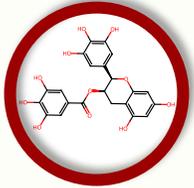


# PHENOLISCHE NATURSTOFFE – EINBLICKE IN IHRE ANTIMIKROBIELLEN UND BIOFILMHEMMENDEN EIGENSCHAFTEN

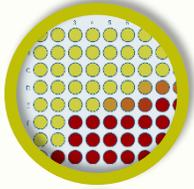
Dr. rer. nat. David Buchmann, M. Sc.  
Universität Greifswald, Pharm. Biologie

# PHENOLISCHE NATURSTOFFE – EINBLICKE IN IHRE ANTIMIKROBIELLEN UND BIOFILMHEMMENDEN EIGENSCHAFTEN

---



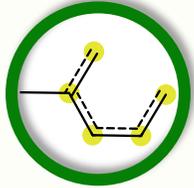
Naturstoffe mit antimikrobiellen und virulenzhemmenden Eigenschaften



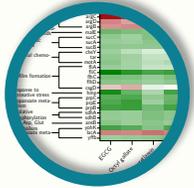
Synergismus von Naturstoffen und Antibiotika



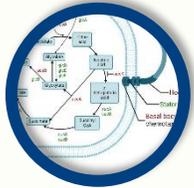
Biofilm – Bildung und Hemmung



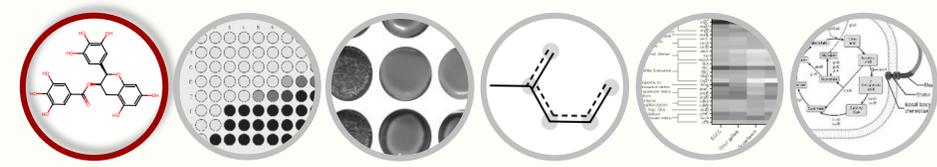
Vorhersage von Biofilminhibitoren mit mathematischen Algorithmen



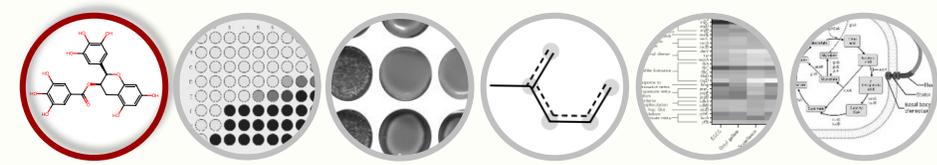
Wirkmechanismus – erste Ansätze zur Aufklärung



Zusammenfassung und Ausblick

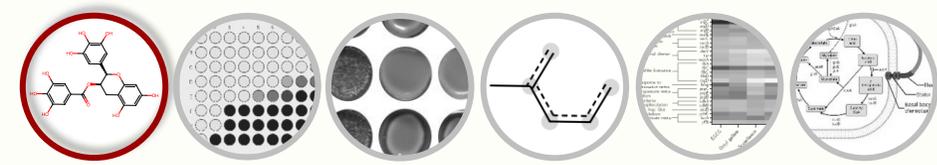


➡ Naturstoffe mit antimikrobiellen und virulenzhemmenden Eigenschaften



## ➡ Naturstoffe mit antimikrobiellen und virulenzhemmenden Eigenschaften

**Naturstoff** = Verbindung, die von Organismen gebildet wird, um **biologische Funktionen** zu erfüllen.



## ➡ Naturstoffe mit antimikrobiellen und virulenzhemmenden Eigenschaften

**Naturstoff** = Verbindung, die von Organismen gebildet wird, um **biologische Funktionen** zu erfüllen.

Ein **antimikrobieller Stoff** wirkt gegen **Mikroorganismen** **zerstörend** oder **wachstumshemmend**.



## ➊ Naturstoffe mit antimikrobiellen und virulenzhemmenden Eigenschaften

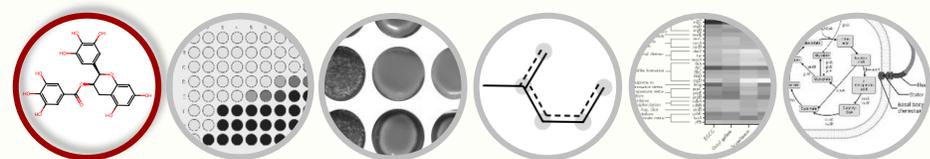
**Naturstoff** = Verbindung, die von Organismen gebildet wird, um **biologische Funktionen** zu erfüllen.

Ein **antimikrobieller Stoff** wirkt gegen **Mikroorganismen** **zerstörend** oder **wachstumshemmend**.



- 75% der antimikrobiellen Wirkstoffe haben natürliche Vorbilder (bspw. Penicillin, Streptomycin)

Abb. 1: *Penicillium notatum*<sup>1</sup>.



## ➊ Naturstoffe mit antimikrobiellen und virulenzhemmenden Eigenschaften

**Naturstoff** = Verbindung, die von Organismen gebildet wird, um **biologische Funktionen** zu erfüllen.

Ein **antimikrobieller Stoff** wirkt gegen **Mikroorganismen** **zerstörend** oder **wachstumshemmend**.



Abb. 1: *Penicillium notatum*<sup>1</sup>.

- 75% der antimikrobiellen Wirkstoffe haben natürliche Vorbilder (bspw. Penicillin, Streptomycin)
- nicht als Antibiotika bedeutsam
- riesiges Potential, da mehr als 8000 Flavonoide beschrieben

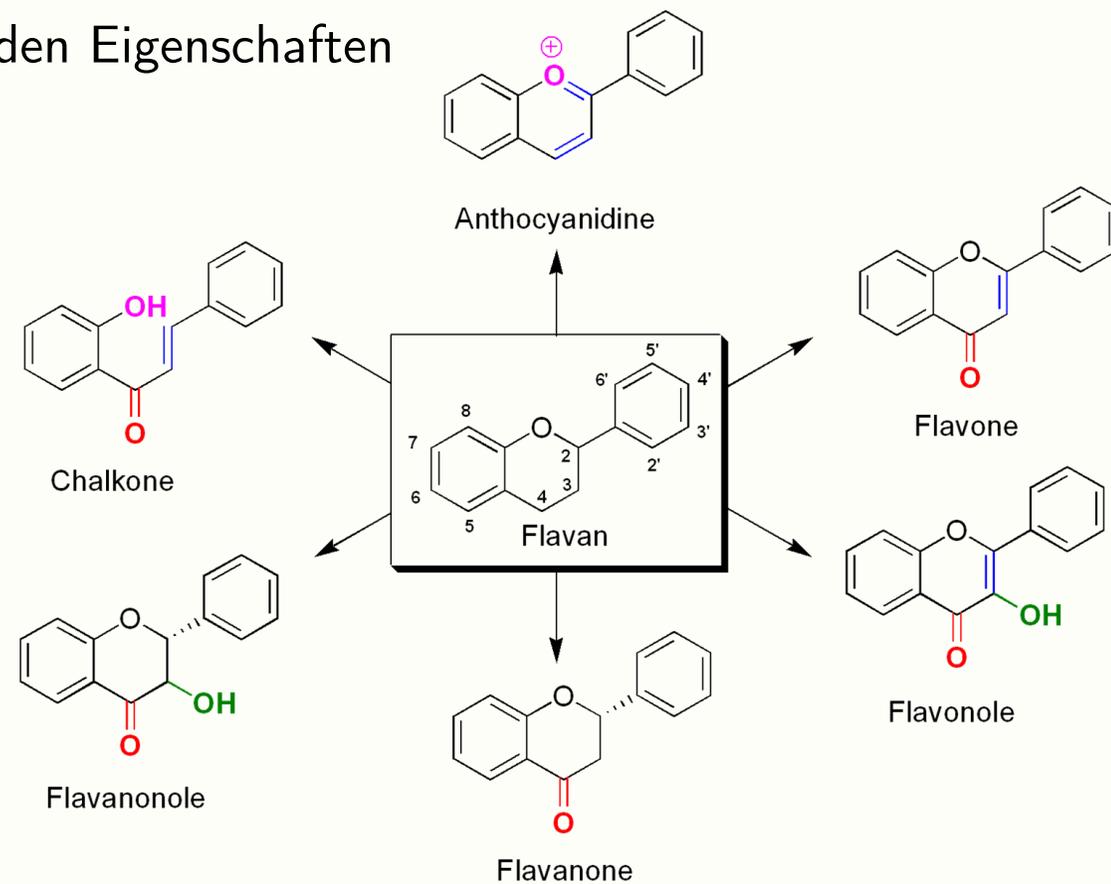
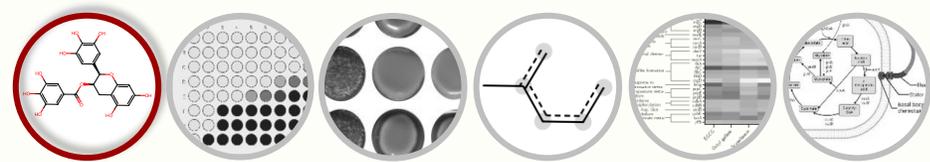


Abb. 2: Übersicht über Flavonoidgrundstrukturen<sup>2</sup>.



## ➔ Naturstoffe mit antimikrobiellen und virulenzhemmenden Eigenschaften

**Naturstoff** = Verbindung, die von Organismen gebildet wird, um **biologische Funktionen** zu erfüllen.

Ein **antimikrobieller Stoff** wirkt gegen **Mikroorganismen** **zerstörend** oder **wachstumshemmend**.



Abb. 1: *Penicillium notatum*<sup>1</sup>.

- 75% der antimikrobiellen Wirkstoffe haben natürliche Vorbilder (bspw. Penicillin, Streptomycin)
- nicht als Antibiotika bedeutsam
- riesiges Potential, da mehr als 8000 Flavonoide beschrieben
- weitreichende Eigenschaften (antiinflammatorisch, antiallergisch, antioxidativ, neuroprotektiv, antimikrobiell und virulenzhemmend)

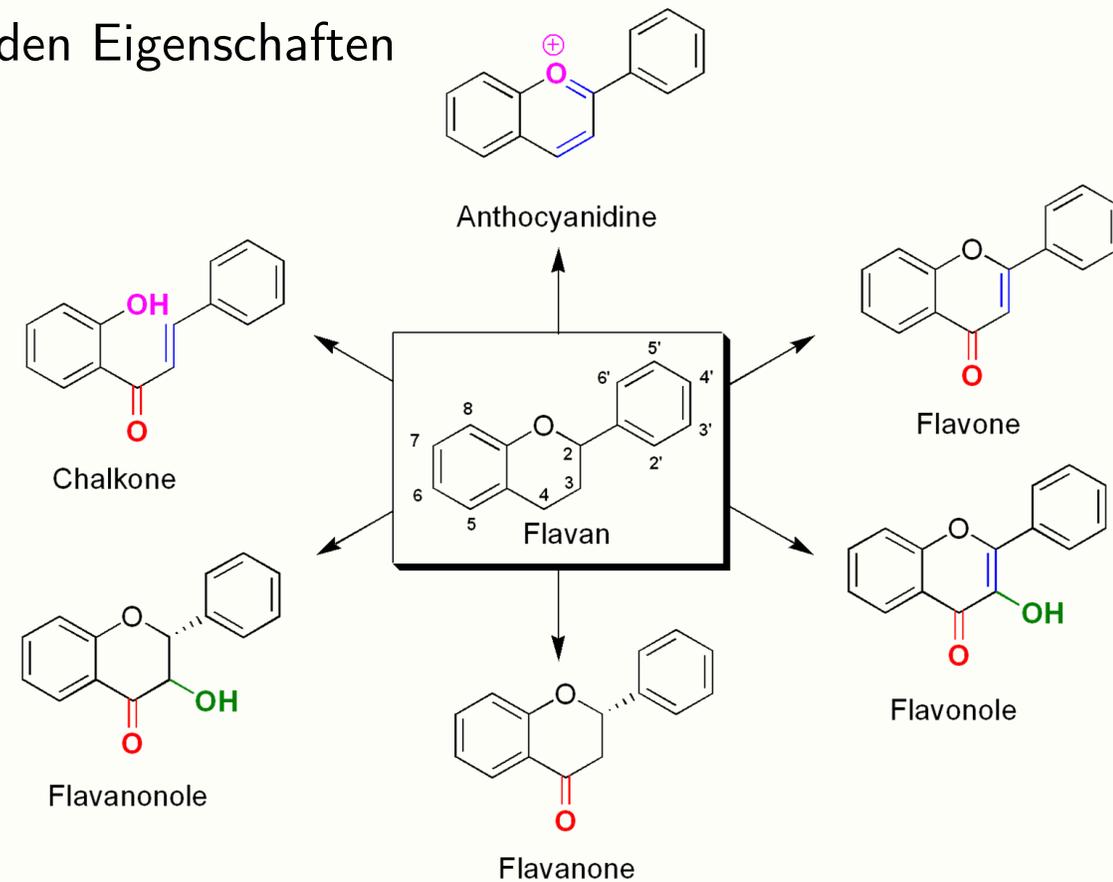
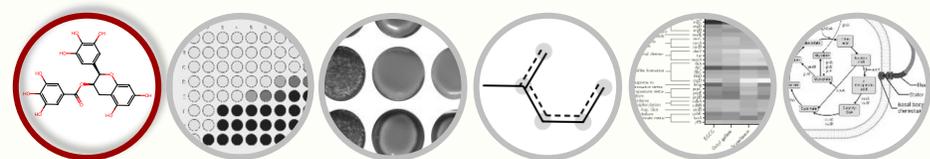


Abb. 2: Übersicht über Flavonoidgrundstrukturen<sup>2</sup>.



## ➊ Naturstoffe mit antimikrobiellen und virulenzhemmenden Eigenschaften

**Naturstoff** = Verbindung, die von Organismen gebildet wird, um **biologische Funktionen** zu erfüllen.

Ein **antimikrobieller Stoff** wirkt gegen **Mikroorganismen** **zerstörend** oder **wachstumshemmend**.

**Virulenz** ist die Fähigkeit eines Erregers, eine **Erkrankung** hervorzurufen. Sie bestimmt den Grad der **Pathogenität**.



Abb. 1: *Penicillium notatum*<sup>1</sup>.

- 75% der antimikrobiellen Wirkstoffe haben natürliche Vorbilder (bspw. Penicillin, Streptomycin)
- nicht als Antibiotika bedeutsam
- riesiges Potential, da mehr als 8000 Flavonoide beschrieben
- weitreichende Eigenschaften (antiinflammatorisch, antiallergisch, antioxidativ, neuroprotektiv, antimikrobiell und virulenzhemmend)

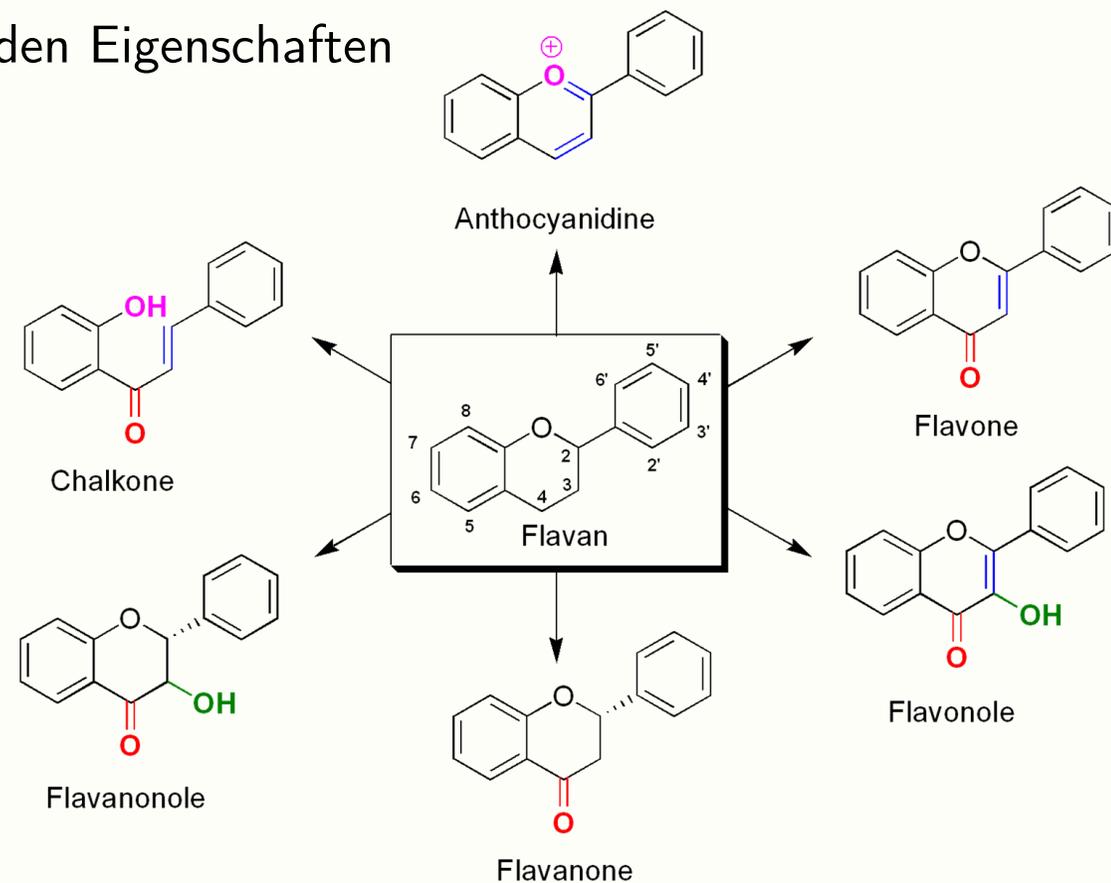
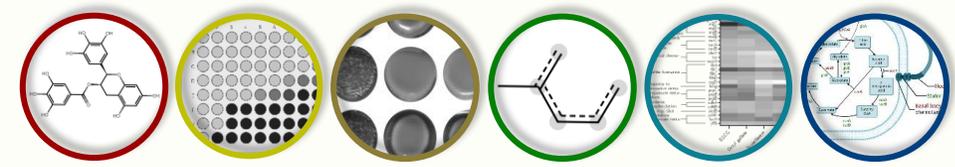
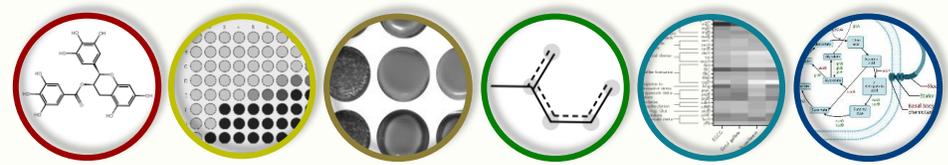


Abb. 2: Übersicht über Flavonoidgrundstrukturen<sup>2</sup>.



## Herangehensweise in der Arbeitsgruppe

Phenolische  
Naturstoffe



## ☰ Herangehensweise in der Arbeitsgruppe

Synergismus

- Antibiotika + Naturstoffe
- Resistenzreduktion
- WHO high-priority Stämme

Phenolische  
Naturstoffe





## Herangehensweise in der Arbeitsgruppe

### Synergismus

- Antibiotika + Naturstoffe
- Resistenzreduktion
- WHO high-priority Stämme

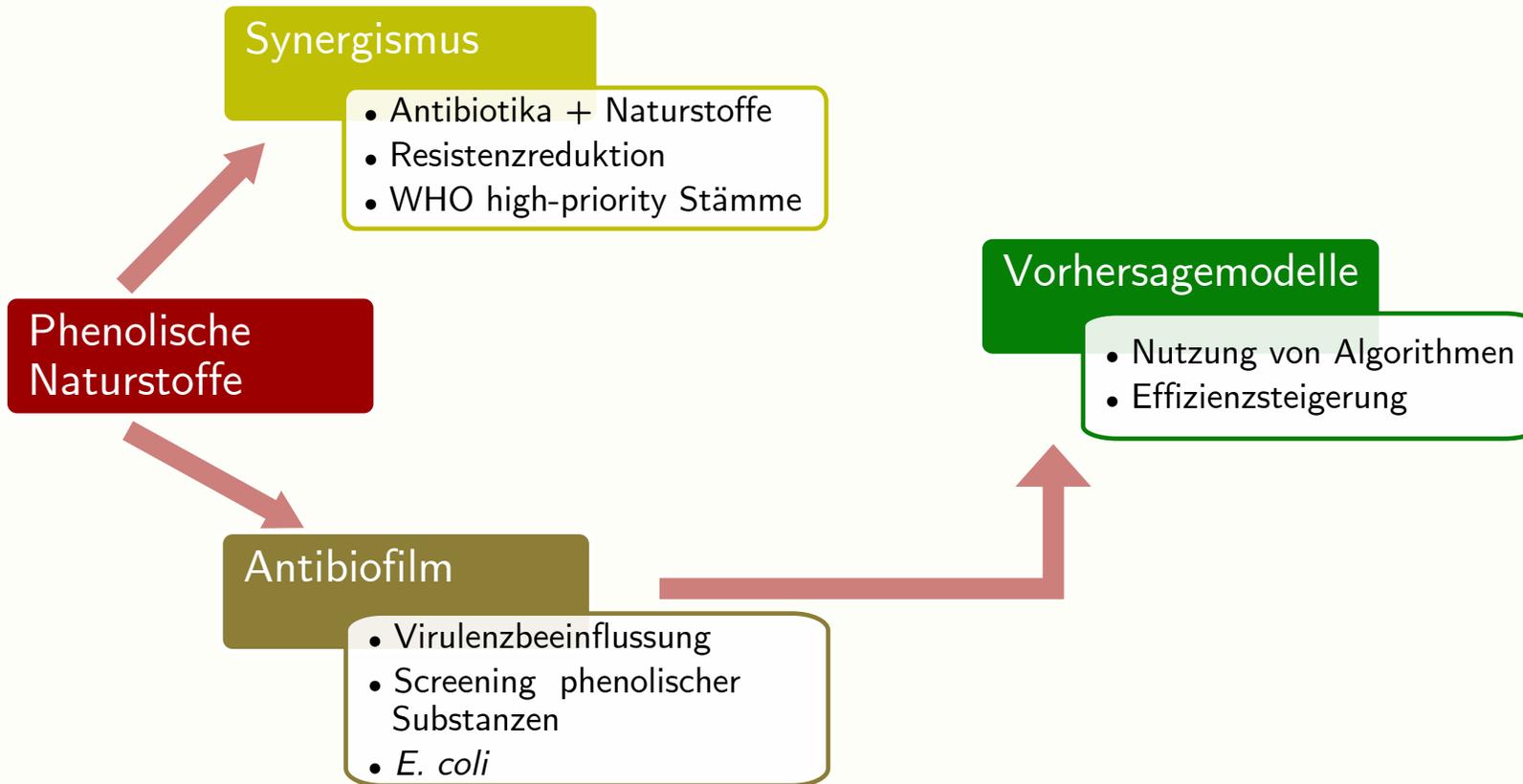
### Phenolische Naturstoffe

### Antibiofilm

- Virulenzbeeinflussung
- Screening phenolischer Substanzen
- *E. coli*

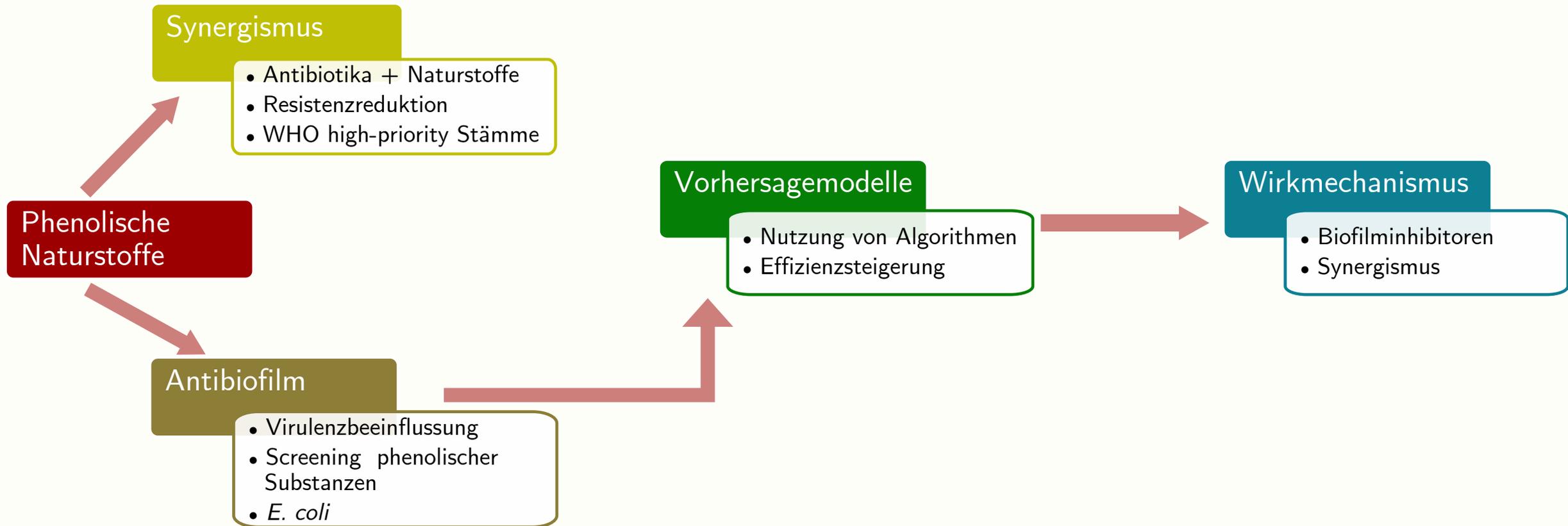


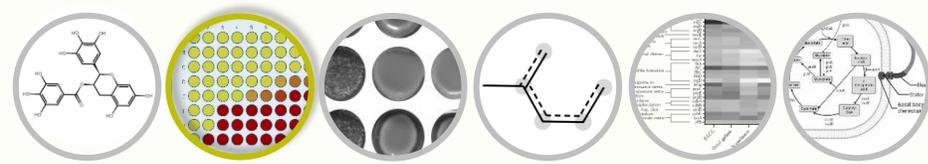
## Herangehensweise in der Arbeitsgruppe





## Herangehensweise in der Arbeitsgruppe





## ⚙️ Synergismus von Naturstoffen und Antibiotika - Hintergrund

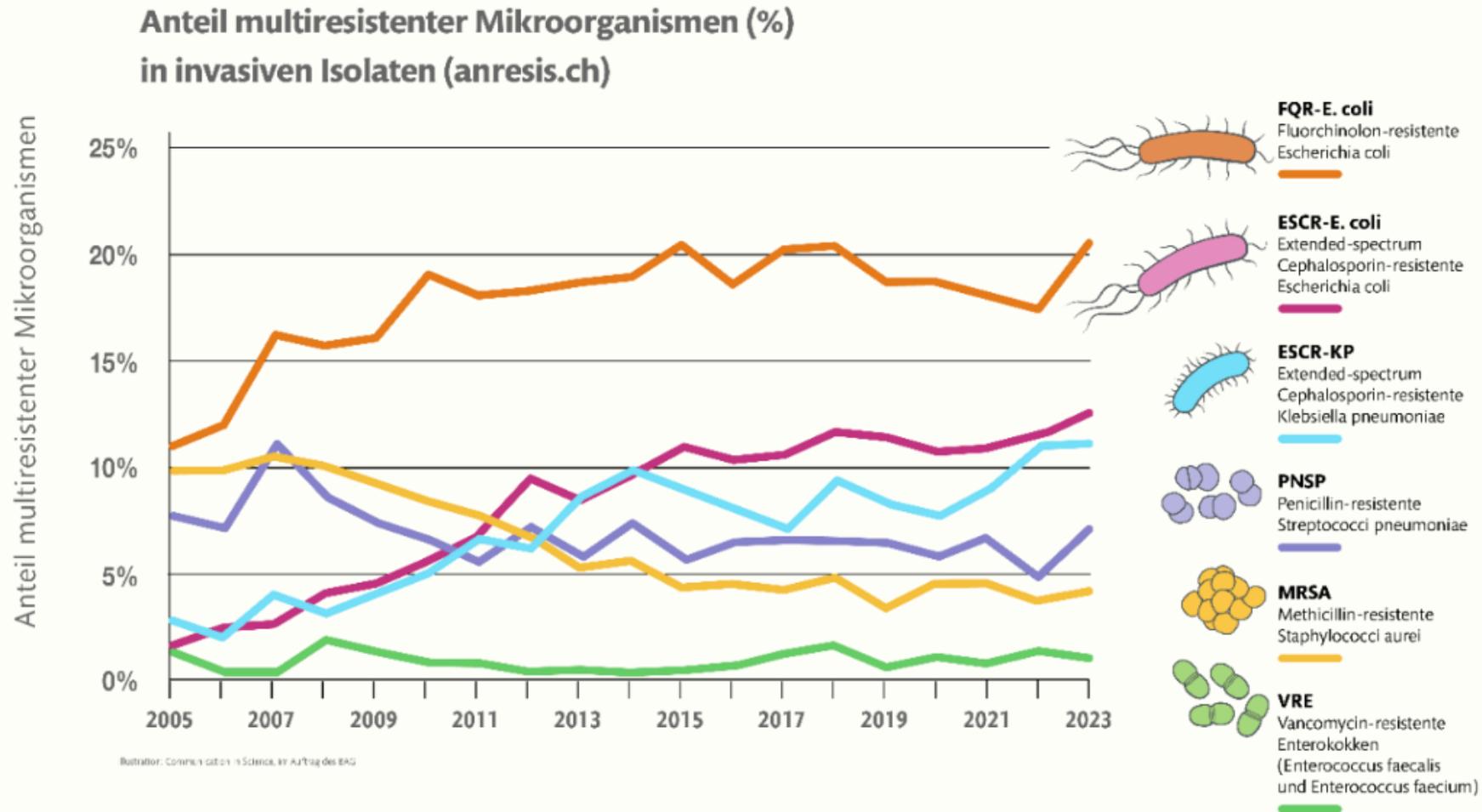
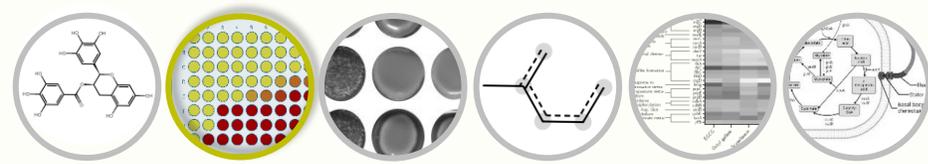


Abb. 3: Auswahl von Resistenzraten hochresistenter Mikroorganismen in der Schweiz<sup>3</sup>.



## ⚙ Synergismus von Naturstoffen und Antibiotika - Methodik

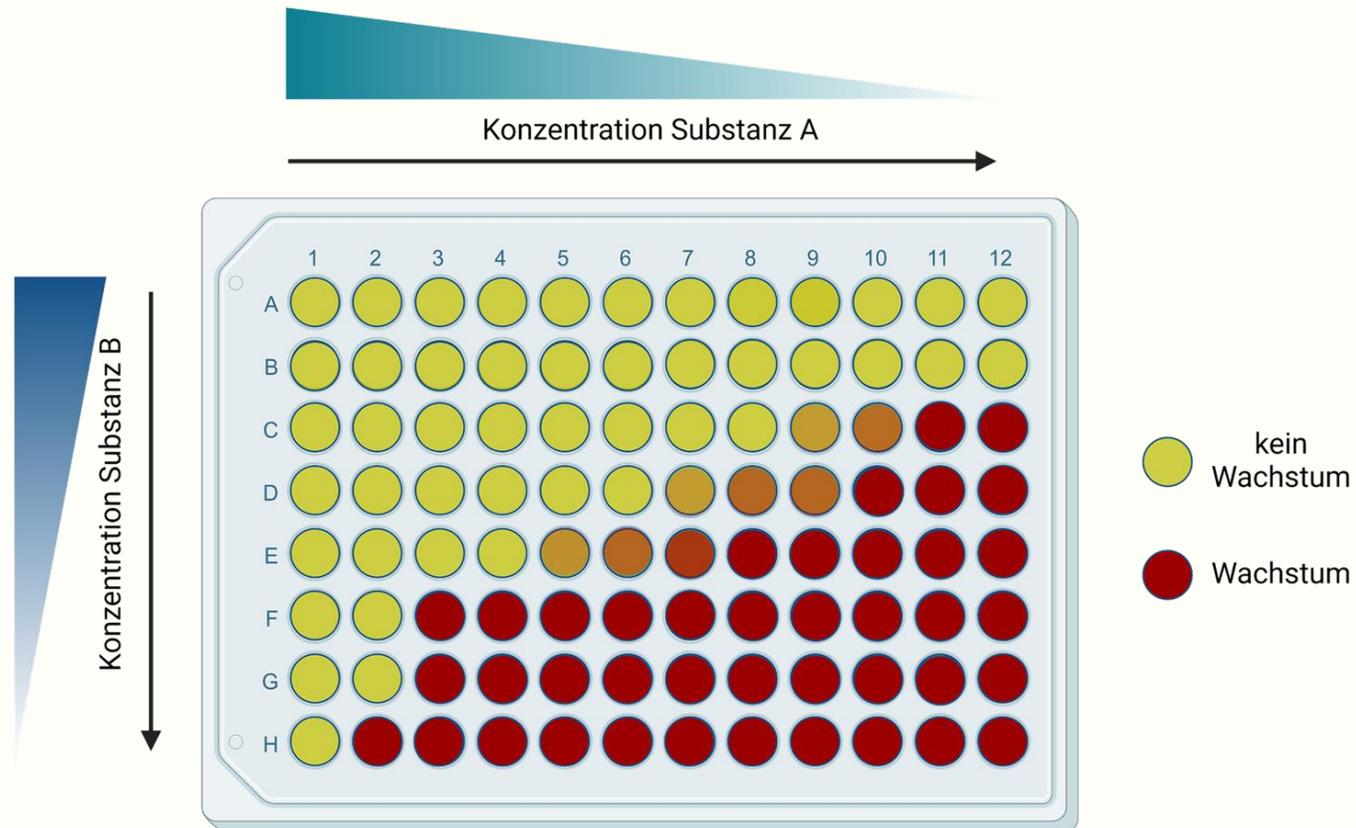
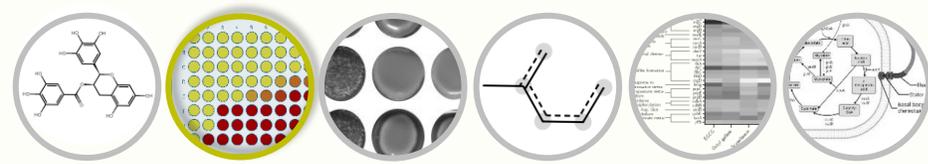
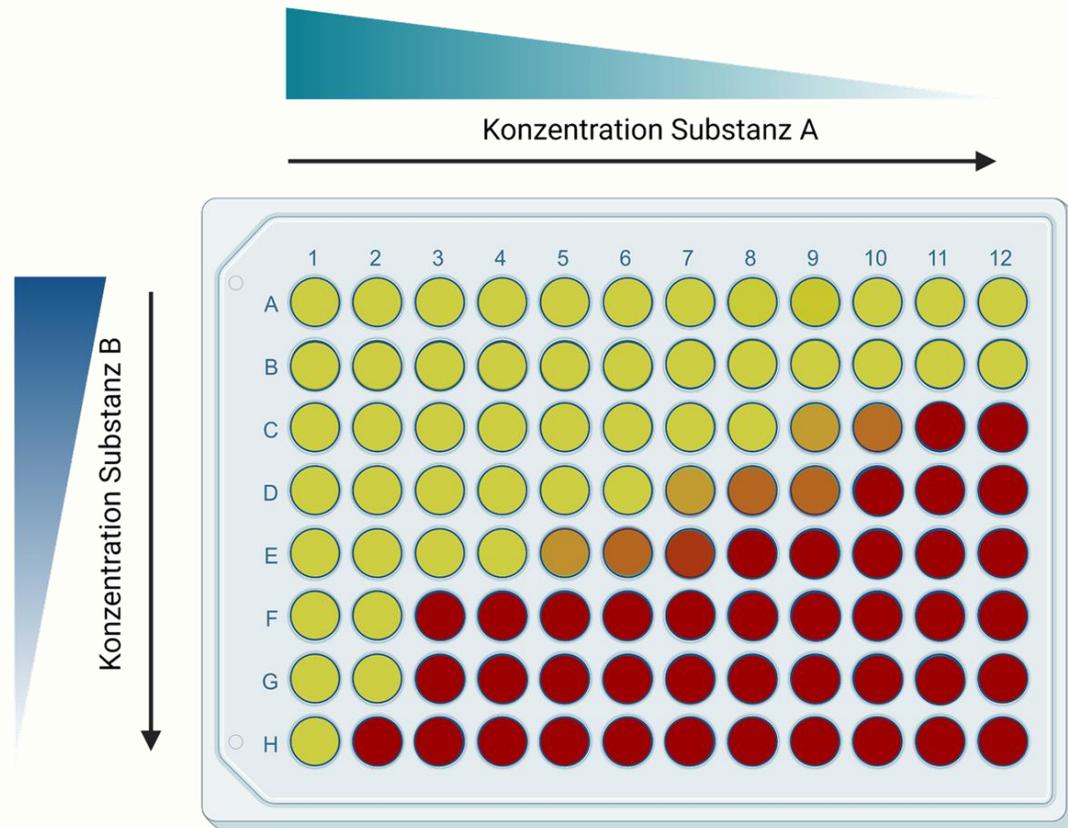


Abb. 5: Prinzip des Checkerboard-Assays. Erstellt mit Biorender.com.



## ⚙️ Synergismus von Naturstoffen und Antibiotika - Methodik



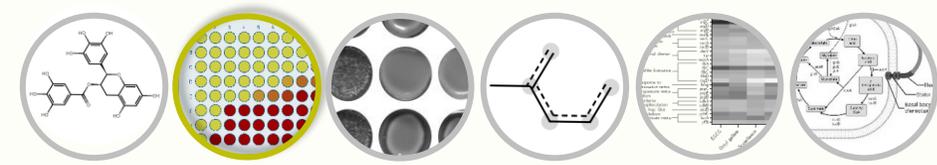
- Maß für Synergismus ist der Fractional Inhibitory Index (FICI)

$$FICI = \frac{MIC_A \text{ in Kombination}}{MIC_A \text{ allein}} + \frac{MIC_B \text{ in Kombination}}{MIC_B \text{ allein}}$$

● kein Wachstum  
● Wachstum

$\leq 0,5$	$\hat{=}$ synergistisch
$0,5 < 1$	$\hat{=}$ partialagonistisch
$1 < 2$	$\hat{=}$ indifferent
$\geq 2$	$\hat{=}$ antagonistisch

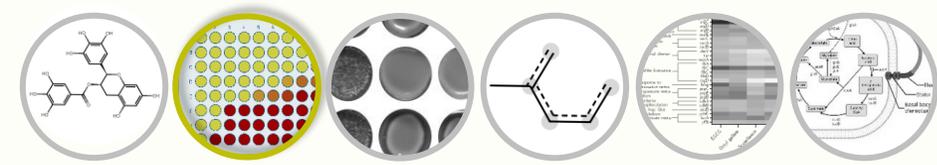
Abb. 5: Prinzip des Checkerboard-Assays. Erstellt mit Biorender.com.



## Synergismus von Naturstoffen und Antibiotika - Methodik

Stamm	Datenbank-nummer	Wirt	Resistenzen
<i>E. coli</i> *	PBIO904	Mensch	EUCAST-Ref.-Stamm
	PBIO730	Amsel	ESBL
	PBIO1442	Mensch	ESBL/3MRGN
<i>S. aureus</i>	PBIO901	Mensch	EUCAST-Ref.-Stamm
	PBIO483	Mensch	MRSA
<i>K. pneumoniae</i>	PBIO2010	Mensch	ESBL, EUCAST-Ref.-Stamm
	PBIO1455	Mensch	3MRGN
	PBIO1990	Mensch	4MRGN
<i>A. baumannii</i>	PBIO2202	Mensch	intrinsisch, Ref.-Stamm
	PBIO2212	Mensch	intrinsisch, Ref.-Stamm
	PBIO721	Fliege	intrinsisch
<i>P. aeruginosa</i>	PBIO903	Mensch	EUCAST-Ref.-Stamm
	PBIO712	Fliege	intrinsisch
	PBIO2208	Mensch	intrinsisch

Tab. 1: Charakteristika der verwendeten Bakterien. Ref. = Referenz, ESBL = Extended spectrum beta lactamase, MRGN = Multiresistente Gramnegative, \*Vertreter der Enterobacterales.

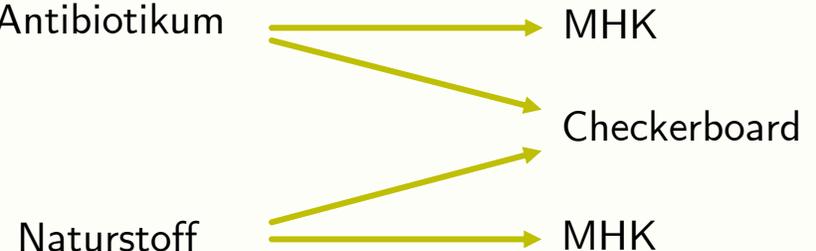


## Synergismus von Naturstoffen und Antibiotika - Methodik

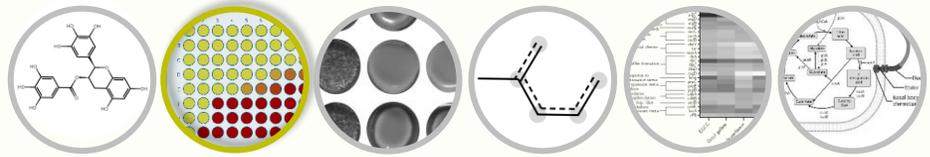
Stamm	Datenbank-nummer	Wirt	Resistenzen
<i>E. coli</i> *	PBIO904	Mensch	EUCAST-Ref.-Stamm
	PBIO730	Amsel	ESBL
	PBIO1442	Mensch	ESBL/3MRGN
<i>S. aureus</i>	PBIO901	Mensch	EUCAST-Ref.-Stamm
	PBIO483	Mensch	MRSA
<i>K. pneumoniae</i>	PBIO2010	Mensch	ESBL, EUCAST-Ref.-Stamm
	PBIO1455	Mensch	3MRGN
	PBIO1990	Mensch	4MRGN
<i>A. baumannii</i>	PBIO2202	Mensch	intrinsisch, Ref.-Stamm
	PBIO2212	Mensch	intrinsisch, Ref.-Stamm
	PBIO721	Fliege	intrinsisch
<i>P. aeruginosa</i>	PBIO903	Mensch	EUCAST-Ref.-Stamm
	PBIO712	Fliege	intrinsisch
	PBIO2208	Mensch	intrinsisch

Tab. 1: Charakteristika der verwendeten Bakterien. Ref. = Referenz, ESBL = Extended spectrum beta lactamase, MRGN = Multiresistente Gramnegative, \*Vertreter der Enterobacterales.

Antibiotikum

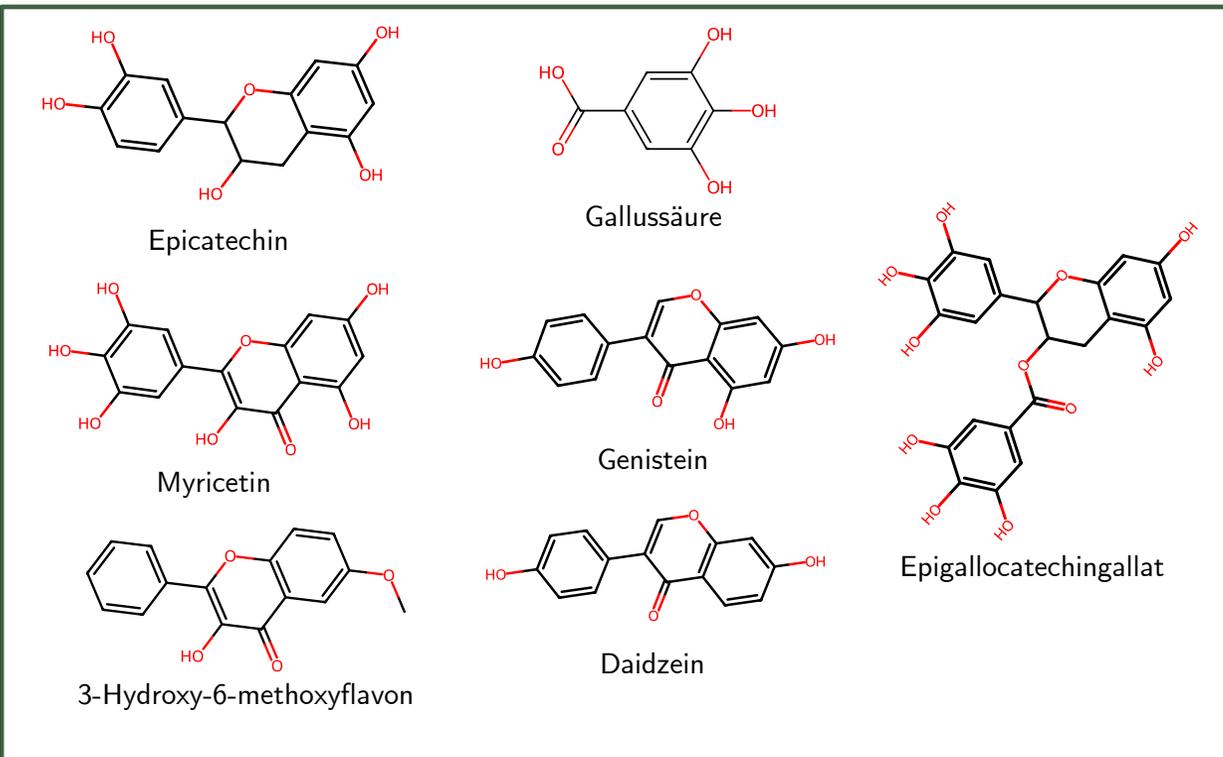


Naturstoff

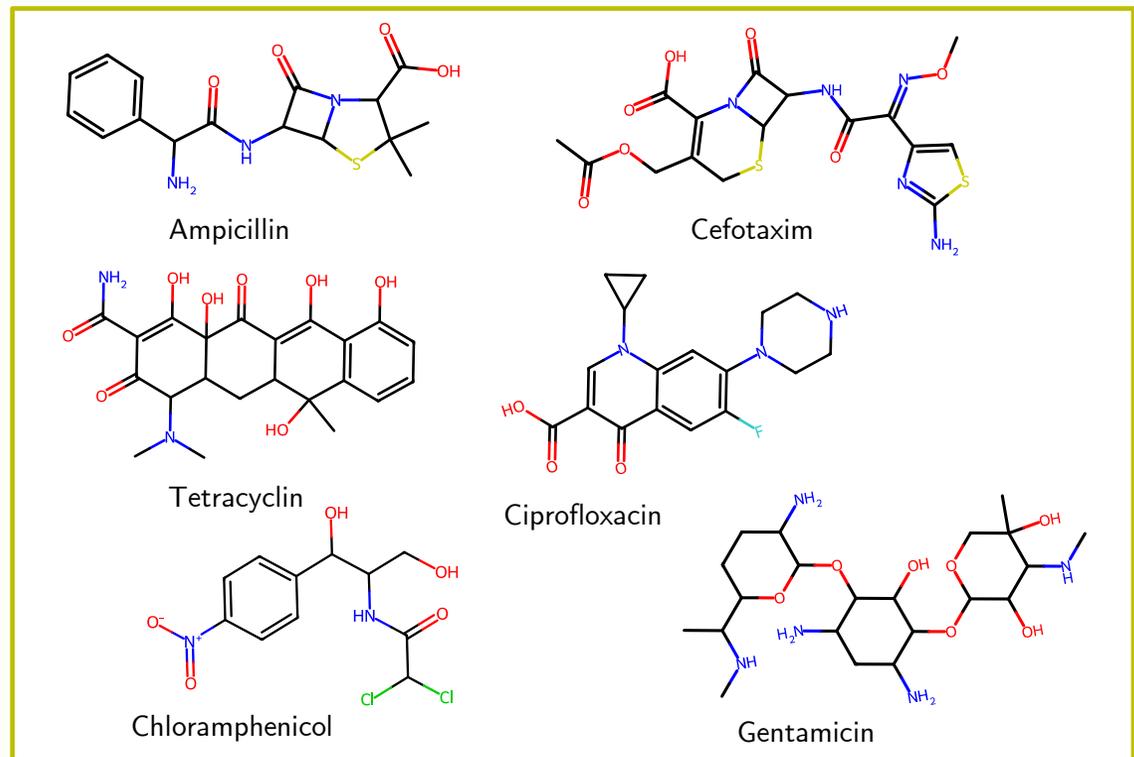


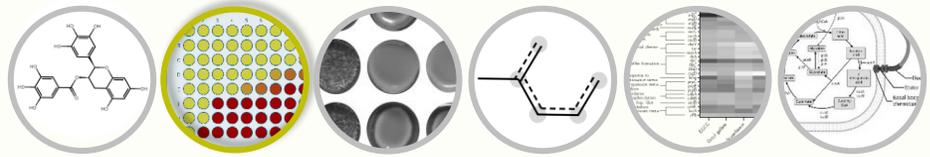
# ⚙ Synergismus von Naturstoffen und Antibiotika - Methodik

## Untersuchte Naturstoffe

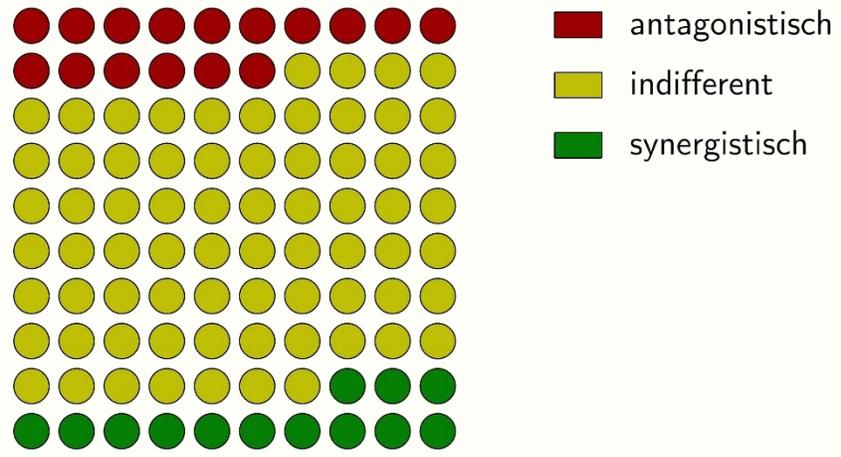


## Untersuchte Antibiotika





## Synergismus von Naturstoffen und Antibiotika - Ergebnisse



Total = 188

Abb. 6: Initiale Testung von sechs Antibiotika ( $256-0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) mit sieben Naturstoffen ( $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) gegen ESKAPE-Pathogene;  $n = 3$ .

## Synergismus von Naturstoffen und Antibiotika - Ergebnisse

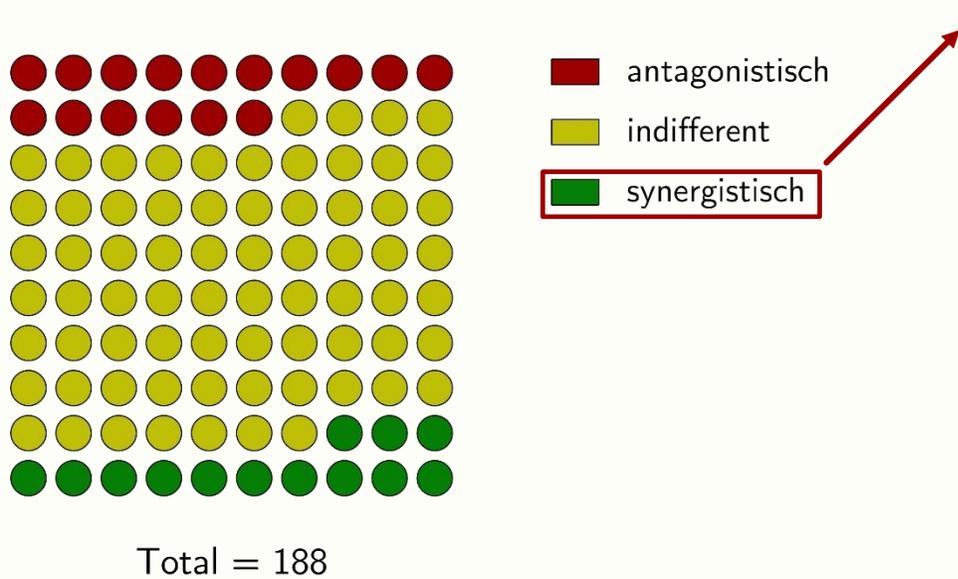


Abb. 6: Initiale Testung von sechs Antibiotika ( $256-0,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) mit sieben Naturstoffen ( $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) gegen ESKAPE-Pathogene;  $n = 3$ .

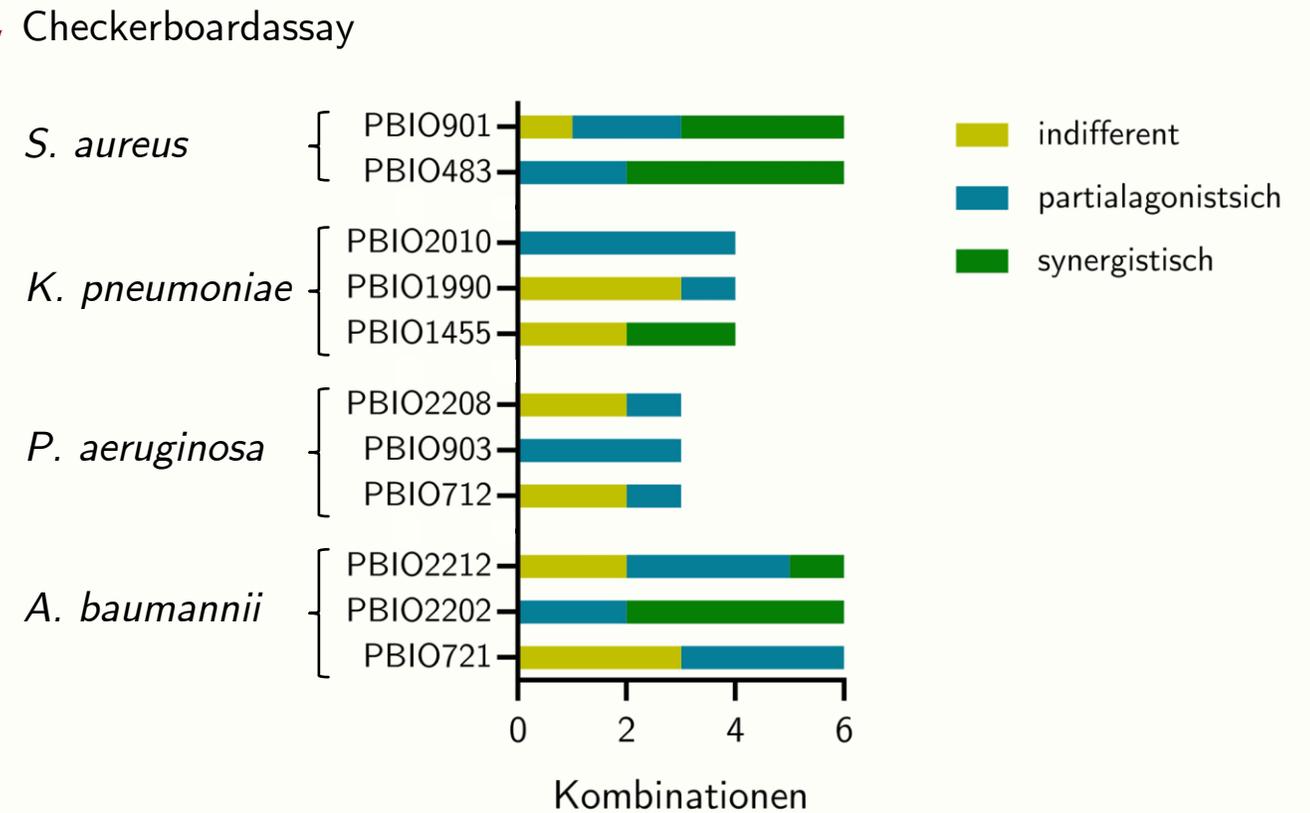
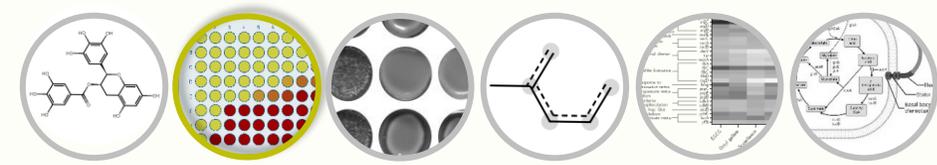


Abb. 7: Ausgewählte Kombinationen antimikrobieller Substanzen gegen verschiedene ESKAPE-Pathogene;  $n = 3$ .



## Synergismus von Naturstoffen und Antibiotika - Ergebnisse

Tab. 2: Wirksamste antimikrobielle Kombinationen aus Antibiotikum und Naturstoff gegen verschiedene ESKAPE-Pathogene.

Spezies	Antibiotikum	EUCAST-Klassifizierung	kombinierter Naturstoff	Naturstoffkonzentration [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Veränderte EUCAST-Klassifikation
<i>A. baumannii</i>	Gentamicin	resistent	EGCG	100	sensibel
			Daidzein	50	sensibel
			Genistein	100	sensibel
<i>S. aureus</i>	Chloramphenicol	resistent	EGCG	50	sensibel
			Myricetin	200	sensibel
<i>K. pneumoniae</i>	Ciprofloxacin	sensibel bei ansteigender Exposition	EGCG	100	sensibel
			Myricetin	12,5	sensibel
<i>P. aeruginosa</i>	Ciprofloxacin	resistent	EGCG	200	sensibel bei ansteigender Exposition
			Myricetin	200	sensibel bei ansteigender Exposition



# Biofilm – Bildung und Hemmung - Hintergrund

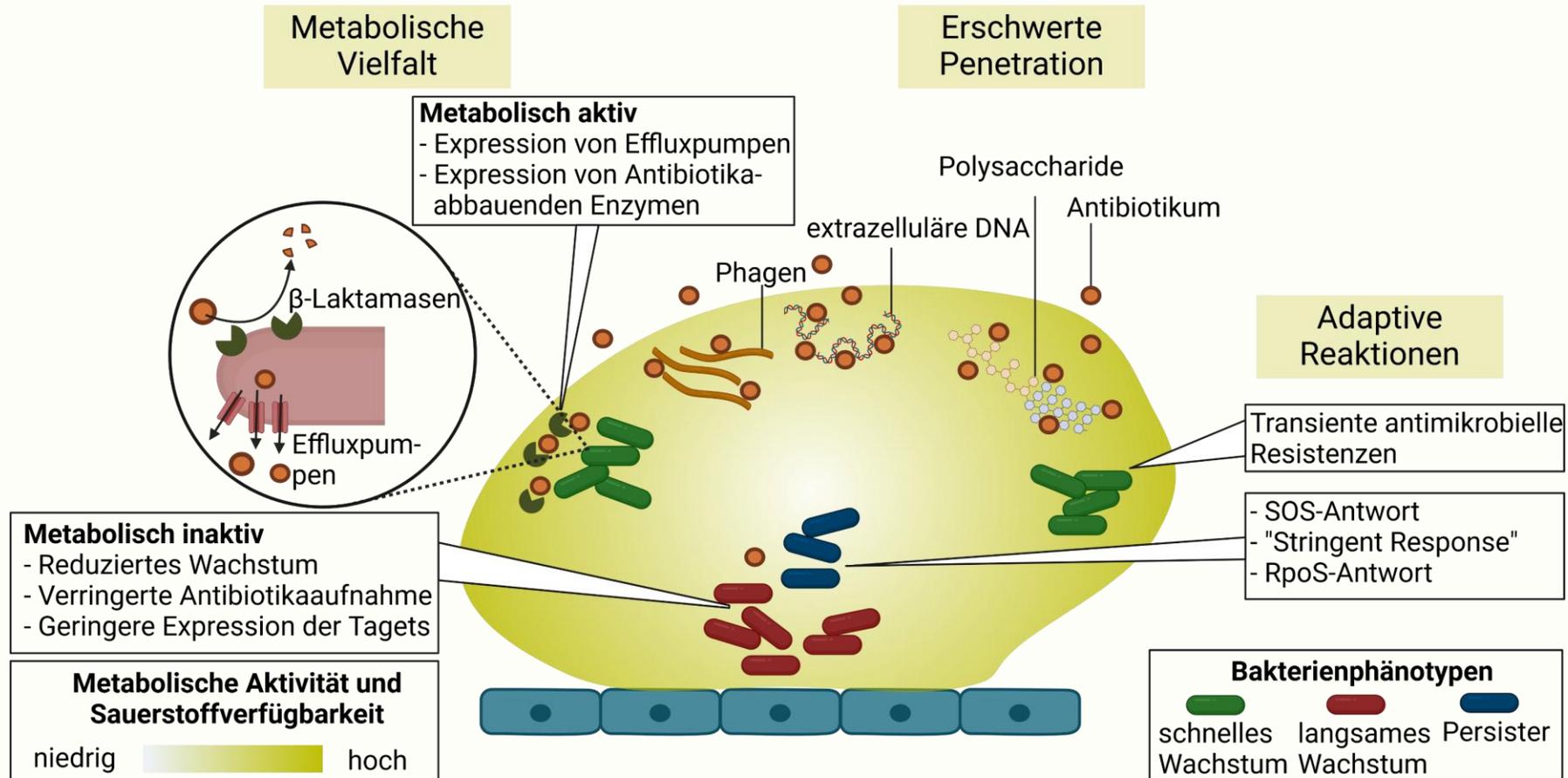
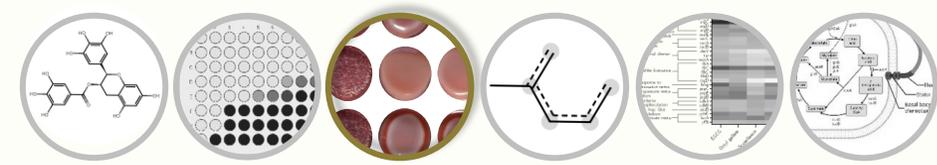
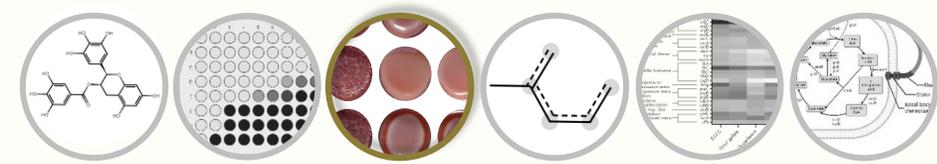


Abb. 8: Mechanismen antimikrobieller Resistenz, Toleranz und Persistenz in Biofilmen. Abbildung erstellt mit BioRender.com nach Ciofu *et al.*<sup>5</sup>



## Biofilm – Bildung und Hemmung - Methodik

- Testung von 320 phenolischen Substanzen einer Datenbank (AnalytiCon Discovery GmbH)

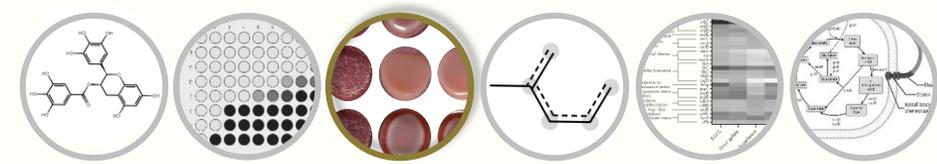


## Biofilm – Bildung und Hemmung - Methodik

- Testung von 320 phenolischen Substanzen einer Datenbank (AnalytiCon Discovery GmbH)



Abb. 9: Makrokolonieassay auf kongorothaltigem Agar; PK = Positivkontrolle.



## Biofilm – Bildung und Hemmung - Methodik

- Testung von 320 phenolischen Substanzen einer Datenbank (AnalytiCon Discovery GmbH)

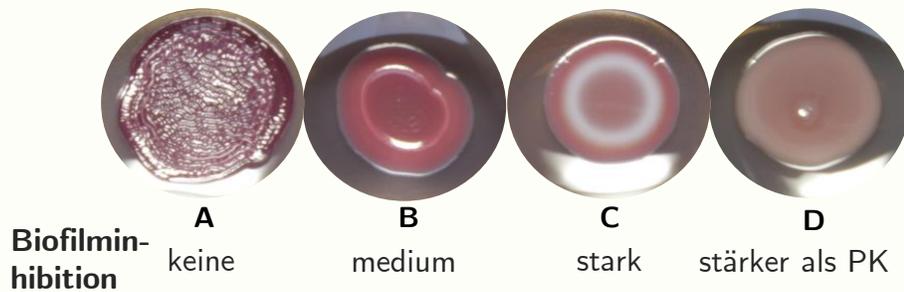
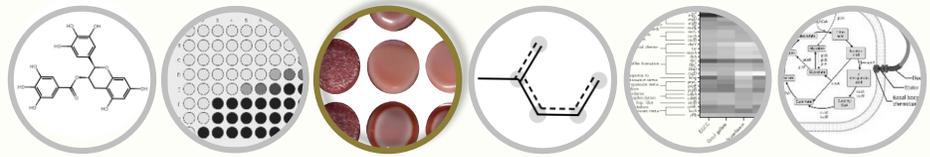


Abb. 9: Makrokolonieassay auf kongorothaltigem Agar; PK = Positivkontrolle.

Tab. 3: Charakteristika der untersuchten Bakterienstämme im Biofilm-inhibitions- und Adhäsionsassay.

Stamm	Wirt	Herkunft	Resistenzgene	CTXM-Typ, Sequenztyp
<i>E. coli</i> PBIO729	Hund	Harnwegsinfektion	<i>bla</i> TEM-1, <i>bla</i> OXA-1, <i>tet</i> (A), <i>tet</i> (R), <i>aadA</i> , <i>aac</i> (6')-ib-cr	CTX-M-15 ST131
<i>E. coli</i> PBIO730	Amsel	Kot	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (R), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadA</i> , <i>aac</i> (3)-II, <i>mph</i> (A), <i>mrx</i> , <i>mphR</i> (A), <i>dhfr</i> VII	CTX-M-15 ST648
<i>E. coli</i> PBIO1986	Mensch	unbekannt	keine	K12



# Biofilm – Bildung und Hemmung - Methodik



- Testung von 320 phenolischen Substanzen einer Datenbank (AnalytiCon Discovery GmbH)

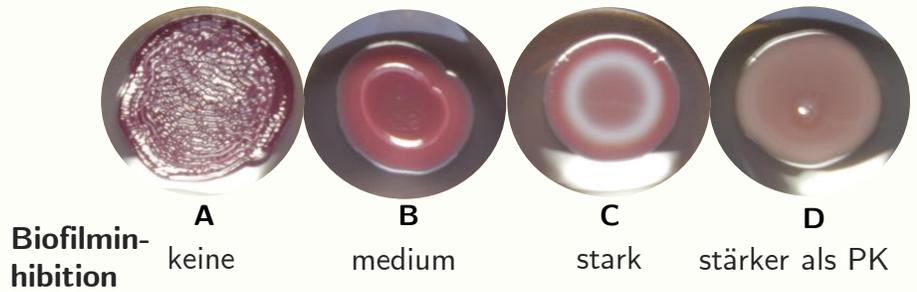


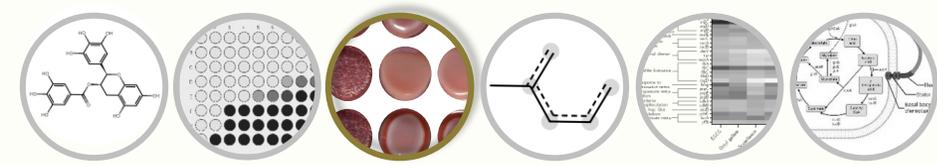
Abb. 9: Makrokolonieassay auf kongorothaltigem Agar; PK = Positivkontrolle.



Abb. 10: Biofilm im Adhäsionsassay, gefärbt mit Safranin-T nach 24 h Wachstum bei 37 °C.

Tab. 3: Charakteristika der untersuchten Bakterienstämme im Biofilm-inhibitions- und Adhäsionsassay.

Stamm	Wirt	Herkunft	Resistenzgene	CTXM-Typ, Sequenztyp
<i>E. coli</i> PBIO729	Hund	Harnwegsinfektion	<i>bla</i> TEM-1, <i>bla</i> OXA-1, <i>tet</i> (A), <i>tet</i> (R), <i>aadA</i> , <i>aac</i> (6')-ib-cr	CTXM-15 ST131
<i>E. coli</i> PBIO730	Amsel	Kot	<i>tet</i> (A), <i>tet</i> (R), <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadA</i> , <i>aac</i> (3)-II, <i>mph</i> (A), <i>mrx</i> , <i>mphR</i> (A), <i>dhfr</i> VII	CTXM-15 ST648
<i>E. coli</i> PBIO1986	Mensch	unbekannt	keine	K12



## Biofilm – Bildung und Hemmung - Ergebnisse

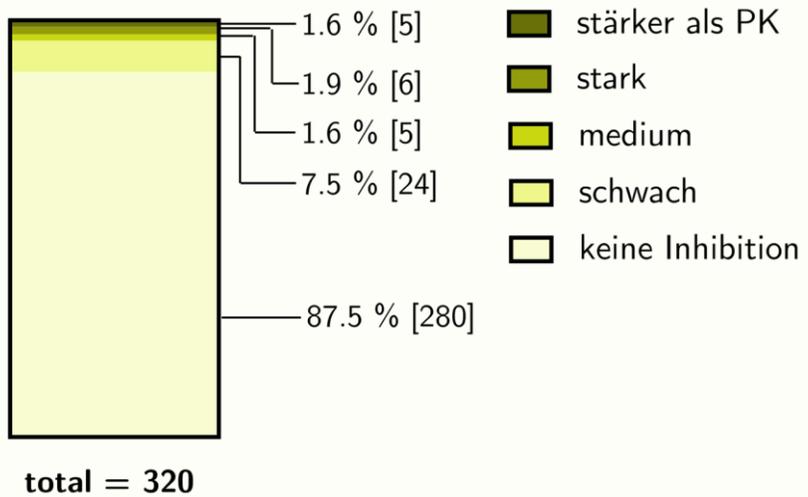
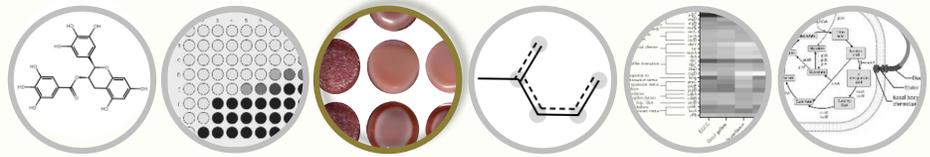


Abb. 11: Substanzdatenbankscreening ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) zur Beeinflussung der Biofilmbildung von *E. coli* PBIO729 und PBIO730 auf Kongorotagar nach 48 h Inkubation;  $n = 1$ .



## Biofilm – Bildung und Hemmung - Ergebnisse

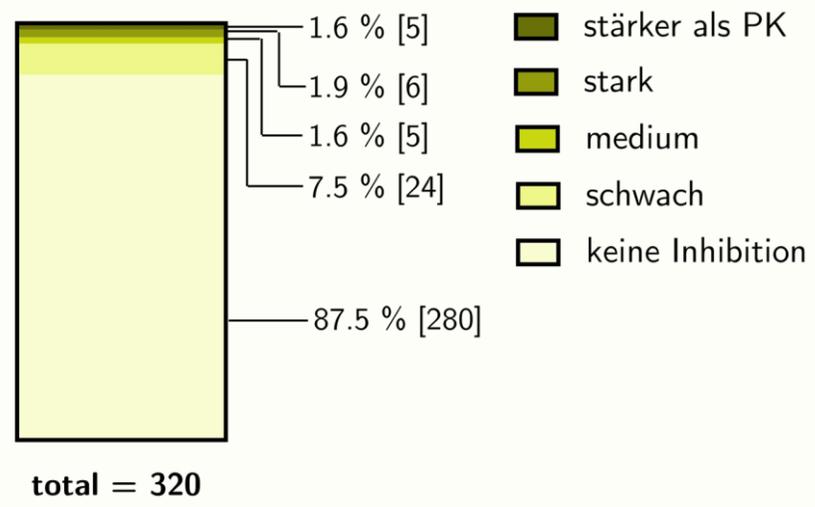


Abb. 11: Substanzdatenbankscreening ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) zur Beeinflussung der Biofilmbildung von *E. coli* PBIO729 und PBIO730 auf Kongorotagar nach 48 h Inkubation; n = 1.

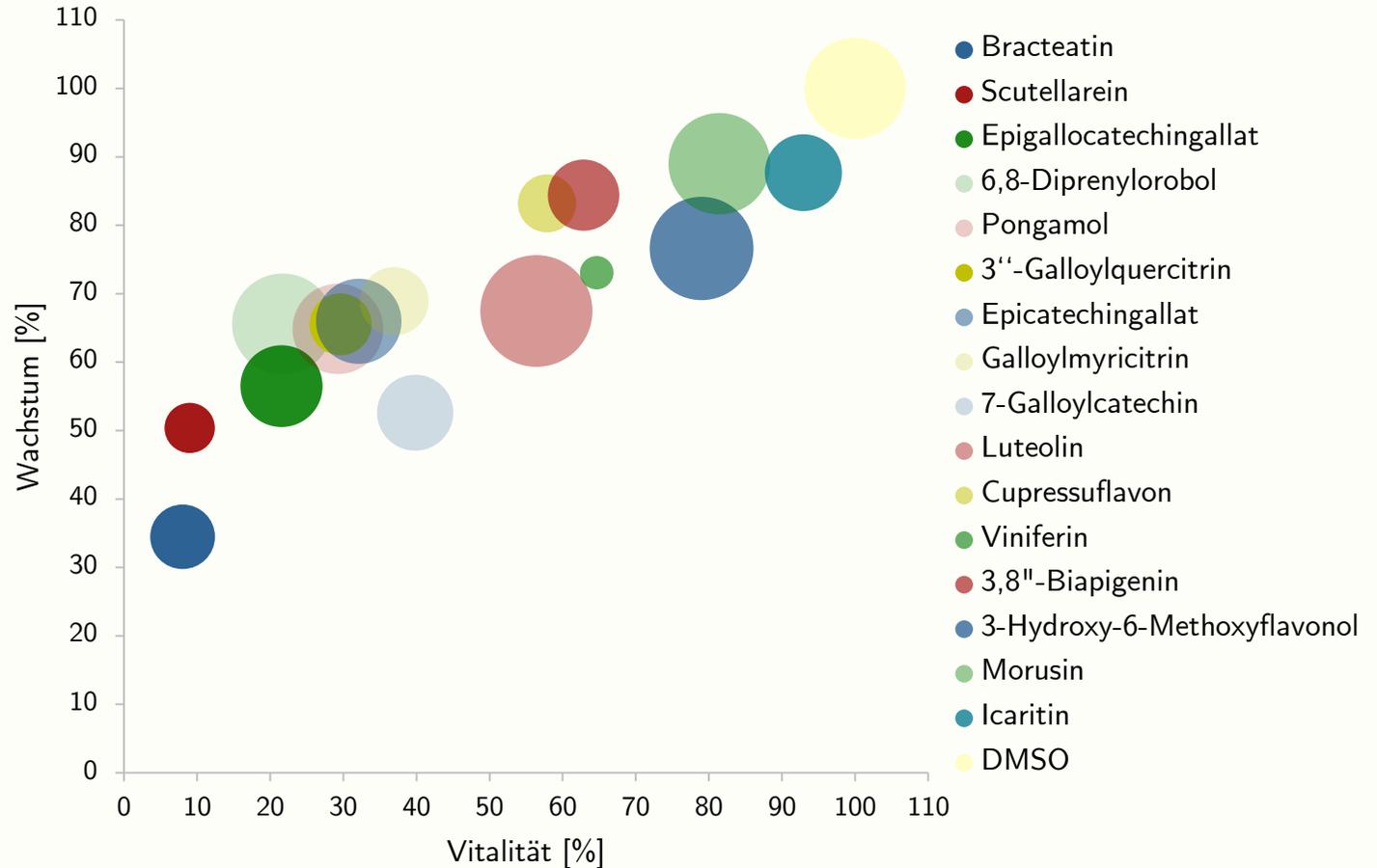


Abb. 12: Zusammenhang des Wachstums von *E. coli* PBIO1986 und der Vitalität der planktonischen Bakterien unter Behandlung mit phenolischen Naturstoffen ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Dargestellt ist eine Auswahl biofilminhibierender Substanzen. Die Blasengröße repräsentiert die Biofilmbildung nach 24 h; n = 1.



## Biofilm – Bildung und Hemmung - Ergebnisse

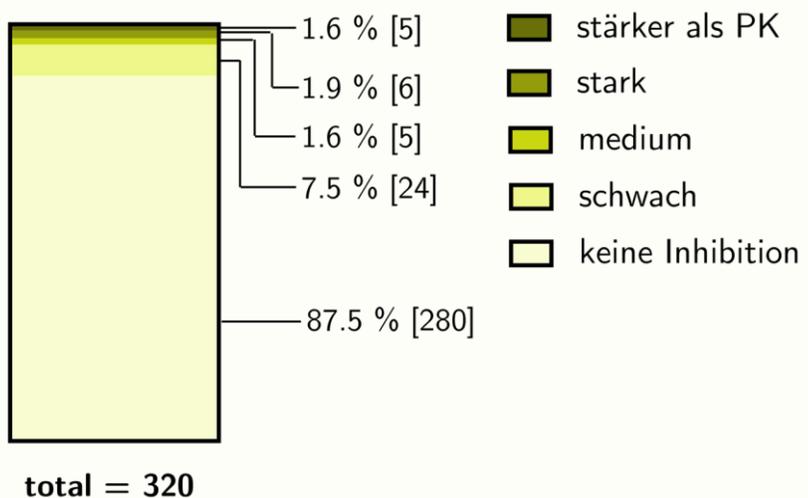


Abb. 11: Substanzdatenbankscreening ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) zur Beeinflussung der Biofilmbildung von *E. coli* PBIO729 und PBIO730 auf Kongorotagar nach 48 h Inkubation;  $n = 1$ .

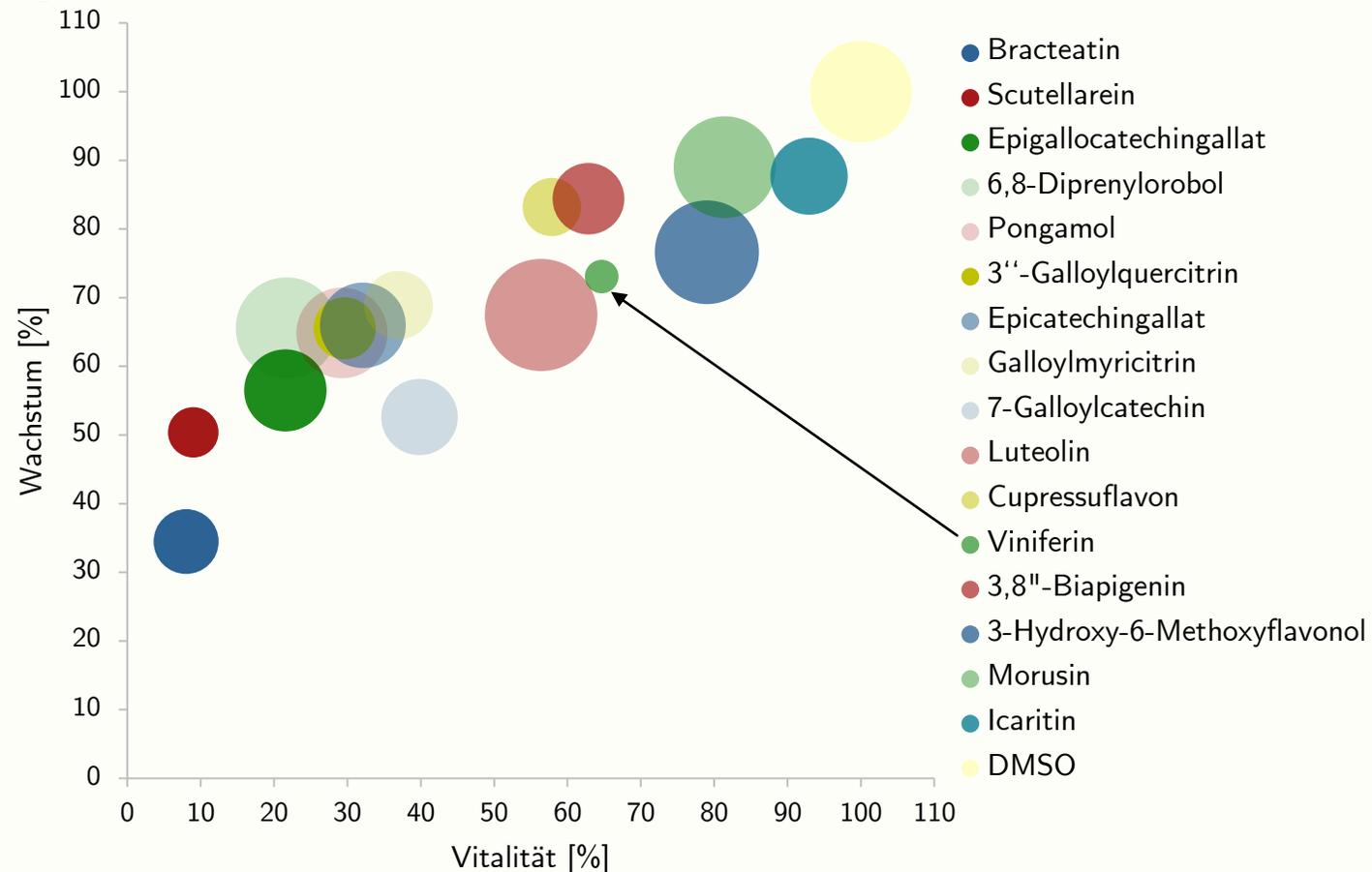
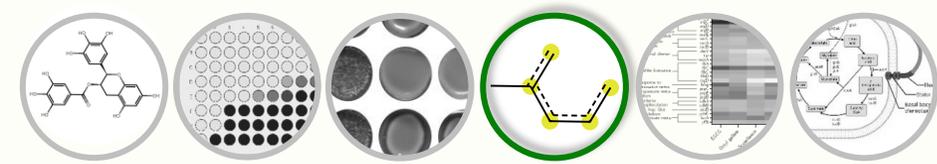
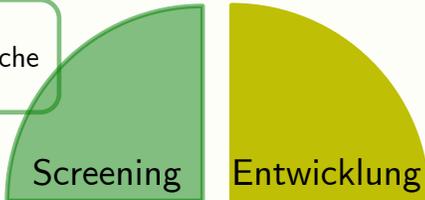


Abb. 12: Zusammenhang des Wachstums von *E. coli* PBIO1986 und der Vitalität der planktonischen Bakterien unter Behandlung mit phenolischen Naturstoffen ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Dargestellt ist eine Auswahl biofilminhibierender Substanzen. Die Blasengröße repräsentiert die Biofilmbildung nach 24 h;  $n = 1$ .

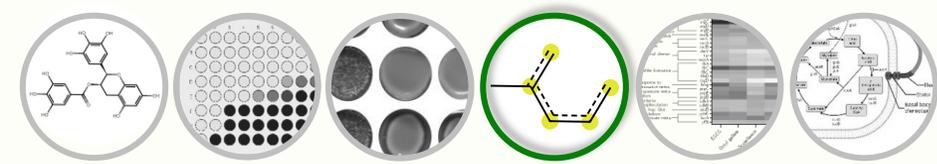


## Vorhersagemodell - Methodik

- Biofilmassay
- 320 phenolische Substanzen

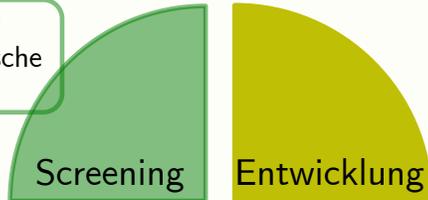


- Vorhersagemodell basierend auf zwei Ansätzen: strukturelle Ähnlichkeit und bayesianische Wahrscheinlichkeiten



## Vorhersagemodell - Methodik

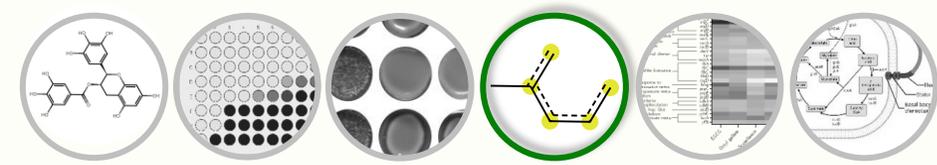
- Biofilmassay
- 320 phenolische Substanzen



- Vorhersagemodell basierend auf zwei Ansätzen: strukturelle Ähnlichkeit und bayesianische Wahrscheinlichkeiten
- Vorbereitung des Datensatzes (Deglykosylierung, Teilung in Trainings- [185] und Testdatensatz [47])
- Training des Modells

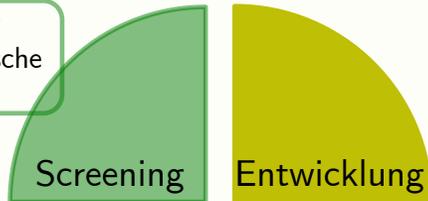
Tab. 4: Anzahl der Substanzen nach Effekt auf die Biofilmbildung von *E. coli*, sowie zusammengefasst in „aktiv“ (grün) und „inaktiv“ (rot) für das Vorhersagemodell vor und nach Deglykosylierung.

	kein	schwach	medium	stark	stärker als EGCG
	280	24	5	6	5
	304		16		
	304 → 218		16 → 14		



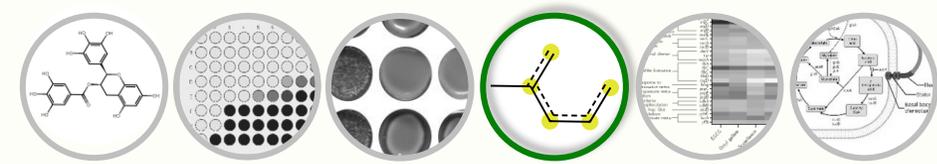
## Vorhersagemodell - Methodik

- Biofilmassay
- 320 phenolische Substanzen



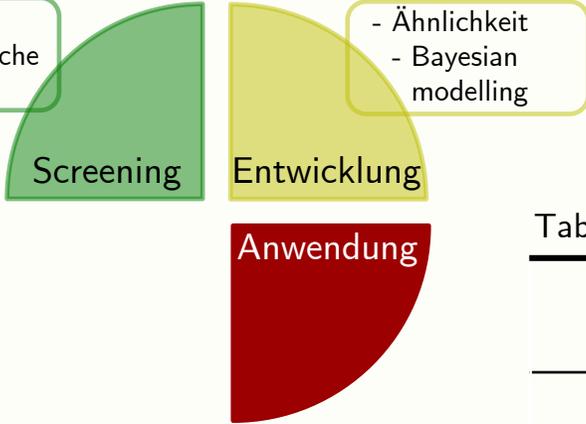
Tab. 5: Ergebnisse der Modellentwicklung.

Modellierungsansatz	Sensitivität	Spezifität
Ähnlichkeit	50,0 %	82,6 %
Bayesian Trainingsset	77,8 %	90,3 %
Bayesian Testset	60,0 %	90,5 %
kombiniert Trainingsset	88,9 %	74,4 %
kombiniert Testset	80,0 %	78,6 %



## Vorhersagemodell - Ergebnisse

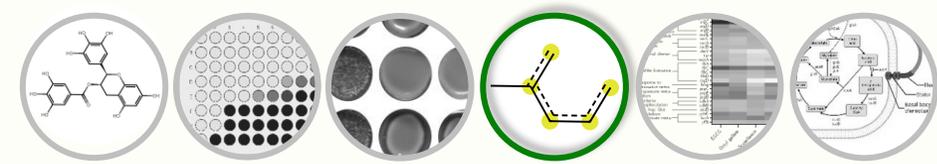
- Biofilmassay
- 320 phenolische Substanzen



- Ähnlichkeit
- Bayesian modelling

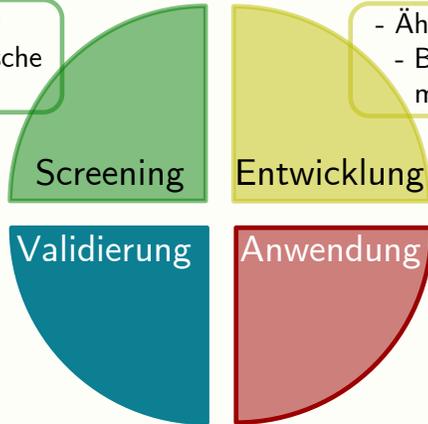
Tab. 6: Anwendung des Modells auf verschiedene Naturstoffdatenbanken<sup>6</sup>.

Datenbank	Subst. nach Vorbereitung	Berechnete Inhibitoren
Flavonoids	386	21
Phenols	169	13
Polyphenols	79	5
Natural compounds	436	10
Natural product-like compounds	753	11
Total	1823	60

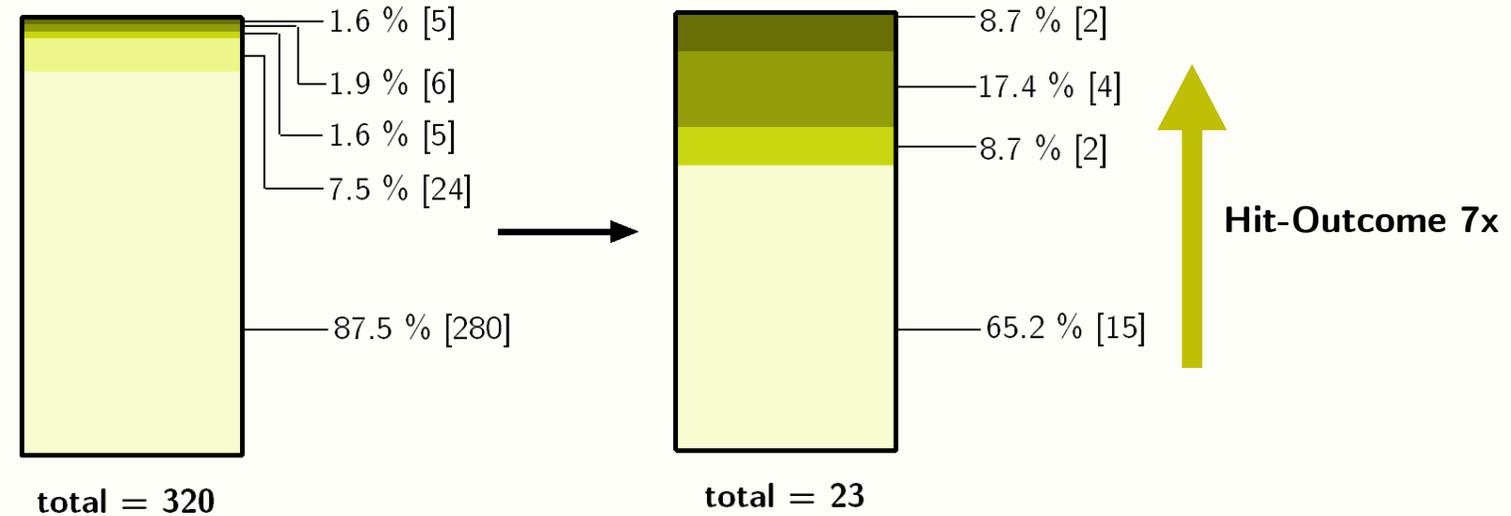


## Vorhersagemodell - Ergebnisse

- Biofilmassay  
- 320 phenolische Substanzen

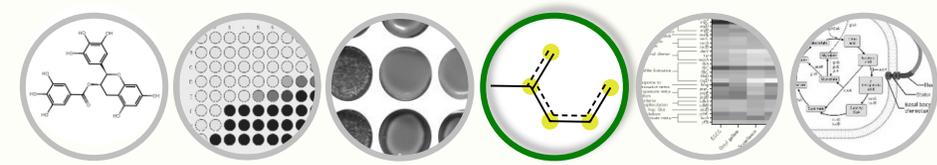


- Ähnlichkeit  
- Bayesian modelling

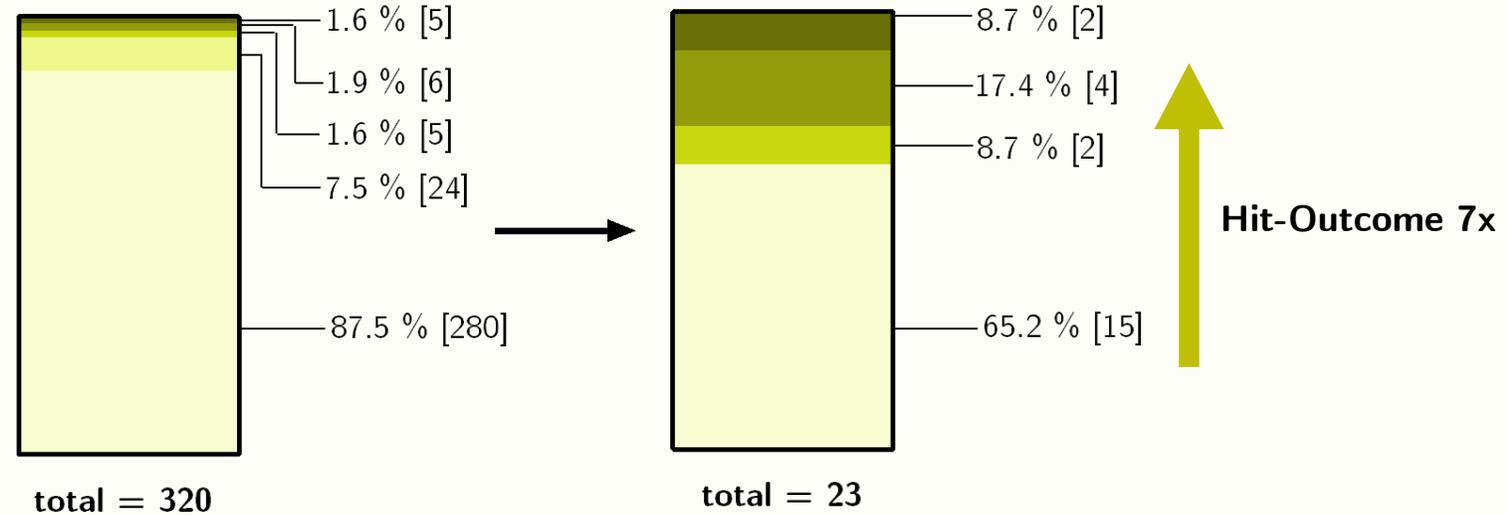
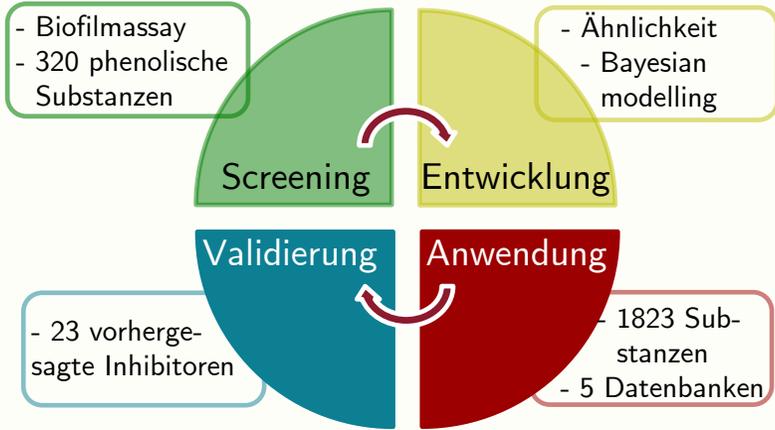


stärker als PK
  stark
  medium
  schwach
  keine Inhibition

Abb. 13: Biofilminhibitionstests ohne (links) und mit (rechts) mathematischer Vorhersage.



## Vorhersagemodell - Ergebnisse



stärker als PK
  stark
  medium
  schwach
  keine Inhibition

Abb. 13: Biofilminhibitionstests ohne (links) und mit (rechts) mathematischer Vorhersage.

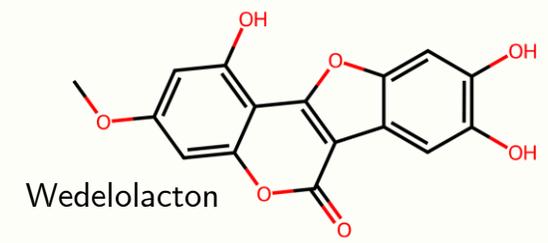
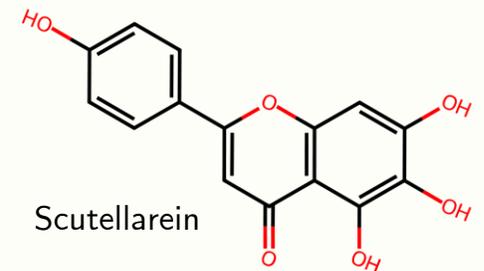
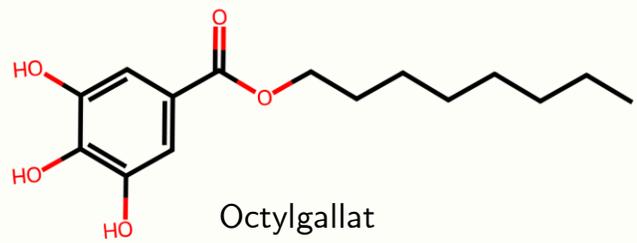
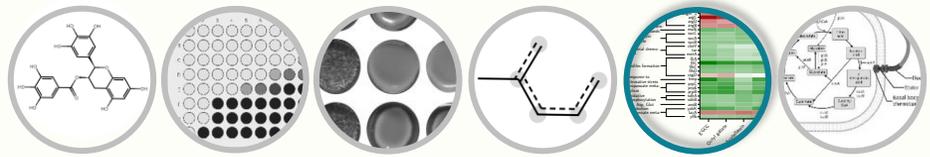


Abb. 14: Bislang unbekannte vorhergesagte Biofilminhibitoren.



## Wirkmechanismusaufklärung - Methodik

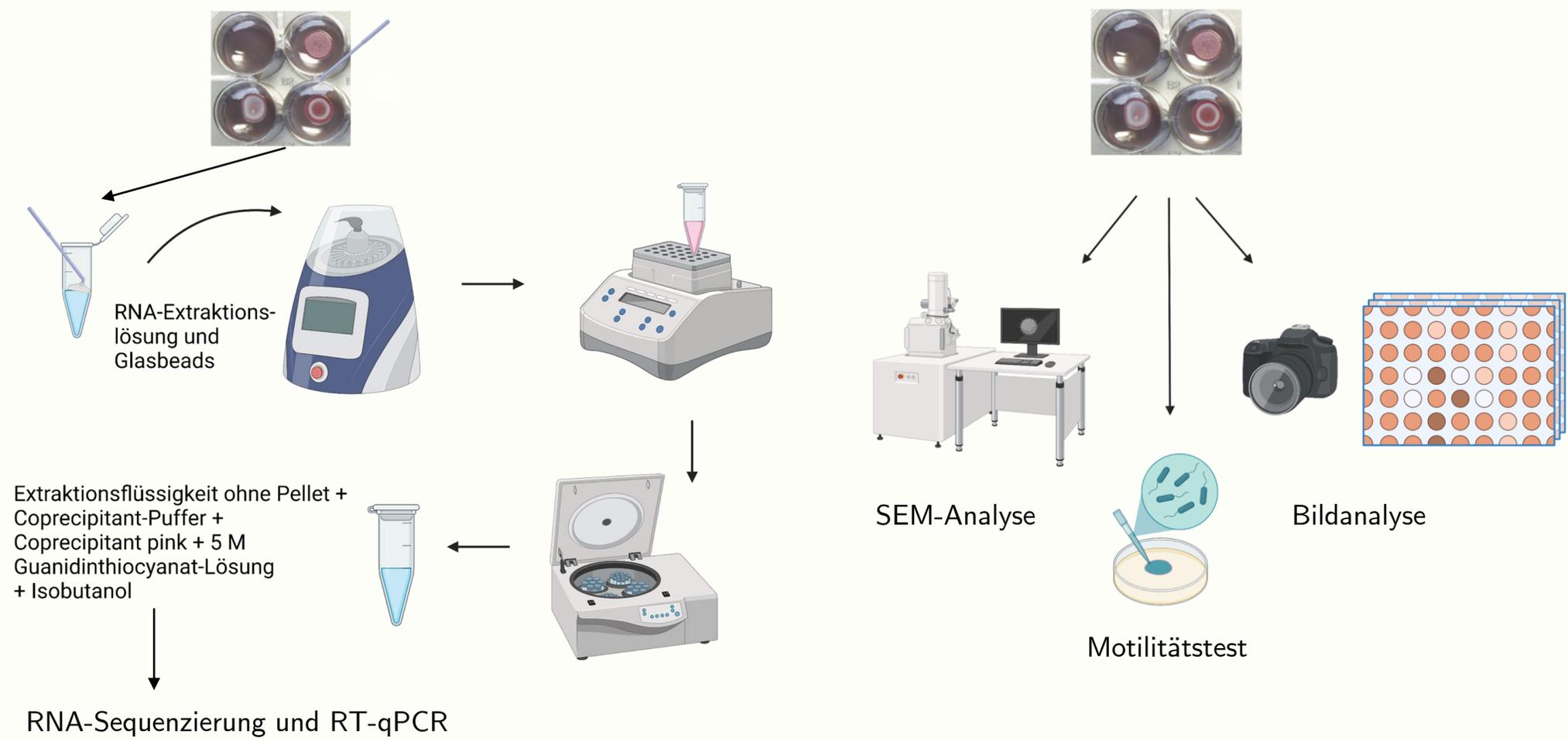
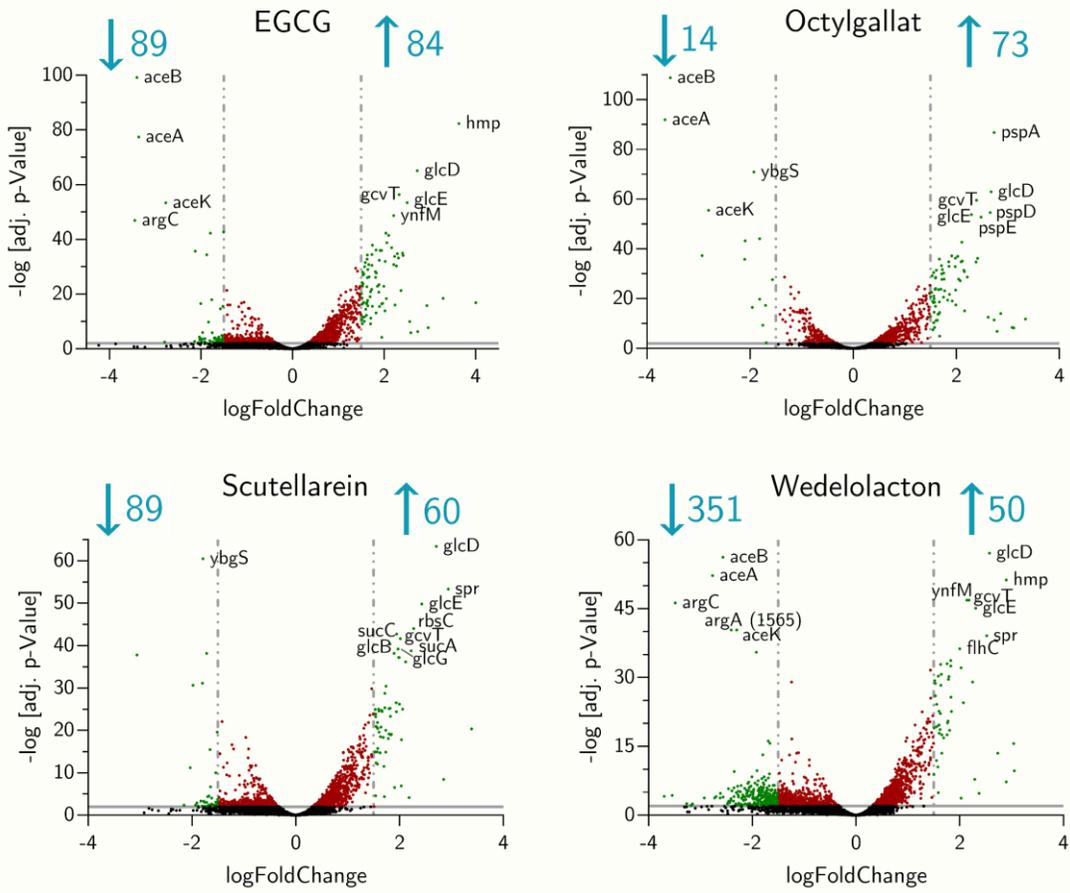


Abb. 15: Methodenschemata zur Analyse der Biofilmbildung. SEM = Scanning Electron Microscope. Abbildung erstellt mit Biorender.com.

Wirkmechanismusaufklärung - Ergebnisse RNA-seq.



● statistisch signifikant reguliert und überexprimiert   ● statistisch signifikant reguliert   ● weder signifikant reguliert noch überexprimiert

Abb. 16: Volcano-Plots der RNA-Sequenzierungsergebnisse.



# Wirkmechanismusaufklärung - Ergebnisse RNA-seq.

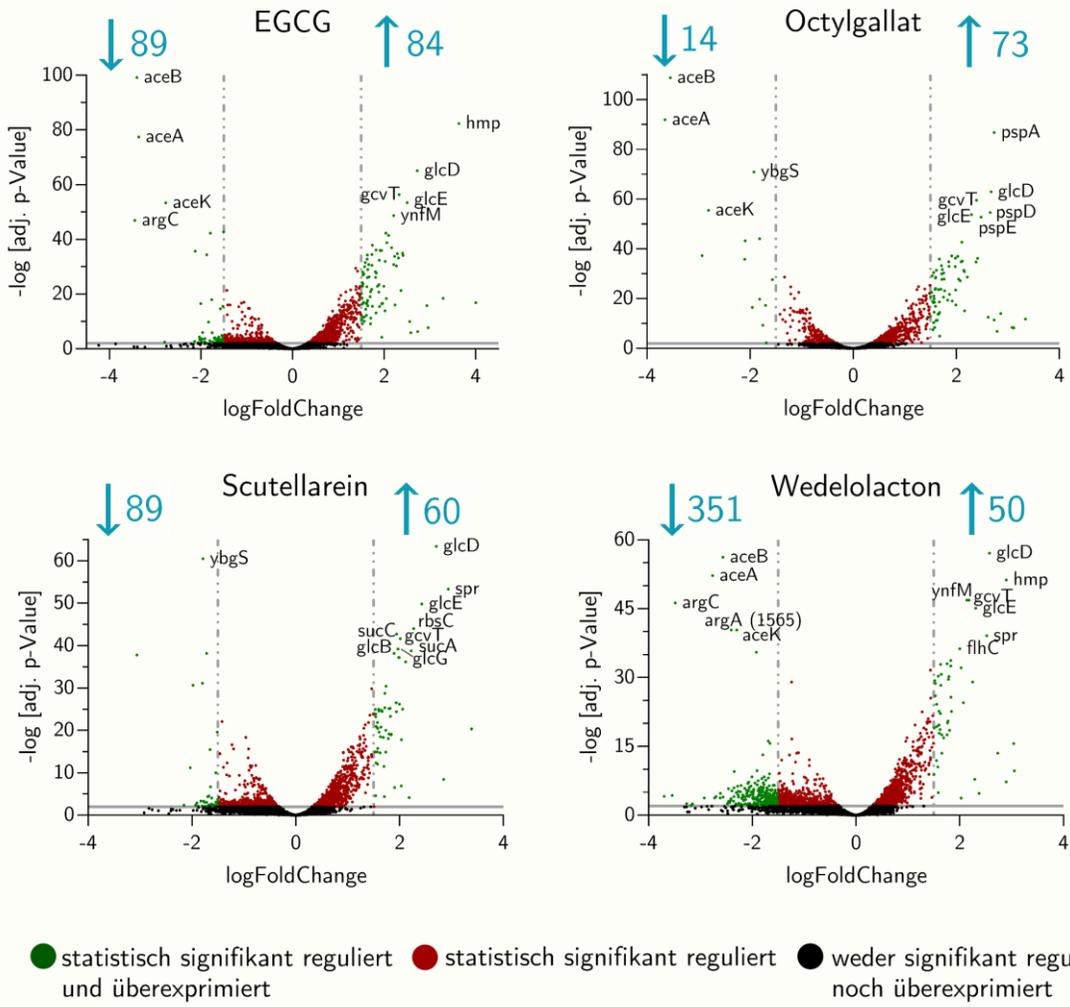
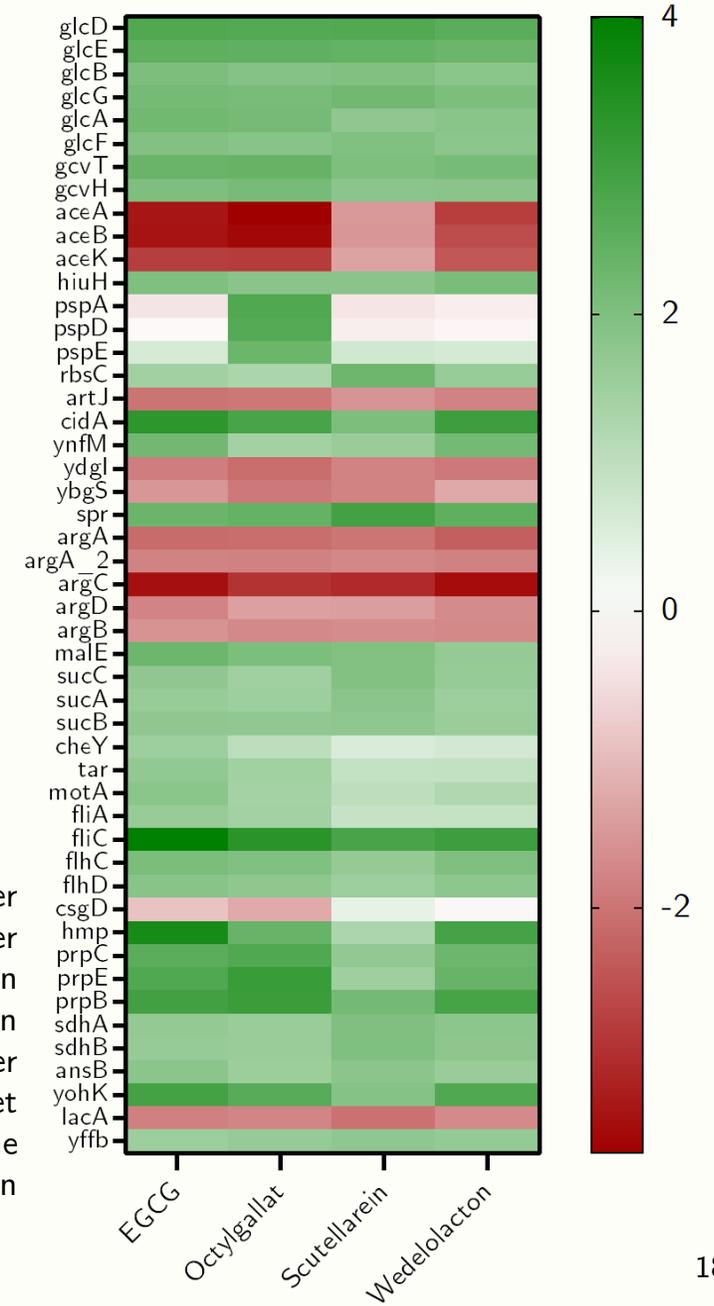


Abb. 16: Volcano-Plots der RNA-Sequenzierungsergebnisse.

Abb. 17: Heatmap der RNA-Sequenzierung der zehn höchst exprimierten Gene aller Behandlungen sowie der Gene, die der Biofilmbildung zugeordnet werden, sofern eine Substanz zu signifikanten Änderungen führte.



## 🔍 Wirkmechanismusaufklärung - Ergebnisse RT-qPCR

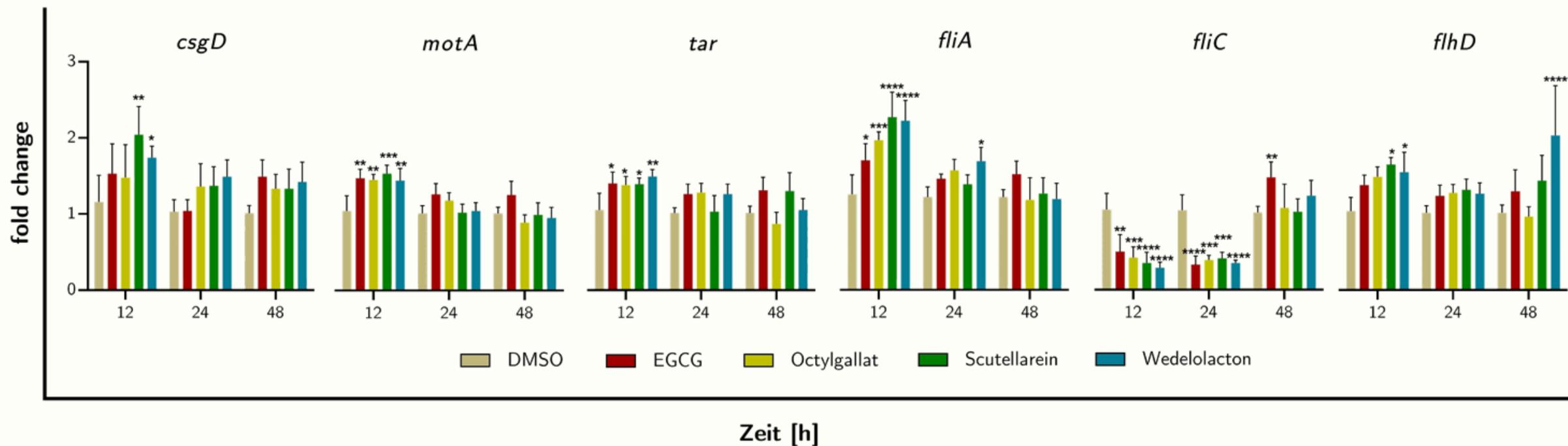
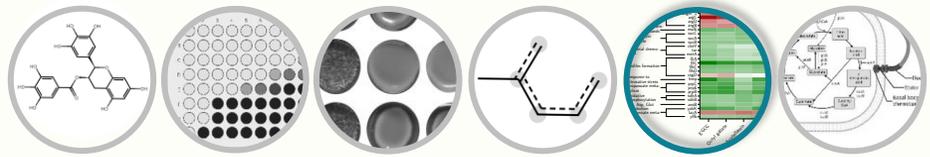


Abb. 18: Ergebnisse der RT-qPCR ausgewählter Gene, die in der RNA-Sequenzierung signifikant verändert exprimiert wurden; MW + StabW; two-way ANOVA Dunnett's-test; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ;  $n = 3$ .



## Beeinflusste biologische Prozesse

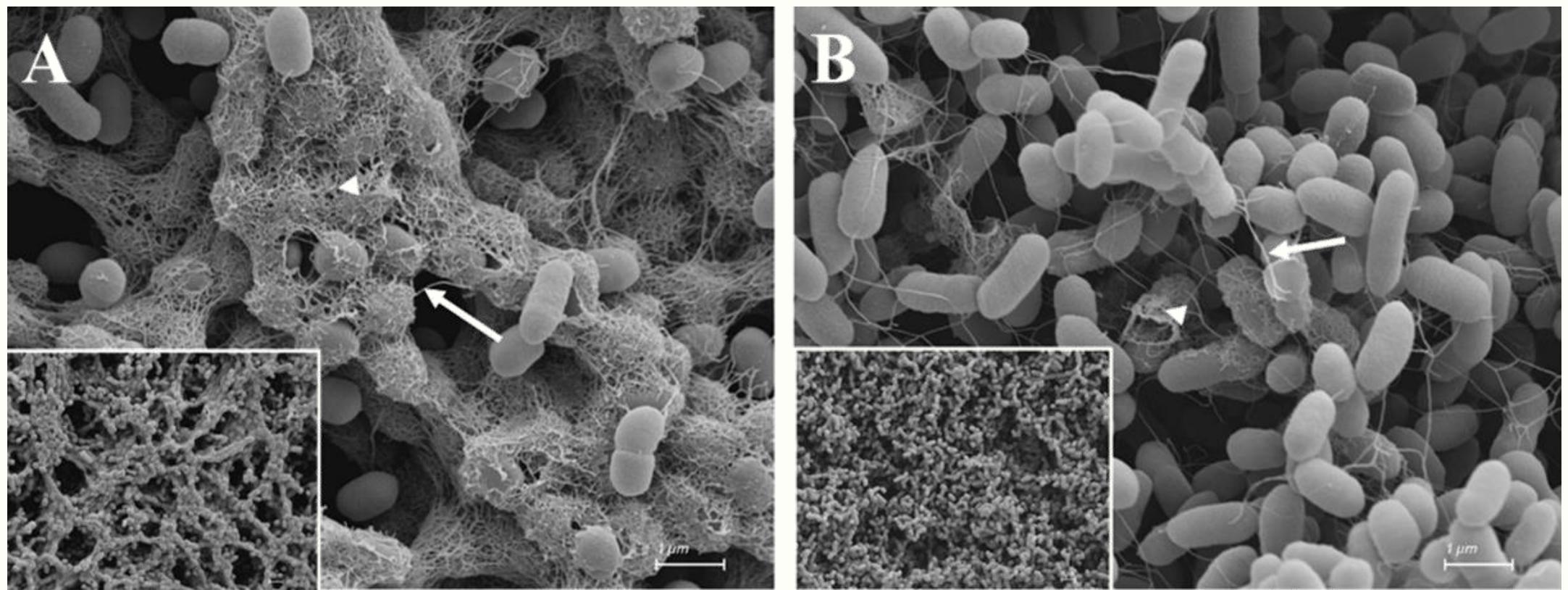


Abb. 19: SEM-Aufnahmen von *E. coli* PBIO729 Biofilmen nach 48 h ohne Behandlung (A) und unter Einfluss von EGCG (B). Pfeile zeigen Flagellen, Dreiecke zeigen dichte Strukturen um die Zellen, welche von Flagellen/Curli/Fimbrien stammen. Maßstab = 1  $\mu$ m.

## Beeinflusste biologische Prozesse

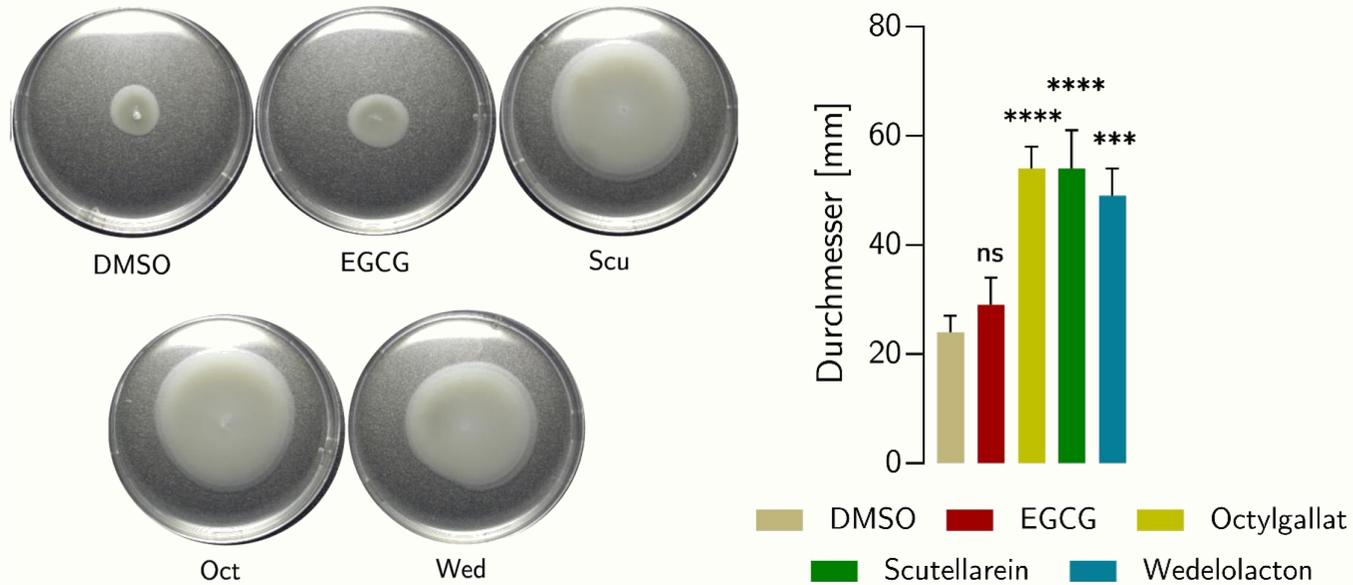


Abb. 20: Motilitätstestungen der Bakterien im Biofilm nach 48 h Behandlung mit je 100  $\mu\text{g}$  EGCG, Octylgallat (Oct), Scutellarein (Scu) oder Wedelolacton (Wed).  $n = 3$ ; MW + StabW; one-way ANOVA Dunnett's-test; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; ns  $\geq 0,05$ .

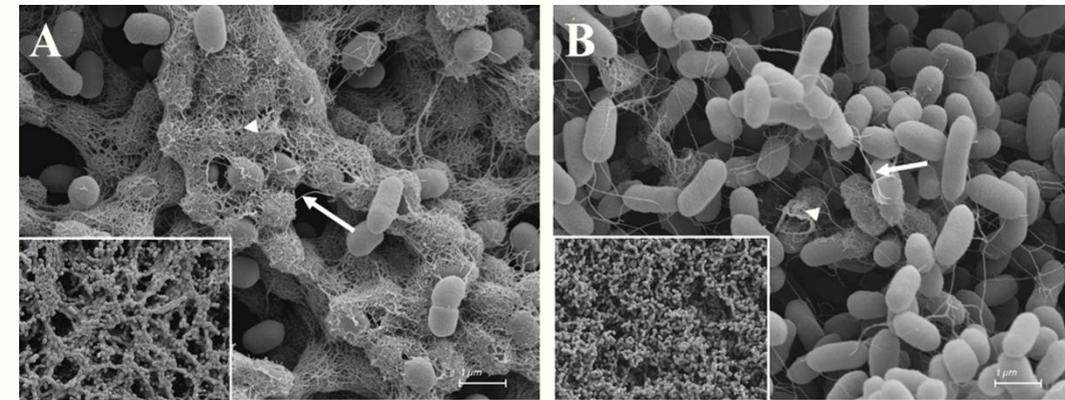


Abb. 19: SEM-Aufnahmen von *E. coli* P BIO729 Biofilmen nach 48 h ohne Behandlung (A) und unter Einfluss von EGCG (B). Pfeile zeigen Flagellen, Dreiecke zeigen dichte Strukturen um die Zellen, welche von Flagellen/Curli/Fimbrien stammen. Maßstab = 1  $\mu\text{m}$ .

## Wirkmechanismusaufklärung - beeinflusste biologische Prozesse

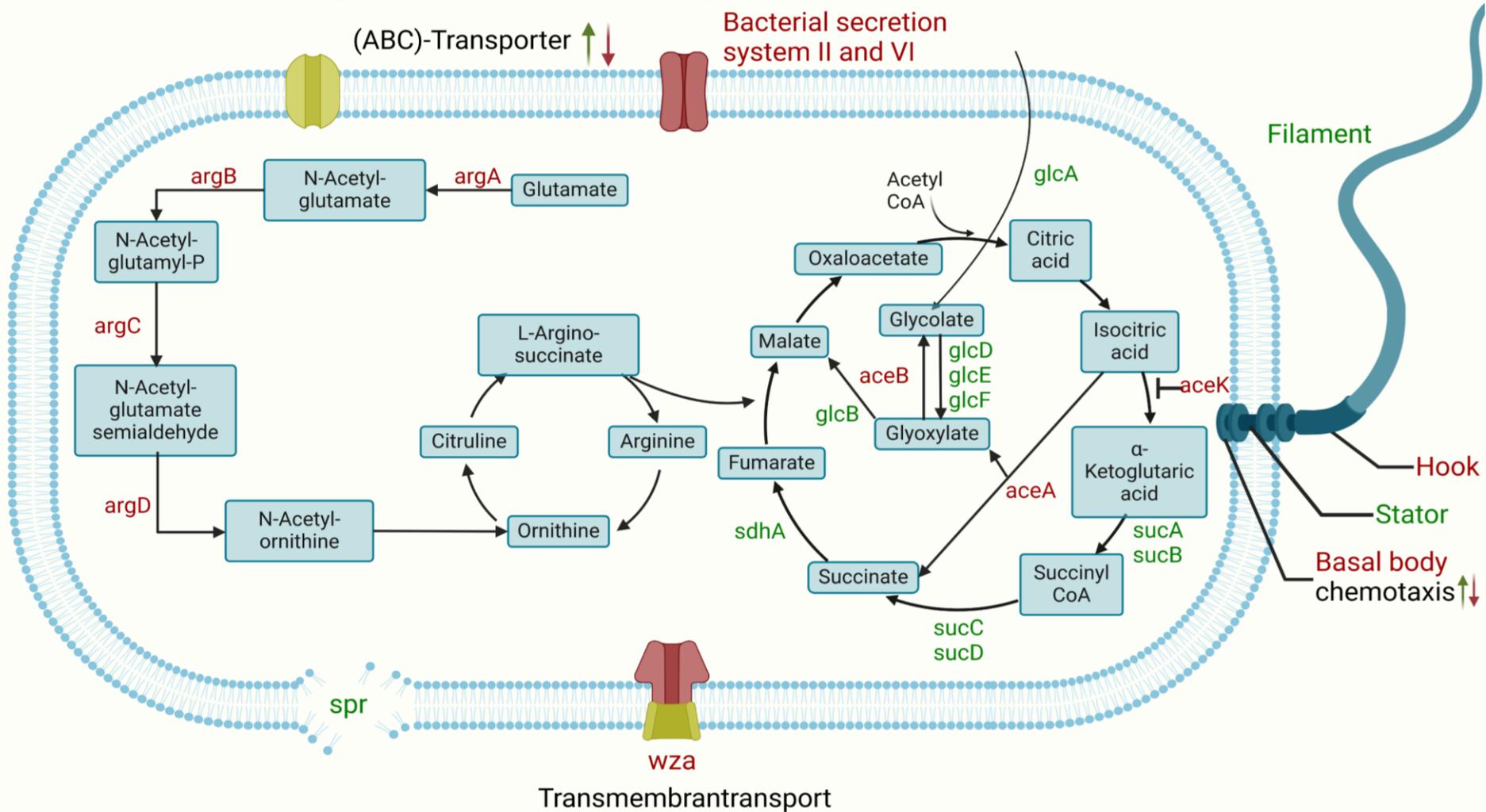
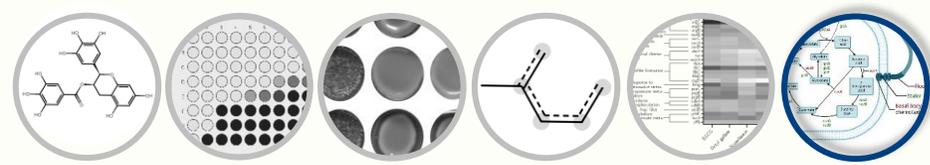
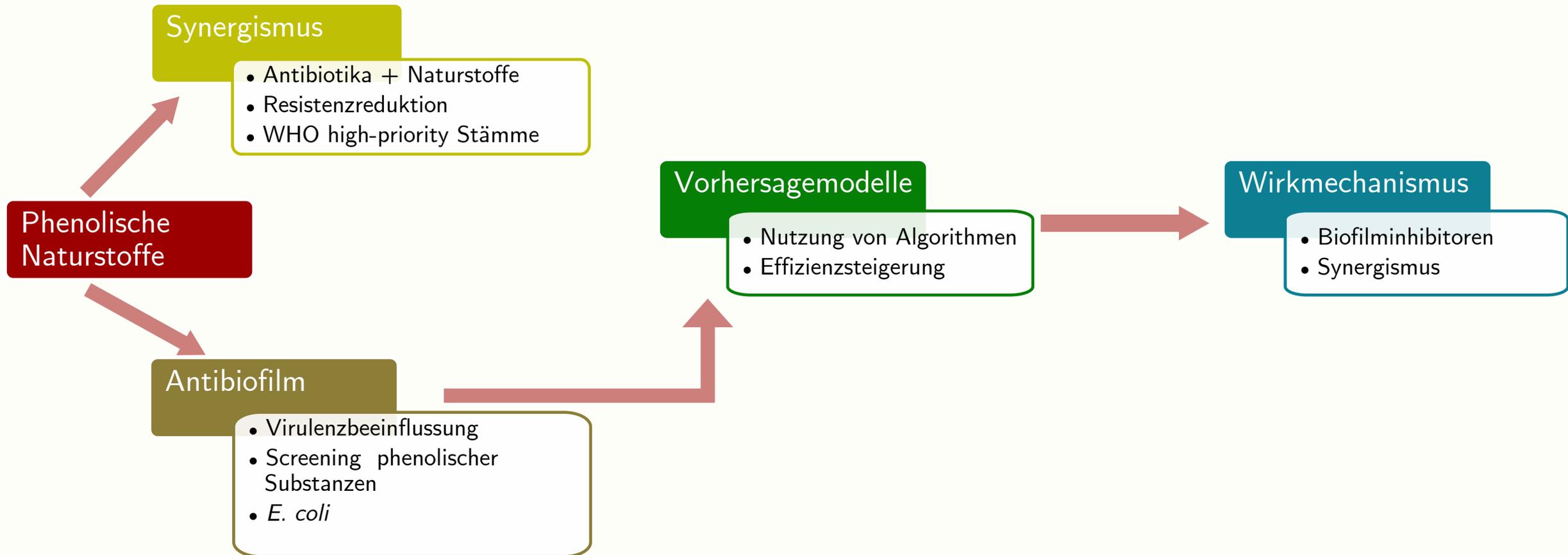
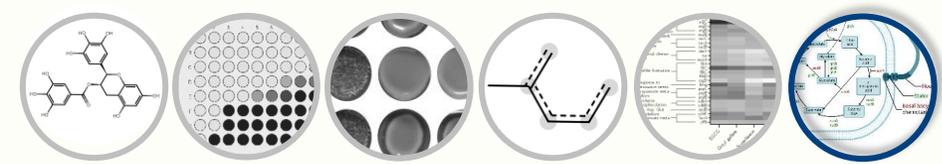


Abb. 22: Wesentliche veränderte biologische Prozesse im Biofilm unter Behandlung mit phenolischen Biofilminhibitoren nach 48 h. Jahrestagung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft



## Zusammenfassung und Ausblick





## Zusammenfassung und Ausblick

### Synergismus

- Antibiotika + Naturstoffe ✓
- Resistenzreduktion ✓
- WHO high-priority Stämme ✓

Phenolische  
Naturstoffe

### Antibiofilm

- Virulenzbeeinflussung
- Screening phenolischer Substanzen
- *E. coli*

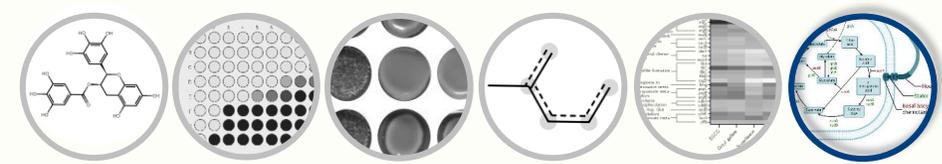
### Vorhersagemodelle

- Nutzung von Algorithmen
- Effizienzsteigerung

### Wirkmechanismus

- Biofilminhibitoren
- Synergismus

<i>A. baumannii</i>	Gentamicin	resistent	→	sensibel
<i>S. aureus</i>	Chloramphenicol	resistent	→	sensibel
<i>K. pneumoniae</i>	Ciprofloxacin	sensibel bei ansteigender Exposition	→	sensibel
<i>P. aeruginosa</i>	Ciprofloxacin	resistent	→	sensibel bei ansteigender Exposition



## Zusammenfassung und Ausblick

### Synergismus

- Antibiotika + Naturstoffe ✓
- Resistenzreduktion ✓
- WHO high-priority Stämme ✓

### Phenolische Naturstoffe

### Antibiofilm

- Virulenzbeeinflussung ✓
- Screening phenolischer Substanzen ✓
- *E. coli* ✓

### Vorhersagemodelle

- Nutzung von Algorithmen
- Effizienzsteigerung

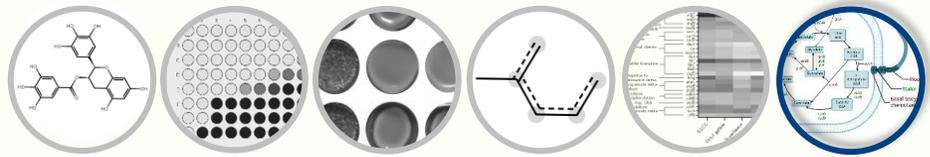
### Wirkmechanismus

- Biofilminhibitoren
- Synergismus

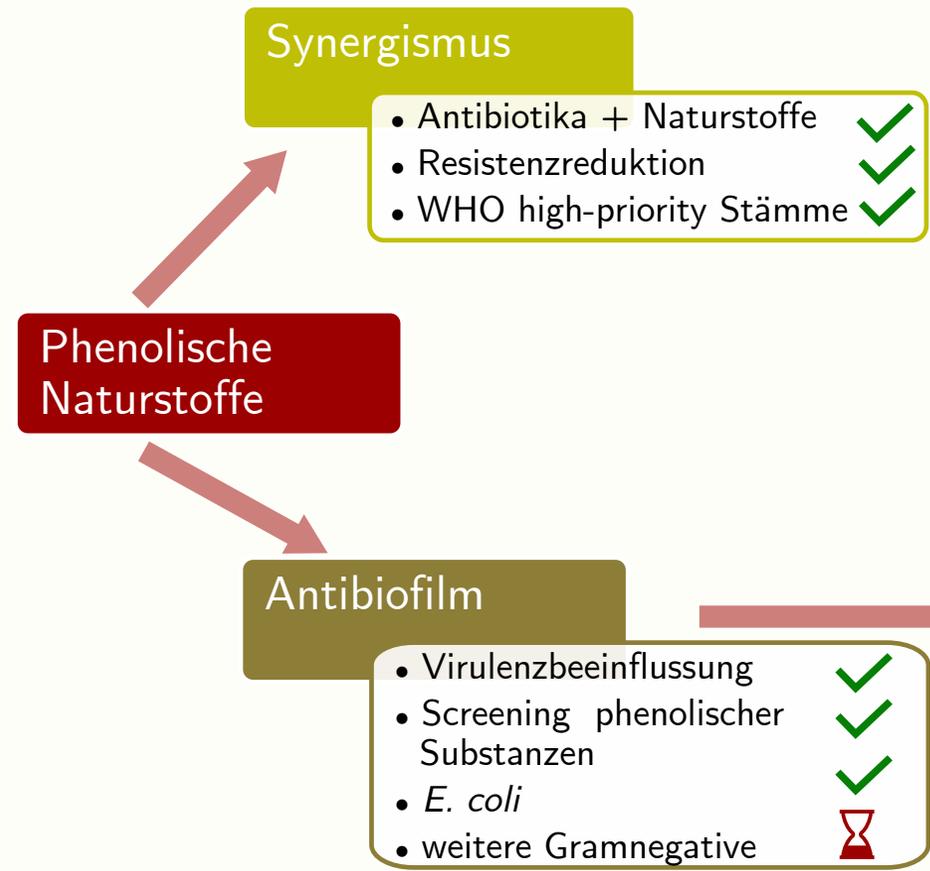


320 Substanzen  
16 Biofilminhibitoren  
Makrokolonie vs. Adhäsion

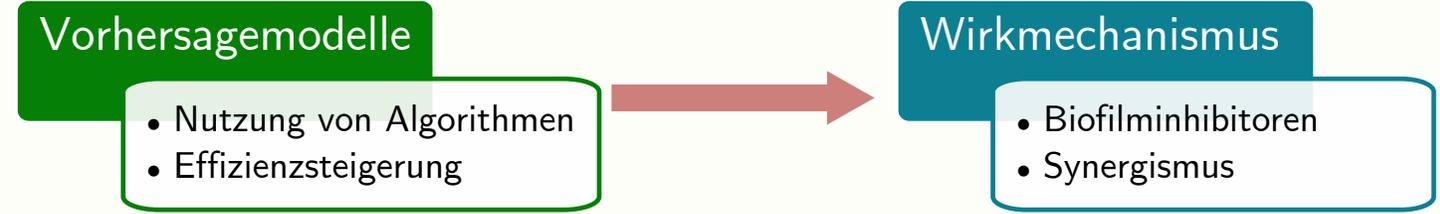
<i>A. baumannii</i>	Gentamicin	resistent	→	sensibel
<i>S. aureus</i>	Chloramphenicol	resistent	→	sensibel
<i>K. pneumoniae</i>	Ciprofloxacin	sensibel bei ansteigender Exposition	→	sensibel
<i>P. aeruginosa</i>	Ciprofloxacin	resistent	→	sensibel bei ansteigender Exposition



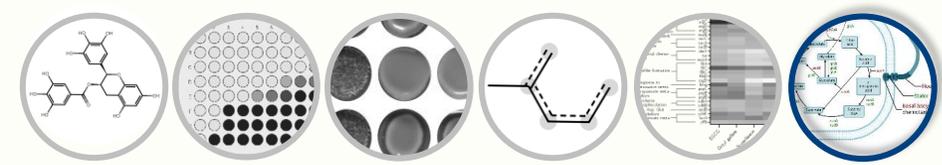
## Zusammenfassung und Ausblick



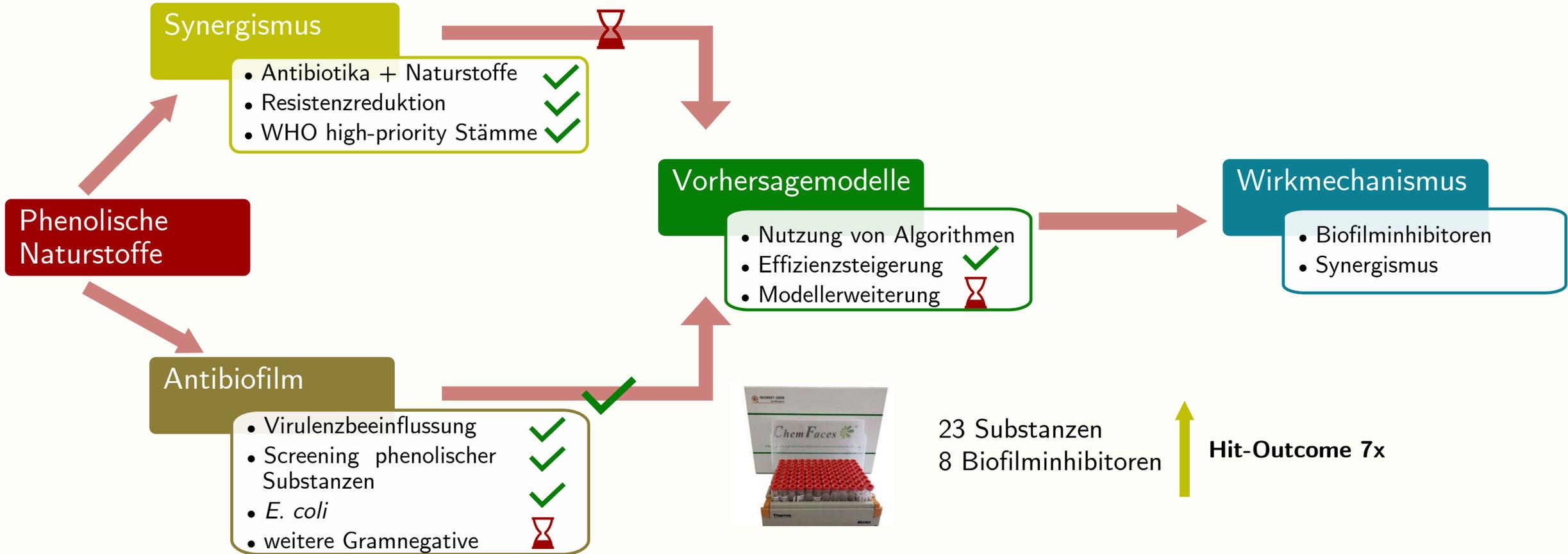
<i>A. baumannii</i>	Gentamicin	resistent	→	sensibel
<i>S. aureus</i>	Chloramphenicol	resistent	→	sensibel
<i>K. pneumoniae</i>	Ciprofloxacin	sensibel bei ansteigender Exposition	→	sensibel
<i>P. aeruginosa</i>	Ciprofloxacin	resistent	→	sensibel bei ansteigender Exposition

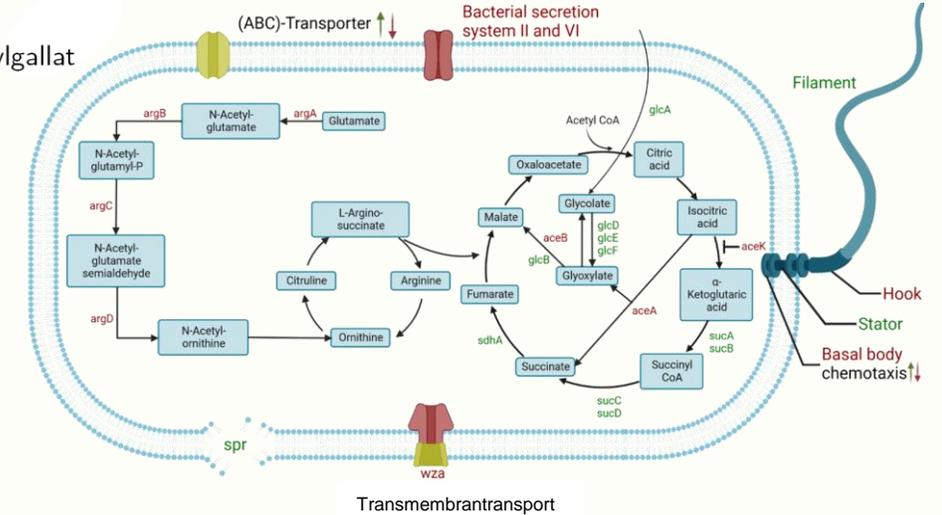
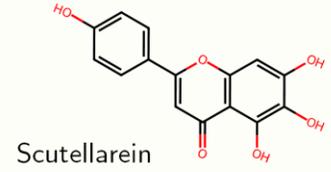
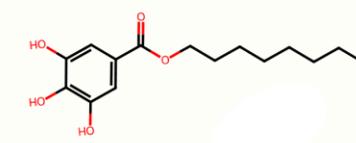
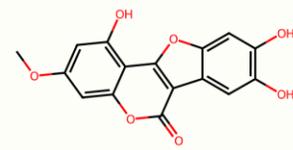
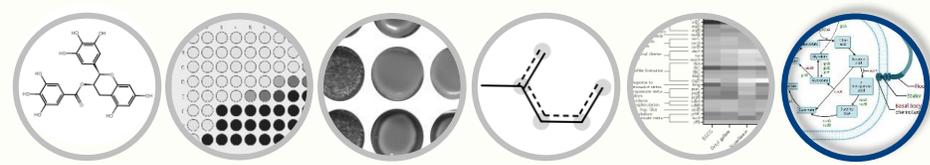


320 Substanzen  
16 Biofilminhibitoren  
Makrokolonie vs. Adhäsion



## Zusammenfassung und Ausblick





# Zusammenfassung und Ausblick

## Synergismus

- Antibiotika + Naturstoffe ✓✓
- Resistenzreduktion ✓✓
- WHO high-priority Stämme ✓✓

## Phenolische Naturstoffe

## Antibiofilm

- Virulenzbeeinflussung ✓✓
- Screening phenolischer Substanzen ✓✓
- *E. coli* ✓✓
- weitere Gramnegative ⌚

## Vorhersagemodelle

- Nutzung von Algorithmen ✓
- Effizienzsteigerung ✓
- Modellerweiterung ⌚

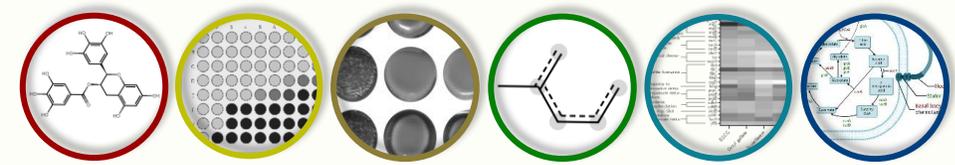
## Wirkmechanismus

- Biofilminhibitoren ✓
- Synergismus ⌚



23 Substanzen  
8 Biofilminhibitoren

Hit-Outcome 7x

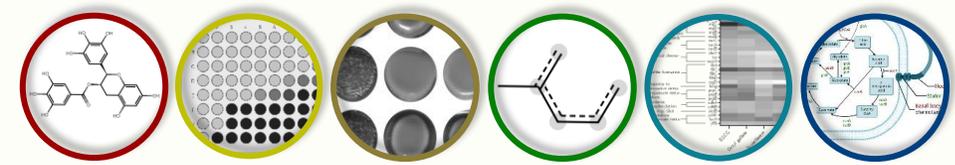


✦ Vielen Dank an...

- Prof. Sebastian Günther
- Dr. Nadin Schultze
- Dmitri Stepanov und Prof. Vitaly Belik
- Dr. Rabea Schlüter
- Dr. Stefan Rödiger
- meinen Diplomanden
- die gesamte Arbeitsgruppe der Pharmazeutischen Biologie

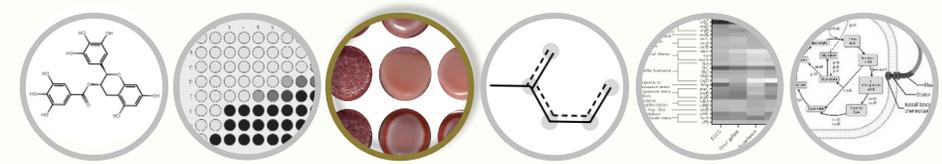
... und Sie, für die Aufmerksamkeit!





## Quellen

- <sup>1</sup> <https://www.sci.news/genetics/genome-alexander-flemings-original-penicillin-producing-fungus-08883.html>
- <sup>2</sup> <https://wiki.naturstoff.net/flavonoide>
- <sup>3</sup> <https://www.bag.admin.ch/bag/de/home/krankheiten/infektionskrankheiten-bekaempfen/antibiotikaresistenzen/wie-entwickelt-sich-die-antibiotikaresistenzlage---.html>
- <sup>4</sup> Brauner, Asher; Fridman, Ofer; Gefen, Orit; Balaban, Nathalie Q. (2016): Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. In: *Nature reviews. Microbiology* 14 (5), S. 320–330. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.34.
- <sup>5</sup> Ciofu, Oana; Moser, Claus; Jensen, Peter Østrup; Høiby, Niels (2022): Tolerance and resistance of microbial biofilms. In: *Nature reviews. Microbiology* 20 (10), S. 621–635. DOI: 10.1038/s41579-022-00682-4.
- <sup>6</sup> <https://www.molport.com/shop/libraries-collections#libraries>



# Anhang: Biofilm – Bildung und Hemmung

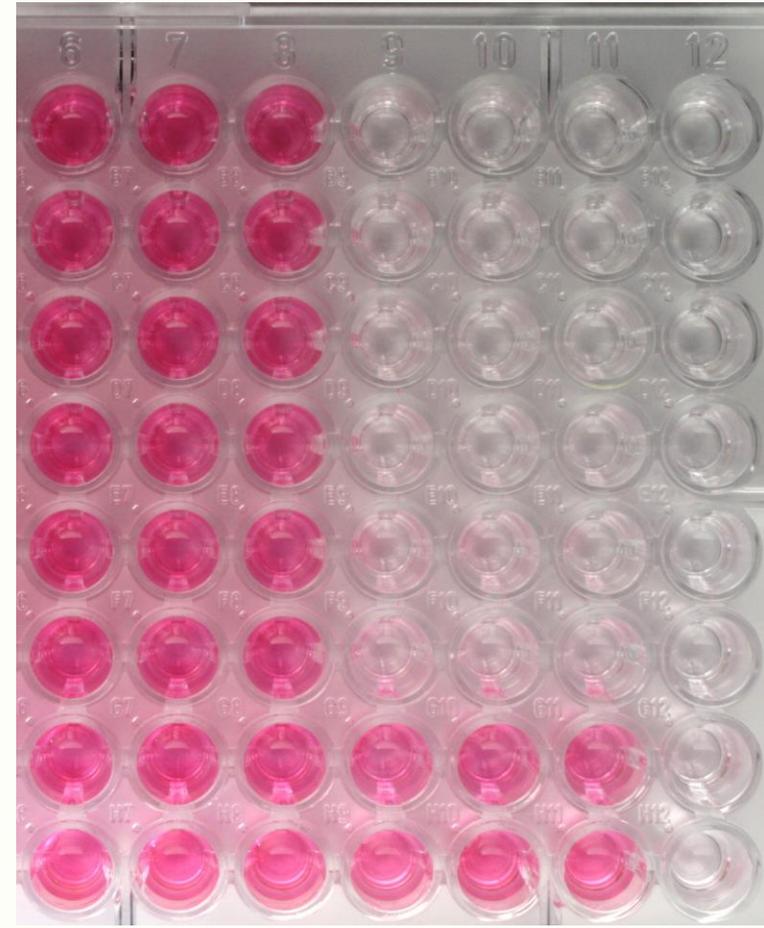
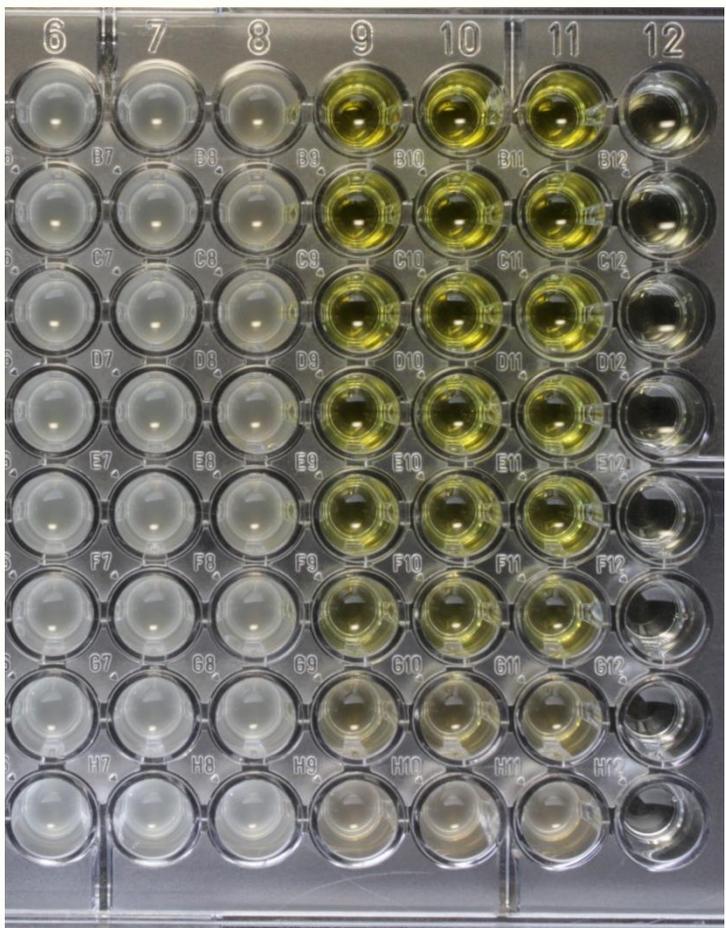
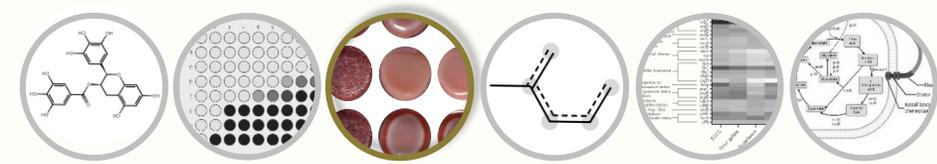


Abb. A-1: Adhäsionsassay in der 96-Well-Platte mit PBIO1986. Links: Gesamtwachstum, Rechts: gelöster Farbstoff (Safranin-T) nach Färbung der adhären Biofilme.



## Anhang: Biofilm – Bildung und Hemmung

Matrix aus Zellulose, Proteinen,  
extrazellulärer DNA, H<sub>2</sub>O

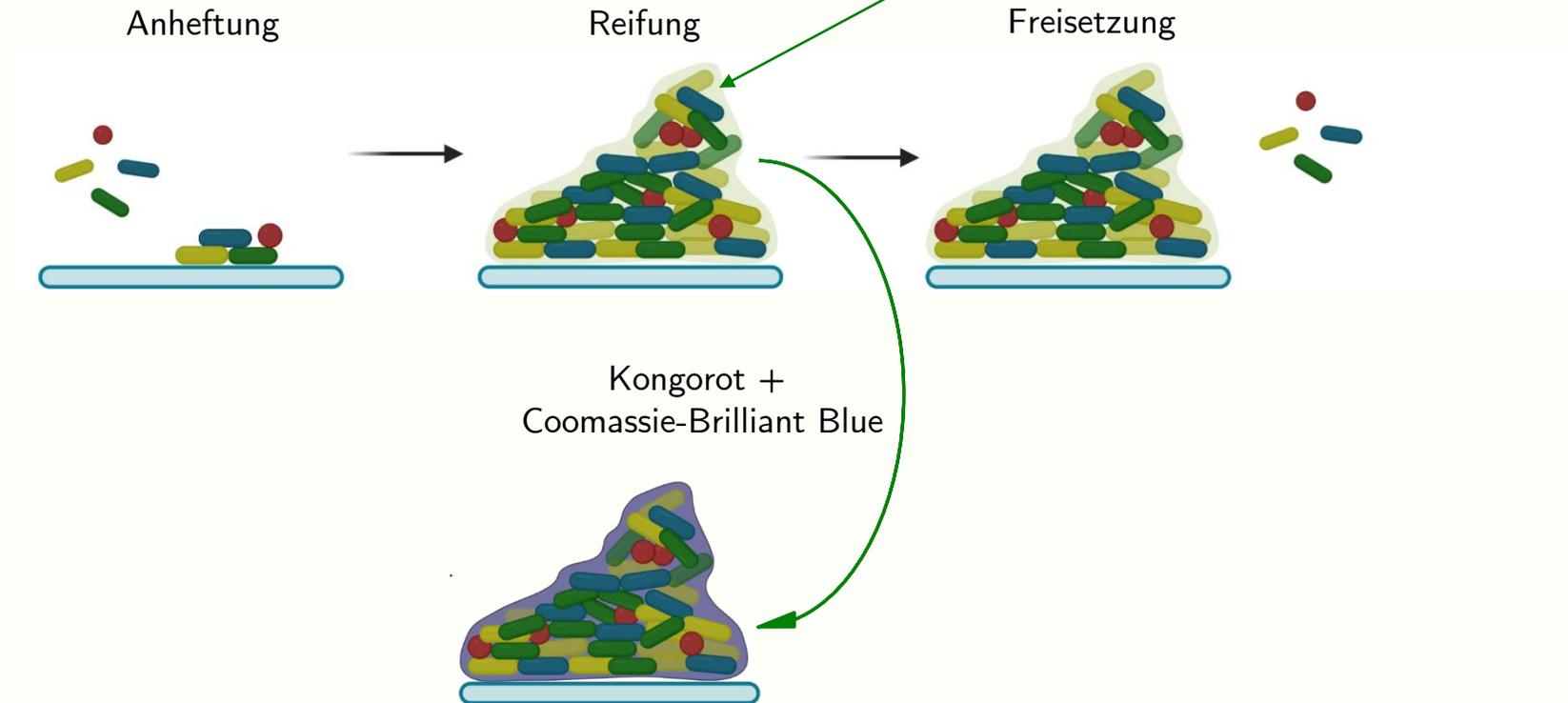


Abb. A-2: Allgemeines Schema der Biofilmbildung und Prinzip des Assays zur Detektion der Inhibierung durch Färbung der Matrixbestandteile.

**DN** Anhang: Transkriptomanalyse – RNAseq.

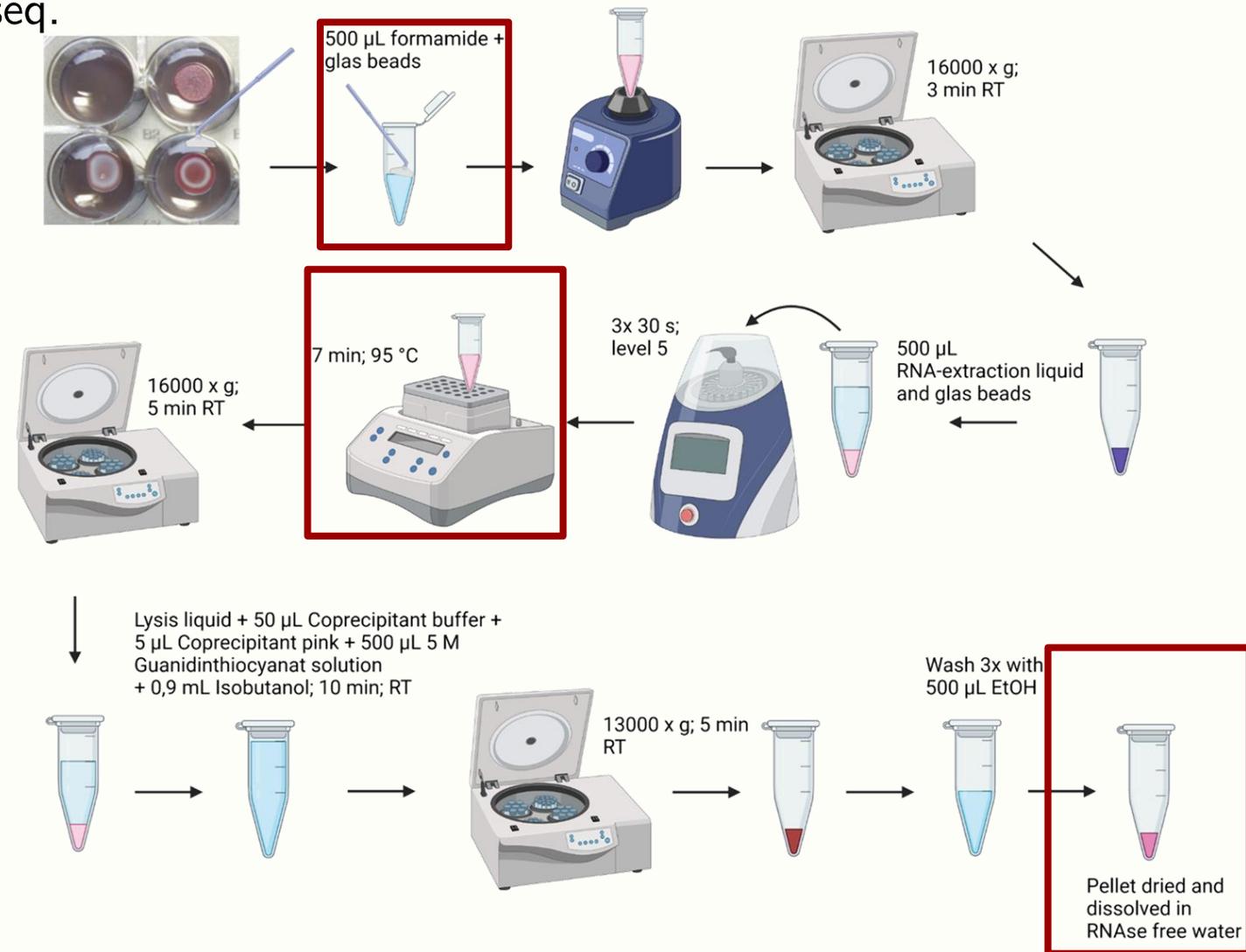
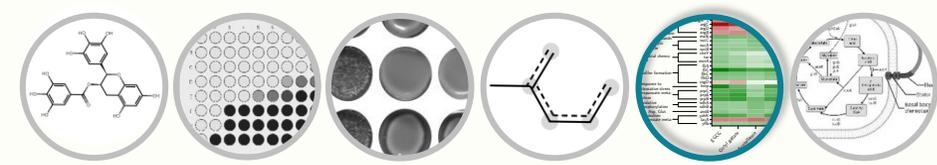


Abb. A-3: RNAsnap Protokoll zur Gewinnung der RNA-Proben aus behandelten und unbehandelten Biofilmen.



## 🔍 Anhang: Transkriptomanalyse – RT-qPCR

Components	Volume	Final concentration
HotScriptase RT master mix	12.5µL	1X
Primer forward (10µM)	1.25µL	0.4µM (0.05-1µM)
Primer reverse (10µM)	1.25µL	0.4µM (0.05-1µM)
Probe (10µM) (optional)	1 µL	0.3µM (0.05-1µM)
Template*/Sample extract**	x µL(not more than 9µL in case of sample extract)	variable volume: >0.1ng RNA or >250ng genomic DNA
Nuclease-free water	up to 25µL total reaction volume	

\*Recommended final template concentration is between 0.1ng/µL to 1ng/µL (total RNA).

\*\* 50 up to not more than 10000 cells/reaction

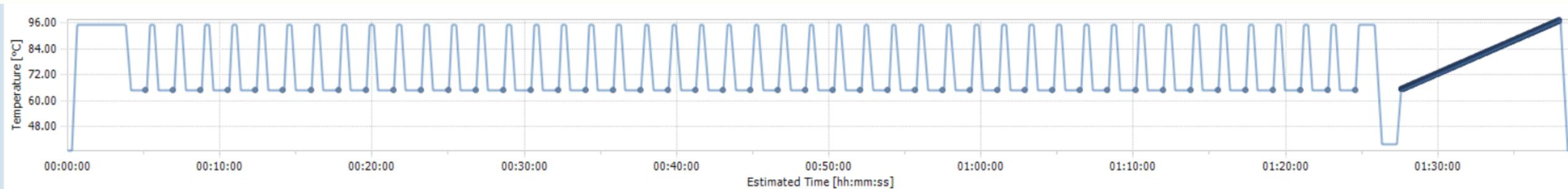
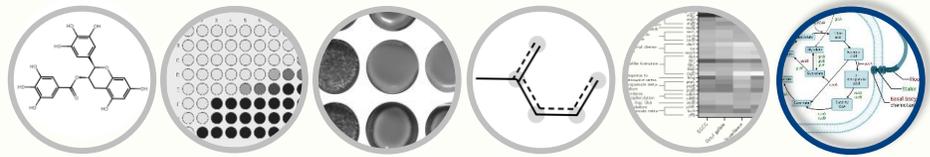


Abb. A-4: Probenzusammensetzung für die RT-qPCR mit Hot-Scriptase von Genaxxon (oben) sowie Cylce-Programm im Lightcycler96 (unten).



## ⦿ Anhang: Beeinflusste biologische Prozesse

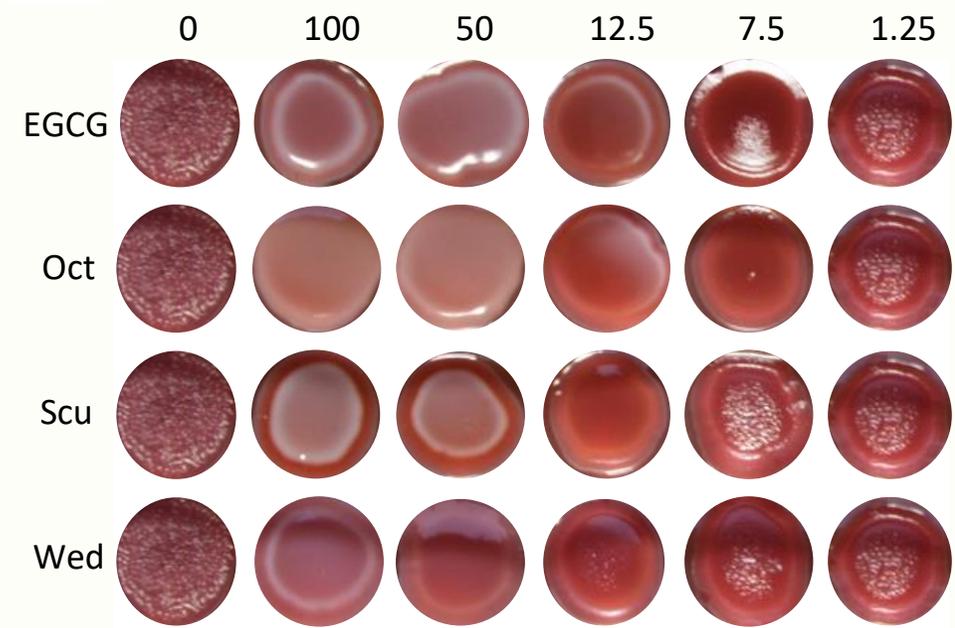


Abb. A-5: Biofilm von multiresistentem *E. coli* PBI0729 und dessen Hemmung unter Behandlung mit Epigallocatechingallat (EGCG), Octylgallat (Oct), Scutellarein (Scu), Wedelolacton (Wed) in unterschiedlicher Konzentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

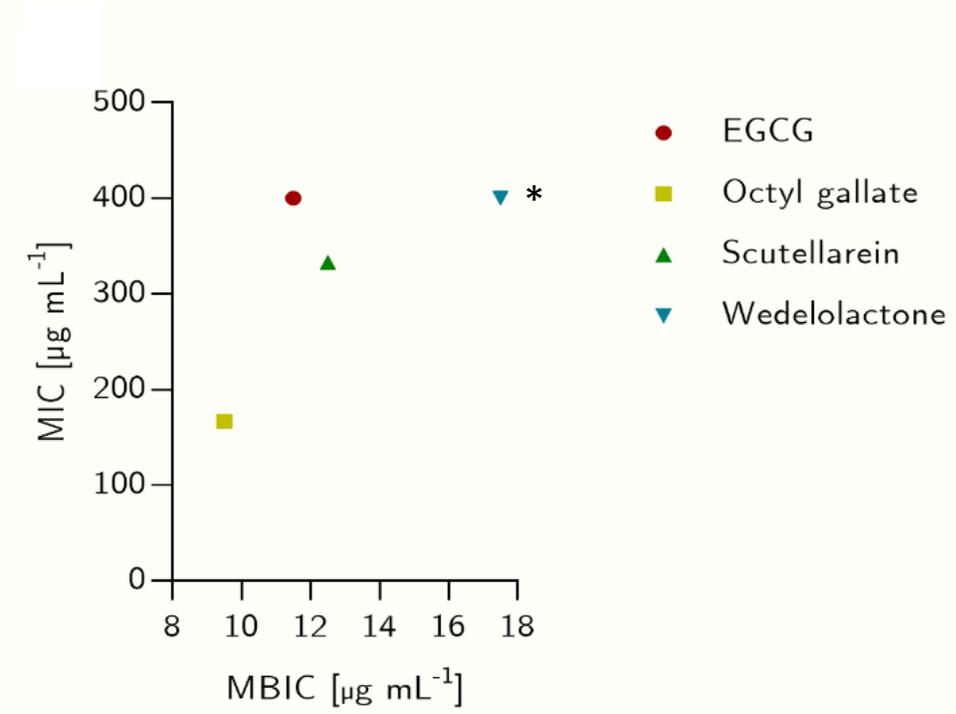


Abb. A-6: Minimale Hemmkonzentration (MIC) und minimale Biofilminhibitions-konzentration (MBIC) der Testsubstanzen gegen *E. coli* PBI0729. \*MIC nicht detektierbar; n = 3 für die MIC; n = 5 für die MBIC.

## Anhang: Beeinflusste biologische Prozesse

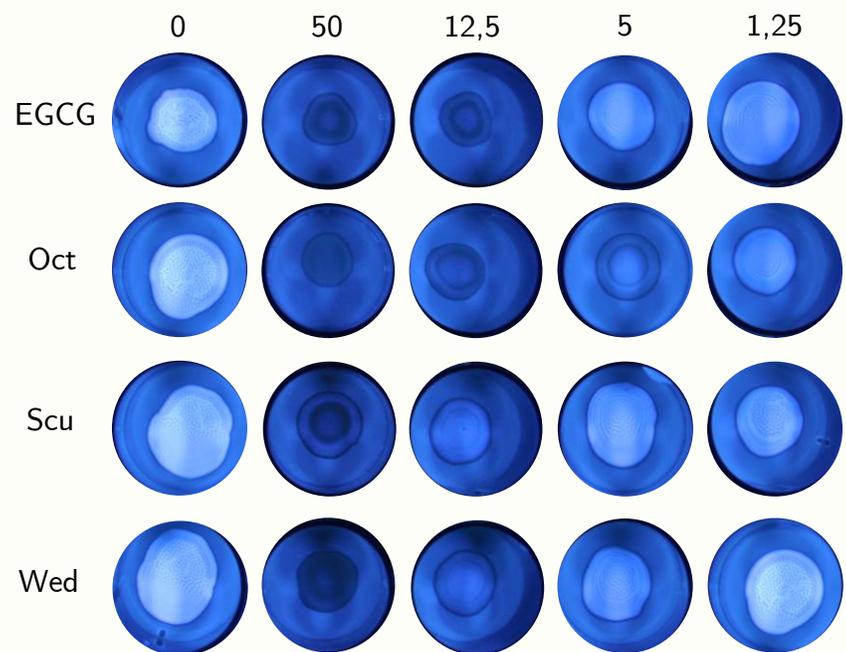


Abb. A-7: Biofilm von multiresistentem *E. coli* und dessen Hemmung unter Behandlung mit Epigallocatechingallat (EGCG), Octylgallat (Oct), Scutellarein (Scu), Wedelolacton (Wed) in unterschiedlicher Konzentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Kolonien gewachsen auf calcofluor-haltigem Agar für 48 h. Detektion UV366 nm.

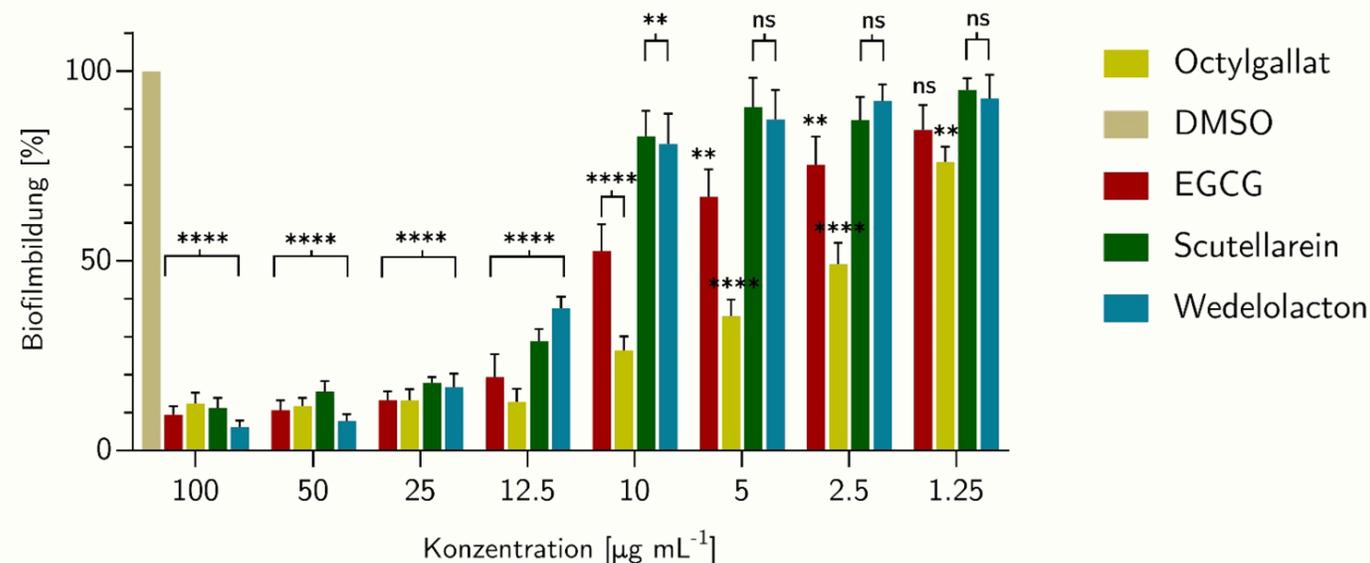
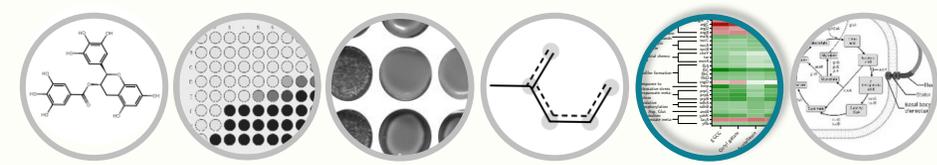


Abb. A-8: Quantifizierung der Biofilminhibition bei *E. coli* PBI0729 unter Einfluss von EGCG, Octylgallat, Scutellarein oder Wedelolacton. Messung der Fluoreszenzintensität bei 630 nm der Kolonien, die auf calcofluorhaltigem Agar gewachsen sind.  $n = 3$ ; two-way ANOVA Dunnett's-test; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; ns  $\geq 0,05$ .



⊗ Anhang: Wirkmechanismusaufklärung - beeinflusste biologische Prozesse

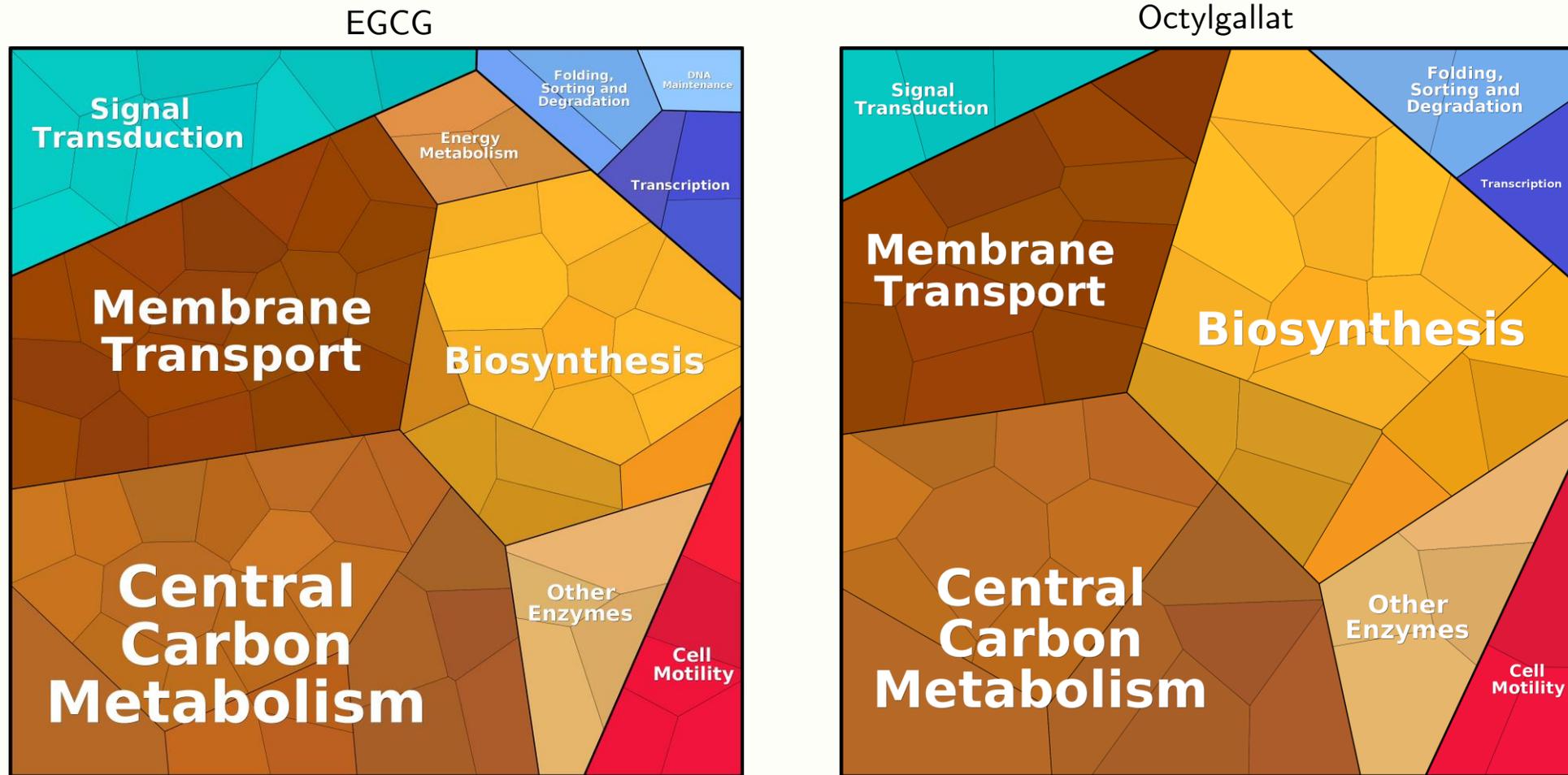


Abb. 21a: Voronoi-Diagramme der differentiell exprimierten KEGG-Pathways im Biofilm von PBI0729 unter Behandlung.

⊗ Anhang: Wirkmechanismusaufklärung - beeinflusste biologische Prozesse

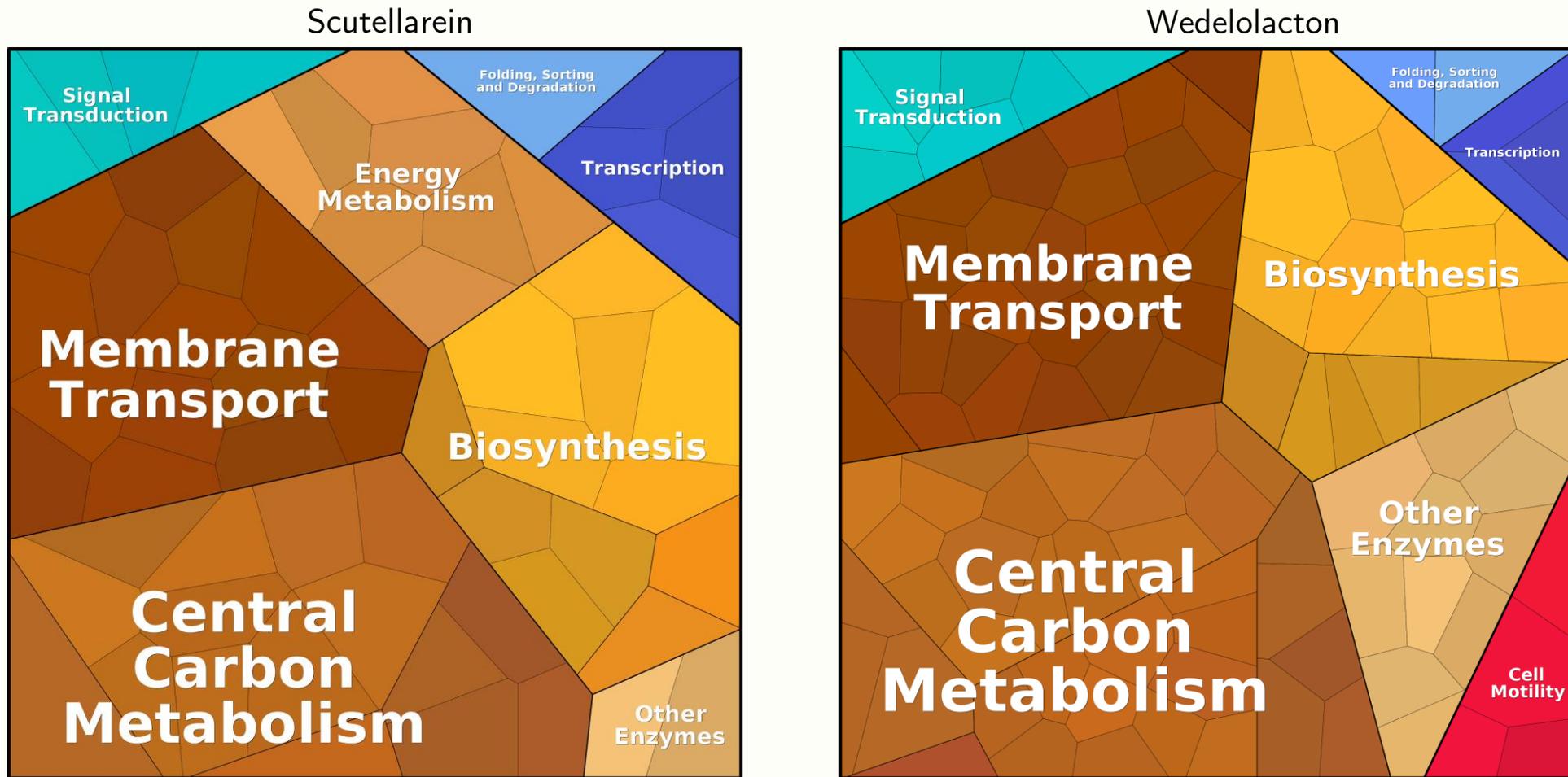


Abb. 21b: Voronoi-Diagramme der differentiell exprimierten KEGG-Pathways im Biofilm von PBI0729 unter Behandlung.

## ⚙️ Anhang: Synergismus von Naturstoffen und Antibiotika

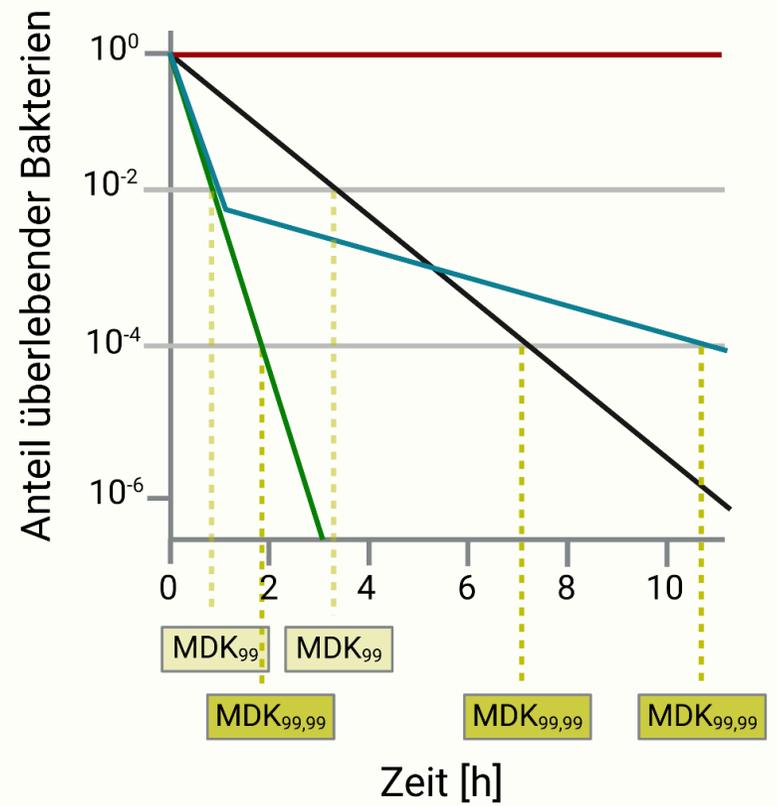
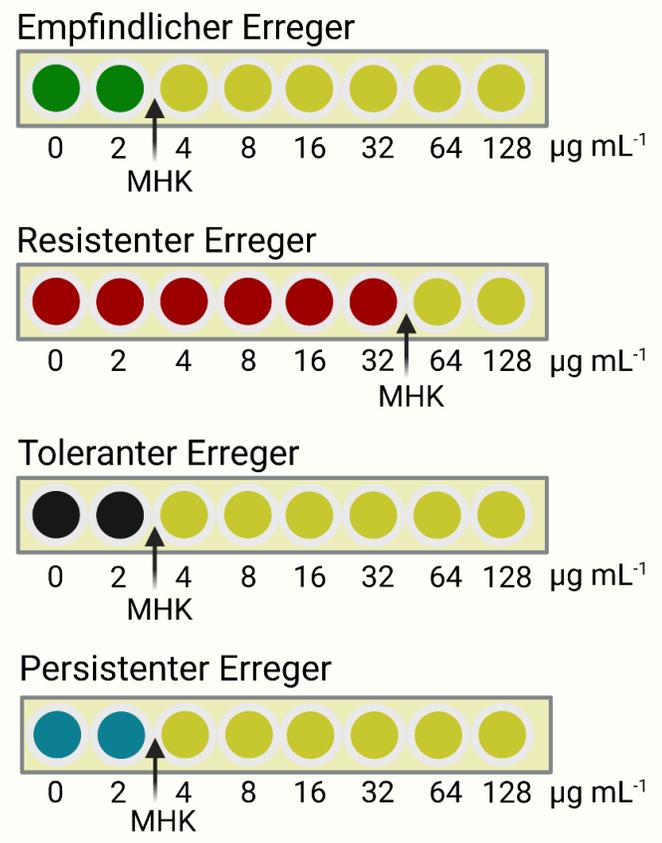


Abb. 4: Ansprechverhalten auf Antibiotikatherapie von sensiblen, resistenten, toleranten und persistenten Bakterien. Erstellt mit BioRender.com nach Brauner *et. al.*<sup>2</sup>