den pathogenen Bakterien und dafür, dass sie immer Zeit und gute Laune für mich hatte.

Vielen Dank an Prof. Lars Blank und an Dr. Martin Zimmermann für die Möglichkeit in den Mikrobiologie-Laboren zu arbeiten und Gisela Beissel für die immer freundliche Unterstützung im Labor.

Vielen Dank an Dr. Michael Klaas, Philipp Dörner und Philipp Müller (Aerodynamisches Institut und Lehrstuhl für Strömungslehre (AIA), RWTH Aachen) für die schöne erfolgreiche Kooperation, durch die das Lungen-Modell entstanden ist.

Vielen Dank an Prof. Lars Leichert (Institut der Biochemie und Pathobiochemie – Biochemie der Mikroorganismen, Ruhr-Universität Bochum) für die Unterstützung bei den OxICAT-Experimenten.

Vielen Dank an Prof. Christian Martin und Nadine Ruske (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Uniklinik RWTH Aachen) für die Zusammenarbeit und für die Bereitschaft Experimente mit Allicin durchzuführen.

Vielen Dank an Karin Thevissen und Els Meert (Institut für Mikrobielle- und Pflanzengenetik, KU Leuven) für die Hilfe bei den Biofilm-Untersuchungen mit *C. albicans*.

Vielen Dank an Prof. Ulrike Kappler (School of Chemistry and Molecular Biosciences, The University of Queensland) für die Hilfe mit *Haemophilus influenzae*.

Vielen Dank an Dr. Günter Brader (Austrian Institute of Technology (Tulln)) für die Biofilm-Reporter-Stämme *Agrobacterium tumefaciens* pZLR4-*traR-traG::lacZ* und *E. coli* pHV2001.

Vielen Dank an Sebastian Köbbing (iAMB) für die Hilfe beim pEMG-*knock out*-Klonierung.

Vielen Dank an die RWTH Aachen für die finanzielle Unterstützung in Rahmen der Graduierten-Förderungsprogramm RFwN (Richtlinien zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses der RWTH Aachen).

Vielen Dank an alle Studenten und Mitarbeiter der Bio III für die schöne Zeit im Institut.

Vielen Dank an Anna Hübbers und Nadja von Salzen für die Motivation und das Interesse an Allicin während ihrer Bachelorarbeiten.

Vielen Dank an Ulrike Noll für die Unterstützung im Laboralltag, fürs Dasein und für das Korrekturlesen dieser und anderen Arbeiten.

Vielen Dank an meine Kollegen Dr. Frank Albrecht, Dr. Jan Borlinghaus, Dr. Martin Gruhlke, Roman Leontiev und Michael Ries für die Unterstützung in wissenschaftlichen und alltäglichen Fragen, für die schöne Zeit im Labor und auch außerhalb. Es hat Spaß gemacht mit Euch!

Vielen Dank an meine Eltern und Alec.

XI. Anhang

a. Identifikation der Oxidationsziele des Allicins in *Pf0-1* und *PfAR-1* mittels OxICAT

Tabelle A1. Oxidationszustand der Proteine bei *Pf0-1* ermittelt im OxICAT-Experiment.

	Anzahl der oxidierten Proteine bei <i>Pf0-1</i>					
	1. Exp.		2. Exp.		3. Exp.	
	Kontrolle	Allicin-Behandlung	Kontrolle	Allicin-Behandlung	Kontrolle	Allicin-Behandlung
0%-20%	2787	1032	742	935	2035	1411
20%-40%	490	827	146	234	307	760
40%-60%	249	492	44	73	118	397
60%-80%	111	275	26	37	44	153
80%-100%	62	100	8	8	28	27
Summe	3699	2726	966	1287	2532	2748

Tabelle A2. Oxidationszustand der Proteine bei *PfAR-1* ermittelt im OxICAT-Experiment.

	Anzahl der oxidierten Proteine bei <i>PfAR-1</i>					
	1. Exp.		2. Exp.		3. Exp.	
	Kontrolle	Allicin-Behandlung	Kontrolle	Allicin-Behandlung	Kontrolle	Allicin-Behandlung
0%-20%	2642	1534	842	1057	2416	2137
20%-40%	395	490	161	249	316	794
40%-60%	277	229	73	96	196	294
60%-80%	188	72	35	37	51	118
80%-100%	68	96	46	29	43	31
Summe	3570	2421	1157	1468	3022	3374

Statistische Analyse der Ergebnisse aus dem OxICAT-Experiment

Für die Auswertung wurde Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) verwendet. Es wurden zwei Kategorien gebildet, Oxidationszustand bis zu 20% und größer als 20%.

Tabelle A3. Oxidationszustand der Proteine bei *Pf0-1* bei einzelnen Experimenten. Oxidationszustand ist in zwei Kategorien 0-20% und 20-100% oxidierte Proteine aufgeteilt.

	Anzahl der oxidierten Proteine bei <i>Pf0-1</i>					
	1. Exp.		2. Exp.		3. Exp.	
	Kontrolle	Allicin-Behandlung	Kontrolle	Allicin-Behandlung	Kontrolle	Allicin-Behandlung
0-20%	2787	1032	742	935	2035	1411
20-100%	912	1694	224	352	497	1337
Summe	3699	2726	966	1287	2532	2748

Tabelle A4. Oxidationszustand der Proteine bei *PfAR-1* bei einzelnen Experimenten. Oxidationszustand ist in zwei Kategorien 0-20% und 20-100% oxidierte Proteine aufgeteilt.

	Anzahl der oxidierten Proteine bei <i>PfAR-1</i>					
	1. Exp.		2. Exp.		3. Exp.	
	Kontrolle	Allicin-Behandlung	Kontrolle	Allicin-Behandlung	Kontrolle	Allicin-Behandlung
0-20%	2642	1534	842	1057	2416	2137
20-100%	928	887	315	411	606	1237
Summe	3570	2421	1157	1468	3022	3374

Tabelle A5. Oxidationszustand der Proteine bei *Pf0-1* bei allen drei Experimenten.

	Anzahl der oxidierten Proteine bei <i>Pf0-1</i>	
	Kontrolle	Allicin-Behandlung
0-20%	5564	3378
20-100%	1633	3383
Summe	7197	6761

Tabelle A6. Oxidationszustand der Proteine bei *PfAR-1* bei allen drei Experimenten.

	Anzahl der oxidierten Proteine bei <i>PfAR-1</i>	
	Kontrolle	Allicin-Behandlung
0-20%	5900	4728
20-100%	1849	2535
Summe	7749	7263

Die Nullhypothese besagt, dass sich die Oxidationszustände bei *Pf0-1* und *PfAR-1* von einander nicht unterscheiden. Dies bedeutet, dass der Mittelwert der Ergebnisse von *Pf0-1* und *PfAR-1* das erwartete Ergebnis darstellt (Tabelle A7). Wenn man die prozentuelle Werte aus dieser Tabelle mit der Anzahl der identifizierten Proteine verrechnet, ergibt sich die erwartete Anzahl der Proteine in jeder Kategorie und bei beiden Behandlungen (Tabelle A8).

Tabelle A7. Mittelwerte des Oxidationszustandes der Proteine bei *Pf0-1* und *PfAR-1* werden als Erwartungswerte bei dem Chi-Quadrat-Wert verwendet.

Oxidationszustand der Proteine	Anteil der oxidierten Proteine bei der Kontrolle (in %)	Anteil der oxidierten Proteine bei der Allicin-Behandlung (in %)
0%-20%	76,7	57,6
20%-100%	23,3	42,4

Tabelle A8. Erwartete Verteilung der Oxidationszustände bei *Pf0-1* und *PfAR-1*, angenommen, der Oxidationszustand unterscheidet sich bei den beiden Bakterien nicht signifikant voneinander.

		Anzahl der oxidierten Proteine bei der Kontrolle	Anzahl der oxidierten Proteine bei der Allicin-Behandlung
0-20%	<i>Pf0-1</i>	76,7% x 7197=5520	57,6% x 7197=4145
	<i>PfAR-1</i>	76,7% x 7749=5943	57,6% x 7749=4463
20-100%	<i>Pf0-1</i>	23,3% x 7197=1677	42,4% x 7197=3052
	<i>PfAR-1</i>	23,3% x 7749=1806	42,4% x 7749=3286

Zur Durchführung des Signifikanz-Tests wurde die Tabelle aufgestellt, die die aufgetretenen und die erwartete Anzahl der Proteine in den beiden Kategorien beinhaltet (Tabelle A9). Die Anzahl der Proteine für die jeweilige Kategorie wurde aus allen drei Experimenten zusammenaddiert (erste Zahl, Tabellen A5 und A6). In den runden Klammern ist der erwartete Wert, falls sich die Aufteilung bei den beiden Stämmen nicht unterscheidet (Tabelle A8). In den eckigen Klammern ist der entsprechende Chi-Quadrat-Wert. Der Chi-Quadrat-Wert wird mit der folgenden Formel ausgerechnet

$$\chi^2 = \frac{(\text{beobachtet} - \text{erwartet})^2}{\text{erwartet}}$$

Tabelle A9. Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) für den Oxidationszustand der Proteine bei *Pf0-1* und *PfAR-1* bei Kontroll-Bedingungen. Erste Zahl ist der beobachtete Wert, in den runden Klammern der erwartete Wert und in den eckigen Klammern der Chi-Quadrat-Wert.

unbehandelt	Oxidationszustand 0-20%	Oxidationszustand 20-100%	Summe
<i>Pf0-1</i>	5564 (5520) [0,35]	1633 (1677) [1,15]	7197
<i>PfAR-1</i>	5900 (5943) [0,31]	1849 (1806) [1,02]	7749
	11463	3482	14964

Die Summe der vier χ^2 -Werte beträgt 2,83. Anschließend wird der Wert auf Signifikanz in der Werte-Tabelle mit der Freiheitsgrad Eins überprüft. Der Freiheitsgrad ist der Produkt aus Anzahl der Spalten minus Anzahl der Zeilen minus Eins ((2-1)x(2-1)=1x1=1). Der χ^2 -Wert unter 3,841 zeigt keine statistische Signifikanz. Dies bedeutet, dass die Oxidationszustände von *PfAR-1* und *Pf0-1* sich bei der Kontroll-Behandlung nicht voneinander unterscheiden.

Tabelle A10. Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) für den Oxidationszustand der Proteine bei *Pf0-1* und *PfAR-1* bei der Allicin-Behandlung. Erste Zahl ist der beobachtete Wert, in den runden Klammern der erwartete Wert und in den eckigen Klammern der Chi-Quadrat-Wert.

Allicin-Behandlung	Oxidationszustand 0-20%	Oxidationszustand 20-100%	Summe
<i>Pf0-1</i>	3378 (4145) [141,9]	3383 (3052) [35,9]	6761
<i>PfAR-1</i>	4728 (4463) [15,7]	2535 (3286) [171,6]	7263
Summe	8106	5918	14024

Bei der Allicin-Behandlung beträgt die Summe der vier χ^2 -Werte 365,1. Der χ^2 -Wert höher als 10,8 zeigt eine sehr hohe statistische Signifikanz ($p < 0,001$).

Oxidationsziele des Allicins

Tabelle A11. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-resistenten *PfAR-1* und Allicin-anfälligen *Pf0-1*, detektiert in allen drei OxICAT-Experimenten. Ausführlichen Daten der Tabelle 71, Mittelwerte mit der Standardabweichung (M±StAbw.).

Protein-Name/ Peptid-Sequenz	Bakterium/ Experiment		Anteil der ox. Proteine bei Allicin-Behandlung in %	Anteil der ox. Proteine bei Kontrolle in %	„Delta %“ durchschn. Oxidations-Änderung in %	RoR	Ratio %
Phosphoglucosamin-Mutase CPQVLINVR	<i>Pf0-1</i>	1. Exp.	90,07	5,34	84,73	160,88	16,87
		2. Exp.	24,13	1,20	22,93	26,21	20,13
		3. Exp.	58,78	4,84	53,93	27,99	12,13
		M±StAbw.	57,66 ± 32,98	3,79 ± 2,26	53,86 ± 30,9	71,69 ± 77,24	16,38 ± 4,02
	<i>PfAR-1</i>	1. Exp.	42,78	9,44	33,34	7,17	4,53
		2. Exp.	29,55	1,09	28,50	39,21	27,92
		3. Exp.	67,09	5,66	61,43	33,98	11,85
		M±StAbw.	46,47 ± 19,04	5,4 ± 4,18	41,09 ± 17,78	26,79 ± 17,19	14,77 ± 11,96
Glucose-1-Phosphat- Thymidyl-Transferase EILVISTPEDLPCFR (<i>PfAR-1</i>) EILIISTPEDLPCFKK (<i>Pf0-1</i>)	<i>Pf0-1</i>	1. Exp.	82,15	5,84	76,31	74,18	14,06
		2. Exp.	31,07	2,74	28,33	16,00	11,34
		3. Exp.	71,32	7,23	64,09	31,89	9,86
		M±StAbw.	61,51 ± 26,92	5,27 ± 2,3	56,24 ± 24,93	40,69 ± 30,07	11,75 ± 2,13
	<i>PfAR-1</i>	1. Exp.	56,79	4,80	51,99	26,08	11,84
		2. Exp.	28,59	1,17	27,43	33,97	24,54
		3. Exp.	66,17	7,66	58,52	23,60	8,64
		M±StAbw.	50,52 ± 19,56	4,54 ± 3,25	45,98 ± 16,39	27,88 ± 5,42	15,01 ± 8,41
Ketosäure-Redukto-Isomerase VAIIGYGSQGHACNLK	<i>Pf0-1</i>	1. Exp.	50,16	3,60	46,56	26,97	13,94
		2. Exp.	16,93	1,07	15,87	18,92	15,89
		3. Exp.	36,66	4,24	32,41	13,06	8,64
		M±StAbw.	34,58 ± 16,71	2,97 ± 1,68	31,61 ± 15,36	19,65 ± 6,98	12,82 ± 3,75
	<i>PfAR-1</i>	1. Exp.	22,77	9,96	12,80	2,66	2,28
		2. Exp.	17,24	0,87	16,37	23,73	19,81
		3. Exp.	25,81	3,97	21,84	8,41	6,50
		M±StAbw.	21,94 ± 4,34	4,93 ± 4,62	17 ± 4,55	11,6 ± 10,89	9,53 ± 9,15

Tabelle A12. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-anfälligen *Pf0*-1 und nicht in Allicin-resistenten *PfAR*-1, detektiert in allen drei OxICAT-Experimenten. Ausführlichen Daten der Tabelle 72, Mittelwerte mit der Standardabweichung (M±StAbw.).

Protein-Name/ Peptid-Sequenz	Experiment	Anteil der ox. Proteine bei Allicin-Behandlung in %	Anteil der ox. Proteine bei Kontrolle in %	„Delta %“ durchschn. Oxidations-Änderung in %	RoR	Ratio %
Chaperon HscA SLLQAACAAK	1. Exp.	61,56	6,05	55,51	24,87	10,18
	2. Exp.	18,39	2,46	15,93	8,95	7,49
	3. Exp.	39,31	7,60	31,71	7,87	5,17
	M±StAbw.	39,75 ± 21,59	5,37 ± 2,64	34,38 ± 19,92	13,9 ± 9,52	7,61 ± 2,51
DNA-Gyrase Untereinheit A AGADSCRPENLDPQYGLR	1. Exp.	78,60	6,79	71,81	50,44	11,58
	2. Exp.	33,68	4,16	29,52	11,69	8,09
	3. Exp.	56,05	8,10	47,95	14,47	6,92
	M±StAbw.	56,11 ± 22,46	6,35 ± 2,01	49,76 ± 21,2	25,53 ± 21,61	8,86 ± 2,42
Zink-Aufnahme-Regulations- protein ISSLNAFVGCVHPK	1. Exp.	59,80	7,05	52,75	19,61	8,48
	2. Exp.	18,42	3,38	15,04	6,45	5,44
	3. Exp.	29,35	7,11	22,25	5,43	4,13
	M±StAbw.	35,86 ± 21,44	5,85 ± 2,14	30,01 ± 20,02	10,5 ± 7,91	6,02 ± 2,23
Peptide chain release factor 1 ITHIPTGTVVECQEER	1. Exp.	86,71	7,54	79,16	79,94	11,49
	2. Exp.	45,17	1,95	43,22	41,44	23,17
	3. Exp.	78,59	6,59	72,01	52,05	11,93
	M±StAbw.	70,16 ± 22,02	5,36 ± 2,99	64,8 ± 19,02	57,81 ± 19,89	15,53 ± 6,62
Leucyl-tRNA-Synthetase NNPELQAFIAECK	1. Exp.	70,24	7,80	62,44	27,92	9,01
	2. Exp.	20,19	1,50	18,69	16,58	13,44
	3. Exp.	42,89	3,92	38,97	18,41	10,94
	M±StAbw.	44,44 ± 25,06	4,41 ± 3,18	40,03 ± 21,89	20,97 ± 6,09	11,13 ± 2,22
RNA-Methyl-transferase VACGAAEVIPLVAVTNLAR	1. Exp.	82,16	6,74	75,42	63,73	12,19
	2. Exp.	21,67	1,45	20,22	18,75	14,91
	3. Exp.	58,13	6,91	51,22	18,71	8,41
	M±StAbw.	53,99 ± 30,46	5,03 ± 3,1	48,95 ± 27,67	33,73 ± 25,98	11,84 ± 3,26
HP 1791: DUF469-Domäne- haltiges Protein EAMEANGLGYVGGDDFGLVCLQK	1. Exp.	64,46	6,30	58,16	26,99	10,24
	2. Exp.	15,07	3,06	12,02	5,63	4,93
	3. Exp.	43,42	7,74	35,67	9,14	5,61
	M±StAbw.	40,98 ± 24,78	5,7 ± 2,4	35,28 ± 23,07	13,92 ± 11,45	6,93 ± 2,89
HP 3952: Pyrimidin/Purin- Nucleosid-Phosphorylase VAVDTAYLCEYRG	1. Exp.	96,83	8,11	88,72	345,95	11,95
	2. Exp.	87,32	5,00	82,32	130,90	17,47
	3. Exp.	91,49	8,76	82,73	112,03	10,45
	M±StAbw.	91,88 ± 4,77	7,29 ± 2,01	84,59 ± 3,58	196,29 ± 129,95	13,29 ± 3,7

Tabelle A13. Stark oxidierte Proteine nach Allicin-Behandlung in Allicin-resistenten *PfAR*-1 und nicht in Allicin-anfälligen *PfO*-1, detektiert in allen drei OxICAT-Experimenten. Ausführlichen Daten der Tabelle 73, Mittelwerte mit der Standardabweichung (M±StAbw.).

Protein-Name/ Peptid-Sequenz	Experiment	Anteil der ox. Proteine bei Allicin- Behandlung in %	Anteil der ox. Proteine bei Kontrolle in %	„Delta %“ durchschn. Oxidations-Änderung in %	RoR	Ratio %
Chaperon GroEL ALSKPCADFK	1. Exp.	20,88	6,26	14,62	3,95	3,34
	2. Exp.	17,14	0,77	16,37	26,73	22,32
	3. Exp.	26,80	6,49	20,32	5,28	4,13
	M±StAbw.	21,61 ± 4,87	4,51 ± 3,24	17,1 ± 2,92	11,99 ± 12,79	9,93 ± 10,74
Riboflavin-Synthase AVEFCIR	1. Exp.	47,45	18,57	28,87	3,96	2,55
	2. Exp.	30,23	2,36	27,87	17,91	12,80
	3. Exp.	51,47	7,36	44,11	13,35	7,00
	M±StAbw.	43,05 ± 11,28	9,43 ± 8,3	33,62 ± 9,1	11,74 ± 7,11	7,45 ± 5,14
Biotin-Carboxylase der Acetyl-CoA-Carboxylase DLVRDEGFCK	1. Exp.	47,11	7,56	39,55	10,89	6,23
	2. Exp.	43,42	0,70	42,73	109,37	62,31
	3. Exp.	49,35	5,09	44,26	18,18	9,70
	M±StAbw.	46,63 ± 2,99	4,45 ± 3,47	42,18 ± 2,4	46,15 ± 54,87	26,08 ± 31,42
Putative Formate- Dehydrogenase- Oxidoreduktase GAQVVCINPLK	1. Exp.	50,97	16,99	33,98	5,08	3,00
	2. Exp.	31,61	4,01	27,60	11,06	7,88
	3. Exp.	38,44	9,02	29,42	6,30	4,26
	M±StAbw.	40,34 ± 9,82	10,01 ± 6,55	30,33 ± 3,29	7,48 ± 3,16	5,05 ± 2,53
Ribose-5-Phosphat- Isomerase A SIVGVGTGSTANCFIDALAQHK	1. Exp.	51,68	3,55	48,14	29,09	14,57
	2. Exp.	48,34	0,85	47,49	108,71	56,64
	3. Exp.	62,67	9,43	53,24	16,13	6,65
	M±StAbw.	54,23 ± 7,5	4,61 ± 4,39	49,62 ± 3,15	51,31 ± 50,13	25,95 ± 26,87

b. Einfluss des Allicins auf die Aktivität der DNA-Gyrase

Proteinmenge-Bestimmung der DNA-Gyrase

Tabelle A14. Proteinmenge-Bestimmung der DNA-Gyrase aus Pseudomonaden und *E. coli* mittels Bradford-Assay.

Probe	Absorption (A590/A470) y-Wert	Proteinmenge x-Wert (µg)	Proteinkonzentration (µg/µl)
2 µl DNA-Gyrase aus <i>Pf0-1</i>	1,04950495	0,69931801	0,349659
2 µl DNA-Gyrase aus <i>PfAR-1</i>	1,06052632	0,73785425	0,36892713
1 µl DNA-Gyrase aus <i>E. coli</i>	0,89473684	0,15817078	0,15817078

Tabelle A15. Gen- und Protein-Größe der Untereinheiten A und B der DNA-Gyrase von *Pf0-1* und *PfAR-1*.

	Untereinheit A	Untereinheit B	Gesamt (2 x A + 2 x B)
<i>Pf0-1</i>	2664 bp 887 Aminosäuren ¹ 98,2 kDa ²	2427 bp 808 Aminosäuren 90,4 kDa	377,2 kDa
<i>PfAR-1</i>	2775 bp 924 Aminosäuren 102,4 kDa	2427 bp 808 Aminosäuren 90,3 kDa	385,4 kDa

¹ konvertiert aus der Nukleotid- in Aminosäure-Sequenz mit Hilfe von Online-Tool EMBOSS Transeq (www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/, Madeira et al., 2019)² gerechnet mit Hilfe von Online-Tool ProtParam (www.web.expasy.org/protparam/)

Sequenzierung

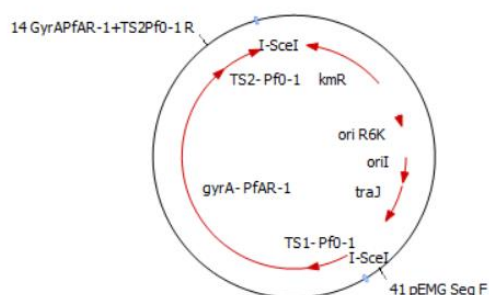
1. pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} Nummer 1 und 14

Abbildung A1. Plasmid-Karte von pEMG-TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1}. Das Plasmid wurde mit den Primerpaaren 41 (am 5'-Ende) bzw. 14 (am 3'-Ende) sequenziert.

A.	
1	gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtat agggataaca gggtaaatctg aattcgagct cggtaaccgg ggatccctcc tcgcgagcag gctcgtctcc
101	acagggtttg tgatcgttac agaacctgt gagagtaagc ctgctcgcga agaggccttg aaagtcaata aacatccgca atttcgtccc gaaatttgca
201	ttcagggaaag ctctgagcct ctctcgtccc cgttaagcct gtcctcggtc atctaactat gctccatgag catctggggg ataggtgagt ggcggctctt
301	gtgataacat ccggcggttt ccgagggcagt cccacggggt tgtcttcaact gcgcaaatcc agggtaact tgcgatttg tcgtaagtcg gcgcattggca
401	ctcggcctgc atcgacgagc ttctgtcgtc ccttatggat atggcgaagt ttcaccagaa aaaggaatca ggcttctcat gggcgaactg gccaaagaaa
501	tcctcccggt caatatcgaa gacgagctga aacagtccca cctcgactac gcaatgagcg taatcgtcgg ccgagcactg ccggacgcgc gcgatggcct
601	caagcccggt caccgtcgcg tgcgttgcg gatgagcgag ctgggcaacg acttcaacaa gccgtacaag aaatctgccc gtgtcgtcgg cgacgtgac
701	ggtaagtatc acccgcacgg tgacacggcc gtgtacggca ccattgttgc tatggccagc ccgttctccc tgcgttacct gctgggtcgac ggcacgggca
801	acttcgggtc ggtcga
B.	
pEMG für Pf01 1 Primer 41 29.01.18 edited (1 to 816) Homology Block: 1 to 816 pEMG für Pf0-1 (1 to 6743) Homology Block: 2763 to 3578	
C.	
1	gtcacgacgttgtaaaacgacggccagtatagggataaacagggtaatctgaattcgagctcggtaaccggggatccctccttcgcgagcagggctcgtctccc
2763	
101	acagggtttgtgatcgttacagaaacctgtgagagtaagcctgctcgcgaagaggccttgaaagtcaataaacatccgcaatttcgtcccgaaatttgca
2863	
201	ttcagggaaagctctgagcctctctcgtccccgttaagcctgcatcggtcatctaactatgctccatgagcgcacatctgggggataggtgctgctggcgtctt
2963	
301	gtgataacatccggcggtttccgagggcagtcacacggggttgccttcactgcgcaaatccagggtcaacttgcgatttgcgtaagtcggcgatggca
3063	
401	ctcggcctgcacgacgagcttctgctgctcccccttatggatagggcaagtttcaccagaaaaaggaatcaggcttctcatggcggaactggccaaagaaa
3163	
501	tcctcccggtcaatatcgaaagacgagctgaacagtcctacctcgactacgcaatgagcgtaatcgtcggccgagcactgccggacgcgcgcgatggcct
3263	
601	caagcccggtgcacgctcgtgctgttcgcatgagcagctgggcaacgacttcaacaagccgtacaagaaatctgccgtgctcgtcggcgacgtgac
3363	
701	ggtaagtatcacccgcacgggtgacaccccggtgacggcaccattgttcgtatggccagccgttctccctgcttacctgctgggtgcagcgccagggca
3463	
801	acttcgggtcgggtcga
3563	

Abbildung A2. Sequenzierung der Plasmides pEMG 1 mit dem Primer 41. Der sequenzierte Abschnitt des Plasmides pEMG 1 mit dem Primer 41 (A) liegt im TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-Bereich (B) und stimmt mit der Sequenz überein (C).

[illegible]

Abbildung A3. Sequenzierung der Plasmides pEMG 1 mit dem Primer 14. Der sequenzierte Abschnitt des Plasmides pEMG 1 mit dem Primer 14 (A) liegt am 5'-Ende des *gyrA^{PIAR-1}*-Genes (B) und (C) es kam zu einem Nukleotid-Austausch von Gyanin₂₅₂₈ zu Adenin. Diese Mutation führt zum Aminosäureaustausch Asparagin statt Glycin (Gly₈₄₃Asp).

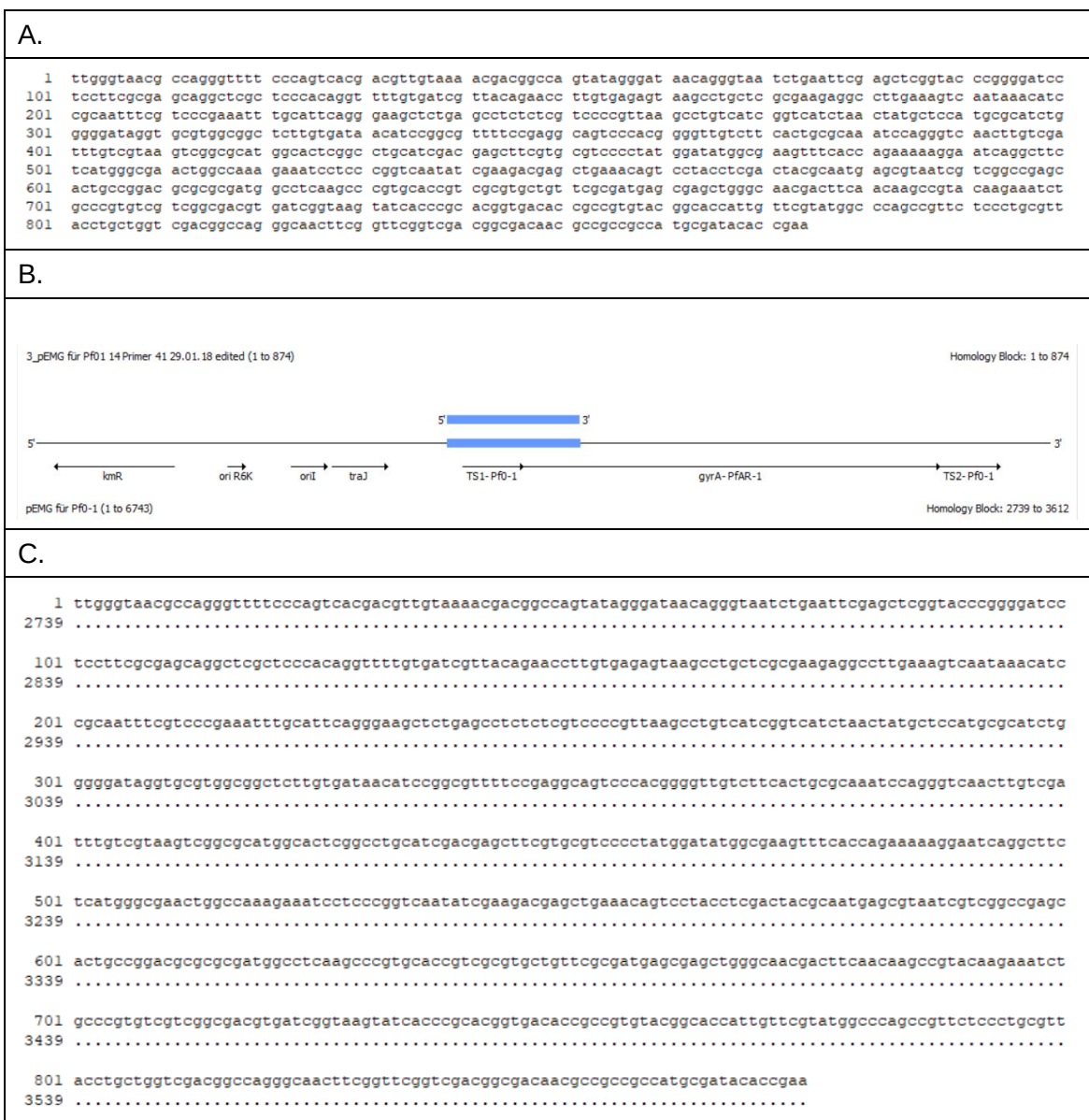


Abbildung A4. Sequenzierung der Plasmides pEMG 14 mit dem Primer 41. Der sequenzierte Abschnitt des Plasmides pEMG 14 mit dem Primer 41 (A) liegt im TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-Bereich (B) und stimmt mit der Sequenz überein (C).

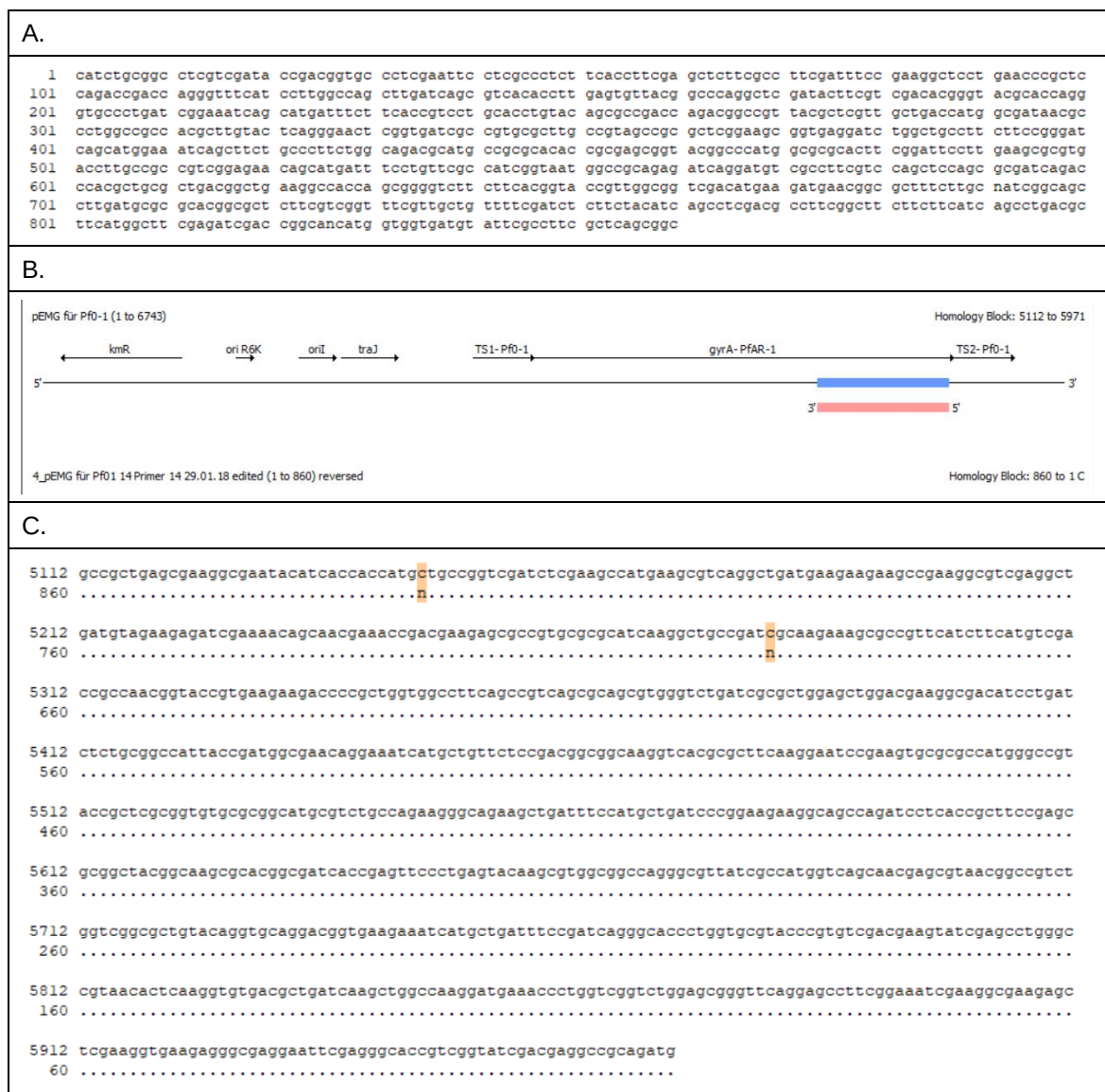


Abbildung A5. Sequenzierung der Plasmides pEMG 14 mit dem Primer 14. Der sequenzierte Abschnitt des Plasmides pEMG 14 mit dem Primer 14 (A) liegt am 5'-Ende des *gyrA_{PfAR-1}*-Genes (B) und mit der Ausnahme von 2 nicht identifizierten Nukleotiden (C) stimmt er mit der Sequenz überein.

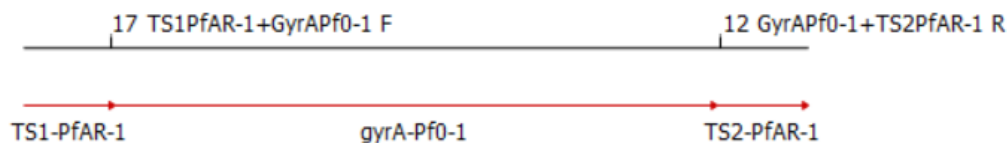
2. *gyrA*-Gene in *PfAR*-1- und *Pf0*-1-*gyrA*-Austauschmutanten

Abbildung A6. Die *PfAR*-1-*gyrA*-Austauschmutanten wurden im Bereich TS1_{*PfAR*-1}-*gyrA*_{*Pf0*-1}-TS2_{*PfAR*-1} mit den zwei Primern 12 (am 3'-Ende) und 17 (am 5'-Ende) teilweise sequenziert.

A.	
1	gacgagctga aacagtcccta tctcgactac gcgatgagcg tgatcgctgg ccgtgcaactg cgggatggcg gcgatggctt gaagcccggtg caccgtcgcg
101	tgctgttgc gatgagcgag ctgggcaacg actttaacaa gcggtacaag aaatctgccc gtgtcgctgg tgacgtgato ggtaagtatc acccgcaacg
201	tgataccggc gtgtacgaca ccacgtctcg catggcgacg cctttctccc tgcgttaact gctggctgac ggccagggca acttcgggtc ggtggacggc
301	gacaaatgcc cggccatgac atacacggaa gtgcgcatga ccaagctggc gcacgagctg ctggccgacc tgcacaagga aacgtgggac tgggtgcgga
401	actacgacgg caccgaactg atcccgggcg tcatgcccag ccgctgacgg aaactgtgtg tcaacgggtc cagcggtatc gcggtgggca tggcgaccaa
501	cattccggcg cacaaccttg gtgaagtcac cgacgggttg ctggccctca tgcacaaccc cgagctgacc gtccgatgac tgatgcaata cattcccggt
601	cgggacttcc cgactgcgac gatcatcaac ggtcgcgctg gcacatcaga agcctacggc accggccgtg gccgcattta catgcgcgac cgtctgatca
701	tcgaagacat cgacaaggtc ggtggcgctc agcagatcgt catcacgaaa ctcccttacc agctgaacaa ggccgctctg atcgagaaga tgcggagct
801	ggtaaaagag aagaaactcg aaggtcatcag caactcgccg gacgagtcgg acaaggacgg tatgcgcgtc gtgatcgaa tgcgtcgcg cgaagtgcct
901	gaggtgatcc tcaacaacct ctacgcccag acccagctgc aatcggtatt cggcatcaac atcgttgccg tgatcgacgg ccgtccggcg atccctgaacc
1001	tcaaggacct gctggaagcc ttctgcgtc accgtgcgca agtggttacc ccgctgaccg tgttcgaact g
B.	
PfAR1-AM1 Pr 17 edited (1 to 1071)	
Homology Block: 1 to 1071	
TS1-PfAR-1	
gyrA-Pf0-1	
TS2-PfAR-1	
TS1PfAR1-gyrAPf01-TS2PfAR1 (1 to 3464)	
Homology Block: 443 to 1513	
C.	
1	gacgagctga aacagtcccta tctcgactac gcgatgagcg tgatcgctgg ccgtgcaactg cgggatggcg gcgatggctt gaagcccggtg caccgtcgcg
443	
101	tgctgttgc gatgagcgag ctgggcaacg actttaacaa gcggtacaag aaatctgccc gtgtcgctgg tgacgtgato ggtaagtatc acccgcaacg
543	
201	tgataccggc gtgtacgaca ccacgtctcg catggcgacg cctttctccc tgcgttaact gctggctgac ggccagggca acttcgggtc ggtggacggc
643	
301	gacaaatgcc cggccatgac atacacggaa gtgcgcatga ccaagctggc gcacgagctg ctggccgacc tgcacaagga aacgtgggac tgggtgcgga
743	
401	actacgacgg caccgaactg atcccgggcg tcatgcccag ccgctgacgg aaactgtgtg tcaacgggtc cagcggtatc gcggtgggca tggcgaccaa
843	
501	cattccggcg cacaaccttg gtgaagtcac cgacgggttg ctggccctca tgcacaaccc cgagctgacc gtccgatgac tgatgcaata cattcccggt
943	
601	cgggacttcc cgactgcgac gatcatcaac ggtcgcgctg gcacatcaga agcctacggc accggccgtg gccgcattta catgcgcgac cgtctgatca
1043	
701	tcgaagacat cgacaaggtc ggtggcgctc agcagatcgt catcacgaaa ctcccttacc agctgaacaa ggccgctctg atcgagaaga tgcggagct
1143	
801	ggtaaaagag aagaaactcg aaggtcatcag caactcgccg gacgagtcgg acaaggacgg tatgcgcgtc gtgatcgaa tgcgtcgcg cgaagtgcct
1243	
901	gaggtgatcc tcaacaacct ctacgcccag acccagctgc aatcggtatt cggcatcaac atcgttgccg tgatcgacgg ccgtccggcg atccctgaacc
1343	
1001	tcaaggacct gctggaagcc ttctgcgtc accgtgcgca agtggttacc ccgctgaccg tgttcgaact g
1443	

Abbildung A7. Sequenzierung der *PfAR*-1-*gyrA*-Austauschmutante 1 mit dem Primer 17. Der sequenzierte Abschnitt des *gyrA*-Genes mit dem Primer 17 (A) liegt an der 5'-Ende des *gyrA*_{*Pf0*-1}-Genes (B) und (C) stimmt mit der Sequenz überein.



Abbildung A8. Sequenzierung der *PfAR-1-gyrA*-Austauschmutante 1 mit dem Primer 12. Der sequenzierte Abschnitt des *gyrA*-Genes mit dem Primer 12 (A) liegt am 3'-Ende des *gyrA_{Pf0-1}*-Genes (B) und mit der Ausnahme von 4 nicht identifizierten Nukleotiden (C) stimmt er mit der Sequenz überein.



Abbildung A9. Sequenzierung der *PfAR-1-gyrA*-Austauschmutante 2 mit dem Primer 17. Der sequenzierte Abschnitt des *gyrA*-Genes mit dem Primer 17 (A) liegt am 5'-Ende des *gyrA_{PR0-1}*-Genes (B) und (C) stimmt mit der Sequenz überein.

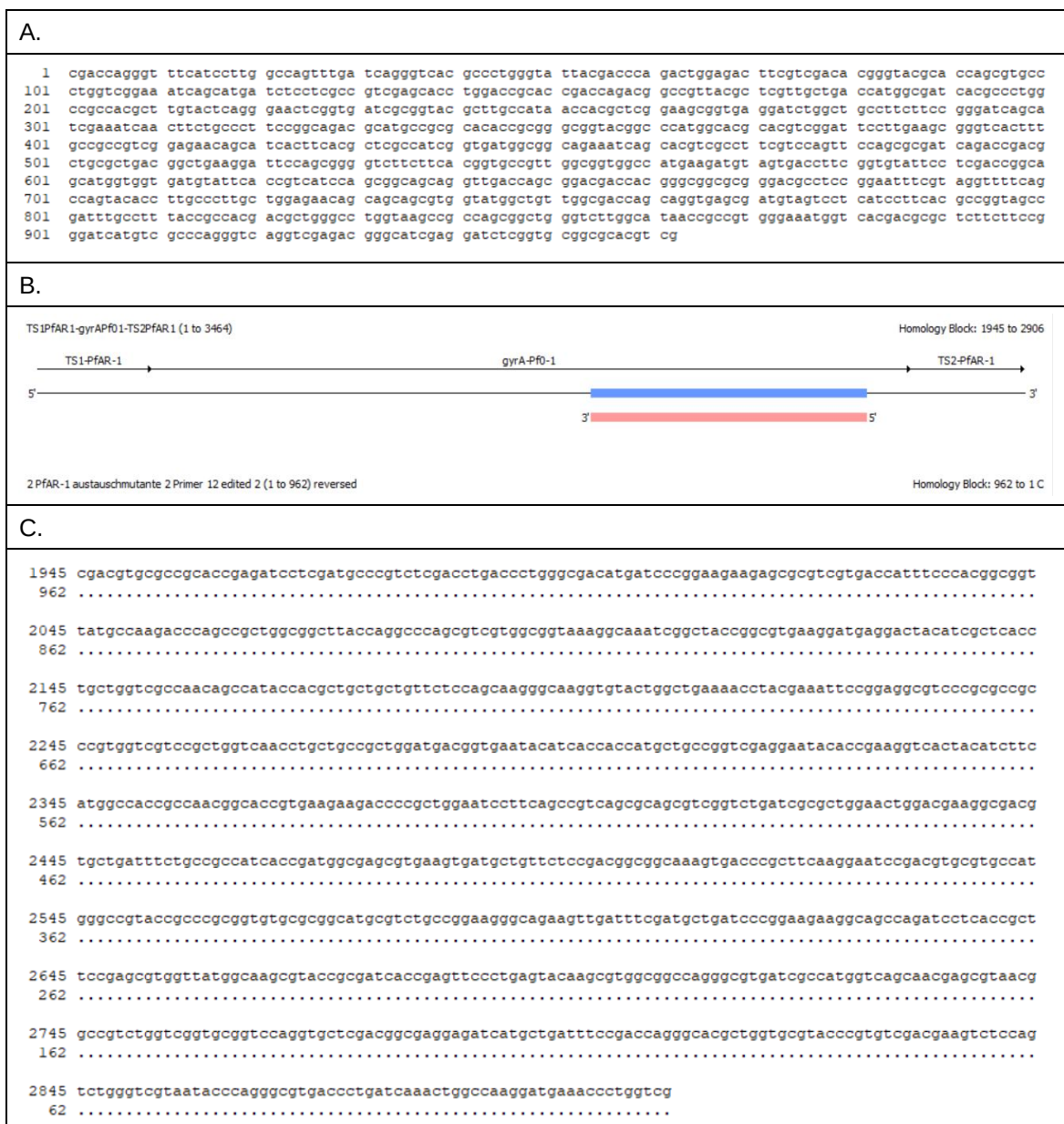


Abbildung A10. Sequenzierung der *PfAR-1-gyrA*-Austauschmutante 2 mit dem Primer 12. Der sequenzierte Abschnitt des *gyrA*-Genes mit dem Primer 12 (A) liegt am 3'-Ende des *gyrA_{Pf0-1}*-Genes (B) und stimmt mit der Sequenz überein (C).

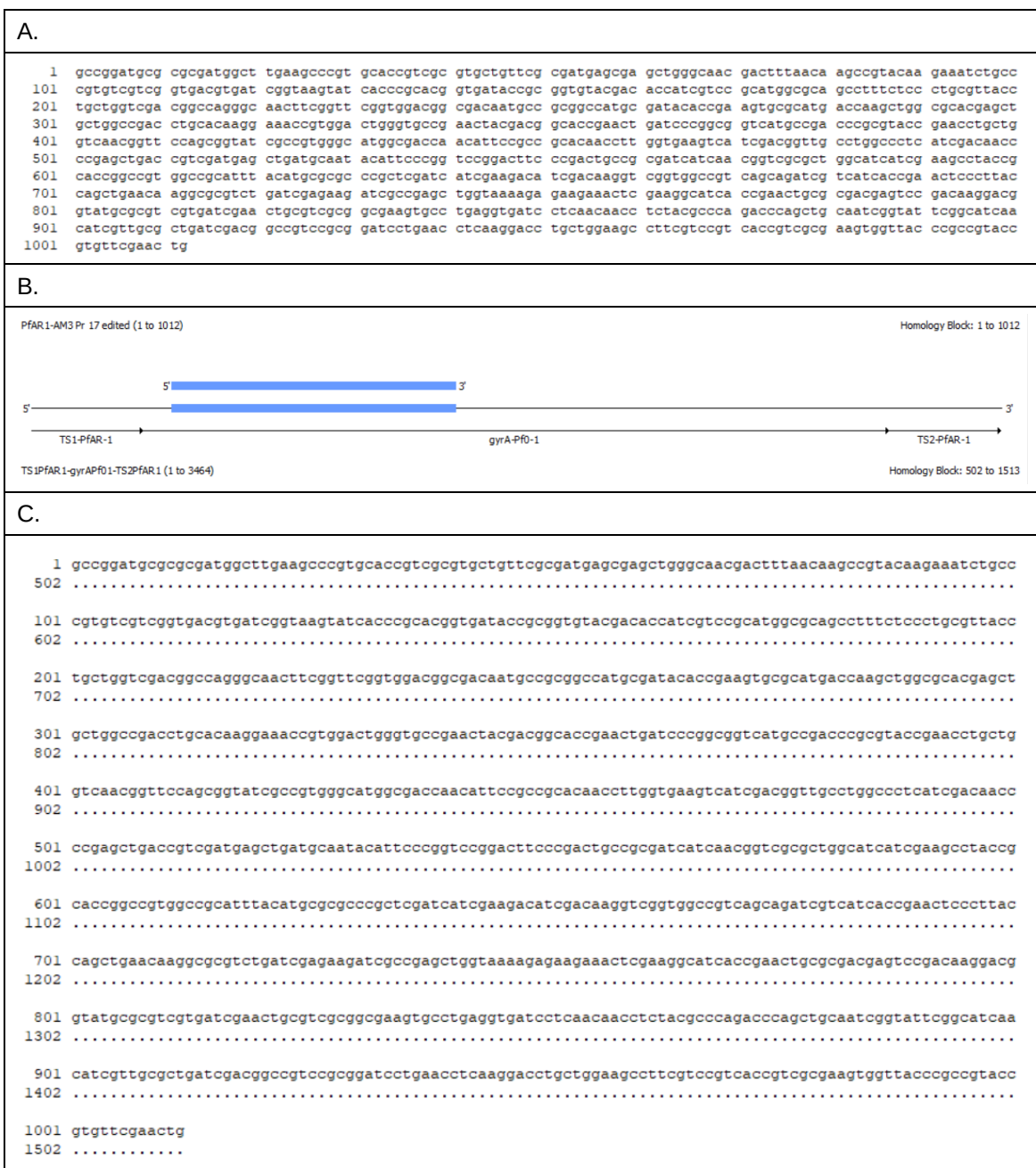


Abbildung A11. Sequenzierung der *PfAR*-1-*gyrA*-Austauschmutante 3 mit dem Primer 17. Der sequenzierte Abschnitt des *gyrA*-Genes mit dem Primer 17 (A) liegt am 5'-Ende des *gyrA*_{Pf0-1}-Genes (B) und (C) stimmt mit der Sequenz überein.



Abbildung A12. Sequenzierung der *PfAR-1-gyrA*-Austauschmutante 3 mit dem Primer 12. Der sequenzierte Abschnitt des *gyrA*-Genes mit dem Primer 12 (A) liegt am 3'-Ende des *gyrA*_{Pf0-1}-Genes (B) und (C) stimmt die Sequenz überein.

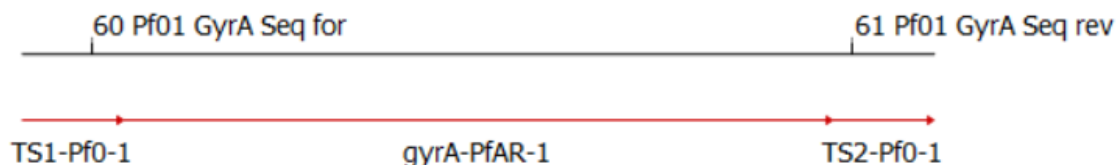


Abbildung A13. Die *Pf0-1-gyrA*-Austauschmutanten wurden im Bereich TS1_{Pf0-1}-*gyrA*_{PfAR-1}-TS2_{Pf0-1} mit den zwei Primern 60 (am 5'-Ende) und 61 (am 3'-Ende) teilweise sequenziert.



Abbildung A14. Sequenzierung der *Pf0-1-gyrA*-Austauschmutante 1 mit dem Primer 60. Der sequenzierte Abschnitt des *gyrA*-Genes mit dem Primer 60 (A) liegt am 5'-Ende des *gyrA*_{PfAR-1}-Genes (B) und (C) stimmt die Sequenz überein.

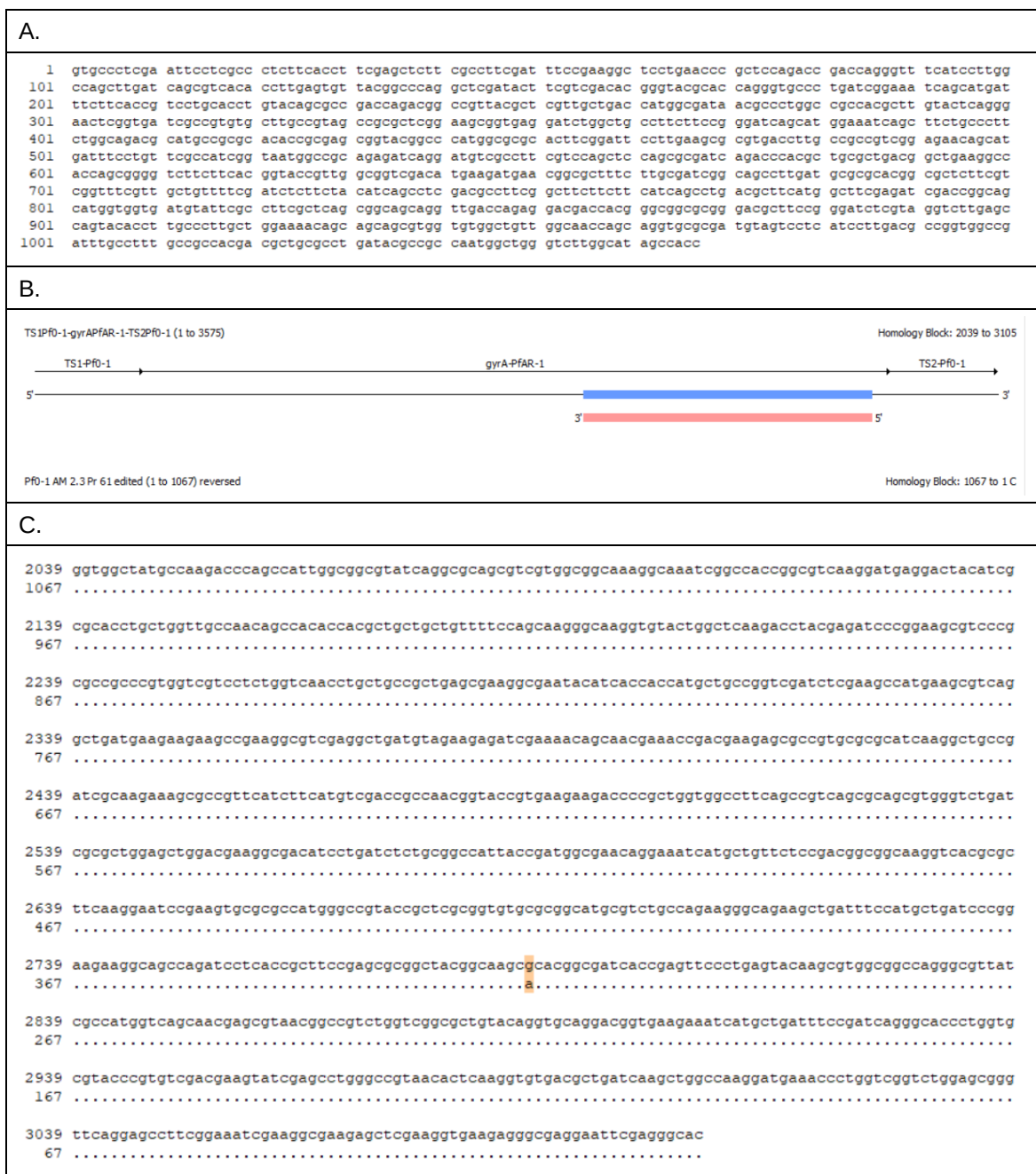


Abbildung A15. Sequenzierung der Pf0-1-gyrA-Austauschmutante 1 mit dem Primer 61. Der sequenzierte Abschnitt des *gyrA*-Genes mit dem Primer 61 (A) liegt am 3'-Ende des *gyrA*_{PfAR-1}-Genes (B) und (C) es kam zu einem Nukleotid-Austausch von Guanin₂₃₈₇ zu Adenin. Diese Mutation führt zum Aminosäureaustausch Histidin statt Arginin (Arg₇₉₆His).

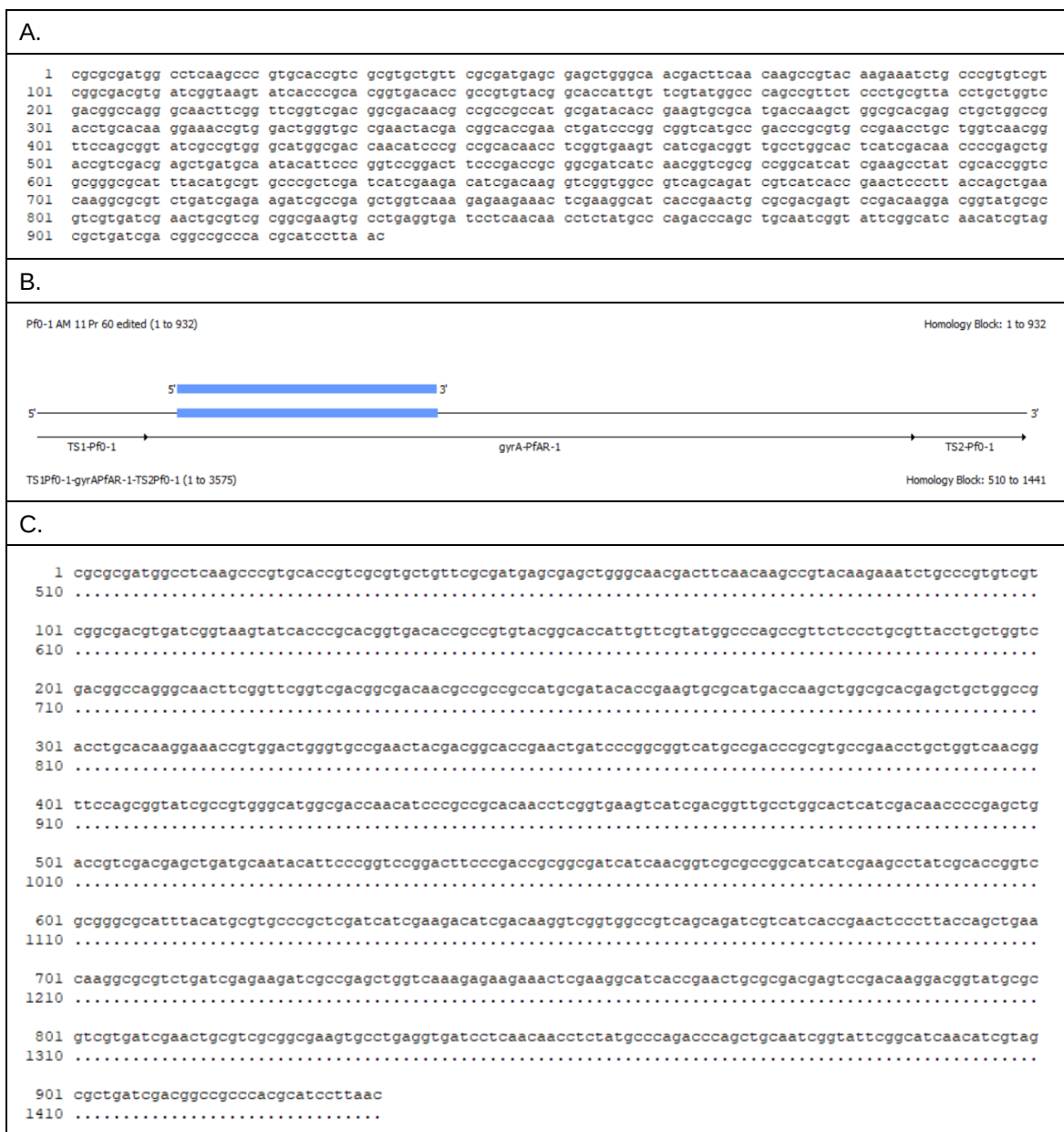


Abbildung A16. Sequenzierung der *Pf0-1-gyrA*-Austauschmutante 2 mit dem Primer 60. Der sequenzierte Abschnitt des *gyrA*-Genes mit dem Primer 60 (A) liegt am 5'-Ende des *gyrA^{PfAR-1}*-Genes (B) und (C) stimmt die Sequenz überein.



Abbildung A17. Sequenzierung der *Pf0-1-gyrA*-Austauschmutante 2 mit dem Primer 61. Der sequenzierte Abschnitt des *gyrA*-Genes mit dem Primer 61 (A) liegt am 3'-Ende des *gyrA_{PIAR-1}*-Genes (B) und (C) es kam zu einem Nukleotid-Austausch von Gyanin₂₃₈₇ zu Adenin. Diese Mutation führt zum Aminosäureaustausch Histidin statt Arginin (Arg₇₉₆His).



Abbildung A18. Sequenzierung der *Pf0-1-gyrA*-Austauschmutante 3 mit dem Primer 60. Der sequenzierte Abschnitt des *gyrA*-Genes mit dem Primer 60 (A) liegt am 5'-Ende des *gyrA_{PfAR-1}*-Genes (B) und (C) stimmt die Sequenz überein.

A.

1	gcgtcacacc	ttgagtgta	cgcccaggc	tgcatacttc	gtcgacacgg	gtacgcacca	gggtgccctg	atcgaaatc	agcatgattt	cttcaccgtc
101	ctgcacctgt	acagcgccga	ccagacggcc	gttacgctcg	ttgctgacca	tggcgataac	gcccctggccg	ccacgcttgt	actcagggaa	ctcggtgac
201	gcogtgtgct	tgcggtagcc	gcgctcggaa	ggggtgagga	tctggtctgoc	ttcttccggg	atcagcatgg	aaatcagctt	ctgcccctct	ggcagacgca
301	tgcgcgcac	accgcgagcg	gtacggccca	tggcgcgcac	ttcggtattcc	ttgaagcgcg	tgacotttgcc	gocgtcggag	aacagcatga	tttctctgtc
401	gccatcggt	atggccgcag	agatcaggat	gtcgccctcg	tccagctcca	gocgcatcag	acccacgctg	cgctgacggc	tgaaggccac	cagcggggtc
501	ttcttcacgg	taccgttggc	ggtcgacatg	aagatgaacg	gcgctttctt	gcgatcggca	gccttgatgc	gocgacggcg	ctcttcgctg	gtttcgttgc
601	tgttttcgat	ctctttctaca	tcagcctoga	cgccttcggc	ttctttcttca	tcagcctgac	gcttcatggc	ttcgagatcg	accggcagca	tgggtgtgat
701	gtatttcgct	tcgctcagcg	gcagcaggtt	gaccagagga	cgaccacggg	cggcgcgggg	cgtctccggg	atctcgttag	tctttgagcca	gtacaccttg
801	cccttgctgg	aaaacagcag	cagcg							

B.

TS1-Pf0-1-*gyrA*-TS2-Pf0-1 (1 to 3575)

Homology Block: 2169 to 2993

5' 3'

Pf0-1-AM-17 Pr 61 edited (1 to 825) reversed

Homology Block: 825 to 1 C

C.

2169	cgctgctgctgttttccagcaagggcaaggtgtactggctcaagacctacagatccccgaagcgtcccgcgccgcccgtggtcgctcctctggtcaacct
825	
2269	gctgcccgtgagcggaaggcgaatacatcaccaccatgctgcccgtcgatctcgaagccatgaagcgtcagggtgatgaagaagaagccgaaggcgtcgag
725	
2369	gctgatgtagaagagatcgaaaaacagcaacgaaacgcgaagagcgccgtgcccgcgatcaaggctgcccgatcgcaagaagcgccgttcattctcatgt
625	
2469	cgaccgccaacggtagcgtgaagaagaccccgctggtggccttcagccgtcagcgagcgtgggtctgatcgcgctggagctggacgaaggcgacatcct
525	
2569	gatctctgcggccattaccgatggcgaacaggaaatcatgctgttctccgacggcggaagggtcacgcgcttcaaggaaatccgaagtgcgcgccatgggg
425	
2669	cgtaaccgctcgcgggtgtgcgcggcatgcgtctgccagaagggcagaagctgatttccatgctgatccccgaagaaggcagccagatcctcaccgcttcog
325	
2769	agcgcggctacggcaagcgacggcgatcaccaggttcctctgagtaacaagcgtggcgccaggcggtatcgccatggtcagcaacgagcgttaacggcg
225	
2869	tctggtcggcgctgtacaggtgcaggacggtgaagaaatcatgctgatttccgatcagggcaccctgggtcggtaccgctgtcgacgaagtatcgagcgtg
125	
2969	ggcgcgtaacactcaaggtgtgacgc
25	

Abbildung A19. Sequenzierung der *Pf0-1-gyrA*-Austauschmutante 3 mit dem Primer 61. Der sequenzierte Abschnitt des *gyrA*-Genes mit dem Primer 61 (A) liegt am 3'-Ende des *gyrA_{PfAR-1}*-Genes (B) und (C) es kam zu einem Nukleotid-Austausch von Gyanin₂₃₈₇ zu Adenin. Diese Mutation führt zum Aminosäureaustausch Histidin statt Arginin (Arg₇₉₆His).

3. *Intergenic spacer* Region (16S–23S rRNA Gene) der *gyrA*-Austauschmutanten sowie Wildtypen von *Pf0*-1 und *PfAR*-1 (Primerpaar 21 & 22)

A.	
1	ttacttcaga agcagtagtg gtggagccaa gcgggatcga accgctgacc tctgcgtgc aaggcaggcg ctctcccagc tgagctatgg ccccgatatt
101	ctacaggcgt ttcccacaca aaattgggtg gtctgggcag attcgaactg ccgacctcac ccttatcagg ggtgcgctct aaccaactga gctacagacc
201	caatttcggg ctgcttcttt cgtcttcttc aatgaatcaa gcaattcgtg tgggaactta tggagcagct gatgtcgtcg attaaggagg tgatccagcc
301	gcaggttccc ctacggct
B.	
1	attgcgcgaa aattcgaatt tctcaactaa gagaactcac aaattttacc ttagcctgat ccgttaccag tgaaagtaac gttcagtcta tctttctatc
101	acatacccaa atttttaag aacgatctaa tcaaaagact agaaatcaat attctctcgg aatattcatt tctaagcttt cagaagcagt ttatatggtg
201	gagccaagcg ggatcgaacc gctgacctcc tgcgtgcaag gcaggcgctc tcccagctga gctatggccc cataacaaaa ttggtgggtc tgggcagatt
301	cgaactgcgg acctcacctc tatcaggggt gcgctctaac caactgagct acagacccaa ttctgagcgc gtaactgtta gcctggagct atcagcttgg
401	agcttaaacg tgcttctatc gtcttcttca atgaatcaag caattcgtgt gggagctcat gcagcagctg atgtcgtcga ttaaggaggt gatccagccc
501	caggttcccc tacggcta
C.	
5	ttcagaagcag--ta-gtgggtggagccaagcgggatcgaaccgctgacctcctgcgtgcaaggcaggcgctctcccagctgagctatggcccgct----att--t--ct
179	tt..ta.....a.aacaa.a.tgggtggg
103	acaggc--gtttccac-acaaaaat--tggtgggtctgggcag-attcgaa-ctgcgcgact-ca-ccttatcagggggtgcg-ctctaaccaact-gagcta-cag-ac
289	t..t..gca.a...ga..tg..cg..cctcacctta..a...gt..cgc..t...c..aa..t...g..a..ga..ca..ttc..a..c...taa..gttagc..g.....t...ctt
200	ccaatttcgggctgcttcttctgcttcttcaatgaatcaagcaattcgtgtgggaacttatggagcagctgatgtcgtcgattaaggaggtgatccagccgcaggttcc
399	gg.gc..aaa.....a.....g..c..c.....
310	cctacggct
509	

Abbildung A20. Sequenzierung von *intergenic spacer* Region (16S–23S rRNA Gene) von *Pf0*-1- (A) und *PfAR*-1-Wildtypen (B). Die Sequenzen sind zu 74% identisch (C).

A.	
1	ttacttcaga agcagtagtg gtggagccaa gcgggatcga accgctgacc tctgcgtgc aaggcaggcg ctctcccagc tgagctatgg ccccgatatt
101	ctacaggcgt ttcccacaca aaattgggtg gtctgggcag attcgaactg ccgacctcac ccttatcagg ggtgcgctct aaccaactga gctacagacc
201	caatttcggg ctgcttcttt cgtcttcttc aatgaatcaa gcaattcgtg tgggaactta tggagcagct gatgtcgtcg attaaggagg tgatccagcc
301	gcaggttccc ctacggct
B.	
88	agccgtaggggaacctgcggctggatcacctccttaatcgacgacatcagctgctccataagttcccacacgaattgcttgattcattgaagaagacgaa
318	
188	agaagcagcccgaattgggtctgtagctcagttggttagagcgcacccctgataaggggtgaggtcggcagttcgaatctgccagaccaccaatatttg
218	
288	tgtgggaaacgcctgtagaaatacggggccatagctcagctgggagagcgcctgccttgacgcagagaggtcagcggttcgatcccgccttggtccacca
118	
388	ctactgcttctgaagtaa
18	

Abbildung A21. Sequenzierung von *intergenic spacer* Region (16S–23S rRNA Gene) des *Pf0*-1-Wildtyps. Die Sequenz (A) ist zu 100% identisch mit der verwendeten Sequenz von *Pf0*-1-WT (B).

A.	
1	cgatggaatg ctcatttcta agctnttact tcagaagcag tantggtgga gccaagcggg atcgaaccgc tgacctcctg cgtgcaaggc aggcgctctc
101	ccagctgagc tatggcccg tatttctaca ggcgtttccc acacaaaatt ggtgggtctg ggcagattcg aactgccgac ctcaccotta tcaggggtgc
201	gctctaacca actganctac agaccgaatt tcgggctgct tctttcgtct tcttcaatga atcaagcaat tcgtgtggga acttatggag canctgatgt
301	cntcgattaa ggaggtgatc cagccgcagg ttcccctacg gcta
B.	
87	tagcgtaggggaacctgcggctggatcacctccttaatcgacgacatcagctgctccataagttcccacacgaattgcttgattcattgaagaagacga
344	n.....n.....
187	aagaagcagcccgaaattgggtctgtagctcagttgggttagagcgcacccctgataagggtgaggtcggcagttcgaatctgccagaccaccaatttt
244	n.....
287	gtgtgggaaacgcctgtagaaatacggggccatagctcagctgggagagcgcctgccttgacgcaggaggtcagcggttcgatcccgcttggtccacc
144	
387	actactgcttctgaagtaaaagcttagaaatgagcattccatcg
44	.n.....n.....

Abbildung A22. Sequenzierung von *intergenic spacer* Region (16S–23S rRNA Gene) der *gyrA*-Austauschmutanten *Pf0*-1-AM-1. Die Sequenz (A) ist zu 98% identisch mit der von *Pf0*-1-WT (B), da 5 Nukleotide nicht identifiziert wurden.

A.	
1	tcaacgatgg aatgctcatt tctaagcttt tacttcagaa gcagtagtgg tggagccaag cgggatcgaa ccgctgacct cctgcgtgca aggcaggcgc
101	tctcccagct gagctatggc ccggtatttc tacaggogtt tcccacacaa aattgggtggg tctgggcaga ttogaactgc cgacctcacc cttatcaggg
201	gtgcgtctta accaactgag ctacagaccc aatttcgggg tgcttctttc gtcttcttca atgaatcaag caattcgtgt gggaacttat ggagcagctg
301	atgtcgtcga ttaaggaggt gatccagccg caggttcccc tacggc
B.	
89	gocgtaggggaacctgcggctggatcacctccttaatcgacgacatcagctgctccataagttcccacacgaattgcttgattcattgaagaagacgaaa
346	
189	gaagcagcccgaaattgggtctgtagctcagttgggttagagcgcacccctgataagggtgaggtcggcagttcgaatctgccagaccaccaattttgt
246	
289	gtgggaaacgcctgtagaaatacggggccatagctcagctgggagagcgcctgccttgacgcaggaggtcagcggttcgatcccgcttggtccaccac
146	
389	tactgcttctgaagtaaaagcttagaaatgagcattccatcggtga
46	

Abbildung A23. Sequenzierung von *intergenic spacer* Region (16S–23S rRNA Gene) der *gyrA*-Austauschmutanten *Pf0*-1-AM-2. Die Sequenz (A) ist zu 100% identisch mit der von *Pf0*-1-WT (B).

A.	
1	cgatggaatg ctcatttcta agcttttact tcagaagcag tagtgggtgga gccaagcggg atcgaaccgc tgacctcctg cgtgcaaggc aggcgctctc
101	ccagctgagc tatggcccg tatttctaca ggcgtttccc acacaaaatt ggtgggtctg ggcagattcg aactgccgac ctcaccotta tcaggggtgc
201	gctctaacca actgagctac agaccgaatt tcgggctgct tctttcgtct tcttcaatga atcaagcaat tcgtgtggga acttatggag cagctgatgt
301	cgtcgattaa ggaggtgatc cagccgcagg ttcccctacg gca
B.	
89	gocgtaggggaacctgcggctggatcacctccttaatcgacgacatcagctgctccataagttcccacacgaattgcttgattcattgaagaagacgaaa
342	
189	gaagcagcccgaaattgggtctgtagctcagttgggttagagcgcacccctgataagggtgaggtcggcagttcgaatctgccagaccaccaattttgt
242	
289	gtgggaaacgcctgtagaaatacggggccatagctcagctgggagagcgcctgccttgacgcaggaggtcagcggttcgatcccgcttggtccaccac
142	
389	tactgcttctgaagtaaaagcttagaaatgagcattccatcg
42	

Abbildung A24. Sequenzierung von *intergenic spacer* Region (16S–23S rRNA Gene) der *gyrA*-Austauschmutanten *Pf0*-1-AM-3. Die Sequenz (A) ist zu 100% identisch mit der von *Pf0*-1-WT (B).

A.	
1	atttcgacgaa aattcgaatt tctcaactaa gagaactcac aaattttacc ttagcctgat ccgttaccag tgaagtaac gttcagctca tctttctatc
101	acatacccaa atttttaaag aacgatctaa tcaaaagact agaaatcaat attctctcgg aatattcatt tctaagcttt cagaagcagt ttatatgggtg
201	gagccaagcg ggaatcgaacc gctgacctcc tgcgtgcaag gcaggcgctc tcccagctga gctatggccc cataacaaaa ttgggtgggtc tgggcagatt
301	cgaactgcgc acctcacctc tatcaggggt gcgctctaac caactgagct acagacccaa ttccgagcgc gtaactgtta gcctggagct atcagcttgg
401	agcttaaacg tgcctctatc gtctctttca atgaatcaag caattcgtgt gggagctcat gcagcagctg atgtcgtoga ttaaggaggt gatccagcgc
501	cagggtcccc tacggcta
B.	
274	atttcgacgaaattcgaatttctcaactaagagaactcacaaattttaccttagcctgacccgttaccagtgaaagtaacgttcagctctatctttctatcacatacccaa
1	
384	atttttaaagaacgatctaatacaaaagactagaaatcaatattctctcggaaatattcatttctaagctttcagaagcagtttatatgggtggagccaagcgggatcgaacc
111	
494	gctgacctcctgcgtgcaaggcaggcgctctcccagctgagctatggccccataacaaaatttgggtgggtctgggcagattcgaactgccgacctcaccttatcaggggt
221	
604	gcgctctaaccaactgagctacagacccaatttcgagcgcgtaactgttagcctggagctatcagcttggagcttaaaagctgcttctatcgtcttcttcaatgaatcaag
331	
714	caattcgtgtgggagctcatgcagcagctgatgcgtcgattaaggaggtgatccagccgcaggttccctacggcta
441	

Abbildung A25. Sequenzierung von *intergenic spacer* Region (16S–23S rRNA Gene) des *PfAR*-1-Wildtyps. Die Sequenz (A) ist zu 100% identisch mit der verwendeten Sequenz von *PfAR*-1-WT (B).

A.	
1	gcaatctggt tatactgtga agacgacatt cgcgaaaaat tcgaatttct caactaagag aactcacaaa tttacotta gcctgatccg ttaccagtga
101	aagtaacgtt cagtcctatct ttctatcaca taccacaaatt tttaaagaac gatctaataa aaagactaga aatcaatatt ctctcggaat attcatttct
201	aagctttcag aagcagttta tatggtggag ccaagcggga tcgaacgcgt gacctcctgc gtgcaaggca ggcgctctcc cagctgagct atggcccat
301	aacaaaattg gtgggtctgg gcagattcga actgcgcacc tcaccottat caggggtgct ctctaaccac ctgagctaca gacccaattt cgagcgcgta
401	actgttagcc tggagctatc agcttggagc ttaaagctgc ttctatcgtc ttcttcaatg aatcaagcaa ttctgtgtgg agctcatgca gcagctgatg
501	tcgtcgatta aggaggtgat ccagccgcag gt
B.	
247	gcaatctggttatactgtgaagacgacattcgcgaaaaattcgaatttctcaactaagagaactcacaaattttaccttagcctgacccgttaccagtga
1	
347	aagtaacgttcagtcctatctttctatcacatacccaaatttttaaagaacgatctaatacaaaagactagaaatcaatattctctcggaaatattcatttct
101	
447	aagctttcagaagcagtttatatggtggagccaagcgggatcgaaccgctgacctcctgcgtgcaaggcaggcgctctcccagctgagctatggcccat
201	
547	aacaaaatttgggtgggtctgggcagattcgaactgccgacctcaccttatcaggggtgctgctctaaccaactgagctacagacccaatttcgagcgcgta
301	
647	actgttagcctggagctatcagcttggagcttaaaagctgcttctatcgtcttcttcaatgaatcaagcaattcgtgtgggagctcatgcagcagctgatg
401	
747	tcgtcgattaaggaggtgatccagccgcaggt
501	

Abbildung A26. Sequenzierung von *intergenic spacer* Region (16S–23S rRNA Gene) der *gyrA*-Austauschmutanten *PfAR*-1-AM-1. Die Sequenz (A) ist zu 100% identisch mit der von *PfAR*-1-WT (B).

A.	
1	ctggttatac tgtgaagacg acattgcgcg aaaattcgaa tttctcaact aagagaactc acaaatttta ccttagcctg atccgttacc agtgaaagta
101	acgttcagtc tatctttcta tcacataccc aaatttttaa agaacgatct aatcaaaaga ctagaatca atattctctc ggaatattca tttctaagct
201	ttcagaagca gtttatatgg tggagccaag cgggatcgaa cgcctgacct cctgcgtgca aggcaggcgc tctcccagct gagctatggc cccataacaa
301	aattgggtggg tctgggcaga ttcgaaactgc cgacctcacc cttatcaggg gtgcgctcta accaactgag ctacagaccc aatttcgagc gcgtaaactgt
401	tagcctggag ctatcagctt ggagcttaaa gctgcttcta tcgtcttctt caatgaatca agcaattcgt gtgggagctc atg
B.	
252	ctggttatactgtgaagacgacattcgcgaaaattcgaattttctcaactaagagaactcacaattttaccttagcctgatccgttaccagtgaagta
1	
352	acgttcagtcctatctttctatcacatacccaaatttttaagaacgatctaatacaaaagactagaaatcaatattctctcggaatattcatttctaagct
101	
452	ttcagaagcagtttatatggtggagccaagcgggatcgaaccgctgacctcctgcgtgcaaggcaggcgcctctcccagctgagctatggcccccataacaa
201	
552	aattgggtgggtctgggcagattcgaaactgccgacctcaccccttatcaggggtgcgctctaaccaactgagctacagacccaatttcgagcgcgtaactgt
301	
652	tagcctggagctatcagcttggagcttaaaagctgcttctatcgtcttcttcaatgaatcaagcaattcgtgtgggagctcatg
401	

Abbildung A27. Sequenzierung von *intergenic spacer* Region (16S–23S rRNA Gene) der *gyrA*-Austauschmutanten *PfAR*-1-AM-2. Die Sequenz (A) ist zu 100% identisch mit der von *PfAR*-1-WT (B).

A.	
1	agcaatctgg ttatactgtg aagacgacat tcgccgaaaa ttogaatttc tcaactaaga gaactcacia attttacctt agcctgatcc gttaccagtg
101	aaagtaacgt tcagtcctatc tttctatcac atacccaaatt ttttaagaa cgaatcaatc aaaagactag aaatcaatat tctctoggaa tattcatttc
201	taagctttca gaagcagttt atatggtgga gccaaagcggg atcgaaccgc tgacctcctg cgtgcaaggc aggcgctctc ccagctgagc tatggcccca
301	taacaaaatt ggtgggtctg ggcagattcg aactgcgcac ctcaccctta tcaggggtgc gctctaacca actgagctac agaccaat tcgagcgcgt
401	aactgttagc ctggagctat cagcttggag cttaaagctg cttctatcgt cttcttcaat gaatcaagca attcgtgtgg gagtcatg
B.	
246	agcaatctgggttatactgtgaagacgacattcgcgaaaattcgaattttctcaactaagagaactcacaattttaccttagcctgatccgttaccagtg
1	
346	aaagtaacgttcagtcctatctttctatcacatacccaaatttttaagaacgatctaatacaaaagactagaaatcaatattctctcggaatattcatttc
101	
446	taagctttcagaagcagtttatatggtggagccaagcgggatcgaaccgctgacctcctgcgtgcaaggcaggcgcctctcccagctgagctatggcccca
201	
546	taacaaaattggtgggtctgggcagattcgaaactgccgacctcaccccttatcaggggtgcgctctaaccaactgagctacagacccaatttcgagcgcgt
301	
646	aactgttagcctggagctatcagcttggagcttaaaagctgcttctatcgtcttcttcaatgaatcaagcaattcgtgtgggagctcatg
401	

Abbildung A28. Sequenzierung von *intergenic spacer* Region (16S–23S rRNA Gene) der *gyrA*-Austauschmutanten *PfAR*-1-AM-3. Die Sequenz (A) ist zu 100% identisch mit der von *PfAR*-1-WT (B).

Anfälligkeit der GyrA-Austauschmutanten *Pf0-1_{gyrAPfAR-1}* und *PfAR-1_{gyrAPf0-1}* gegenüber Allicin und anderen Antibiotika

Tabelle A16. Untersuchung der Allicin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit *Pf0-1* und *PfAR-1*-Gyrase-Austausch-Mutanten. Es wurden 20 µl 60 mM Allicin (195 µg) in ein Loch im Agar mit dem Durchmesser 6 mm appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einem Experiment (n=9) mit Standardabweichung (StAbw.).

Replikant	Hemmhof-Durchmesser (mm)								
	<i>Pf0-1</i> WT	<i>Pf0-1</i> AM-1	<i>Pf0-1</i> AM-2	<i>Pf0-1</i> AM-3	<i>Pf0-1</i> _{pEMG} 5.1	<i>PfAR-1</i> WT	<i>PfAR-1</i> AM-1	<i>PfAR-1</i> AM-2	<i>PfAR-1</i> AM-3
1.	15	19	18	17	16	7	8	9	9
2.	16	16	20	18	15	8	9	8	9
3.	16	17	19	17	17	8	9	8	9
4.	15	16	19	17	15	8	8	9	7
5.	14	18	18	19	17	7	9	9	7
6.	15	17	20	19	19	7	8	9	9
7.	16	17	17	17	16	7	8	8	8
8.	16	17	17	18	15	8	8	8	9
9.	16	18	20	17	18	8	9	9	9
Mittelwert	15,4	17,2	18,7	17,7	16,4	7,6	8,4	8,6	8,4
StAbw.	0,7	1,0	1,2	0,9	1,4	0,5	0,5	0,5	0,9

Tabelle A17. Statistische Analyse der Ergebnisse zur Untersuchung der Allicin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit *Pf0-1* und *PfAR-1*-Gyrase-Austausch-Mutanten mittels Einweg-ANOVA-Tukey's Test. Ergebnisse mit dem $p \leq 0,05$ (*) sind signifikant, $p \leq 0,01$ (**) sind sehr signifikant und $p \leq 0,001$ (***) sind hoch signifikant.

	Signifikanz		Signifikanz
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>Pf0-1</i> AM-1	***	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> WT	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>Pf0-1</i> AM-2	***	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>Pf0-1</i> AM-3	***	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> WT	***	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> WT	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>Pf0-1</i> AM-2	**	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>Pf0-1</i> AM-3	ns	<i>PfAR-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-1	ns
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> WT	***	<i>PfAR-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-2	ns
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***	<i>PfAR-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-3	ns
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***	<i>PfAR-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	ns
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***	<i>PfAR-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	ns
<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>Pf0-1</i> AM-3	ns	<i>PfAR-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	ns

Tabelle A18. Untersuchung der Nalidixinsäure-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit *Pf0-1* und *PfAR-1*-Gyrase-Austausch-Mutanten. Es wurden 20 µl 60 mM Nalidixinsäure (305 µg) in ein Loch im Agar mit dem Durchmesser 6 mm appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (n=16-19) mit Standardabweichung (StAbw.).

	Replik	Hemmhof-Durchmesser (mm)								
		<i>Pf0-1</i> WT	<i>Pf0-1</i> AM-1	<i>Pf0-1</i> AM-2	<i>Pf0-1</i> AM-3	<i>Pf0-1</i> pEMG 5.1	<i>PfAR-1</i> WT	<i>PfAR-1</i> AM-1	<i>PfAR-1</i> AM-2	<i>PfAR-1</i> AM-3
1. Experiment	1.	29	10	6	7	32	-	-	27	38
	2.	26	8	-	9	33	-	33	26	35
	3.	29	11	-	6	29	-	34	26	36
	4.	28	11	8	7	31	19	40	26	32
	5.	29	10	6	6	27	19	34	26	33
	6.	28	11	6	6	39	17	34	25	31
	7.	26	10	6	6	32	15	33	25	34
	8.	26	10	-	6	30	18	34	24	-
	9.	27	11	6	6	29	17	34	23	-
2. Experiment	1.	25	10	8	9	22	15	21	23	28
	2.	28	9	9	10	26	14	24	23	26
	3.	34	10	8	9	23	14	29	24	30
	4.	33	10		10	28	15	25	22	28
	5.	33	9	9	9	26	15	28	24	27
	6.	25	10	10	10	24	18	30	23	27
	7.	33	11	9	9	26	16	27	23	29
	8.	31	9	10	9	28	16	28	24	27
	9.	31	10	6	10	26	16	22	22	29
	10.	29	11	9	9	26	15	17	23	30
Mittelwert		28,9	10,1	7,7	8,1	28,5	16,2	29,3	24,2	30,6
StAbw.		2,9	0,8	3,3	1,6	4,0	6,2	8,8	1,5	10,2

Tabelle A19. Statistische Analyse der Ergebnisse zur Untersuchung der Nalidixinsäure-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit *Pf0-1* und *PfAR-1*-Gyrase-Austausch-Mutanten mittels Einweg-ANOVA-Tukey's Test. Ergebnisse mit dem $p \leq 0,05$ (*) sind signifikant, $p \leq 0,01$ (**) sind sehr signifikant und $p \leq 0,001$ (***) sind hoch signifikant.

	Signifikanz		Signifikanz
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>Pf0-1</i> AM-1	***	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> WT	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>Pf0-1</i> AM-2	***	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>Pf0-1</i> AM-3	***	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> WT	***	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-1	ns	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> WT	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-3	ns	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>Pf0-1</i> AM-2	ns	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>Pf0-1</i> AM-3	ns	<i>PfAR-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> WT	***	<i>PfAR-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***	<i>PfAR-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***	<i>PfAR-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***	<i>PfAR-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	ns
<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>Pf0-1</i> AM-3	ns	<i>PfAR-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***

Tabelle A20. Untersuchung der Novobiocin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit *Pf0-1* und *PfAR-1*-Gyrase-Austausch-Mutanten. Es wurden 20 µl 60 mM Novobiocin (762 µg) in ein Loch im Agar mit dem Durchmesser 6 mm appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (n=15-20) mit Standardabweichung (StAbw.).

	Replik	Hemmhof-Durchmesser (mm)								
		<i>Pf0-1</i> WT	<i>Pf0-1</i> AM-1	<i>Pf0-1</i> AM-2	<i>Pf0-1</i> AM-3	<i>Pf01_{pEM}</i> G 5.1	<i>PfAR-1</i> WT	<i>PfAR-1</i> AM-1	<i>PfAR-1</i> AM-2	<i>PfAR-1</i> AM-3
1. Experiment	1.	17	13	17	13	25	20	23	17	-
	2.	17	13	16	12	24	21	24	16	19
	3.	18	12	11	12	22	17	20	16	22
	4.	17	11	15	12	24	22	23	17	18
	5.	17	13	15	13	23	23	23	17	22
	6.	17	13	14	13	21	-	21	16	20
	7.	18	13	15	8	23	-	20	17	23
	8.	17	15	14	11	22	-	19	17	22
	9.	17	15	-	12	25	-	-	17	25
	10.					22				
2. Experiment	1.	15	12	14	10	17	16	16	14	17
	2.	18	16	12	12	19	19	14	14	16
	3.	24	17	11	13	20	15	17	15	17
	4.	23	16	14	12	20	16	14	14	16
	5.	21	15	13	11	18	16	16	16	16
	6.	16	13	14	13	16	17	17	15	17
	7.	19	16	12	14	17	17	16	15	18
	8.	21	16	13	13	19	17	15	16	15
	9.	22	15	15	11	16	18	15	13	15
	10.	17	17	15	12	18	15	14	15	18
Mittelwert		18,5	14,3	13,9	11,9	20,6	17,9	18,2	15,6	18,7
Stabw.		2,5	1,8	3,6	1,4	3,0	7,8	5,4	1,3	5,2

Tabelle A21. Statistische Analyse der Ergebnisse zur Untersuchung der Novobiocin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit *Pf0-1* und *PfAR-1*-Gyrase-Austausch-Mutanten mittels Einweg-ANOVA-Tukey's Test. Ergebnisse mit dem $p \leq 0,05$ (*) sind signifikant, $p \leq 0,01$ (**) sind sehr signifikant und $p \leq 0,001$ (***) sind hoch signifikant.

	Signifikanz		Signifikanz
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>Pf0-1</i> AM-1	***	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> WT	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>Pf0-1</i> AM-2	***	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>Pf0-1</i> AM-3	***	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	ns
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> WT	ns	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-1	ns	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> WT	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-2	**	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-3	ns	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>Pf0-1</i> AM-2	ns	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>Pf0-1</i> AM-3	*	<i>PfAR-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-1	ns
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> WT	***	<i>PfAR-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-2	ns
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***	<i>PfAR-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-3	ns
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	ns	<i>PfAR-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	*
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***	<i>PfAR-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	ns
<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>Pf0-1</i> AM-3	ns	<i>PfAR-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	**

Tabelle A22. Untersuchung der Levofloxacin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit *Pf0-1* und *PfAR-1*-Gyrase-Austausch-Mutanten. Es wurden 20 µl 60 mM Levofloxacin (434 µg) in ein Loch im Agar mit dem Durchmesser 6 mm appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (n=15-18) mit Standardabweichung (StAbw.).

	Replik	Hemmhof-Durchmesser (mm)								
		<i>Pf0-1</i> WT	<i>Pf0-1</i> AM-1	<i>Pf0-1</i> AM-2	<i>Pf0-1</i> AM-3	<i>Pf01_{pEM}</i> G 5.1	<i>PfAR-1</i> WT	<i>PfAR-1</i> AM-1	<i>PfAR-1</i> AM-2	<i>PfAR-1</i> AM-3
1. Experiment	1.	40	38	39	38	48	44	50	42	-
	2.	39	37	40	39	48	47	49	42	43
	3.	41	35	42	40	45	46	45	46	48
	4.	44	36	40	39	48	45	48	49	49
	5.	43	38	40	38	46	48	48	43	49
	6.	42	35	39	39	44	48	50	43	46
	7.	43	36	38	38	49	-	48	46	52
	8.	39	36	37	41	46	-	48	45	49
	9.	40	37	40	37	48	-	51	46	50
2. Experiment	1.	37	37	40	37	41	42	40	42	45
	2.	39	41	38	39	42	43	39	42	44
	3.	44	38	38	40	42	38	40	42	46
	4.	42	39	41	41	41	41	39	43	44
	5.	44	39	39	38	41	39	39	41	44
	6.	40	34	40	40	40	42	41	43	45
	7.	46	39	38	40	40	42	41	43	44
	8.	47	41	40	40	41	41	42	41	43
	9.	44	41	43	38	45	43	41	43	44
Mittelwert		41,9	37,6	39,6	39,0	44,2	43,3	44,4	43,4	46,2
Stabw.		2,7	2,1	1,5	1,2	3,2	16,8	4,5	2,1	11,2

Tabelle A23. Statistische Analyse der Ergebnisse zur Untersuchung der Levofloxacin-Anfälligkeit mittels Hemmhof-Tests mit *Pf0-1* und *PfAR-1*-Gyrase-Austausch-Mutanten mittels Einweg-ANOVA-Tukey's Test. Ergebnisse mit dem $p \leq 0,05$ (*) sind signifikant, $p \leq 0,01$ (**) sind sehr signifikant und $p \leq 0,001$ (***) sind hoch signifikant.

	Signifikanz		Signifikanz
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>Pf0-1</i> AM-1	***	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> WT	**
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>Pf0-1</i> AM-2	ns	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>Pf0-1</i> AM-3	*	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> -WT	ns	<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-1	ns	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> WT	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-2	ns	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***
<i>Pf0-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>Pf0-1</i> AM-2	ns	<i>Pf0-1</i> AM-3 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>Pf0-1</i> AM-3	ns	<i>PfAR-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-1	ns
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> WT	***	<i>PfAR-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-2	ns
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-1	***	<i>PfAR-1</i> WT vs <i>PfAR-1</i> AM-3	ns
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	***	<i>PfAR-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-2	ns
<i>Pf0-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	***	<i>PfAR-1</i> AM-1 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	ns
<i>Pf0-1</i> AM-2 vs <i>Pf0-1</i> AM-3	ns	<i>PfAR-1</i> AM-2 vs <i>PfAR-1</i> AM-3	ns

c. Bestimmung von MHK und MBK für Allicin bei lungenpathogenen Bakterien

Tabelle A24. Bestimmung der minimalen hemmenden (MHK) und bakteriziden Konzentrationen (MBK) des Allicins bei den lungenpathogenen Bakterien (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Organismus	MHK		MBK	
	µg/ml	mM	µg/ml	mM
<i>Acinetobacter baumannii</i> SNo 45541	16	0,1	16	0,1
	8	0,05	32	0,2
	16	0,1	32	0,2
<i>Acinetobacter baumannii</i> SNo 45760	16	0,1	16	0,1
	8	0,05	32	0,2
	16	0,1	32	0,2
<i>Acinetobacter baumannii</i> SNo 45757	16	0,1	32	0,2
	16	0,1	16	0,1
	16	0,1	32	0,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SNo 45412	128	0,79	128	0,79
	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	128	0,79
	128	0,79	128	0,79
<i>Klebsiella pneumoniae</i> SNo 45413	128	0,79	128	0,79
	128	0,79	128	0,79
	128	0,79	128	0,79
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 SBUG8	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	128	0,79
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO25	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	256	1,58
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 2659	128	0,79	1024	6,31
	512	3,16	1024	6,31
	256	1,58	512	3,16
	256	1,58	512	3,16
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	32	0,2	512	3,16
	32	0,2	512	3,16
	32	0,2	512	3,16
<i>Staphylococcus aureus</i> SNo 68709	64	0,39	256	1,58
	64	0,39	256	1,58
	64	0,39	256	1,58
	64	0,39	256	1,58

Tabelle A24 (Fortsetzung). Bestimmung der minimalen hemmenden (MHK) und bakteriziden Konzentrationen (MBK) des Allicins bei den lungenpathogenen Bakterien (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Organismus	MHK		MBK	
	µg/ml	mM	µg/ml	mM
<i>Streptococcus pneumoniae</i> CSR ¹⁴ -10	64	0,39	64	0,39
	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	64	0,39
	64	0,39	64	0,39
	64	0,39	64	0,39
	64	0,39	64	0,39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Poland ^{23F} -16	64	0,39	64	0,39
	32	0,2	64	0,39
	32	0,2	64	0,39
	64	0,39	64	0,39
	64	0,39	64	0,39
	64	0,39	64	0,39
	32	0,2	32	0,2
	64	0,39	64	0,39
	32	0,2	32	0,2
<i>Streptococcus pneumoniae</i> S. Africa ^{9A} -13	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	64	0,39
	64	0,39	64	0,39
	64	0,39	64	0,39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> Spain ^{23F} -1	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	64	0,39
	64	0,39	64	0,39
	64	0,39	64	0,39
	64	0,39	64	0,39
	64	0,39	64	0,39
	32	0,2	64	0,39
	64	0,39	64	0,39
	32	0,2	64	0,39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> SNo 23083	64	0,39	64	0,39
	32	0,2	64	0,39
	32	0,2	32	0,2
	64	0,39	64	0,39
	32	0,2	32	0,2
<i>Streptococcus pneumoniae</i> SNo 68665	64	0,39	64	0,39
	32	0,2	32	0,2
	64	0,39	64	0,39
	32	0,2	64	0,39
<i>Streptococcus pneumoniae</i> SNo 68668	32	0,2	64	0,39
	32	0,2	64	0,39
	32	0,2	64	0,39
	32	0,2	32	0,2

Tabelle A24 (Fortsetzung). Bestimmung der minimalen hemmenden (MHK) und bakteriziden Konzentrationen (MBK) des Allicins bei den lungenpathogenen Bakterien.

Organismus	MIK		MBK	
	µg/ml	mM	µg/ml	mM
<i>Streptococcus agalactiae</i> SNo 67764	32	0,2	64	0,39
	32	0,2	128	0,79
	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	64	0,39
	64	0,39	128	0,79
	64	0,39	64	0,39
<i>Streptococcus agalactiae</i> SNo 69235	64	0,39	64	0,39
	64	0,39		
<i>Streptococcus agalactiae</i> SNo 72800	64	0,39	512	3,16
	64	0,39		
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	32	0,2	64	0,39
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> SNo 67799	64	0,39	1024	6,31
	64	0,39	1024	6,31
	64	0,39	1024	6,31
	64	0,39	1024	6,31
	64	0,39	1024	6,31
	64	0,39	1024	6,31
	64	0,39	1024	6,31
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> SNo 71818	64	0,39	256	1,58
	64	0,39		
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> SNo 73742	64	0,39	1024	6,31
	64	0,39	1024	6,31
	32	0,2	64	0,39
<i>Streptococcus pyogenes</i> SNo 67467	32	0,2	32	0,2
	16	0,1	32	0,2
	16	0,1	64	0,39
	16	0,1	64	0,39
	32	0,2	64	0,39
	16	0,1	64	0,39
	32	0,2	64	0,39

d. Auswirkung des Allicins auf die Biofilm-Ausbildung

Tabelle A25. Wachstum von *Pf0-1* als Standkultur in dem Glasröhrchen, gemessen als optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD₆₀₀).

	Kontrolle	Allicin (mM)				
		0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Replikat 1	0,96	0,72	0,37	0,11	0,05	0,045
Replikat 2	0,86	0,56	0,35	0,11	0,05	0,05
Mittelwert	0,91	0,64	0,36	0,11	0,05	0,05
StAbw.	0,07	0,11	0,02	0,00	0,00	0,00

Tabelle A26. Wachstum von *PfAR-1* als Standkultur in dem Glasröhrchen bei verschiedenen Allicin-Konzentrationen, gemessen als optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD₆₀₀).

	Kontrolle	Allicin (mM)								
		0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8
Replikat 1	0,79	0,68	0,57	0,39	0,48	0,39	0,38	0,26	0,07	0,03
Replikat 2	0,84	0,74	0,66	0,52	0,44	0,45	0,41	0,30	0,10	0,03
Mittelwert	0,82	0,71	0,61	0,45	0,46	0,42	0,40	0,28	0,09	0,03
StAbw.	0,04	0,04	0,06	0,09	0,03	0,04	0,02	0,02	0,03	0,00

Tabelle A27. Bestimmung der minimalen hemmende Allicin-Konzentration (MHK) bei *Candida albicans* in 96-Mikrotiter-Format. Wachstum bei verschiedenen Allicin-Konzentrationen wurde als optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD₆₀₀) detektiert. Ausgerechneter Mittelwert bei der Kontrolle beträgt 0,2877 und wurde als 100% des Wachstums für die weitere Auswertung angenommen.

Replik	Allicin (µM)										Kontrolle	
	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20	10		
1	0,061	0,068	0,051	0,05	0,051	0,053	0,066	0,24	0,25	0,25	0,257	0,271
2	0,06	0,057	0,05	0,052	0,051	0,053	0,074	0,229	0,243	0,253	0,258	0,282
3	0,086	0,058	0,053	0,055	0,053	0,053	0,092	0,256	0,268	0,275	0,279	0,303
4	0,053	0,063	0,059	0,057	0,06	0,069	0,257	-	0,286	0,287	0,3	0,307
5	0,059	0,055	0,055	0,057	0,056	0,062	0,262	-	0,276	0,289	0,293	0,314
6	0,106	0,075	0,068	0,067	0,069	0,069	0,264	-	0,285	0,283	0,296	0,292

Tabelle A28. Bestimmung der minimal hemmende Allicin-Konzentration (MHK) bei *Candida albicans* in 96-Mikrotiter-Format, dargestellt in Prozent des Kontrollwertes. Ausgerechneter Mittelwert bei der Kontrolle OD₆₀₀= 0,2877 wurde als 100% des Wachstums genommen. Das Wachstum bei verschiedenen Allicin-Konzentrationen wurde in Prozent des Kontroll-Wachstumes umgerechnet und die Mittelwerte mit Standardabweichungen (StAbw.) bestimmt.

Replik	Allicin (µM)										Kontrolle	
	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20	10		
1	21,2	23,6	17,7	17,4	17,7	18,4	22,9	83,4	86,9	86,9	89,3	94,2
2	20,9	19,8	17,4	18,1	17,7	18,4	25,7	79,6	84,5	87,9	89,7	98,0
3	29,9	20,2	18,4	19,1	18,4	18,4	32,0	89,0	93,2	95,6	97,0	105,3
4	18,4	21,9	20,5	19,8	20,9	24,0	89,3	-	99,4	99,8	104,3	106,7
5	20,5	19,1	19,1	19,8	19,5	21,6	91,1	-	95,9	100,5	101,9	109,2
6	36,8	26,1	23,6	23,3	24,0	24,0	91,8	-	99,1	98,4	102,9	101,5
Mittelwert	24,6	21,8	19,5	19,6	19,7	20,8	58,8	84,0	93,2	94,8	100,0	
StAbw.	7,2	2,7	2,3	2,1	2,4	2,7	35,1	4,7	6,3	6,0	6,4	

Tabelle A29. Bestimmung der minimalen Allicin-Konzentration, die Ausbildung von Biofilm bei *C. albicans* hemmt. In 96-Mikrotiter-Format wurde die Biofilm-Ausbildung bei verschiedenen Allicin-Konzentrationen als optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD₆₀₀) detektiert. Ausgerechneter Mittelwert bei der Kontrolle beträgt 0,3284 und wurde als 100% des Wachstums für die weitere Auswertung angenommen.

Replik	Allicin (µM)										Kontrolle	
	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20	10		
1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,26	0,28	0,27	0,28	0,35
2	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,21	0,29	0,31	0,29	0,38
3	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,19	0,27	0,25	0,30	0,37
4	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,05	0,20	0,26	0,27	0,28	0,29	0,34
5	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,26	0,27	0,27	0,31	0,27	0,34
6	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,19	0,28	0,28	0,31	0,37	0,36

Tabelle A30. Bestimmung der minimalen Allicin-Konzentration, die Ausbildung von Biofilm bei *C. albicans* hemmt, dargestellt in Prozent des Kontrollwertes. Ausgerechneter Mittelwert bei der Kontrolle OD₆₀₀= 0,3284 wurde als 100% der Biofilm-Ausbildung genommen. Die Biofilm-Ausbildung bei verschiedenen Allicin-Konzentrationen wurde in Prozent des Kontroll-Wertes umgerechnet und die Mittelwerte mit Standardabweichungen (StAbw.) bestimmt.

Replik	Allicin (µM)										Kontrolle	
	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20	10		
1	14,6	14,3	14,9	14,9	14,6	14,6	15,2	80,1	85,6	83,4	85,6	106,9
2	14,6	14,3	14,9	15,2	15,2	14,9	15,8	62,7	87,1	94,4	89,2	114,8
3	14,0	14,6	14,9	15,5	15,2	15,5	15,5	57,9	82,2	76,1	92,3	111,7
4	15,2	15,5	16,7	16,7	16,7	15,8	59,4	78,6	83,1	85,3	88,0	102,9
5	15,5	15,8	16,4	17,7	16,7	17,1	80,4	81,0	81,9	92,9	83,4	103,2
6	16,1	15,5	16,1	16,1	16,1	16,4	57,5	85,0	83,7	95,0	113,3	108,7
Mittelwert	15,0	15,0	15,7	16,0	15,8	15,7	40,6	74,2	83,9	87,8	100,0	
StAbw.	0,8	0,7	0,9	1,0	0,9	0,9	28,7	11,1	2,0	7,5	11,6	

Tabelle A31. Bestimmung der minimalen Allicin-Konzentration, die den ausgebildeten Biofilm von *C. albicans* abtötet. Im 96- Mikrotiter-Format wurde die Vitalität des Biofilms bei verschiedenen Allicin-Konzentrationen mit Hilfe MTT-Tests bei der optischen Dichte bei 570 nm Wellenlänge (Referenzwellenlänge 630 nm) detektiert. Ausgerechneter Mittelwert bei der Kontrolle beträgt 1,5337 und wurde als 100% des Biofilm-Vitalitäts für die weitere Auswertung angenommen.

Replik	Allicin (µM)									Kontrolle		
	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20			
1	0,11	0,10	0,07	0,10	1,29	1,54	1,42	1,51	1,49	1,51	1,54	1,63
2	0,12	0,08	0,06	0,46	1,70	1,65	1,51	1,58	1,66	1,58	1,45	1,00
3	0,12	0,07	0,06	0,30	1,64	1,74	1,62	1,58	1,65	1,70	1,61	1,49
4	0,12	0,07	0,06	0,92	1,63	1,42	1,67	1,69	1,70	1,74	1,67	1,68
5	0,12	0,08	0,06	1,10	1,67	1,23	1,62	1,59	1,30	1,43	1,44	1,38
6	0,11	0,08	0,07	1,03	1,64	1,69	1,64	1,66	1,69	1,60	1,62	1,56

Tabelle A32. Bestimmung der minimalen Allicin-Konzentration, die den ausgebildeten Biofilm von *C. albicans* abtötet, dargestellt in Prozent des Kontrollwertes. Ausgerechneter Mittelwert bei der Kontrolle OD₅₇₀= 1,5337 wurde als 100% des Biofilm-Vitalität genommen. Die Biofilm-Eradikation bei verschiedenen Allicin-Konzentrationen wurde in Prozent des Kontroll-Wertes umgerechnet und die Mittelwerte mit Standardabweichungen (StAbw) bestimmt.

Replik	Allicin (µM)									Kontrolle		
	5000	2500	1250	625	313	156	78	39	20			
1	7,4	6,5	4,4	6,2	83,8	100,6	92,7	98,3	97,3	98,5	100,2	106,5
2	7,8	5,0	4,0	30,1	111,1	107,5	98,6	103,2	108,4	103,2	94,3	65,4
3	7,8	4,8	4,0	19,8	107,1	113,6	105,4	103,2	107,6	110,8	104,7	97,2
4	7,7	4,8	3,9	59,9	106,3	92,8	109,0	109,9	111,1	113,3	108,7	109,5
5	7,8	5,2	3,9	71,6	108,6	80,0	105,5	103,4	84,9	92,9	94,1	89,7
6	7,0	5,3	4,7	66,9	107,0	110,2	106,9	108,4	110,2	104,3	105,4	101,6
Mittelwert	7,6	5,3	4,2	42,4	104,0	100,8	103,0	104,4	103,2	100,0		
StAbw	0,3	0,6	0,3	27,3	10,0	12,6	6,1	4,2	10,3	10,9		

e. Einfluss des Allicins auf tierische Zellen

Sensitivität tierischer Zellen in der Zellkultur gegenüber Allicin

Tabelle A33. Suszeptibilität der Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Test in zwei Experimenten (n=8). Dargestellt sind die einzelnen Messwerte.

	Allicin-Konzentration (µM)	Replikate mit Zugabe von 1 mM GSH						Replikate ohne GSH-Zugabe					
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1. Experiment	2500	0,05	0,05	0,05	0,06			0,05	0,05	0,06	0,05		
	1250	0,04	0,04	0,05	0,04			0,03	0,05	0,04	0,04		
	625	0,06	0,07	0,05	0,07			0,04	0,05	0,04	0,04		
	312,5	1,83	1,74	1,70	1,73			0,09	0,15	0,13	0,12		
	156,25	1,85	1,82	1,83	1,70			0,64	0,61	0,63	0,59		
	78,125	1,95	1,72	1,83	1,78			1,81	1,88	1,69	1,65		
	Kontrolle	2,00	1,72	1,65	1,63	1,73	1,56	1,80	1,84	1,84	1,73	1,81	1,74
2. Experiment	2500	0,06	0,07	0,06	0,06			0,08	0,07	0,07	0,06		
	1250	0,05	0,04	0,04	0,04			0,04	0,05	0,04	0,06		
	625	0,10	0,22	0,11	0,15			0,04	0,04	0,04	0,03		
	312,5	1,78	1,64	1,75	1,81			0,19	0,26	0,24	0,21		
	156,25	1,94	1,75	1,93	1,84			0,48	0,52	0,46	0,53		
	78,125	2,02	1,95	1,98	1,97			2,00	1,65	1,73	1,65		
	Kontrolle	1,97	1,94	1,91	1,83	1,95	1,87	1,78	1,68	1,69	1,66	1,69	1,65

Tabelle A34. Suszeptibilität der Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Test in zwei Experimenten (n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

Allicin-Konzentration (µM)	Zugabe von 1 mM GSH		ohne GSH-Zugabe	
	Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung
2500	0,06	0,01	0,06	0,01
1250	0,04	0,00	0,04	0,01
625	0,10	0,05	0,04	0,00
312,5	1,75	0,06	0,17	0,06
156,25	1,83	0,08	0,56	0,07
78,125	1,90	0,11	1,76	0,13
Kontrolle	1,85	0,08	1,70	0,11

Tabelle A35. Suszeptibilität der Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Test in zwei Experimenten (n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung im Verhältnis zur Kontrolle.

Allicin-Konzentration (µM)	Zugabe von 1 mM GSH		ohne GSH-Zugabe	
	Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung
2500	3,1%	0,4%	3,6%	0,6%
1250	2,2%	0,2%	2,6%	0,4%
625	5,6%	3,0%	2,3%	0,2%
312,5	94,4%	3,3%	10,2%	3,7%
156,25	99,0%	4,4%	32,6%	4,1%
78,125	102,6%	6,0%	103,1%	7,6%
Kontrolle	100,0%	4,2%	100,0%	6,4%

Tabelle A36. Suszeptibilität der Darmepithel -Zelllinie Caco-2 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Test in zwei Experimenten (n=8). Dargestellt sind die einzelnen Messwerte.

	Allicin-Konzentration (µM)	Replikate mit Zugabe von 1 mM GSH						Replikate ohne GSH-Zugabe					
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1. Experiment	2500	0,05	0,05	0,04	0,04			0,03	0,05	0,05	0,04		
	1250	0,03	0,02	0,01	0,02			0,03	0,04	0,03	0,02		
	625	0,09	0,06	0,15	0,06			0,03	0,04	0,05	0,02		
	312,5	1,88	1,78	2,01	2,02			0,07	0,06	0,06	0,09		
	156,25	1,92	1,98	1,97	1,78			0,24	0,07	0,16	0,16		
	78,125	1,96	1,94	1,88	1,92			1,87	1,94	1,95	1,97		
	Kontrolle	1,80	1,81	1,96	1,91	1,99	1,97	1,97	1,93	2,04	1,86	1,87	1,80
2. Experiment	2500	0,04	0,05	0,04	0,03			0,04	0,05	0,04	0,04		
	1250	0,03	0,03	0,01	0,02			0,02	0,04	0,03	0,02		
	625	0,06	0,23	0,03	0,07			0,05	0,08	0,04	0,03		
	312,5	1,92	1,93	2,03	1,96			0,13	0,06	0,08	0,04		
	156,25	1,90	1,94	2,01	1,96			0,29	0,20	0,20	0,03		
	78,125	1,94	1,87	2,01	1,95			1,87	2,03	1,96	1,90		
	Kontrolle	1,69	1,82	1,83	1,74	1,86	1,84	1,63	1,55	1,82	1,76	1,73	1,66

Tabelle A37. Suszeptibilität der Darmepithel-Zelllinie Caco-2 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Test in zwei Experimenten (n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

Allicin-Konzentration (µM)	Zugabe von 1 mM GSH		ohne GSH-Zugabe	
	Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung
2500	0,04	0,01	0,04	0,01
1250	0,02	0,01	0,03	0,01
625	0,09	0,07	0,04	0,02
312,5	1,94	0,08	0,07	0,03
156,25	1,93	0,07	0,17	0,09
78,125	1,93	0,04	1,94	0,06
Kontrolle	1,85	0,09	1,80	0,14

Tabelle A38. Suszeptibilität der Darmepithel-Zelllinie Caco-2 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Test in zwei Experimenten (n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung im Verhältnis zur Kontrolle.

Allicin-Konzentration (µM)	Zugabe von 1 mM GSH		ohne GSH-Zugabe	
	Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung
2500	2,3%	0,4%	2,4%	0,4%
1250	1,2%	0,4%	1,6%	0,4%
625	5,1%	3,6%	2,4%	1,0%
312,5	104,9%	4,5%	4,2%	1,5%
156,25	104,5%	3,8%	9,3%	4,8%
78,125	104,5%	2,3%	107,5%	3,1%
Kontrolle	100,0%	4,9%	100,0%	8,0%

Tabelle A39. Suszeptibilität der Lungenepithel-Zelllinie A549 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Test in zwei Experimenten (n=8). Dargestellt sind die einzelnen Messwerte.

	Allicin-Konzentration (µM)	Replikate mit Zugabe von 1 mM GSH						Replikate ohne GSH-Zugabe					
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1. Experiment	2500	0,07	0,06	0,06	0,06			0,06	0,06	0,05	0,05		
	1250	0,07	0,07	0,05	0,04			0,04	0,06	0,04	0,04		
	625	0,21	0,38	0,29	0,33			0,04	0,05	0,04	0,04		
	312,5	1,95	1,92	2,03	2,00			0,27	0,38	0,27	0,30		
	156,25	2,03	2,03	1,97	1,96			1,12	1,26	1,18	1,05		
	78,125	1,80	1,65	1,90	1,97			1,97	1,76	1,91	1,92		
	Kontrolle	1,94	1,87	1,92	1,87	1,88	1,82	1,98	1,98	2,02	1,97	1,96	1,84
2. Experiment	2500	0,05	0,06	0,06	0,06			0,06	0,07	0,07	0,05		
	1250	0,04	0,05	0,04	0,04			0,04	0,04	0,04	0,04		
	625	0,46	0,61	0,66	0,65			0,05	0,06	0,05	0,04		
	312,5	1,92	1,87	1,97	1,97			0,48	0,77	0,53	0,56		
	156,25	1,77	1,79	1,88	1,87			1,60	1,84	1,65	1,65		
	78,125	1,90	1,86	1,93	1,99			1,96	1,77	1,92	1,89		
	Kontrolle	1,85	1,78	1,80	1,77	1,74	1,78	1,97	1,93	1,95	1,96	1,98	1,89

Tabelle A40. Suszeptibilität der Lungenepithel-Zelllinie A549 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Test in zwei Experimenten (n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

Allicin-Konzentration (µM)	Zugabe von 1 mM GSH		ohne GSH-Zugabe	
	Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung
2500	0,06	0,01	0,06	0,01
1250	0,05	0,01	0,04	0,01
625	0,45	0,17	0,05	0,01
312,5	1,95	0,05	0,44	0,17
156,25	1,91	0,10	1,42	0,30
78,125	1,88	0,11	1,89	0,08
Kontrolle	1,83	0,06	1,95	0,05

Tabelle A41. Suszeptibilität der Lungenepithel-Zelllinie A549 gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Test in zwei Experimenten (n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung im Verhältnis zur Kontrolle.

Allicin-Konzentration (µM)	Zugabe von 1 mM GSH		ohne GSH-Zugabe	
	Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung
2500	3,2%	0,3%	3,0%	0,3%
1250	2,7%	0,6%	2,2%	0,3%
625	24,5%	9,5%	2,3%	0,4%
312,5	106,6%	2,7%	22,7%	9,0%
156,25	104,2%	5,5%	72,7%	15,3%
78,125	102,3%	5,9%	96,7%	4,1%
Kontrolle	100,0%	3,4%	100,0%	2,3%

Tabelle A42. Suszeptibilität der Lungen/Bronchiengewebe-Zelllinie Beas-2B gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Test in zwei Experimenten (n=8). Dargestellt sind die einzelnen Messwerte.

	Allicin-Konzentration (µM)	Replikate mit Zugabe von 1 mM GSH						Replikate ohne GSH-Zugabe					
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
1. Experiment	2500	0,05	0,07	0,05	0,05			0,05	0,07	0,05	0,05		
	1250	0,05	0,07	0,06	0,04			0,04	0,06	0,03	0,04		
	625	1,71	1,79	1,91	1,95			0,35	0,54	0,34	0,29		
	312,5	1,73	1,85	1,96	1,93			2,03	1,87	2,01	1,89		
	156,25	1,84	1,75	1,98	1,89			1,85	1,85	2,04	2,02		
	78,125	1,95	1,88	1,97	1,99			1,95	1,68	1,95	1,98		
	Kontrolle	1,68	1,71	1,74	1,71	1,86	1,71	2,01	2,01	2,01	1,99	1,65	1,93
2. Experiment	2500	0,05	0,06	0,04	0,04			0,05	0,07	0,06	0,05		
	1250	0,06	0,06	0,05	0,06			0,04	0,06	0,05	0,04		
	625	1,76	1,83	1,90	1,92			0,45	0,64	0,48	0,43		
	312,5	1,77	1,80	1,90	1,89			1,88	1,79	1,80	1,82		
	156,25	2,03	1,98	1,96	2,00			1,98	1,84	1,92	1,90		
	78,125	1,57	1,59	1,78	1,82			1,80	1,68	1,88	1,85		
	Kontrolle	1,67	1,66	1,75	1,70	1,76	1,88	1,97	1,99	1,99	1,93	2,04	1,91

Tabelle A43. Suszeptibilität der Lungen/Bronchiengewebe-Zelllinie Beas-2B gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Test in zwei Experimenten (n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

Allicin-Konzentration (µM)	Zugabe von 1 mM GSH		ohne GSH-Zugabe	
	Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung
2500	0,05	0,01	0,06	0,01
1250	0,05	0,01	0,04	0,01
625	1,85	0,09	0,44	0,11
312,5	1,85	0,08	1,89	0,09
156,25	1,93	0,09	1,93	0,08
78,125	1,82	0,16	1,85	0,12
Kontrolle	1,73	0,07	1,95	0,10

Tabelle A44. Suszeptibilität der Lungen/Bronchiengewebe-Zelllinie Beas-2B gegenüber Allicin in Abhängigkeit von Glutathion-Anwesenheit untersucht mittels MTT-Test in zwei Experimenten (n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung im Verhältnis zur Kontrolle.

Allicin-Konzentration (µM)	Zugabe von 1 mM GSH		ohne GSH-Zugabe	
	Mittelwert	Standard-abweichung	Mittelwert	Standard-abweichung
2500	3,0%	0,5%	2,9%	0,5%
1250	3,1%	0,5%	2,2%	0,6%
625	106,3%	5,0%	22,5%	5,8%
312,5	106,8%	4,9%	96,7%	4,6%
156,25	111,2%	5,4%	98,7%	4,1%
78,125	104,8%	9,4%	94,6%	6,1%
Kontrolle	100,0%	4,0%	100,0%	5,2%

Sensitivität von Lungengewebe-Schnitte der Ratte gegenüber Allicin

Tabelle A45. Untersuchung der Sensitivität der Lungengewebe aus Ratte gegenüber Allicin. Dargestellt sind die einzelnen Werte der EK_{50} aus zwei Experimenten ohne Zugabe von GSH (n=10 bei LDH- und WST-Test) und aus einem Experiment mit GSH-Zugabe (n=6 bei LDH-Test, n=4 bei WST-Test) sowie die Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen.

	Replik	EK_{50} -Allicin (μM)			
		ohne GSH-Zugabe		mit 1 mM GSH-Zugabe	
		LDH-Test	WST-Test	LDH-Test	WST-Test
1. Experiment	1.	14,5	14,0		
	2.	11,6	17,5		
	3.	17,6	11,8		
	4.	14,6	14,4		
2. Experiment	1.	10,8	14,0	586,9	417,8
	2.	19,9	17,5	376,0	11,8
	3.	13,9	11,8	418,0	391,0
	4.	14,5	14,0	744,8	438,6
	5.	11,6	17,6	973,6	
	6.	17,6	11,8	836,2	
	Mittelwert	14,7	14,4	655,9	314,8
	Standard-abweichung	2,8	2,2	237,1	203,0

f. Auswertung der Oxidationszielen des Allicins in Bakterien

Tabelle A46. Chemische Polarität der Aminosäuren, die zu dem homologen Cystein, das nicht durch Allicin-Behandlung oxidiert wurde, benachbart sind. Drei Aminosäuren rechts und links von dem Cystein (C, gelb dargestellt) sind gezeigt. Die sieben polaren/hydrophilen Aminosäuren (R: Arginin, K: Lysin, D: Aspartat, Q: Glutamin, N: Asparagin, E: Glutamat, H: Histidin) sind blau dargestellt. Die fünf unpolaren/hydrophoben Aminosäuren (I: Isoleucin, V: Valin, L: Leucin, F: Phenylalanin, A: Alanin) sind orange dargestellt.

Allicintargets in <i>Pf0-1</i>		-3	-2	-1	0	+1	+2	+3
HscA - Chaperone protein	<i>PfAR-1</i>	Q	T	A	C	A	A	K
Zinc uptake regulation protein/PfI01_0060	<i>E. coli</i>	Y	V	L	C	H	L	F
PrfA - Peptide chain release factor 1	<i>E. coli</i>	V	V	E	C	Q	D	E
LeuS - Leucyl-tRNA synthetase	<i>E. coli</i>	I	D	E	C	R	N	T
RlmB - RNA methyltransferase	<i>E. coli</i>	K	V	A	C	G	A	A
HP 1791: DUF469 domain-containing protein	<i>E. coli</i>	G	L	I	C	M	Q	E
HP 3952: Pyrimidine/purine nucleoside phosphorylase	<i>E. coli</i>	S	Y	L	C	R	Y	L
Allicintargets in <i>PfAR-1</i>								
GroL - Heat shock protein 60 family chaperone	<i>E. coli</i>	S	V	P	C	S	D	S
	<i>Pf0-1</i>	S	A	P	C	T	D	T
Biotin carboxylase of acetyl-CoA carboxylase	<i>Pf0-1</i>	E	G	F	C	K	G	G
Putative formate dehydrogenase oxidoreductase protein	<i>Pf0-1</i>	Q	V	V	C	V	N	P
Allicintargets in <i>E. coli</i>								
RidA	<i>PfAR-1</i>	A	R	A	C	V	Q	A
AceA	<i>PfAR-1</i>	T	S	D	C	D	P	Y
	<i>Pf0-1</i>	T	S	D	C	D	P	Y
LeuS	<i>PfAR-1</i>	I	A	E	C	K	G	G
	<i>Pf0-1</i>	I	A	E	C	K	G	G
Asd	<i>PfAR-1</i>	D	G	I	C	V	R	I
	<i>Pf0-1</i>	D	G	I	C	V	R	I
GrxC	<i>Pf0-1</i>	V	G	G	C	D	D	L

Tabelle A47. Nicht-Targets von Allicin in *Pf0-1*, *PfAR-1* und *E. coli* als Referenz-Proteine. Die homologen Sequenzen zu den bei den OxICAT identifizierten Peptiden bzw. den Allicin-oxidierten Cysteinen wurden als Kontrollen zu den Untersuchungen der benachbarten AS in Hinsicht auf chemische Polarität und Säure-Basen-Eigenschaften verwendet (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Allicintargets in <i>Pf0-1</i>	Oxidiertes Peptid	Nicht oxidiertes Homolog in <i>PfAR-1</i>	Homologes Peptid	Ähnlichkeit
Chaperone protein HscA	SLLQAACA A AK	>fig 294.41.peg.2146 Chaperone protein HscA	NLLQTACA A AK	nicht identisch
DNA-Gyrase subunit A	AGADSCR P ENLDPQYGLR	>fig 294.41.peg.103 DNA gyrase subunit A (EC 5.99.1.3);Ontology_term	AGADSCR P ENLDPQYGLR	identisch
Zinc uptake regulation protein/PfI01_0060	ISSLNAFVGC V HPK	>fig 294.41.peg.5355 Zinc uptake regulation protein ZUR	ISSLNAFVGC V HPE	identisch
Peptide chain release factor 1	ITHIPTGT V VE C QEE R	>fig 294.41.peg.2858 Peptide chain release factor 1	ITHIPTGT V VE C QEE R	identisch
Leucyl-tRNA synthetase	NNPELQAFIA E CK	>fig 294.41.peg.4584 Leucyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.4);Ontology_term	NNPELQAFIA E CK	identisch
RNA methyltransferase	VACGAAEVIPLVAV T NLAR	>fig 294.41.peg.3128 23S rRNA (guanosine-2'-O-) - methyltransferase rlmB (EC 2.1.1.-);Ontology_term	VACGAAEVIPLVAV T NLAR	identisch
HP 1791: DUF469 domain-containing protein	EAMEANGLGYVGGDDFGL V CLQK	>fig 294.41.peg.4729 FIG002060: uncharacterized protein YggL	EAMEANGLGYVGGDDFGL V CLQK	identisch
HP 3952: Pyrimidine/purine nucleoside phosphorylase	VAVDTAYL C EYRG	>fig 294.41.peg.1595 Putative cytoplasmic protein	VAVDTAYL C EYRG	identisch
Allicintargets in <i>PfAR-1</i>	Oxidiertes Peptid	Nicht oxidiertes Homolog in <i>Pf0-1</i>	Homologes Peptid	
Heat shock protein 60 family chaperone GroEL	ALSK P CAD F K	>PfI01_4501 chaperonin GroEL [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	KLSAP C TD T K	nicht identisch
Riboflavin synthase	AVE F CIR	>PfI01_5018 riboflavin synthase subunit alpha [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	AVE F RI R	Cystein nicht vorhanden
Biotin carboxylase of acetyl-CoA carboxylase	DLVRDEGF C K	>PfI01_0618 acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	DLTRDEGF C K G	nicht identisch
Putative formate dehydrogenase oxidoreductase protein	GAQ V C INPLKER	>PfI01_0279 oxidoreductase alpha (molybdopterin) subunit [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	GAQ V C VNPLKER	nicht identisch
Ribose 5-phosphate isomerase A	SIVGVGTG S TAN C FI D ALAH K	>PfI01_5382 ribose-5-phosphate isomerase A[Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	SIVGVGTG S TAN C FI D ALAH K	identisch

Tabelle A47 (Fortsetzung). Nicht-Targets von Allicin in *Pf0-1*, *PfAR-1* und *E. coli* als Referenz-Proteine. Die homologen Sequenzen zu den bei dem OxICAT identifizierten Peptiden bzw. den Allicin-oxidierten Cysteinen wurden als Kontrollen zu den Untersuchungen der benachbarten AS in Hinsicht auf chemische Polarität und Säure-Basen-Eigenschaften verwendet (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Allicintargets in <i>E. coli</i>	Oxidiertes Peptid	Nicht oxidiertes Homolog in <i>Pf0-1</i>	Homologes Peptid	Ähnlichkeit
RidA	SCVEVARLPK	>Pfl01_5552 endoribonuclease L-PSP[Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	AAIGVAALPK	Cystein nicht vorhanden
AceA	TDADAADLITSDCDPYDSEF ITGERTSEGFFR	>Pfl01_3602 isocitrate lyase [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	TDANAADLLTSDCDPYDQPF VTGTRTQEGFYK	nicht identisch
AspC	CTQELLFGKGSALINDKR	>Pfl01_1497 aromatic amino acid aminotransferase [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	VINELVLGVDSKLIAEQR	Cystein nicht vorhanden
RpoA	LLVDACYPSPVER	>Pfl01_5055 DNA-directed RNA polymerase subunit alpha [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	LQLDSSFSPVRR	Cystein nicht vorhanden
LeuS	AAENNPELAAFIDE CR NTK	>Pfl01_4957 leucyl-tRNA synthetase [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	AAKNNPELQAFIAE CK GGS	nicht identisch
Asd	ILNTSSVIPVDGL C VR	>Pfl01_1893 aspartate-semialdehyde dehydrogenase [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	ILGRFKSPIPVDG I CVR	nicht identisch
AroG	VAIDAINAAGAPH C FLSVTK	>Pfl01_3069 phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	VAVDAMRSAAHPHRHFGVD S	Cystein nicht vorhanden
GapA	GVLGYTEDDVVSTDFNGEV CTSVF D AK	>Pfl01_4376 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	KILGFNTLPLVSSDFNHNPLS SIFDAN	Cystein nicht vorhanden
GrxC	TTVPQIFIDAQHIGGCDDLYA LDAR	>Pfl01_0335 glutaredoxin GrxC[Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	TSVPQIWIGDTHVGG C DDLY ALERA	nicht identisch
SerA	GTVVDIPALCDALASK	>Pfl01_5387 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	GTVVELDHLAAAIKDK	Cystein nicht vorhanden
PurA	VGAGPFPTELFDETGEFLCK	>Pfl01_0528 adenylosuccinate synthetase [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	VGSGPFPTELFDEVGAHLAK	Cystein nicht vorhanden
Pgk	LLTTCNIPVPSDVR	>Pfl01_5265 phosphoglycerate kinase [Pseudomonas fluorescens <i>Pf0-1</i>]	IAAKVSVPLPVDVV	Cystein nicht vorhanden

Tabelle A47 (Fortsetzung). Nicht-Targets von Allicin in *Pf0-1*, *PfAR-1* und *E. coli* als Referenz-Proteine. Die homologen Sequenzen zu den bei dem OxICAT identifizierten Peptiden bzw. den Allicin-oxidierten Cysteinen wurden als Kontrollen zu den Untersuchungen der benachbarten AS in Hinsicht auf chemische Polarität und Säure-Basen-Eigenschaften verwendet (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Allicintargets in <i>Pf0-1</i>	Oxidiertes Peptid	Nicht oxidiertes Homolog in <i>E. coli</i>	Homologes Peptid	Ähnlichkeit
Chaperone protein HscA	SLLQAACA AK	>WP_001196613.1 MULTISPECIES: molecular chaperone HscA [Proteobacteria]	ELLDA AI AAK	Cystein nicht vorhanden
DNA-Gyrase subunit A	AGADSC R PENLDPQYGLR	>WP_001281242.1 MULTISPECIES: DNA gyrase subunit A [Proteobacteria]	AGDDAARPEWLE P EFGVR	Cystein nicht vorhanden
Zinc uptake regulation protein/Pf01_0060	ISSLNAFVG C VHPK	>AAC43140.1 ORF_f191 [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]	VESTNSYVLCHLFD Q	nicht identisch
Peptide chain release factor 1	ITHIPTGT V VE C QEER	>WP_000804726.1 MULTISPECIES: peptide chain release factor 1 [Proteobacteria]	ITHLPTGIVVE C QDE R	nicht identisch
Leucyl-tRNA synthetase	NNPELQAFIA E CK	>CQR80241.1 leucyl-tRNA synthetase [Escherichia coli K-12]	NNPELAAFI D E C R	nicht identisch
RNA methyltransferase	VACGAAEVIPLVAVTNL A R	>WP_001293282.1 MULTISPECIES: 23S rRNA (guanosine(2251)-2'-O)-methyltransferase RlmB [Proteobacteria]	VACGAAESVPLIR V TNLAR	nicht identisch
HP 1791: DUF469 domain-containing protein	EAMEANGLGYVGGDDF G LVCLQK	>WP_001107564.1 MULTISPECIES: DUF469 domain-containing protein [Proteobacteria]	EVIENKLA F DGSGYLAWEGL I CMQE	nicht identisch
HP 3952: Pyrimidine/purine nucleoside phosphorylase	VAVD T AYL C EYRG	>WP_000941942.1 MULTISPECIES: hypothetical protein [Proteobacteria]	VAEPTSYL C RYL	nicht identisch
Phospho-glucosamine mutase	CPQVLINVR - <i>Pf0-1</i> and <i>PfAR-1</i>	>AAA97510.1 regulatory protein [Escherichia coli K-12]	FPQILVNVR	Cystein nicht vorhanden
Glucose-1-phosphate thymidyl-transferase	EILIISTPEDL P CFK - <i>Pf0-1</i>	>AAA67589.1 unknown [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]	EILIITTPEDKGY F Q	Cystein nicht vorhanden
	EILVISTPEDL P CFR- <i>PfAR-1</i>			
Ketol-acid reducto-isomerase	VAIGYGSQGHAQ A CNLK - <i>Pf0-1</i> and <i>PfAR-1</i>	>pdb 3ULK A Chain A, Ketol-acid Reductoisomerase	VVIVGCGAQGL N QGLNMR	Cystein nicht vorhanden

Tabelle A47 (Fortsetzung). Nicht-Targets von Allicin in *Pf0*-1, *PfAR*-1 und *E. coli* als Referenz-Proteine. Die homologen Sequenzen zu den bei dem OxICAT identifizierten Peptiden bzw. den Allicin-oxidierten Cysteinen wurden als Kontrollen zu den Untersuchungen der benachbarten AS in Hinsicht auf chemische Polarität und Säure-Basen-Eigenschaften verwendet (Fortsetzung auf der nächsten Seite).

Allicintargets in <i>PfAR</i> -1	Oxidiertes Peptid	Nicht oxidiertes Homolog in <i>E. coli</i>	Homologes Peptid	Ähnlichkeit
Heat shock protein 60 family chaperone GroEL	ALSKP C ADFK	>WP_000729117.1 MULTISPECIES: molecular chaperone GroEL [Proteobacteria]	ALSV P CSDSK	nicht identisch
Riboflavin synthase	AVEF C IR	>WP_000493947.1 MULTISPECIES: riboflavin synthase [Proteobacteria]	QIWFKV	Cystein nicht vorhanden
Biotin carboxylase of acetyl-CoA carboxylase	DLVRDEGF C K	>AKK14936.2 acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit protein [Escherichia coli K-12]	RIMNDENFQH	Cystein nicht vorhanden
Putative formate dehydrogenase oxidoreductase protein	GAQV V CINPLKER	>WP_000726691.1 MULTISPECIES: hypothetical protein [Proteobacteria]	GAKMIAINPLQER	Cystein nicht vorhanden
Ribose 5-phosphate isomerase A	SIVGVGTG S TAN C FIDALAQHK	>CQR82353.1 ribose 5-phosphate isomerase, constitutive [Escherichia coli K-12]	TIVGVGTG S TAAH FIDALGTMK	Cystein nicht vorhanden

Tabelle A47 (Fortsetzung). Nicht-Targets von Allicin in *Pf0-1*, *PfAR-1* und *E. coli* als Referenz-Proteine. Die homologen Sequenzen zu den bei dem OxICAT identifizierten Peptiden bzw. den Allicin-oxidierten Cysteinen wurden als Kontrollen zu den Untersuchungen der benachbarten AS in Hinsicht auf chemische Polarität und Säure-Basen-Eigenschaften verwendet.

Allicintargets in <i>E. coli</i>	Oxidiertes Peptid	Nicht oxidiertes Homolog in <i>PfAR-1</i>	Homologes Peptid	Ähnlichkeit
RidA	SCVEVARLPK	>fig 294.41.peg.4201 Endoribonuclease L-PSP family protein	ACVQASMMV	nicht identisch
AceA	TDADAADLITSDCDPYDS EFITGERTSEGFFR	>fig 294.41.peg.3815 Isocitrate lyase (EC 4.1.3.1);Ontology_term	TDANAADLLTSDCDPYDQ PFVTGERTQEGFYK	nicht identisch
AspC	CTQELLFGKGSALINDKR	>fig 294.41.peg.3735 Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1);Ontology_term	VINELVLGADSKLITEQR	Cystein nicht vorhanden
RpoA	LLVDACYSPVER	>fig 294.41.peg.4476 DNA-directed RNA polymerase alpha subunit (EC 2.7.7.6);Ontology_term	LQLDSSFSPVRR	Cystein nicht vorhanden
LeuS	AAENNPelaarAFIDEcRNT K	>fig 294.41.peg.4584 Leucyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.4);Ontology_term	AAKNNPELQAFIAECKGG S	nicht identisch
Asd	ILNTSSVIPVDGLcVR	>fig 294.41.peg.4313 Aspartate-semialdehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.11);Ontology_term	ILGRKSPIPVDGICVR	nicht identisch
AroG	VAIDAINAAGAPHCFLSVT K	>fig 294.41.peg.4182 2-keto-3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase I alpha (EC 2.5.1.54);Ontology_term	IAVDAMRSAAHPhRHFGV DS	Cystein nicht vorhanden
GapA	GVLGYTEDDVSTDFNG EVCTSVFDAK	>fig 294.41.peg.2386 NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12);Ontology_term	KILGYNTLPLVSSDFNHNP LSSIFDAN	Cystein nicht vorhanden
GrxC	TTVPQIFIDAQHIGGCDDL YALDAR	>fig 294.41.peg.1901 Glutaredoxin	IKVPCLRIEENGQTTWMYE SK	Cystein nicht vorhanden
SerA	GTVVDIPALCDALASK	>fig 294.41.peg.3630 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95);Ontology_term	GVAVVDGDLVEALKEG	Cystein nicht vorhanden
PurA	VGAGPFPTelFDEtGEFL CK	>fig 294.41.peg.3123 Adenylosuccinate synthetase (EC 6.3.4.4);Ontology_term	VGSGPFPTelFDDVGAHL AK	Cystein nicht vorhanden
Pgk	LLTTCNIPVPSDVR	>fig 294.41.peg.1167 Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3);Ontology_term	IAAKVSVPLPVDVV	Cystein nicht vorhanden

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Pseudomonas fluorescens strain CREA-C16 genome	217	217	100%	6e-53	99%	CP017951.1
☐	Pseudomonas granadensis strain LMG 27940 genome assembly, chromosome 1	211	211	100%	3e-51	98%	LT629778.1
☐	Pseudomonas sp. Z003-0.4C(8344-21) genome assembly, chromosome 1	195	195	100%	3e-46	96%	LT629756.1
☐	Pseudomonas sp. A3(2016), complete genome	167	167	100%	6e-38	92%	CP014870.1

Abbildung A29. Ergebnisse der Sequenzsuche von *PfAR*-1's 40-AS-spezifischen Sequenz mit Hilfe von BLAST ergeben vier Treffer.

<i>Pf0</i> -1	VKALSEENTYDSSSIKVLKGLDAVRKRPGMYIGDTDDGSLHHMVFEVDNSIDEALAGH	60
<i>PfAR</i> -1	VKALSEENTYDSSSIKVLKGLDAVRKRPGMYIGDTDDGSLHHMVFEVDNSIDEALAGH	60

<i>Pf0</i> -1	DDISIIHPDESITVKDNGRGIPVDVHKEEGVSAAEVIMTVLHAGGKFDDNSYKVSDDL	120
<i>PfAR</i> -1	DDISIIHPDESITVKDNGRGIPVDVHKEEGVSAAEVIMTVLHAGGKFDDNSYKVSDDL	120

<i>Pf0</i> -1	HGVGVSVDNALSEELVLTVRSGKIWEQTYVHGVQPAPMAIVGDSETTGQIHFKA	180
<i>PfAR</i> -1	HGVGVSVDNALSEELVLTVRSGKIWEQTYVHGVQPAPMAIVGDSETTGQIHFKA	180

<i>Pf0</i> -1	FKNIHFSWDILAKRIRELSFLNSGVGIVLKDERSGKEELFKYEGGLRAFVEYLN	240
<i>PfAR</i> -1	FKNIHFSWDILAKRIRELSFLNSGVGIVLKDERSGKEELFKYEGGLRAFVEYLN	240

<i>Pf0</i> -1	NQVFHFNIQREDGIGVEIALQWNSFNENLLFTNNIPQRDGGTHLVGFRSAL	300
<i>PfAR</i> -1	NQVFHFNIQREDGIGVEIALQWNSFNENLLFTNNIPQRDGGTHLVGFRSAL	300

<i>Pf0</i> -1	IEQEGGLAKKHVATTGDDAREGLTAIISVKVPDPKFSSQTKDKLVSEVKTAVE	360
<i>PfAR</i> -1	IEQEGGLAKKHVATTGDDAREGLTAIISVKVPDPKFSSQTKDKLVSEVKTAVE	360

<i>Pf0</i> -1	FSDFLLENPNEAKLVGKMDAARAREAAARKAREMTRRKALDIAGLPGKLAD	420
<i>PfAR</i> -1	FSDFLLENPNEAKLVGKMDAARAREAAARKAREMTRRKALDIAGLPGKLAD	420

<i>Pf0</i> -1	LSELYLVEGDSAGGSAKQGRNRKTQAILPLKGKILNVEKARFDKMISSQEV	480
<i>PfAR</i> -1	LSELYLVEGDSAGGSAKQGRNRKTQAILPLKGKILNVEKARFDKMISSQEV	480

<i>Pf0</i> -1	GIGREEYNIDKLRYHNIIIMTDADVDGSHIRTLTLLTFFFRQLPELIERGY	540
<i>PfAR</i> -1	GIGREEYNIDKLRYHNIIIMTDADVDGSHIRTLTLLTFFFRQLPELIERGY	540

<i>Pf0</i> -1	VKKGKQEQYIKDDAMEEYMTQSALEDASLHNLNEDAPGISGEALERLVNDF	600
<i>PfAR</i> -1	VKKGKQEQYIKDDAMEEYMTQSALEDASLHNLNEDAPGISGEALERLVNDF	600

<i>Pf0</i> -1	LSRLYPQELTEHFIYLPVLSLEMLGDHAKMQDWLAQYEVRLRTVEKSGLV	660
<i>PfAR</i> -1	LSRLYPQELTEHFIYLPVLSLETLDHAAAMQDWLAQYEVRLRTNEKSGLV	660

<i>Pf0</i> -1	RGVWLPEVELISHGLSNVYTFNRDFFGSNDYKTVVTLGAQLSTLLDEGAY	720
<i>PfAR</i> -1	RGVWLPEVELISHGLSNVYTFNRDFFGSNDYKTVVTLGAQLSTLLDEGAY	720

<i>Pf0</i> -1	TEFKEALDWLMAESTKRHTIQRYKGLGEMNPDQLWETMDPSVRRMLKVTI	780
<i>PfAR</i> -1	TEFKEALDWLMAESTKRHTIQRYKGLGEMNPDQLWETMDPSVRRMLKVTI	780

<i>Pf0</i> -1	FNTLMGDAVEPRRDFIESNALAVSNLDF	808
<i>PfAR</i> -1	FNTLMGDAVEPRRDFIESNALAVSNLDF	808

Abbildung A30. Aminosäuren-Vergleich der Untereinheit B der DNA-Gyrase bei *Pf0*-1 und *PfAR*-1.

Tabelle A48. Zusammenfassung der Nicht-Targets von Allicin in *Pf0-1*, *PfAR-1* und *E. coli*. Die homologen Sequenzen zu den bei dem OxICAT identifizierten Peptiden bzw. den Allicin-oxidierten Cysteinen wurden als Kontrollen zu den Untersuchungen der benachbarten AS im Hinblick auf chemische Polarität und Säure-Basen-Eigenschaften verwendet.

Allicintargets in <i>Pf0-1</i>	Allicin-oxidiertes Peptid	Nichttarget aus	Homologes Peptid
HscA - Chaperone protein	SLLQAACA CAK	<i>PfAR-1</i>	NLLQTACA CAK
Zinc uptake regulation protein/ Pfl01_0060	ISSLNAFVG CV HPK	<i>E. coli</i>	VESTNSYVL CH LFDQ
PrfA - Peptide chain release factor 1	ITHIPTGT VE CQEER	<i>E. coli</i>	ITHLPTGIV VE CQDER
LeuS - Leucyl-tRNA synthetase	NNPELQAFIA ECK	<i>E. coli</i>	NNPELAAFID E CRNT KVAE
RlmB - RNA methyltransferase	VACGAAEVIPLVAVT NLAR	<i>E. coli</i>	NATAKKVACGAA E SV PLIRVTNLAR
HP 1791: DUF469 domain- containing protein	EAMEANGLGYVGDD FGLV CL QK	<i>E. coli</i>	EVIEPNKLAFD G SGY LAW EGL ICMQE
HP 3952: Pyrimidine/purine nucleoside phosphorylase	VAVD TAYL CEYRG	<i>E. coli</i>	VAEPTSY LC RYL
Allicintargets in <i>PfAR-1</i>	Allicin-oxidiertes Peptid	Nichttarget aus	Homologes Peptid
GroL - Heat shock protein 60 family chaperone	ALSK PC ADFK	<i>E. coli</i>	ALS VP CSDSK
		<i>Pf0-1</i>	KLSAP CT DTK
Biotin carboxylase of acetyl-CoA carboxylase	DLVRDEGF CK	<i>Pf0-1</i>	DLTRDEGF CK GGVNI HYLE
Putative formate dehydrogenase oxidoreductase protein	GAQ VVC INPLKER	<i>Pf0-1</i>	GAQ VVC VNPLKER
Allicintargets in <i>E. coli</i>	Allicin-oxidiertes Peptid	Nichttarget aus	Homologes Peptid
RidA	FPAR SC VEVARLPK	<i>PfAR-1</i>	APAR AC VQASMMV
		<i>PfAR-1</i>	TDANAADLLTSD CDP
AceA	TDADAADLITSD CDP YDSEFITGERTSEG FFR	<i>Pf0-1</i>	YDQPFVTGERTQEGFYK TDANAADLLTSD CDP YDQPFVTGTRTQEGFYK
		<i>PfAR-1</i>	AAKNNPELQAFIA E C KGGS
LeuS	AAEN NP ELAAFID E C RNTK	<i>Pf0-1</i>	AAKNNPELQAFIA E C KGGS
		<i>PfAR-1</i>	ILGRKSPIVDG IC V RIGAM
Asd	ILNTSSVIPVDG L CV RVGALR	<i>Pf0-1</i>	ILGRF K SPIVDG IC VRIGAMR
GrxC	TTVPQIFID AQ HIGG CDDLYALDAR	<i>Pf0-1</i>	TSVPQIWIGD TH VGG CDDLYAL E RA

Tabelle A49. Oxidationszustand des Cystein₄₁₄ der Untereinheit B der DNA-Gyrase in *Pf0-1* und *PfAR-1* bei der Kontrolle und nach Allicin-Behandlung.

	<i>Pf0-1</i>			<i>PfAR-1</i>		
	Anteil der oxidierten		Δ Oxidation (in %)	Anteil der oxidierten		Δ Oxidation (in %)
	Form (in %)			Form (in %)		
	Kontrolle	Allicin- Behandlung		Kontrolle	Allicin- Behandlung	
1. Exp.	5,8	27,4	21,6	8,9	9,9	1,0
2. Exp.	1,9	4,6	2,6	-	-	-
3. Exp.	6,2	19,2	13,0	5,3	12,2	6,9
Durchschnitt	4,6	17,1	12,4	7,1	11,1	4,0

Tabelle A50. Oxidationszustand des Cystein₄₈₀ der Untereinheit B der DNA-Gyrase in *Pf0-1* und *PfAR-1* bei der Kontrolle und nach Allicin-Behandlung.

	<i>Pf0-1</i>			<i>PfAR-1</i>		
	Anteil der oxidierten Form (in %)		Δ Oxidation (in %)	Anteil der oxidierten Form (in %)		Δ Oxidation (in %)
	Kontrolle	Allicin-Behandlung		Kontrolle	Allicin-Behandlung	
1. Exp.	6,0 18,2 6,0	21,8 45,9 45,9	15,8 27,7 39,9	13,4	13,5	-0,2
2. Exp.	-	-	-	17,6	15,5	-2,2
3. Exp.	38,6	35,8	-2,8	-	-	-
Durchschnitt	17,2	37,4	20,2	15,5	14,5	-1,2