

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie  
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. W. Hosemann)

der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema:

**Antimikrobielle Effekte von Myrtol standardisiert und  
BNO 101 auf *Staphylococcus aureus***

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

an der Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2020

vorgelegt von:

Constantin Lucas Max, Schütz

geb. am 04.09.1991

in Berlin

Dekan: Prof. Dr. Karlhans Endlich

1. Gutachter: PD Dr. Achim Beule

2. Gutachter: Prof. Dr. Susanne Engelmann

Bremen

Tag der Promotion: 25.08.2021

# 1 Inhaltsverzeichnis

2	Abkürzungsverzeichnis.....	6
3	Einleitung.....	8
3.1	Phytopharmaka .....	13
3.1.1	BNO 101.....	14
3.1.2	Myrtol standardisiert.....	16
3.2	Staphylococcus aureus .....	20
3.3	Zielsetzung.....	22
4	Material und Methoden.....	24
4.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	24
4.2	Lösungen.....	25
4.3	Geräte und Software .....	28
4.4	Medikamente .....	29
4.5	Kulturmedien.....	30
4.6	Zellkultivierung .....	31
4.6.1	Typisierung der <i>S. aureus</i> Isolate mittels Multiplex PCR.....	32
4.6.2	Experimente mit BNO 101.....	33
4.6.3	Experimente mit Myrtol standardisiert.....	35
4.7	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	40
4.8	Proteomanalyse.....	41
4.8.1	Arbeitsablauf der Proteomanalyse.....	41
4.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	41
4.8.3	2D-DIGE.....	42
4.8.4	Identifikation der Proteine .....	45
5	Ergebnisse Multiplex PCR-Analyse.....	50
6	Ergebnisse BNO 101 .....	51

6.1	Kultivierung .....	51
6.1.1	Dosisbestimmung.....	51
6.1.2	Wachstumskurven .....	51
6.1.3	CFU-Bestimmung und Überlebensraten.....	54
7	Ergebnisse Myrtol standardisiert.....	56
7.1	Kultivierung .....	56
7.1.1	Dosisbestimmung.....	56
7.1.2	Wachstumskurven .....	57
7.1.3	CFU-Bestimmung und Überlebensraten.....	59
7.2	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	67
7.3	2D-DIGE Gelelektrophorese.....	70
7.3.1	Quantitative Analyse.....	70
7.3.2	Principle component analysis (PCA) .....	72
7.3.3	Qualitative Analyse .....	74
7.4	Proteinidentifikation InGel.....	76
7.4.1	Datenbankabgleich .....	76
7.4.2	Voronoi Treemaps/KEGG-Pathway-Analyse.....	79
7.4.3	Spezifische Veränderung der Proteinmengen durch Myrtol stand.....	85
7.5	Proteinidentifikation Direktverdau .....	96
7.5.1	Bestätigung der Ergebnisse aus dem 2D-DIGE -Experiment.....	97
7.5.2	Ergänzende Proteinidentifikationen .....	97
8	Diskussion .....	98
8.1	Multiplex PCR Analyse/Typisierung .....	98
8.2	BNO 101 .....	99
8.3	Myrtol standardisiert .....	100
8.3.1	Wachstumskurven und CFU-Bestimmung .....	100
8.3.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	102

## Inhaltsverzeichnis

8.3.3	Proteomanalysen.....	104
8.4	Einordnung dieser Arbeit und Ausblick.....	117
9	Zusammenfassung.....	119
10	Literatur.....	121
11	Tabellenverzeichnis.....	138
12	Abbildungsverzeichnis.....	140
13	Anlagen.....	142
13.1	Ergänzendes Material.....	142
13.2	Wissenschaftliche Publikation.....	173
13.3	Eidesstattliche Erklärung.....	174
13.4	Danksagung.....	175

## 2 Abkürzungsverzeichnis

Nicht in diesem Verzeichnis aufgeführt sind SI-Einheiten und im deutschen Sprachraum übliche Abkürzungen.

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
2D-SDS-PAGE	2-dimensional sodium dodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis
ABC	Ammoniumbicarbonat/ ammoniumhydrogencarbonat
ACN	Acetonitril
ad.	Aufgefüllt bis ... erreicht worden sind
amu	Atomic mass unit
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ABRS	Acute bacterial Rhinosinusitis
ARS	Acute Rhinosinusitis
BSA	Bovine serum albumine
CC	Clonal cluster
CCP	Cacodylatpuffer
CFU	Colony forming units
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CoA	Coenzym A.
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CRP	C-reaktives Protein
CRSsNP	chronische Rhinosinusitis ohne nasalen Polypen
CRSwNP	chronische Rhinosinusitis mit nasalen Polypen
DALY	Disability-adjusted life years
DBPC	Double blinded placebo controlled
DGHNO	Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren Heilkunde, Kopf-und Hals-Chirurgie
DEGAM	Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin
DIGE	Differential in gel electrophoresis
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
ED	Einzel dosis
EPOS	European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal polyps
EtOH	Ethanol
FESS	Functional Endoscopic Sinus Surgery
GA	Glutaraldehyd
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
HPLC	High performance liquid chromatography
IAA	Iodacetamid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin (A; D; E; G; M)

## Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
IPG	Immobilized ph- gradient
LC-MS	Liquid Chromatographie – Massenspektrometrie
LP	Laufpuffer
M&M	Material und Methoden (Kapitel)
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
MBC	minimal bakterizide Konzentration
MeOH	Methanol
MHK	minimale Hemmkonzentration
Mpx	Multiplex
MRE	multi- resistenter Erreger
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
OD	Optische Dichte
ORSA	Oxacillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PAGE	Polyacrylamide-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCA	Principle component analysis
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
RHB	Rehydratisierungspuffer
RR	Rutheniumrot
SDS	Sodium dodecyl sulfate
serol. stand.	Serologische/serologischer standardisiert
SHIP	Study of Health in Pommerania
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Tryptone soya broth
UDP	Uridindiphosphat
UT	Urea(8M)/Thiourea(2M)
UTP	Uridintriphosphat
VRSA	Vancomycin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
WP	Waschpuffer

### 3 Einleitung

Jeder erwachsene Mensch ist durchschnittlich zwei bis fünf Mal pro Jahr erkältet bzw. an einer Entzündung mit Beteiligung der Nasennebenhöhlen erkrankt, Schulkinder sogar mehr als doppelt so oft [48, 174]. Die Akute Rhinosinusitis (ARS) hat mit einer Prävalenz von 6-15% und besonders aufgrund ihrer saisonalen Abhängigkeit eine hohe gesellschaftliche und sozialmedizinische Relevanz [48, 174]. Allein zwischen Juli 2000 und Juni 2001 wurde in Deutschland ca. 6,3 Millionen Mal die Diagnose einer akuten Entzündung von Nase oder Nase und Nasenhöhlen gestellt und das ungeachtet der nicht bei einem Arzt vorgestellten Fälle [10]. Die Gesamtkosten einer ARS-Episode beliefen sich in einer schwedischen Untersuchung im Zeitraum von November 2008 bis Dezember 2009 auf durchschnittlich 1102€. 25% davon verteilten sich auf direkte und 75% auf indirekte Kosten [144].

Die Bezeichnung „Rhino“-sinusitis ist die korrekte Bezeichnung, weil bei fast allen Erkältungen mit Beteiligung der Nasenschleimhäute auch die Nasennebenhöhlen krankheitsspezifische Veränderungen aufweisen. Somit sind vermehrte Sekretion der Nase bei Erkältungen und die Sinusitis, nicht nur von den anatomischen Gegebenheiten, sehr stark vergesellschaftet [61].

ARS ist definiert als plötzliches Auftreten der krankheitstypischen Beschwerden über einen Zeitraum von maximal 12 Wochen. Zu diesen Symptomen gehören nach aktuellen nationalen und internationalen Leitlinien bzw. Publikationen obligat Nasenatmungsbehinderung oder Sekretion der Nase (anterior/posterior) sowie fakultativ Schmerzen oder Druck im Bereich des Gesichts, sowie Reduktion oder Verlust der Geruchsempfindung. Weitere mögliche Symptome sind Fieber und Kopfschmerzen [48, 126, 146, 174]. Außerdem ist bei Kindern ein Husten zu den ausschlaggebenden Symptomen zu zählen [48, 174]. In Einzelfällen und bei Hochrisikopatienten wird mit Hilfe einer Form der Bildgebung, wie einer endoskopischen Untersuchung oder Computertomographie, die Diagnose einer Rhinosinusitis gestellt. Dies ist jedoch bei den akuten Verlaufsformen nicht notwendig [146]. Persistieren die Beschwerden über 12 Wochen, spricht man von chronischer Rhinosinusitis (CRS), beim Auftreten von mindestens vier Episoden einer akuten RS im Zeitraum von 12 Monaten mit dazwischen liegenden symptomfreien Intervallen, von rezidivierender ARS. Der größte Anteil an ARS ist viral bedingt und selbstlimitierend, doch in etwa 0,5-2% der Fälle von Erkrankungen kommt es zusätzlich zu einer bakteriellen Infektion und somit zur akuten bakteriellen RS (ABRS) [48, 146, 174].



## Einleitung

Neben den akuten Infektionen im Bereich von Nase und Nasennebenhöhlen fallen auch die chronischen Entzündungen durch hohe Prävalenzen auf. In einer randomisierten Studie mit über 57,000 Befragten aus 19 europäischen Zentren erfüllten 10,9% die genannten Kriterien für eine CRS [18, 48, 66, 174]. Weitere Studienergebnisse belegen, dass zwischen 5 und 15% der Gesamtbevölkerung unter CRS mit nasalen Polypen (CRSwNP) leiden, wobei diese in nur 2-4% auch ärztlich befundet sind. Als Erklärungen hierfür werden viele Erkrankte, die sich der Krankheit nicht bewusst sind, unter nur gering ausgeprägter Symptomatik leiden oder keinen Arzt aufsuchen, genannt [21, 134, 174]. Im aktuellen European Positioning Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps (EPOS) 2020 liegt eine CRS bei Persistieren der bereits genannten Symptome einer ARS über einen Zeitraum von länger als 12 Wochen vor [48]. Die Ätiopathogenese der CRS ist nach wie vor nicht abschließend geklärt und in den meisten Fällen liegt ein multifaktorieller Prozess zugrunde. Im aktuellen EPOS findet die Klassifizierung der CRS zunehmend anhand der bekannten ätiologischen Faktoren statt. Unterschieden wird in primär und sekundär (Folge einer Grunderkrankung) sowie nachfolgend nach Lokalisation (uni/bilateral) gegliedert und dann in Endo- und Phenotypen spezifiziert. Zur Entwicklung bestehen verschiedene mittlerweile etablierte Theorien. Neben fungaler Besiedelung (AFRS, allergic fungal rhinosinusitis) [48, 116] oder einem kausalen Zusammenhang mit Aspirin-Sensitivität [124], sind Superantigene von *Staphylococcus aureus* [11, 163], die eine Inflammation auslösen, genauso diskutiert, wie Barrierestörungen durch eben diesen Erreger [48, 163, 174]. Es konnte experimentell nachgewiesen werden, dass *S. aureus* eine gesonderte Rolle für die CRS spielt. Insbesondere durch das stetige intrazelluläre Vorhandensein der Erreger bei CRSwNP im Vergleich zur CRS ohne nasale Polypen (CRSsNP) und bei den Aspirin abhängigen CRS [33, 48, 128, 163]. Wesentlich an der Ausbildung von Polypen sind Signalmoleküle wie TGF- $\beta$  und deren Rezeptoren beteiligt [8, 162]. Anatomische Variationen korrelieren mit rezidivierender ARS und CRS, sind jedoch aufgrund der hohen Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung im Einzelfall als Kausalitätsfaktoren schwer nachweisbar [84, 175]. Die Unterteilung der CRS nach Endotypen, abhängig von Zusammensetzung und Mengen bestimmter inflammatorischer Parameter, hat eine hohe klinische Relevanz. Einzelne Cluster korrelieren mit der Ausprägung von Krankheitssymptomen und bestimmten Begleiterkrankungen wie dem schweren Asthma [155].

Verlängerte und komplizierte Krankheitsverläufe sind häufig mit Besiedelung von Bakterien assoziiert und regelmäßig spielen dabei Resistenzen der Erreger gegenüber den gängigen Antibiotika eine große Rolle [115, 146]. Diese Erreger sind oft Bestandteil der normalen

menschlichen Hautflora oder der Nasenschleimhaut, sodass ein großer Teil der Bevölkerung kommensal mit Bakterien besiedelt ist, die potentielle Erreger von Krankheiten der Atemwege sind [26]. Nasenabstriche von gesunden Blutspendern in Pommern zwischen 2002 und 2006 haben einen Gesamtanteil von dauerhaften und intermittierenden Trägern des Bakteriums *S. aureus* mit über 43% ermittelt [70, 71]. Zu den klinisch relevantesten Resistenzgruppen von *S. aureus* zählen solche mit Unempfindlichkeiten gegen die Antibiotika Methicillin (MRSA), Vancomycin (VRSA) oder allgemein gegen mehrere gängige Antibiotika (MRE). Für MRSA konnten in einer Untersuchung mit norddeutschen Probanden ein Anteil der MRSA unter den kommensalen *S. aureus* von ca. 6% ermittelt werden [103] und in einer weiteren Untersuchung konkret für Patienten mit CRS Anteile von 19-74% [2]. Zwischen ARS und CRS Patienten bestehen nach einer systematischen Literaturrecherche von 2012 bezüglich dieser Werte große Unterschiede (0% bis 15,9% bei ARS und 1,8% bis 20, 7% bei CRS [102]). Die Resistenzen haben direkte Auswirkungen auf Mortalität und Morbidität der Patienten, wie eine große epidemiologische Studie mit Daten über resistente Bakterienstämme aus ganz Europa zeigt [30]. Allein für MRSA wurden im Median 32,6 disease-adjusted life years (DALYs) bezogen auf 100.000 Menschen errechnet. Dementsprechend sind Entwicklung und Etablierung alternativer Behandlungsstrategien abseits der Antibiotikatherapie eine zunehmend wichtige Aufgabe für die Zukunft.

Inwiefern das Vorhandensein von Symptomen oder klinisch messbaren Parametern Hinweise auf eine bakterielle Besiedelung geben, wird diskutiert und ist Teil aktueller Untersuchungen [146]. Systematische Literaturrecherchen von 2013 konnten keinen signifikanten Hinweis auf Fieber oder Gesichtsschmerzen als diagnostische Marker für eine bakterielle Besiedelung finden [67]. Auch für die Dauer der Erkrankung und purulenten Schleim gibt es in diesem Zusammenhang keine Evidenz [155, 164]. Nach amerikanischer Leitlinie [126] soll bei Auftreten von „double worsening“ (Symptomverschlechterung nach anfänglicher Verbesserung) und bei Ausbleiben einer Beschwerdebesserung über 10 Tage, die Diagnose ABRS gestellt werden [126]. In der aktuellen deutschen Leitlinie zur Rhinosinusitis heißt es: „Eine antibiotische Therapie [...] sollte erfolgen bei Hinweisen auf Komplikationen, wie Kopfschmerzen, Gesichtsschwellung, Lethargie“ [146]. Außerdem kann eine Antibiotikatherapie empfohlen werden bei starken Schmerzen in Kombination mit erhöhten Entzündungswerten oder insgesamt starken Beschwerden, Verstärkung der Symptome im Verlauf, sowie Fieber (>38,5°C) [146]. In solchen Situationen muss die Gefahr von schweren Krankheitsverläufen abgewendet werden [174]. Zusätzliche Faktoren die für eine ABRS

## Einleitung

sprechen sind laut EPOS 2020 erhöhte Entzündungsparameter im Blut sowie auf eine Seite beschränkte Beschwerden [48].

Die viral bedingten ARS sind selbstlimitierende Erkrankungen und daher steht die Behandlung der Symptome um das Krankheitsgefühl des Patienten zu lindern, im Vordergrund. Eine routinemäßige Gabe von Antibiotika ist hier evidenzbasiert nicht angebracht [146]. Nur für die oben beschriebenen bakteriellen Infekte und so eng auf das Erregerspektrum abgestimmt wie möglich, ist die Therapie mit Antibiotika sinnvoll.

Unabhängig von der Therapie mit Antibiotika stehen zur Behandlung der verschiedenen Formen der Rhinosinusitis eine Reihe nicht-medikamentöser und medikamentöser Therapieverfahren zur Verfügung. Für ARS und die rezidivierende ARS gilt laut der aktuellen Leitlinie von DEGAM und DGHNO [146] eine Empfehlung zur lokalen Behandlung mit Kochsalzlösung und die Inhalation heißer Dämpfe (38-42°C). Bei CRS sollten nasale Anwendungen von Salzlösungen durchgeführt werden. Topische Dekongestiva können für maximal 10 Tage bei ARS zur Symptomkontrolle eingesetzt werden, sollten jedoch bei CRS aufgrund der möglichen Schleimhautschäden, keine Verwendung finden und frei von Konservierungsstoffen wie Banzalkoniumchlorid sein [146]. Weiterhin sind Analgetika zur Behandlung der Schmerzen bei ARS und rez. ARS empfohlen [146]. Für rez. ARS können korticoidhaltige Nasensprays Linderung verschaffen und sollten angewendet werden. Bei CRS mit und ohne Polypen ist ebenfalls eine Therapie mit topischen Kortikosteroiden anzuwenden, im Einzelfall sollte hier auch die systemische Applikation erwogen werden. Bei Versagen etablierter Therapieformen ist im Einzelfall auch die Anwendung von Biologica sinnvoll. Konkret bedeutet das meist, eine individuelle, bei dem jeweiligen Patienten bereits erwiesen funktionierende Behandlungskombination [174].

In der aktuellen Leitlinie zur Rhinosinusitis [146] wird außerdem die Behandlung der ARS mit speziellen Phytotherapeutika empfohlen. Hierunter zählen der patentierte (Misch-) Extrakt (BNO 1016) und definierte Eukalyptusextrakte, für die in randomisiert kontrollierten Studien (RCT) Wirksamkeiten nachgewiesen werden konnten. Eine generelle Empfehlung für oder gegen Phytotherapie kann für ARS und CRS aufgrund der aktuellen Evidenzlage nicht getroffen werden [146]. Cineole, Myrtol- und Enzian-extrakte sind in der DEGAM-Leitlinie von 2008 [37] Mittel der ersten Wahl und auch die EPOS 2012 und 2020 [48, 174] sprechen von belegter Wirksamkeit, deren genaue Hintergründe weiter erforscht und die Wirksamkeit in Reviews bestätigt werden sollten. Es heist: "Um pharmakodynamische und pharmakokinetische

Eigenschaften der aktiven Substanzen aus den pflanzlichen Medikamenten und ihren Einfluss auf die Behandlung von ARS zu verstehen, sind weitere Studien und Metaanalysen notwendig.“ [174] Außerdem mangelt es zurzeit für die meisten Phytotherapeutika noch an qualitativ hochwertigen klinischen Multizenter-Studien mit doppelt verblindetem, randomisiertem Aufbau. Dennoch sind die oben erwähnten Substanzen Bestandteile vieler over-the-counter-Arzneimittel (OTC) und aus den „häuslichen Apotheken“ gar nicht mehr wegzudenken [174], wie eine Querschnittsstudie in Dänemark aus dem Jahr 2000 bereits belegt. Durchschnittlich 14% der randomisiert Befragten gaben einen Konsum von naturmedizinischen Produkten in den vergangenen zwei Wochen an, wobei der Anteil bei den weiblichen Befragten höher liegt als bei den männlichen [109].

### 3.1 Phytopharmaka

„Phytopharmaka sind Fertigarzneimittel, die als wirksame Bestandteile Zubereitungen aus pflanzlichen Drogen enthalten [...] und die im Sinne einer wissenschaftlich begründeten Therapie im Rahmen der naturwissenschaftlich orientierten Medizin eingesetzt werden“ [152].

Diese Medikamente können zellulärer Herkunft sein oder sogar aus vollständigen Zellen bestehen und haben ihren Ursprung in lebenden oder getrockneten Pflanzen, Mikroorganismen oder Tieren. In den meisten Fällen sind in den Zubereitungen mehrere, nicht immer identifizierte Wirkstoffe enthalten, deren Zusammenspiel eine Wirksamkeit ermöglicht und z.T. über die der Einzeleffekte hinausgeht. So zum Beispiel durch ähnliche Zielmechanismen der einzelnen Substanzen, die zu einer sehr geringen Anzahl an „non responder“ führen oder ein zusätzlich vergrößertes Wirkspektrum. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die allgemein gute Verträglichkeit der Präparate, verbunden mit nur wenigen Wechselwirkungen bei paralleler Verabreichung mit anderen Medikamenten.

Dabei ist im besonderen Maße, die immer stärker verbreitete Selbstmedikation mit nicht verschreibungspflichtigen Medikamenten (OTC) zu nennen. Bereits 2003 sind in europäischen Staaten knapp 5 Milliarden Euro für diese „soft drugs“ ausgegeben worden, insbesondere in Deutschland und Frankreich [35]. Laut Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller wächst der Umsatz pflanzlicher Arzneimittel in Deutschland seit Jahren, speziell im Jahr 2017 um 3,2 % zum Vorjahr auf 1,7 Milliarden Euro. 568 Mio. Euro davon gehen allein auf die Indikationsgruppen „Hustenmittel, Erkältungsmittel, Mittel gegen grippale Infekte und sonstige Atemwegserkrankungen“ zurück [27]. Ursachen hierfür sind geringere Preise und unerwünschte Nebenwirkungen verglichen mit rein synthetischen Medikamenten [35].

Dennoch ist auch bei der Behandlung mit Phytotherapeutika auf die individualisierte Anwendung, angepasst an die körperlichen Eigenschaften des Patienten mit Grunderkrankungen, Allergien, bisherige Medikamenteneinnahme und die jeweilige Krankheitsentwicklung, zu achten. Traditionelle Medizin aus vor allem östlichen Ländern, deren Wirksamkeit mit wissenschaftlichen Methoden nur unzureichend geklärt ist, sollte nach Teuscher et al. mit besonderer Vorsicht betrachtet werden [132, 152].

### **3.1.1 BNO 101**

#### ***3.1.1.1 Einleitung***

Sinupret® (Trockenextrakt BNO 101, Eingetragene Wortmarke, Bionorica SE, 92318 Neumarkt, DE) in seinen verschiedenen Darreichungsformen ist, nach Angaben des Herstellers (Bionorica SE, Handelsregister-Nummer: HRB 26312, Neumarkt, Deutschland) ein pflanzliches Arzneimittel zur Behandlung von Sinusitiden. Das Medikament ist ohne Verschreibung erhältlich und beinhaltet als Wirkstoffe Auszüge von Enzianwurzel, Eisenkraut, Gartensauerampferkraut und Schlüsselblumenblüten mit Kelch in geschnittener Form, sowie gerebelten Holunderblüten im Verhältnis 1:3:3:3:3 (Naturrohstoff/Extraktverhältnis 1:11). Durch die Verwendung als Auszugsmittel sind außerdem 19% Ethanol und gereinigtes Wasser Bestandteil der BNO 101 Tropfen. Der Anwendungsbereich sind akute und chronische Entzündungen der Nasennebenhöhlen sowie allgemeine Schnupfensymptome [20].

In klinischen Studien konnte BNO 101 bei akuten viralen Rhinosinusitiden unter 15-tägiger Behandlung für eine signifikant bessere Heilung der Kriterien im Sinne des EPOS 2012 sorgen und das Gesundheitsgefühl der Probanden signifikant steigern [85].

Metaanalysen zur Wirksamkeit bei Sinusitis mit Daten hauptsächlich von jungen, männlichen Patienten aus dem Zeitraum von 1986 bis 1990 zeigen außerdem eine Verbesserung der Symptomatik, besonders bei gleichzeitiger Gabe von Antibiotika im Vergleich zur Kontrolle aus Antibiotika kombiniert mit Placebo. Die Effekte sind mit bereits bekannten Sekretolytika vergleichbar. Insgesamt wurde ein nur geringes Maß an Nebenwirkungen berichtet, welches dem des Placebos entsprach [105]. Allerdings handelt es sich bei den beiden letztgenannten Untersuchungen [85, 105] um herstellerfinanzierte Studien. Für die Darreichungsform BNO 1016 (160 mg Trockenextrakt/Tablette) konnte in einer 2017 veröffentlichten Studie bei CRS ein Behandlungseffekt nachgewiesen werden, insbesondere für die Subgruppe der Patienten mit ausgeprägter Symptomatik und längerer Krankheitsdauer. Dementsprechende Konfirmationsstudien sind in Bearbeitung [113]. Eine Übersichtsarbeit von 2018 belegt die Wirksamkeit von BNO 101 bei CRS [60].

#### ***3.1.1.2 Pharmakodynamik***

Krankheitsgefühl, Kopfschmerzen und Schnupfen sind bei ARS und CRS wesentlich durch mangelnden Abfluss des Schleimes bestimmt. BNO 101 verbessert diese Symptome durch dosisabhängige Erhöhung des Cl<sup>-</sup>-Transportes an Chlorid-Kanälen der Schleimhautzellen. In

der Folge binden die Ionen Wasser und die Viskosität des Schleimes sinkt. Dies wird als Hauptwirkmechanismus der Mukosekretolyse durch BNO 101 gesehen [168]. Weitere wichtige Faktoren sind die Erhöhung der Schlagfrequenz der Schleimhautzilien und Veränderung der Konsistenz der Atemwegsflüssigkeit [183].

Außerdem konnten antimikrobielle Effekte gegenüber relevanten Erregern von ABRS, wie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus pneumoniae* in Untersuchungen mit einem Lyophilisat der Wirkstoffkombination aus BNO 101 auf Agarplatten nachgewiesen werden. Genaue Wirkmechanismen wurden in der genannten Studie nicht untersucht. Von den Autoren wurden die Induktion endogener antibakterieller Peptide und direkte Wirkungen des Phytopharmakons auf den Mikroorganismus diskutiert [100].

### **3.1.1.3 Nebenwirkungen**

Als Nebenwirkungen können in bis zu 1% der Fälle Magen-Darm-Beschwerden, wie Magenschmerzen oder Übelkeit auftreten. Des Weiteren sind selten allergische Reaktionen von geringem und schwerem Ausmaß beschrieben worden, bei deren ersten Anzeichen das Medikament sofort abgesetzt werden sollte und die Konsultation eines Arztes angezeigt ist. Die Einnahme von BNO 101 in der Schwangerschaft ist nach Ergebnissen einer Untersuchung von 2003 [77] unbedenklich, laut Hersteller ist eine ärztliche Beratung mit Risiko-Nutzen-Abwägung vor Therapiebeginn notwendig. BNO 101 Tropfen ist für Kinder unter 2 Jahren nach Herstellerangaben aufgrund mangelnder Datenlage nicht empfohlen [20].

### 3.1.2 Myrtol standardisiert

#### 3.1.2.1 Einleitung

GeloMyrtol®forte (Eingetragene Wortmarke, G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, 25551 Hohenlockstedt, DE [55]) ist ein rezeptfrei erhältliches, pflanzliches Arzneimittel, welches gemäß Herstellerangaben (G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Handelsregister-Nummer: HRA 85 IZ, Hohenlockstedt, Deutschland) zur Schleimlösung bei Atemwegserkrankungen angewendet wird. Die enthaltene Wirkstoffgruppe wird als *Myrtol standardisiert* bezeichnet und ist ein in seiner Zusammensetzung festes Mischdestillat aus rektifiziertem Eukalyptusöl, rektifiziertem Süßorangenöl, rektifiziertem Myrtenöl und rektifiziertem Zitronenöl im Verhältnis von 66:32:1:1. Als Anwendungsgebiete sind akute und chronische Bronchitiden, sowie die akuten und chronischen Sinusitiden bekannt [172]. Gemäß der aktuellen Leitlinie zur Rhinosinusitis von DGHNO und DEGAM kann die Komedikation neben Antibiotika bei ARS für die Bestandteile Myrtol und Cineol empfohlen werden [146].

Für die akuten Bronchitiden konnten klinische Studien einen signifikanten Vorteil gegenüber Placebo im Krankheitsverlauf durch Gabe von Myrtol stand. nachweisen [57, 99]. Gleiches gilt für chronische Erkrankungen der Bronchien bei denen insbesondere, die für den Krankheitsverlauf charakteristischen Exacerbationen durch Myrtol stand. signifikant gesenkt werden können [104]. Bei der Behandlung von Sinusitiden wurden ebenfalls klare Vorteile gegenüber Placebo gezeigt und die Behandlungsoptionen ausgeweitet [45]. Die verbessernde Wirkung auf den Krankheitsverlauf der oben genannten Atemwegserkrankungen liegt nach aktuellem Wissensstand in der mukosekretolytischen Wirkung, welche ergänzt wird durch die positiven bronchospasmolytischen, antiinflammatorischen, antioxidativen und antimikrobiellen Eigenschaften. Die relevanten molekularen Wirkmechanismen auf Mikroorganismen sind weitgehend ungeklärt [114, 172].

Die vier rektifizierten ätherischen Öle aus denen sich das feste Mischdestillat Myrtol stand. zusammensetzt, enthalten eine Reihe von wirksamen Komponenten. Ätherisches Eukalyptusöl, welches größtenteils aus den getrockneten Blättern von *Eucalyptus globosus* gewonnen wird, enthält neben 1,8-Cineol (siehe Tabelle 1), auch Phloroglucin-Sesquiterpen-Verbindungen mit nachgewiesenen virostatischen und antibakteriellen Effekten. Aufgrund der Gewinnung aus Pflanzenanteilen enthalten die Öle geringfügig schwankende Mengen der Bestandteile. Dem Hersteller zufolge werden bestimmte Anteile garantiert.

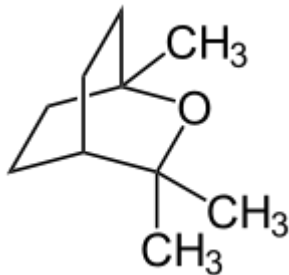


### 3.1.2.2 Inhaltsstoffe

Tabelle 1: Hauptbestandteile der ätherischen Öle in Myrtol stand.

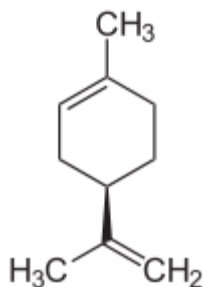
Darstellung der chemischen Hauptbestandteile der ätherischen Öle in Myrtol stand. mit Strukturformel und Beschreibung

#### 1,8-Cineol



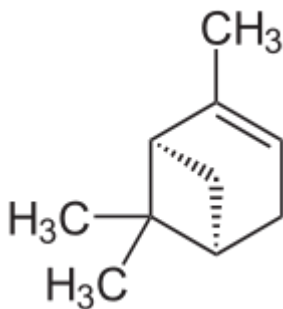
Cineol (Cineolum Ph. Eur., Eucalyptolum, 1,8-Cineol, Erstarrungstemperatur 0,5°C) wird durch Ausfrieren aus Eucalyptusöl erhalten und wie dieses benutzt (ED 0,2 g). Nicht nur als Expektorans, sondern auch bei akuter Rhinosinusitis und als Zusatztherapeutikum bei COPD hat sich seine Anwendung bewährt [152].

#### D-(+)-Limonen



Limonen ist ein monocyclisches Terpen. (S)-(-)-Limonen ist eine zitronenartig riechende Flüssigkeit, (R)-(+)-Limonen riecht nach Orangen. Das Racemat wird als *Dipenten* bezeichnet. Limonen ist unlöslich in Wasser und mischbar mit Alkohol. Es kommt in der Natur sehr häufig vor, (R)-(+)-Limonen zu 90% im Pomeranzenöl, Kümmelöl, Dillöl, Zitronenöl und weiteren. [161].

#### α-Pinen



Pinene sind bicyclische Monoterpene, die in den ätherischen Nadel- und Zapfenölen der meisten Nadelhölzer (Coniferen) vorkommen und vielfach in ätherischen Ölen, Früchten, sowie Citrus-Produkten identifiziert wurden. Sie haben einen terpentinartigen Geruch und sind leicht entzündbare Flüssigkeiten [161].

Als Hauptkomponenten in Myrtol stand. sind 1,8-Cineol, sowie das D-(+)-Limonen, α-Pinen und weitere Terpene zu nennen [152]. Je Kapsel GeloMyrtol forte sind 300 mg des wirksamen Mischdestillates enthalten.

### 3.1.2.3 Pharmakodynamik

Der Abtransport des Schleimes wird durch die metachrone Kinozilienbewegung gewährleistet. In verschiedenen Experimenten konnte eine Steigerung dieser selbstständigen, andauernden Reinigung der Atemwege gezeigt werden [15, 65]. Dieser, als mukoziliäre Clearance bezeichnete Vorgang, wird außerdem durch eine Herabsetzung der Viskosität des Schleimes verbessert [4]. Das Zusammenspiel beider Faktoren soll maßgeblich für die symptomlindernde

Wirkung von Myrtol stand. bei Erkrankungen der oberen Atemwege zuständig sein. Für den Krankheitsverlauf von Entzündungen spielen die von Leukozyten bei Abwehrreaktion ausgeschütteten Sauerstoff-Radikale, Superoxide und Stickoxide als gewebezerstörende Faktoren eine große Rolle [68]. Lipophile Eigenschaften der Bestandteile von Myrtol stand. ermöglichen antioxidative und antiinflammatorische Effekte vor allem bei chronischen Entzündungsverläufen durch eine Hemmung der leukozytären Überreaktion. Außerdem ist es möglich, histamininduzierten Bronchospasmus mit Hilfe von Myrtol stand. präventiv zu verringern [172]. Neben der Stärkung körpereigener Abwehrsysteme konnten für Myrtol stand. auch antimikrobielle Eigenschaften nachgewiesen werden. In einer Studie mit in vitro Untersuchung der minimalen Hemmkonzentration von Myrtol stand. auf verschiedene Erreger, zeigte sich vor allem gegen *Streptococcus pneumoniae*, *Hämophilus influenzae*-und *parainfluenzae* sowie *Staphylococcus aureus* ein wachstumshemmender Effekt. Die ermittelten Endkonzentrationen zur Wachstumshemmung liegen je nach Bakterium zwischen 0,625% und 2,5% [23, 172]. Eine weitere Untersuchung zu antibakteriellen Effekten von ätherischen Ölen konnte für eine Mixtur der Myrtol stand.-Hauptkomponenten speziell bei *S. aureus* eine Minimale Hemmkonzentration von 0,16% im Endvolumen ermitteln. Es wurde eine Kultivierung über 18 Stunden durchgeführt und anschließend auf Agarplatten ausgestrichen. Die Löslichkeit der Öle wurde außerdem vor der Behandlung mit einem Tensid verbessert [32].

#### **3.1.2.4 Pharmakokinetik**

Nach seiner Freisetzung wird der Wirkstoff im Dünndarm schnell resorbiert und zum größten Teil über die Bronchialschleimhaut ausgeschieden [188]. Seit 1995 können Aussagen über die Bioverfügbarkeit von Myrtol stand. in verschiedenen Darreichungsformen getroffen werden. In einer klinischen randomisierten cross-over-Studie wurde an Hand der Leitsubstanz Cineol eine relative Bioverfügbarkeit im Blutplasma von über 95% gezeigt. Besonders für die magensaftresistenten Kapseln zeigten sich im Vergleich zur zerkauten Form leicht verzögerte und geringere Konzentrationsspitzen mit dem Resultat eines Konzentrations-Plateaus von Cineol im Blutplasma der Probanden zwischen zwei und acht Stunden nach der oralen Gabe (Myrtol stand. mit 300 mg Wirkstoffmenge je Kapsel) [188].

### ***3.1.2.5 Nebenwirkungen***

Zu den häufigsten Nebenwirkungen von GeloMyrtol forte werden Schmerzen im Bereich des Oberbauches und des Magens gezählt (bis zu 10%). Außerdem ist in bis zu 1% der Behandlungen mit Verdauungsbeschwerden jeglicher Art, Kopfschmerzen, Schwindel oder einer allergischen Reaktion zu rechnen. Anaphylaxien sind laut Hersteller nicht bekannt. Insgesamt ist das Medikament sehr gut verträglich [99]. In Schwangerschaft und Stillzeit ist eine Medikamenteneinnahme nur nach Nutzen-Risiko-Abwägung durch den behandelnden Arzt empfehlenswert. GeloMyrtol forte ist für Kinder und Jugendliche ab 6 Jahren geeignet [55].

## 3.2 Staphylococcus aureus

*S. aureus* ist eine Familie, die zu der Ordnung Bacillales gehört und somit zum Stamm der Firmicutes. Die Bakterien sind grampositive Kokken mit einem Durchmesser von ca. 0,5 µm bis 1,5 µm. Sie kommen einzeln oder auch in kleinen und größeren, meist traubenförmigen Gruppen, sowie in kurzen Ketten mit drei bis vier Zellen vor. Sie wachsen als fakultative Anaerobier unter sauerstoffreichen Bedingungen besser sind Koagulase-positiv und in der Lage Pathogenitätsfaktoren auszuschleiden oder auf der Oberfläche zu bilden. Dazu zählen bspw. Clumping Factor, verschiedene Hämolsine, Oberflächenprotein A und die membranständigen Lipoteichonsäuren [58]. Krankheiten mit Beteiligung von *S. aureus* reichen von leichten oberflächlichen Hautinfektionen, Erkrankungen der Atemwege, wie akuter und chronischer RS, Pneumonien, Osteomyelitiden, invasiven hochgefährlichen Bakteriämien bis hin zur Sepsis [69, 81].

Bakterien wie *S. aureus* haben die Fähigkeit als Anpassung an verschiedene Umweltbedingungen Biofilm-Formationen zu bilden. Diese sind in der Regel aus mehreren verschiedenen Krankheitserregern zusammengesetzt. Die Zellen produzieren extrazelluläre polymere Substanzen und können so einen sesshaften Verband bilden, der in der Lage ist, über Signalmoleküle beispielsweise das Größenwachstum der Kolonie zu regulieren. Durch die phänotypischen Eigenschaften der verschiedenen Mikroorganismen ergeben sich für die Formationen komplexere Möglichkeiten der Anpassung an die Umwelt und der erheblich größere Genpool erschwert die Entwicklung von langfristig wirksamen Therapiemethoden [34, 80, 173].

Angesichts einer Beteiligung bei ca. 65% aller bakteriellen Infekte nach Angaben des National Institute of Health (NIH, USA) und der erhöhten Resistenzfähigkeit gegenüber Antibiotika gilt den Biofilmen eine besondere Relevanz [95, 147]. Ein Großteil dieser Infektionen sind Harnwegserkrankungen, Katheterinfektionen oder Entzündungen des Zahnfleisches. Speziell für die Hals-Nasen-Ohrenheilkunde erschwert und verlängert diese Form von bakterieller Besiedelung die Heilungsprozesse enorm [16, 50]. Für einige CRS Patienten besteht nach Ausschöpfen aller konservativen Therapiemethoden die Indikation zur endoskopischen Nasennebenhöhlenchirurgie mit dem Ziel der Verbesserung der Drainage (FESS, functional endoscopic sinus surgery). In mehreren Studien konnten durch Untersuchung der Gewebeproben Biofilme bei Patienten nachgewiesen werden [46, 120]. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass drei von vier Patienten mit FESS Indikation positiv auf Biofilme

## Einleitung

getestet wurden (76% [39], 72% [49], 77% [138]). *S. aureus* nimmt als häufigster Erreger, mit Vorhandensein als Biofilm in dem CRS Patientengut von z.T. 49% [50], respektive 70% [138], eine wichtige Rolle ein.

Im Zusammenhang mit den Biofilmen konnten zudem *S. aureus* im Inneren der Zellen der sinunasalen Mukosa nachgewiesen werden, sogenannte „intracellular staphylococcus aureus“ (ICSA) [150]. In einer Untersuchung speziell von CRS Patienten wurden bei 39% der Erkrankten ICSA und eine damit verbundene erhöhte Rezidivrate festgestellt [151]. Durch eine weitere Studie von 2016 sind Hinweise auf eine verstärkte Immunreaktion bei ICSA in den Schleimhautproben bekannt, jedoch ohne Korrelation mit vermehrter Symptomatik [111]. Die genauen Auswirkungen der ICSA auf CRS Patienten ist derzeit nicht ausreichend verstanden und Bestandteil mehrerer Untersuchungen.

Für Patienten mit CRS unabhängig einer Polyposis stellen die bakteriellen Biofilme [137, 184] und intrazellulärer *S. aureus* [151] einen perioperativen Risikofaktor bei der Therapie mit FESS dar. Hierbei kommt es häufiger zu rekurrierenden Infektionen und Symptompersistenzen, wenn eine entsprechende *S. aureus* Kolonisation nachgewiesen wurde.

### 3.3 Zielsetzung

Die Behandlung von akuten und chronischen Infektionen der oberen Atemwege ist eine der wichtigsten Aufgaben im Tätigkeitsbereich der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde und der Allgemeinmedizin. Sehr häufig sind Nase und Nasennebenhöhlen durch Infektionen einer Vielzahl von Erregern betroffen, sodass im EPOS 2020 von einem „häufigen Leiden“ [48] gesprochen wird, „das zu einer signifikanten Belastung von Gesundheitssystemen und Produktivität der Gesellschaft führt.“ [48]

Es besteht also nicht nur eine rein individuelle Relevanz für den einzelnen Patienten, sondern auch ein wichtiger gesundheitsökonomischer Ansatzpunkt. Zur Behandlung der bakteriell bedingten Erkrankungen werden aufgrund rascher Resistenzentwicklung immer wieder neue, aufwendig entwickelte Antibiotika benötigt, die zwar sehr effektiv sind, jedoch z.T. auch erhebliche Nebenwirkungen oder allergenes Potential mit sich bringen. Weitere unterstützende oder ersetzende Medikamente sind dringend notwendig, um auf lange Sicht mehrere Therapieoptionen zur Auswahl zu haben.

Myrtol stand. und BNO 101 sind Phytopharmaka, deren Wirksamkeit bei ARS und ABRS in der Vergangenheit gezeigt werden konnte. Die vergleichsweise geringen Nebenwirkungen, das breite Anwendungsspektrum und die positive Beurteilung in Leitlinien, machen sie bereits zur Standardtherapie, obwohl keine generelle Empfehlung für Phytotherapeutika bei den genannten Erkrankungen besteht. Ihre positiven Effekte werden im Wesentlichen mit der anregenden Wirkung auf die mukoziliäre Clearance begründet. Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, ob und wie neben der Stärkung der Abwehr des Erkrankten auch eine direkte Wirkung auf die Erreger erfolgt.

Abgesehen von der häufigen kommensalen Besiedelung mit *S. aureus*, spielt dieser Erreger durch Bildung von schwer behandelbaren Biofilm-Formationen und ICSPA eine gesonderte Rolle. Die Wirkung der oben genannten Phytopharmaka auf Infektionen dieser Art sind bislang wenig betrachtet worden. Außerdem gibt es Überlegungen zur systemischen und topischen perioperativen Anwendung im Rahmen von Prävention und Behandlung bakterieller Infektionen. Aus dieser Vielzahl an Gründen stellt sich die Frage: Wie wirken die pflanzlichen Medikamente auf *Staphylococcus aureus*?

## Einleitung

Ziel dieser Arbeit ist daher, antimikrobielle Effekte von Myrtol standardisiert und BNO 101 auf *Staphylococcus aureus* zu untersuchen. Mit Hilfe der Daten können Aussagen über die Wirkungsweise der Phytopharmaka getroffen und Möglichkeiten alternativer Behandlungen von Erkrankungen der oberen Atemwege, beziehungsweise Forschungsansätze für klinische Untersuchungen ermittelt werden.

Betrachtet werden die Wirkungen auf das mikrobielle Wachstum und morphologische Eigenschaften. Zum Verständnis der molekularen und biochemischen Prozesse werden zusätzlich Proteomanalysen des *S. aureus* Laborstammes durchgeführt.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
<sup>18</sup> O-Wasser	Sigma Aldrich
3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS)	Sigma Aldrich
Acetonitril HPLC grade, ≥ 99,9%, 41,05 g/mol (ACN)	Merck Millipore
Acryamid, 4K-Solution 40%, Mix 37,5:1	Appli Chem
Ammoniumbicarbonat (ABC)	Sigma Aldrich
Bovines Serum Albumin(BSA)	Sigma Aldrich
Bradford-Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Oxford Glycosystems
Dithiothreitol (DTT)	GE Healthcare Life Sciences
Drystrip Cover Fluid	GE Healthcare Life Sciences
Essigsäure 100%	Roth
Essigsäure MS grade 100%	Sigma Aldrich
Ethanol 96%, 10% MEK	Merck Millipore
G-Dye 100, G-Dye 200, G-Dye 300, G-Dye StopSolution, G-Dye Working Solution	NH-DyeAgnostics
Glycerol 87%	GE Healthcare Life Sciences
Iodacetamid (IAA)	Sigma Aldrich
IPG Strips (pH 4-7, pH 3-10)	GE Healthcare Life Sciences
Isopropanol	ChemSolute
LB Broth 10 g/l Tryptone, 5 g/l Yeast Extract, 5 /l NaCl	Sigma Aldrich
MALDI-H <sub>2</sub> O, HPLC grade	J. T. Baker
Methanol HPLC grade, 32,04 g/mol	Roth
NaOH	Roth
Natriumchlorid (NaCl) 0,9%	Braun
Natriumdodecylsulfat (SDS) 20%	Roth
Pharmalyte pH 3-10	GE Healthcare Life Sciences
Phosphatgepufferte Salzlösung Roti Stock (PBS) 10x	Roth
Protein Assay Dye Agent Concentrate	BIORAD
Roti Blue 5x	Roth
Salzsäure (HCl) 32%	Roth
Select Agar 15 g/l Agar, powder	Invitrogen



## Material und Methoden

Stickstoff, flüssig	Air Liquide
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	GE Healthcare Life Sciences
Thiourea	Sigma Aldrich
Trichloressigsäure (TCA), ≥99%	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck Millipore
Trypsin	Promega
TSB Medium	CM0129, Oxoid
Tween 80 BioXtra, viscous liquid	Sigma Aldrich
Urea	Merck Millipore

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien**

<b>Material</b>	<b>Name, Hersteller</b>
Alu-Folie	Roth
Bottle Top Filter	Steritop-GP SCGPS01RE, Vacuum Filter Unit, Radio-Sterilized, Merck Millipore
Filter für REM	Isopore Membrane Filters, 0,2 µm GTTP, Merck Millipore
Filterpapier	GE Healthcare Life Sciences
IEF-Elektrodenstreifen	GE Healthcare Life Sciences
Küvetten 1x nutzbar	Sarstedt
Micro Packaging vials	ThermoFisher Scientific
Zip-Tip µ-C <sub>18</sub>	Merck Millipore

## 4.2 Lösungen

**Tabelle 4: Zusammensetzung UT-Puffer (1xUT)**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Urea	1,92 g	8 M
Thiourea	0,61 g	2 M
Aqua dest.	ad 4 ml	

**Tabelle 5: UT Menge je Probe**

Menge UT Puffer in der die Proben zum angegebenen Zeitpunkt je nach für die Proteinkonzentrationsbestimmung aufgenommen wurden. Die Angaben sind für die behandelte Gruppe und die Kontrolle getrennt aufgelistet.

	<b>Myrtol stand.</b>	<b>Kontrolle</b>
<b>OD 0,2</b>	----	200 µl
<b>1 h</b>	150 µl	150 µl

<b>4 h</b>	250 µl	250 µl
<b>8 h</b>	500 µl	400 µl
<b>24 h</b>	400 µl	400 µl

**Tabelle 6: Zusammensetzung Trenngelösung für 6 Gele (12,5% Polyacrylamid)**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>
Acrylamid 40%	158,8 ml
TRIS/ HCl 1,5M, pH 8,8/ 0,1% SDS	127 ml
aqua dest.	219,5 ml
APS 10%	2,5 ml
TEMED	125 µl

**Tabelle 7: Zusammensetzung Rehydratisierungspuffer (RH) je Probe**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
CHAPS	80 mg	0,1 M
DTT	17,5 mg	13,125%
Pharmalyte pH 3-10	52,5 µl	0,1 mM
Bromphenolblau	Spatelspitze	

**Tabelle 8: Zusammensetzung der Äquilibrierungsflüssigkeit A und B für je 2 Streifen**

Beide Flüssigkeiten besitzen die gleichen Grundkomponenten und unterscheiden sich nur durch das Hinzufügen von DTT für A und IAA+ Bromphenolblau für B.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Menge</b>	<b>Endkonzentration</b>
Urea	7,2 g	6 M
TRIS/ HCl 1,5M, pH 8,8	8 ml	375 mM
Glycerol 87%	4,6 ml	20%
SDS 20%	4,0 ml	4%
Aqua dest.	ad 20 ml	
<b>Dazu für Äquilibrierungsflüssigkeit A</b>		
DTT	100 mg ad 10 ml aqua	
<b>Dazu für Äquilibrierungsflüssigkeit B</b>		
IAA	250 mg ad 10 ml aqua	
Bromphenolblau	Spatelspitze	

Tabelle 9: Zusammensetzung Lösung zur Entfärbung der Gelstücke

Komponente	Volumen/Menge	Endkonzentration
Ammoniumbicarbonat	79,1 mg	200 mM
ACN– HPLC grade	2,5 ml	
Maldi H <sub>2</sub> O	2,5 ml	

Tabelle 10: Zusammensetzung 10x Laufpuffer

Komponente	Volumen/Menge	Endkonzentration
Glycin	720 g	9,6 M
1,5M TRIS/ HCl pH 8,8	150 g	1,2 M
SDS 20%	250 ml	5%
Aqua dest.	Ad 5000 ml	

Tabelle 11: Zusammensetzung IPG Übersichtung 0,5% Agarose

Vor jeder Verwendung wurde die Lösung in der Mikrowelle bis zur Verflüssigung erwärmt.

Komponente	Volumen/Menge	Endkonzentration
Agarose	0,5 g	0,5%
Laufpuffer 1x	100 ml	95,5%

Tabelle 12: Zusammensetzung Trypsin Lösung (10µg/µl)

Die Trypsinlösung mit 10 µg/µl wurde durch Lösen eines Trypsin -Röhrchens in 2 ml Ammoniumbicarbonat hergestellt.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Trypsin (lyophilisiert)	1 Röhrchen	
Ammoniumbicarbonat	2 ml	20 mM

Tabelle 13: Zusammensetzung Coomassie 100 ml Färbelösung

Komponente	Volumen	Endkonzentration
5x Rotiblu	20 ml	20%
Methanol	20 ml	20%
Aqua dest	60 ml	

Tabelle 14: Zusammensetzung Puffer A

Komponente	Volumen/ Menge	Endkonzentration
Acetonitril 100%	80 µl	2%
Essigsäure 5%	80 µl	0,1%
MALDI-H <sub>2</sub> O	Ad 4 ml	

### 4.3 Geräte und Software

Tabelle 15: Geräte

Gerät	Gerätename, Hersteller
2D-Kammer	Protean plus Dodeca Cell, Bio-Rad incl.: Consort 300V - 1000mA E831, Electrophoresis Power Supply und Kühlung K20/DC10, Thermo Haake
Autoklaven	Systec VX 150, Systec GmbH Labor Systemtechnik
Eismaschine	Manitowoc Foodservice New port Richey USA
Floureszens Gel-Scanner	Typhoon 9400, GE-Healthcare
Folienschweißgerät	Polystar 423HP, Rische und Herfurth GmbH Maschinen - und Apparatebau
Gefrierschrank -80°C	Kryotec-Kryosafe GmbH
Gefrierschrank -20°C	Medline, Liebherr
Gelgießkammer	Ettan Dalt Gel Caster, Amersham Biosciences
Homogenisator	Precellys 24, PEQLab
IEF Kammer	Multiphor II, Pharmacia Biotech incl.: EPS 3501XL Power Supply, Amersham Biosciences und Kühlung EC F12, Julabo
Inkubator	BF 240, Binder
Kühlraum	Dresdner Kühlanlagenbau
Kühlschrank	Medline, Liebherr
Lyophilisator	Alpha 1-4 LD plus, Christ
Magnetrührer	Stirrer SB 161-3, Stuart
Mikrowelle	8020, Privileg
pH-Meter	Microprocessor ph-meter ph 537, WTW
Photometer	Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences GeneRay UV-Photometer SN3449, Biometra
Rasterelektronenmikroskop	EVO LS 10, Carl Zeiss Microscopy GmbH
Scanner	Perfection V750 Pro, Epson
Schüttelapparate	3005 und 3015, GFL

## Material und Methoden

Spülmaschine	G7883, Miele Professional MS1 Minishaker, IKA
Thermoschüttler	Thermomixer comfort, Eppendorf
Trockenschrank	ULE 500, Memmert Navigator , Ohaus Corporation Nänikon Schweiz
Trockenschüttler	Certomat IS, Sartorius Stedim Biotech
Vortexmischer	Vortex Genie 2, Scientific Industries, Inc.
Waage	Multifuge X3R, Heraeus Thermo Scientific Fresco 21, Heraeus Thermo Scientific Feinwaage BL120S, Sartorius
Wasserbad	OLS 200, Grant
Wasserstrahlpumpe	Wasserstrahlpumpe mit Wasseranschluss R 3/4" 1/2" Olive 10-12 mm, Brand
Zentrifuge	Biofuge Pico, Heraeus Instruments Centrifuge 5402, Eppendorf

Tabelle 16: Software

<b>Software, Entwickler</b>	<b>Arbeitschritt</b>
Microsoft OFFICE 2010/13, Microsoft Corporation	Präsentation, Dissertation, Statistik
PRISM 5, Graph Pad	Diagrammerstellung, Datensammlung, Statistik
Delta 2D 4.5, Decodon	2D-Geldarstellung und Statistik
Photoshop CS3, ADOBE Systems Incorporated	Bildbearbeitung
Scaffold 5, Proteome Software	Proteomauswertung
GPS Explorer Software, Thermo Fisher Scientific	Proteomauswertung
Sorcerer, Sage-N	Datenbanksuche
Venny 2.0, BioinfoGP	Erstellung Venn- Diagramme

### 4.4 Medikamente

BNO 101 und Myrtol stand. sind Phytopharmaka deren positive Eigenschaften bei der Behandlung von Infekten des oberen Respirationstraktes aus klinischen Studien bereits bekannt sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollen ihre direkten Effekte auf *S. aureus*, einen wichtigen Erreger der Erkrankungen geprüft werden. Die jeweilige Aufbereitung und Form der Verwendung sind in den Kapiteln zu den einzelnen Experimenten beschrieben.

**Tabelle 17: Verwendete Phytopharmaka**

<b>Wirkstoff</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Informationen</b>
BNO 101	Sinupret Tropfen	Bionorica SE, 92318 Neumarkt, DE	N1 100 ml, 29 g Wirkstoffgemisch je 100 g Tropfen, Zul.-Nr.: 34650.00.01, Ch.-B.: 0000080652, Verwendbar bis: JANUAR 2015
Myrtol standardisiert	GeloMyrtol <i>forte</i>	G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, 25551 Hohenlockstedt, DE	N3, 100 magensaftresistente Weichkapseln mit je 300 mg Wirkstoffgemisch, Zul.-Nr.: 6096046.00.00, Ch.-B.: 231253, Verwendbar bis: JULI 2016

## 4.5 Kulturmedien

**Tabelle 18: Zusammensetzung LB-Flüssigmedium**

Zur Herstellung des Flüssigmediums wurde LB-Broth in Aqua dest. wie angegeben gelöst und danach autoklaviert.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Menge</b>
LB-Broth	20,6 g
Aqua dest.	1 l

**Tabelle 19: Zusammensetzung LB-Agar Platten**

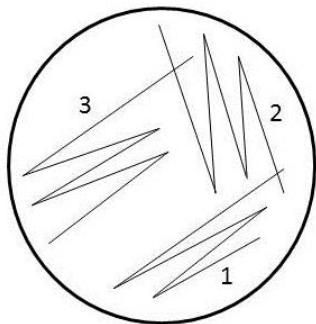
Zur Herstellung des Flüssigmediums wurde LB-Broth in Aqua dest. wie angegeben gelöst und danach autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 45°C wurde die Flüssigkeit zu je 12-15 ml unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Menge</b>
LB-Broth	20,6 g
Agar	12 g
Aqua dest.	1 l

## 4.6 Zellkultivierung

Für alle Experimente wurde *Staphylococcus aureus* verwendet. Die Zellen stammen vom Laborisolat *S. aureus* COL und drei Patientenisolaten A1, B1a und B1b. Letztere wurden vom Institut für Hygiene und Umweltmedizin Greifswald aus zwei verschiedenen Patienten entnommen. Aus der linken Nase des „Patienten A“ das Isolat A1 und aus der rechten Nase des „Patienten B“ die Isolate B1a und B1b. Alle Isolate wurden aus, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Kulturen mit 20% Glycerol-Anteil entnommen und auf Blut-Agar oder LB-Agar mit Hilfe von Impfösen übertragen. Isolat B1a und B1b sind Kolonievarianten.

Der Referenzstamm *S. aureus* COL wurde zu Beginn aus einer Glycerin Kultur auf LB-Agar (Zusammensetzung siehe Tabelle 19) geimpft, die Patientenisolate sind bereits auf LB-Agar bereitgestellt worden. Die Inkubation auf den Agarplatten erfolgte in der Regel über einen Zeitraum von 24 h ( $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ , z.T. abhängig von der Koloniegröße etwas länger). Die Lagerung der Agarplatten fand bei  $4^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank statt. Um die Vitalität der Zellen zu gewährleisten, wurde in regelmäßigen Abständen von 2-6 Wochen auf neue LB-Agar Platten umgeimpft. Dazu wurden einzelne Kolonien mit Hilfe von Impfösen oder Pipettenspitzen aufgenommen und auf einer neuen Agar Platte wie in Abbildung 1: 3-Ösenausstrich ausgestrichen.



**Abbildung 1: 3-Ösenausstrich**

Im 1. Schritt wurde die eine gepickte Kolonie wie abgebildet ausgestrichen und danach mit der anderen Seite der Öse der 2. Schritt durchgeführt. Für das 3. Ausstreichen wurde eine neue sterile Impföse verwendet.

Vor jedem Experiment wurde jeweils eine Kolonie von den LB-Agar Platten mit einer Pipettenspitze aufgenommen und über Nacht (14-16 h) in 3-5 ml LB-Flüssigmedium (Zusammensetzung siehe Tabelle 18) im Trockenschüttler bei  $37^{\circ}\text{C}$  kultiviert. Dieser Schritt wird im Folgenden als Übernacht-Kultur bezeichnet. Für die Experimente wurde dann in 200 ml Erlenmeyerkolben mit 40 ml Medium kultiviert. Alle Flüssigkulturen wurden mittels Suspension aus den Übernacht-Kulturen auf  $\text{OD}_{595\text{nm}}$  0,05 eingestellt und für bis zu 26 h im Schüttel-Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 100 rpm angezogen. Bei  $\text{OD}_{595\text{nm}}$  0,2 (nach ca. 1-2 h) wurde dann das jeweilige Medikament hinzugefügt (BNO 101 bzw. Myrtol stand.).

Als ein Maß für die Zellen in der Kultur kann die Optische Dichte (OD), eine Funktion der Absorptionsstärke der Kultur genutzt werden. Um die tatsächlich lebendigen Zellen zu quantifizieren sind Messungen der Kolonie– bildenden Einheiten (Colony forming units, CFU) notwendig.

#### 4.6.1 Typisierung der *S. aureus* Isolate mittels Multiplex PCR

Mit Hilfe von PCR lässt sich DNA amplifizieren und so das Vorhandensein bestimmter Gene in Organismen nachweisen. Bei Multiplex-Ansätzen werden verschiedene genetische Merkmale parallel in einem PCR-Ansatz untersucht. Die Identifikation der verschiedenen *S. aureus* Isolate wurde mittels Multiplex-PCR im Labor des Institutes für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald durchgeführt. Außerdem wurde die genetische Verschiedenheit belegt. Spezies-spezifische Primer können das ausschließliche Vorhandensein von *S. aureus* Zellen bestätigen und Screening auf verschiedene Virulenzfaktoren ermöglichen die Erstellung kurzer „Genprofile“ der einzelnen Isolate. Die Experimente wurden analog zu Publikationen der Arbeitsgruppe durchgeführt [70, 72, 73]. Die Typisierung wurde an Hand der hypervariablen X Region vom *S. aureus* spezifischen Gen spa durchgeführt [145]. Zusammen mit Informationen aus Datenbanken zu *S. aureus* Gensequenzen wurden die Isolate verschiedenen clonal clusters (CC) zugeordnet [70]. Innerhalb der CC ähneln sich die Zellen genetisch. In der untenstehenden Tabelle 20 sind die Multiplex PCR-Durchläufe mit den untersuchten Genen aufgelistet.

**Tabelle 20: Multiplex PCR Ansätze mit den jeweils untersuchten Genen**

Mpx: Multiplex, agr: accessory gene regulator, seb, sed, see, seg, sej, sek, sel, sen, sep, seq, ser, seu: Superantigen-Enterotoxine mit Bezeichnung, eta, etd: exfoliative toxin mit Bezeichnung, nuc: thermostable nuclease, mecA: methicillin-resistance, pvl: panton-valentine-leukocidin

PCR-Analyse	agr	Mpx I	Mpx II	Mpx III	Mpx IV	Mpx V	single PCR
<b>Gen</b>	agr 1-4	16SrRNA	sed	see	sen	sei	16SrRNA
	agr-1	16SrRNA	etd	seb	seg	ser	gyrase
	agr-2	16SrRNA	eta	sem	seq	seu	mecA
	agr-3	16SrRNA	sek	sel	sej	sep	pvl
	agr-4		nuc	seo			

Ausführliche Beschreibungen zu Versuchsaufbau und Durchführung, sowie den verwendeten Reagenzien und die Auflistung der Primer, Wellenlängen und kompletten Genbezeichnungen befinden sich im Anhang, Seite 142.



## **4.6.2 Experimente mit BNO 101**

### **4.6.2.1 Aufbereitung**

Für die Verwendung in Experimenten mit flüssigen Kulturmedien wurde eine ebenfalls flüssige Form des Medikaments, BNO 101 Tropfen gewählt. Aufgrund der enthaltenen 19% Alkohol als Lösungsmittel musste dieser vor der Verwendung mittels Gefriertrocknung entzogen werden. Für die Lyophilisation wurde nach Kühlung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Mengen von je 5ml über 20 Stunden im Alpha 1-4 LD plus von Christ gefriergetrocknet und anschließend wieder in 5 ml destillierten Wassers gelöst. Somit konnte von einer annähernd gleichen Konzentration der Wirkstoffe in der verwendeten Substanz ausgegangen werden.

Aufgrund bakteriostatischer Effekte durch das Lösungsmittel Ethanol in der Kontrollgruppe bei Experimenten zur Dosisbestimmung, ist in der Vorbereitung der nachfolgenden Experimente BNO 101 analog zu Arbeiten von Maune et al. S. [100] lyophilisiert worden, um den Alkohol zu entfernen. Vor der Anwendung auf die Bakterien wurde eine Sterilfiltration (0,45  $\mu\text{m}$  Porenweite) durchgeführt. Das gelöste Lyophilisat wurde bei Raumtemperatur und mit Alufolie umwickelt, vor Sonnenlicht geschützt gelagert.

### **4.6.2.2 Dosisbestimmung**

Die erste Testdosierung wurde über das Verhältnis von 9 ml Tageshöchstdosis zum Blutvolumen (6 l für männlich, 80 kg) für die Bakterienkulturen mit je 40 ml Medium auf 60  $\mu\text{l}$  bestimmt, dies entspricht einer Konzentration von 0,15%. Zur Bestimmung einer geeigneten Dosis für die nachfolgenden Experimente wurden Ausplattierungen bei verschiedenen Verdünnungen für die Konzentrationen 10; 5; 2,5; 1,25; 0,15; 0,075; 0,0375; 0,019 und 0,01% durchgeführt. Parallel wurden Kontrollen ohne Behandlung mitgeführt und Lösungsmittelkontrollen mit Ethanol erstellt. Diese enthielten Ethanol entsprechend der höchsten Konzentration in den verwendeten BNO 101 Dosierungen.

Zu Beginn wurde bei einer  $\text{OD}_{595\text{nm}}$  von 0,5 aus den Kulturkolben je 1 ml entnommen und für drei Minuten bei 11.000 rpm zentrifugiert, anschließend das Pellet in PBS gelöst und verdünnt. Danach folgte eine gleichmäßige Verteilung von jeweils 100  $\mu\text{l}$  der verdünnten Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit Hilfe von Glaskugeln ( $\emptyset$  1-2 mm). Die Ausplattierungen wurden mit der Verdünnung 1:100.000 vorgenommen. Nach 24 h Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  wurden die Kolonien manuell, mit einem Zählstift ausgezählt. Zum Teil wurden Zählungen von halbierten und geviertelten Platten hochgerechnet. Nach

Auswertung dieser Testreihe wurden für die folgenden Experimente die Konzentrationen 5 und 10% des BNO 101 Lyophilisats ausgewählt um mögliche antibakterielle Effekte zu untersuchen.

#### **4.6.2.3 Wachstumskurven**

Als Äquivalent für die Bakterienmenge in den Kulturkolben wurde mit einem Photometer die Optische Dichte der Wellenlänge 595 nm von 1 ml Proben der Bakteriensuspension gemessen (Median aus drei Messungen). Je mehr Zellen sich in der Bakteriensuspension befinden und so das Licht im Photometer absorbieren oder ablenken, desto größer ist die gemessene Optische Dichte. Zu Beginn des Wachstums fanden die Messungen in Abständen von 30 min und im weiteren Verlauf bis zu 1 h statt. Zusätzlich wurde eine Probe 24 h nach Behandlungsbeginn entnommen. Oberhalb von  $OD_{595nm}$  0,8 wurde eine Verdünnung mit Medium auf ein Zehntel vorgenommen, um zuverlässig im optimalen Messbereich des Photometers zu liegen.

Für jedes Patientenisolat und den Laborstamm wurden nach Heranziehen der Flüssigkultur Wachstumskurven über 24 h erstellt, jeweils mit 5% und 10% BNO 101 Lyophilisat (Anteil an der Gesamtkultur), sowie eine Kontrolle mit Einstellung auf  $OD_{595nm}$  0,05 aus der Übernachtskultur. Zur Validierung der Ergebnisse wurde jeder Versuch in einem komplett neuen Ansatz als „Replikat 2“ wiederholt.

#### **4.6.2.4 CFU-Bestimmung**

Die Ausplattierung wurde mittels der 3 verschiedenen Verdünnungen aus Tabelle 40 im Anhang auf S. 144 vorgenommen, wobei die mittlere in je drei technischen Replikaten erfolgte. Die Arbeitsschritte wurden anhand des Protokolls zur Dosisbestimmung durchgeführt. Das gesamte Experiment wurde für alle Patientenisolate und COL mindestens einmal, wie oben bei Dosisbestimmung beschrieben, durchgeführt. Verwendet wurden die Konzentrationen 5% und 10%. Die genauen Verdünnungsstufen sind im Anhang in Tabelle 40 auf Seite 144 beschrieben.

In Folge methodischer Überlegungen wurde das Protokoll der Ausplattierungsexperiente evaluiert, verändert und eine Probenentnahme zu den Zeitpunkten 1 h, 4 h, 8 h, 24 h, nach der Behandlung, sowie kurz vor der Gabe bei  $OD=0,2$  in den Experimenten unternommen. Somit wurde eine Vergleichbarkeit der behandelten Gruppen zur jeweiligen Kontrolle zu jedem Zeitpunkt geschaffen. In weiteren Vorexperimenten konnten hierfür geeignete

Verdünnungsstufen ermittelt werden. Die Versuche wurden unter sterilen Bedingungen mit der BNO 101-Konzentration 10% durchgeführt. Anschließend wurden, wie oben beschrieben, Proben auf LB-Agarplatten gleichmäßig verteilt und 24 h inkubiert (ohne Pelletierung). Für alle Patientenisolate und COL wurde zu jedem Zeitpunkt  $t[h]$  auf drei parallelen Agar-Platten ausplattiert. Die Angabe der Verdünnung und der ausplattierten Verdünnungen befindet sich in Tabelle 41 auf Seite 144 und Tabelle 42 auf Seite 145 im Anhang.

### **4.6.3 Experimente mit Myrtol standardisiert**

#### **4.6.3.1 Aufbereitung**

Von den verschiedenen Darreichungsformen wurde zur Gewinnung des Myrtol stand. das Präparat GeloMyrtol forte genutzt. Dieses enthält in jeder magensaftresistenten Kapsel 300 mg standardisiertes Myrtol [55].

Die Kapseln wurden einzeln unter sterilen Bedingungen mit Hilfe von Pinzette und Gefäßschere eröffnet und der Inhalt in Zentrifugenröhrchen gesammelt, anschließend sterilfiltriert (Filter 0,45  $\mu\text{m}$ ) und entsprechend des BNO 101-lyophilisates mit Alufolie umwickelt, um Veränderungen durch Sonnenlicht ausschließen zu können. Wie vom Hersteller empfohlen, fand die Lagerung bei Raumtemperatur  $T \leq 25^\circ\text{C}$  statt. Für je zehn Kapseln konnte eine Menge von 3,940 ml Kapselinhalt gewonnen werden (394  $\mu\text{l}$  je Kapsel). Durch Messung des Gewichtsverlustes der Kapseln nach Gewinnung konnte ein Verlust von 11,11% Masse ermittelt werden. Nach Abzug des Verlustes ergeben sich 266,67 mg Menge des Inhaltsstoffes je Kapsel. Somit liegt eine Wirkstoffkonzentration von ca. 0,677 mg/ $\mu\text{l}$  im später verwendeten Myrtol stand. vor. Im Folgenden wird die Konzentration dieses Wirkstoffes immer in Volumenprozent vom Gesamtvolumen angegeben.

#### **4.6.3.2 Dosisbestimmung**

Bei der Dosisbestimmung für Myrtol stand. wurden, analog zu den Experimenten mit BNO 101, zunächst 2 ml je 40 ml Bakterienkultur (5%) als höchste Konzentration ausgewählt. Zusätzlich erfolgten stufenweise Halbierungen der Dosis auf 5; 2,5; 1,25; 0,625 und 0,3125%. Es fand, wie oben beschrieben, eine Ausplattierung zu den Zeitpunkten  $t[h] = (0, 1, 4, 8, 24)$  nach Behandlung statt. Zu jedem Messpunkt der jeweiligen Dosis wurde auf drei parallelen Platten ausplattiert.

### 4.6.3.3 Wachstumskurven

Weil sich in der Dosisbestimmung bereits eine Verringerung der verbleibenden Kolonien für die Konzentration von 0,3125% Myrtol stand. abzeichnete, wurden die Konzentrationen 0,25%, 0,125% Myrtol stand. im weiteren Verlauf zur Behandlung genutzt. (ausführliche Beschreibung in Dosisbestimmung Myrtol stand. Seite: 56)

Im Durchgang 1 wurde für jedes Patientenisolat und COL je eine Wachstumskurve mit den ausgewählten Konzentrationen, sowie eine Kultur im Kontrollmedium erstellt. Der Versuchsablauf entsprach dem unter Behandlung mit BNO 101.

Um eventuelle Fehler bei der OD-Messung durch die im Myrtol stand. enthaltenen ätherischen Öle (Öl-Tröpfchen) auszugleichen, wurde in Durchgang 2 zusätzlich Tween 80 als Tensid hinzugegeben. Tabelle 21 zeigt die verwendeten Dosierungen. Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften von Myrtol stand. wurde vorab getestet, ob eine mittels Tween 80 erhöhte Löslichkeit bzw. verringerte Tröpfchengröße, Einfluss auf die Wirksamkeit hat.

**Tabelle 21: Dosierungen bei Erstellung der Wachstumskurven**

Dargestellt sind die absoluten Mengen und Konzentrationen von Myrtol stand. in beiden Durchgängen, sowie die hinzugefügte Menge des Tensids Tween 80 in Durchgang 2. In der Kontrolle wurden keine Substanzen hinzugefügt.

Durchgang:	Durchgang 1:		Durchgang 2:			
<b>Substanz:</b>	Konz. Myrtol stand.	Myrtol stand. absolut	Konz. Myrtol stand.	Myrtol stand. absolut	Tween 80	Gesamt menge
<b>Kontrolle:</b>	0%	0 µl	0%	0 µl	0 µl	0 µl
<b>Dosis:</b>	0,125%	50 µl	0,125%	50 µl	25 µl	75 µl
	0,25%	100 µl	0,25%	100 µl	50 µl	150 µl

Für die Erstellung der Wachstumskurven wurde in zwei Durchgängen die OD<sub>595nm</sub> in Abhängigkeit zur Zeit t[h] gemessen. Die Tabelle zeigt die Dosierungen von Myrtol stand. absolut und als Gesamtkonzentration im ersten Durchgang, sowie die in Durchgang 2 hinzugefügte Menge an Tween 80 und die sich daraus ergebende Gesamtmenge an hinzugefügter Substanz. In beiden Experimenten wurden die gleichen Mengen des Medikamentes verwendet.

In Vorexperimenten konnte das geeignete Verhältnis und die Mischweise von Tween 80 mit Myrtol stand. ermittelt werden. Vor der Behandlung im Medium sind Tensid und Medikament bereits gut vermischt worden.

#### ***4.6.3.4 CFU-Bestimmung***

Die Versuche wurden mit allen 3 Isolaten und dem Laborstamm durchgeführt. Zu jedem Zeitpunkt  $t[h] = \{0, 1, 4, 8, 24\}$  nach Behandlung, jeder Konzentration 0,25%, 0,125% und der Kontrolle wurden je 3 Ausplattierungen vorgenommen und zur Validierung der komplette Ansatz wiederholt. Auch hier wurde durch manuelles Zählen mit einem Zählstift die CFU-Anzahl bestimmt. Die Angabe der Verdünnung und der ausplattierten Verdünnungen befindet sich in Tabelle 41 auf Seite 144 und Tabelle 42 auf Seite 145 im Anhang.

#### 4.6.3.5 Kultivierung zur Rasterelektronenmikroskopie

Die Kultivierung von COL wurde entsprechend der Experimente zur CFU-Bestimmung durchgeführt. Zu den Zeitpunkten  $t[h] = \{0, 1, 4, 8, 24\}$  wurde dann jeweils eine ausreichende Menge Zellen entnommen ( $\frac{1\text{ml}}{OD_{595\text{nm}}} = \text{Menge Zellsuspension}$ ) und mit 0,9% NaCl auf 10ml aufgefüllt. Mit Hilfe eines Aufbaus von Wasserstrahlpumpe, Schottflasche, Gummiringen zur Abdichtung, Fritte und Polycarbonat-Filter konnten die Zellen dann auf dem Filter gesammelt werden. Im Anschluss wurden die Filter auf ca.  $1\text{ cm}^2$  geschnitten und in zwei Schritten mit mehreren Waschungen die Zellen fixiert.

#### 4.6.3.6 Kultivierung zur Proteinextraktion

Analog zur Kultivierung der Zellen für die CFU-Zählung und die REM-Probenvorbereitung nach Behandlung mit Myrtol stand., wurden die Zellen von COL für die Proteinanalyse kultiviert.

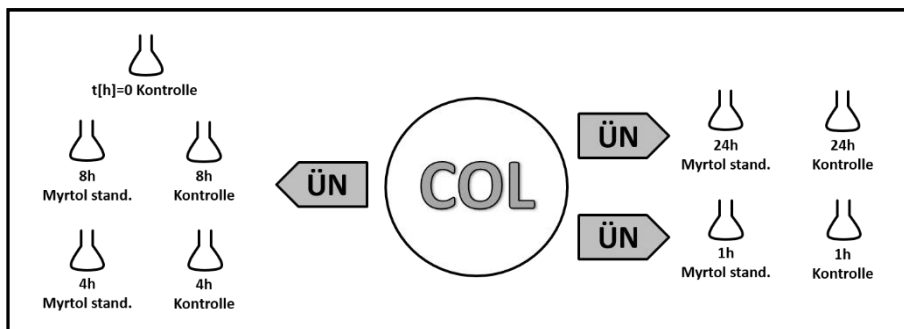


Abbildung 2: Versuchsaufbau zur Kultivierung für Proteinextraktion

Das Schema zeigt den Versuchsaufbau für die Kultivierung zur Proteinanalyse. Die Proben  $t[h] = \{0; 4; 8\}$  wurden gemeinsam mit ihren Kontrollen aus der gleichen Übernacht-Kultur angeimpft, während  $t[h] = 1$  und  $t[h] = 24$  jeweils mit ihren Kontrollen aus einer eigenen Übernacht-Kultur angeimpft worden sind. Alle Übernacht-Kulturen stammen von der gleichen Agarplatte.

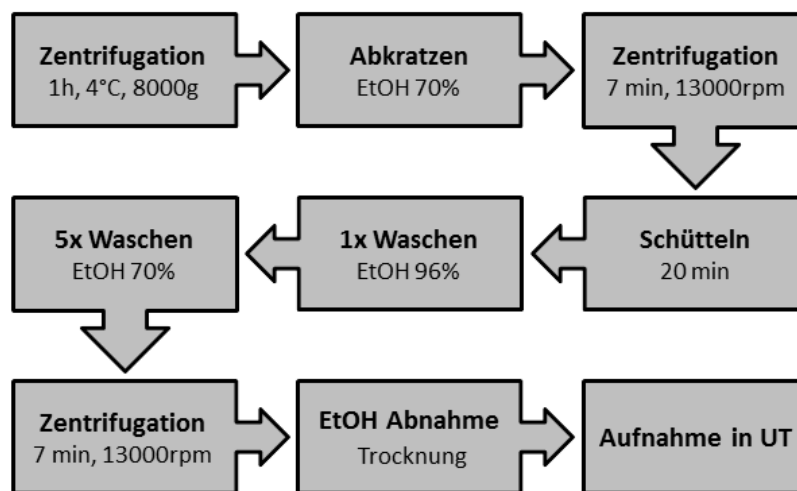
Wie in Abbildung 2 gezeigt, wurde in 9 separaten Erlenmeyerkolben nach Übernacht-Kultur angezüchtet. Myrtol stand. 0,25% wurde bei  $OD_{595\text{nm}} 0,2$  den zu behandelnden Kolben hinzugefügt. Für den Zeitpunkt direkt vor der Behandlung  $t[h] = 0$  ( $OD_{595\text{nm}} 0,2$ ) wurde ein 3 l Kolben und 510 ml Suspension, für alle anderen Versuche,  $t[h] = \{1, 4, 8, 24\}$  nach Behandlung jeweils ein 1 l Kolben mit 170 ml Suspension genutzt. Parallel zu jedem behandelten Kolben wurde in einem unbehandelten Kontrollkolben kultiviert und zeitgleich Proben entnommen. Nach Erreichen der Zeitpunkte  $t[h]$  wurden die Suspensionen entnommen und zentrifugiert (10 min,  $4^\circ\text{C}$ ,  $8000\times g$ ), der Überstand (extrazelluläre Bestandteile, EC) in Schottflaschen auf Eis überführt und mit  $0,45\ \mu\text{m}$  Filter und 50 ml Spritze sterilfiltriert.

Dem Pellet wurde bis zur vollständigen Resuspension steriles PBS hinzugefügt (2-6 ml). Im Anschluss wurde zur Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Davon wurden dann für den

## Material und Methoden

Zellaufschluss je 500 µl in Homogenisatorröhrchen mit 0,7 g Glassand (0,1 mm Durchmesser) und 500 µl eiskaltem sterilem PBS gefüllt. Nach 2x 30 sec. Zellaufschluss bei 6800 rpm im Homogenisator bei zwischenzeitlichen Pausen über 30 sec wurde die Suspension 1 h bei 4°C und 20000x g zentrifugiert und die Überstände (intrazelluläre Bestandteile, IC) vereint und mit 0,2 µm Filter sterilfiltriert worden.

Nach der Filtration wurde den Überständen der extrazellulären (EC) und intrazellulären (IC) Proteinfraction nun jeweils, unter Schwenken langsam frisches TCA (4°C) bis auf 10% Gesamtkonzentration mit einer serologischen Pipette tropfenweise hinzugefügt und über Nacht bei 4°C gefällt. Im Anschluss wurde der Arbeitsablauf wie in Abbildung 3 durchgeführt.



**Abbildung 3: Arbeitsablauf zur Vorbereitung auf die Konzentrationsbestimmung**

Das Schema zeigt die einzelnen Schritte nach der Proteinfällung bis zur Aufnahme in den UT Puffer. (Zusammensetzung in Tabelle 4)

## 4.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht mit Hilfe von gezielten Elektronenstrahlen und deren Wechselwirkungen mit der Oberfläche des zu untersuchenden Objektes eine Darstellung mit extremer Vergrößerung und Tiefenschärfe. Diese kann besonders zur Beurteilung der Oberfläche einzelner Zellen, deren Größe, Form und Anordnung in Zellverbänden genutzt werden.

Unter Behandlung sind die Überlebensraten signifikant und dosisabhängig gesunken. Dies ließ sich mit den Wachstumskurven nicht zeigen. Um diese Diskrepanz erklären zu können, wurde die Morphologie der Zellen mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen untersucht. Im Rahmen der Experimente zu dieser Arbeit wurden daher Aufnahmen zur Darstellung der Zellen von *S. aureus* COL nach Behandlung mit Myrtol stand. im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen angefertigt. Außerdem wurden zur Qualitätssicherung alle 4 Isolate von *S. aureus* bzw. die genutzten Kryo-Kulturen auf Fremdkulturen anderer Mikroorganismen bei 5000-facher Vergrößerung untersucht. Die REM-Aufnahmen der Mikroorganismen wurden mit dem voll digitalisierten Rasterelektronenmikroskop Zeiss EVO LS10 erstellt.

Nach Kultivierung der Zellen (s. Seite 38) erfolgte die Probenvorbereitung für die REM durch das Imaging-Zentrum nach der auf Lysinacetat basierenden Formaldehyd-, Glutaraldehyd-, Rutheniumrot-, Osmium-Fixierungsmethode von Hammerschmidt und Mitarbeitern [64], mit kleineren Modifikationen, wie der Entwässerung der Proben mit Ethanol und die Bedampfung mit Gold/Palladium. Nach Erhalt der Bilder konnten die Zellen bei 8000-facher Vergrößerung vermessen und für jede Probe ein Durchschnittswert des Zelldurchmessers ermittelt werden ( $39 \leq n \leq 92$ ). Unter Annahme einer Kugelform der Staphylococci konnte dann das Volumen der Zellen berechnet und im Anschluss mit den Volumina der Kontrollen verglichen werden. Alle Unterschiede wurden mittels statistischem Test auf ihre Signifikanz geprüft.



## 4.8 Proteomanalyse

### 4.8.1 Arbeitsablauf der Proteomanalyse

Die Abbildung 4 zeigt das schrittweise Vorgehen zur Bestimmung der durch Behandlung veränderten Proteine in dieser Arbeit.

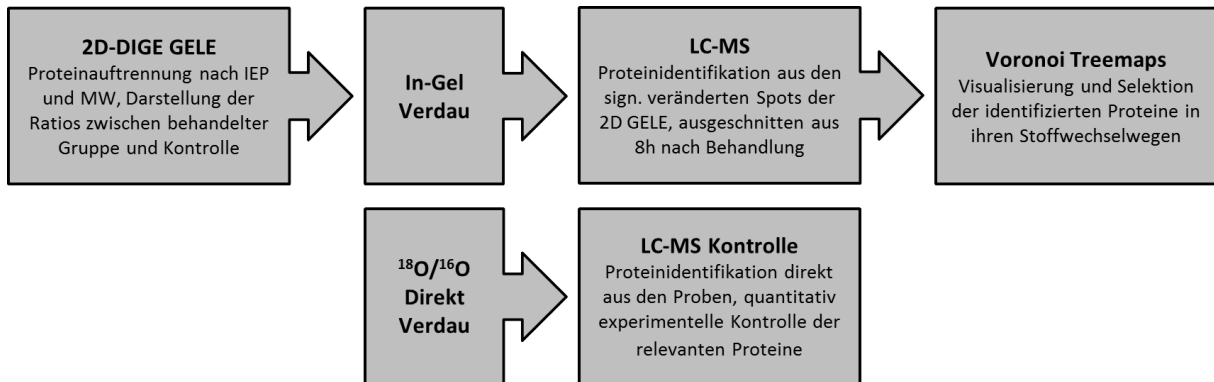


Abbildung 4: Arbeitsablauf der Proteomanalyse

Nach der Kultivierung (s. Seite 38) wurden zunächst die Proteine mittels 2D-DIGE aufgetrennt und anhand der Intensitäten aller aufgetrennten Proteinspots die Verhältnisse zwischen den behandelten Proben und der Kontrolle zu berechnen. Zur Bestimmung der Proteine wurden differenziert exprimierte Proteinspots ausgeschnitten und mit LC-MS analysiert. Im Anschluss wurden Mehrfachidentifizierungen der einzelnen Spots sukzessive durch Anwendung von etablierten Selektionsparametern und Stoffwechselweganalysen in Form von Voronoi Treemaps zusammengefasst. Zur endgültigen Bestätigung wurde eine LC-MS Kontrolle nach  $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$  Direkt-Verdau durchgeführt und so die ausgewählten Proteine mit einer weiteren massenspektrometrischen Methode bestätigt. Es folgen ausführliche Beschreibungen der einzelnen Arbeitsschritte.

### 4.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für weitere Analysen der Proteinextrakte musste zunächst die Proteinkonzentration der einzelnen Proben mittels Bradford-Test ermittelt werden. Das genutzte Bradford-Reagenz ändert bei Bindung an Proteine sein Absorptionsmaximum. Durch photometrische Messungen kann so die Proteinkonzentration in der Probe bestimmt werden. Für die Eichkurve sind verschiedene Konzentrationen von BSA-Standardlösung gewählt worden. Die BSA-Proben wurden mit UT-Puffer, wie in Tabelle 5 beschreiben, verdünnt und mit Aqua dest. in den angegebenen Volumina versetzt. Kurz vor der Messung wurden 200  $\mu\text{l}$  des Bradford Reagenz hinzugefügt. Tabelle 22 zeigt die Zusammensetzung der Proben für die Eichkurve.

Tabelle 22: Zusammensetzung der Proben für die Eichkurve

Laufnummer	0	1	2	4	6	8	10	12
BSA (0.1 ug/ $\mu$ l) [ $\mu$ l]	0	10	20	40	60	80	100	120
1xUT [ $\mu$ l]	5	5	5	5	5	5	5	5
Maldi-Wasser [ $\mu$ l]	795	785	775	755	735	715	695	675
Bradford Reagenz [ $\mu$ l]	200	200	200	200	200	200	200	200
Gesamtvolumen [ $\mu$ l]	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Nachdem die OD<sub>595nm</sub> im Photometer bestimmt worden ist, konnte die Eichkurve erstellt werden. Im Anschluss wurden die Batterien ebenfalls im UT-Puffer gemessen, und mit Hilfe der Eichkurve die enthaltene Proteinkonzentration bestimmt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen musste die Kultur der Probe t[h]= 1 h mit doppelter Menge Kultur wiederholt und die Proteinextrakte anschließend vereinigt werden, um ausreichende Proteinmengen für weitere Analysen zur Verfügung zu haben.

### 4.8.3 2D-DIGE

#### 4.8.3.1 DIGE Färbung

Für die quantitative Analyse der Proteine aus den intra (IC)- und extrazellulären (EC) Proben wurde eine 2 Dimension Fluorescence Difference inGel Electrophoresis kurz 2D-DIGE Färbung durchgeführt. Mit Hilfe des Refraction-2D Labeling Kit von NH DyeAGNOSTICS und den enthaltenen Farbstoffen G-Dye100, G-Dye200 und G-Dye300, deren Absorptionsmaxima und Molekulargewichte sich unterscheiden, können gleichzeitig mehrere Proben innerhalb eines Gels aufgetragen werden. Die Farbstoffe binden kovalent an ca. 3% der Lysinreste aller Proteine in den Proben. Für intrazelluläre und extrazelluläre Proteine war der Versuchsaufbau gleich, Tabelle 37 auf Seite 143 im Anhang zeigt die verschiedenen Eigenschaften der einzelnen Farbstoffe.

So wurden je 100  $\mu$ l jeder Probe jeweils mit G-Dye200 und G-Dye300 markiert und per DyeSwap Prinzip als Doppelansatz durchgeführt [108, 171]. Zur Markierung mit den Farbstoffen wurde zu jeweils 50  $\mu$ g Proteinprobe 1  $\mu$ l des Farbstoffes hinzugegeben und gut vermischt. Inkubiert wurde für 30 min auf Eis. Im Anschluss wurde durch Hinzufügen der StopSolution für 10 min die Reaktion der Farbstoffe beendet [108, 171].

Durch Verwendung eines internen Standards können nach der Analyse Intensitätsvergeiche zu den Proteinen gemacht werden. Der interne Standard wurde jeweils für IC- und EC-Analysen durch äquimolare Mischung aller entnommenen Proben erstellt.

### **4.8.3.2 Rehydratisierung**

Wie in Tabelle 38, Seite 143 im Anhang beschrieben, wurden für die Rehydratisierung, die vorher markierten Proben und der interne Standard mit 10x Rehydratisierungspuffer (Zusammensetzung in

Tabelle 10) aufgenommen und anschließend zu 300 µl mit 1xUT aufgefüllt. Danach wurde 30 min bei 1400 rpm geschüttelt und 15 min abzentrifugiert, um nicht gelöste Proteine abtrennen zu können. Dieser Vorgang wurde separat für jedes einzelne Gel durchgeführt.

Für die Auftrennung der IC Proben sind IGP-Strips mit pH 3-10 und für die EC Proben IGP-Strips mit pH 4-7 verwendet worden. Sie stellen eine Matrix mit definiertem, linearem pH Gradienten dar und ermöglichen so eine standardisierte Auftrennung. Nach Befüllen der Rehydratisierungskammern mit dem jeweiligen Gemisch aus Probe und Rehydratisierungspuffer wurden die IGP-Strips vorsichtig mit Pinzetten mit der Gelseite nach unten in die Kammern gelegt. Zum Schluss wurde mit einer Schicht aus DryStrip Cover Fluid die Oberfläche abgedichtet, um vor der Verdunstung zu schützen. Die Rehydratisierung fand unter Raumtemperatur statt und erfolgte über Nacht.

### **4.8.3.3 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt erfolgte mittels isoelektrischer Fokussierung. Nach beendeter Rehydratisierung wurden dafür die IGP-Strips der Kammer entnommen und mit Aqua dest. gespült. Um kristallisierte Urea zu entfernen sind die Streifen mit feuchtem Blotting-Papier abgezogen und dann mit dem niedrigen pH-Wert zur Anode in die IEF-Kammer gelegt worden. Die Gelseite zeigte hierbei nach oben. Nach Verbindung der Elektroden mit den Elektrodenstreifen und dem Übergießen mit DryStrip Cover Fluid, wurde die Kammer verschlossen und die Auftrennung mit dem in Tabelle 39 (Seite 144 im Anhang) beschriebenen Programm gestartet.

Die IEF dauerte vier bzw. fünf Stunden und im Anschluss wurde das DryStrip Cover Fluid entfernt und die Streifen entweder bei -20°C gelagert oder direkt weiter bearbeitet.

### **4.8.3.4 Gelherstellung**

Zur Auftrennung nach dem Molekulargewicht in der zweiten Dimension wurden polyacrylamidhaltige Trenngele verwendet. Im Folgenden werden die Schritte zur Herstellung dieser beschrieben.

Nach Reinigung des Gießstandes und der Glasplatten mit 70% Ethanol wurde die Trenngelösung (siehe Tabelle 6) zwischen die Platten in den Gießstand gegossen und langsam mit Isopropanol zur glatten Abdichtung überschichtet. In der Folge wurde für eine Stunde die Polymerisierung abgewartet und anschließend die Isopropanolschicht mit Aqua dest. abgespült und das fertige Gel vorsichtig der Kammer entnommen. Die so hergestellten Gele hatten eine Größe von ca. 24 × 21 cm.

#### **4.8.3.5 Äquilibrierung**

Unmittelbar vor der SDS-DIGE wurden in zwei Schritten mit den Äquilibrierungsflüssigkeiten A und B zunächst die Disulfidbrücken gelöst (DTT) und im Anschluss eine erneute Bildung der Brücken durch Alkylierung der Cysteine (IAA) über die Dauer von 15 min verhindert. In Vorbereitung auf die 2. Dimension fand die Beladung mit negativen SDS (20%) Ladungsträgern innerhalb beider Äquilibrierungsschritte statt. Tabelle 8 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.

#### **4.8.3.6 Zweite Dimension: Polyacrylamid – Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Nach der Beladung mit SDS wurden die Streifen zwischen die Gelplatten gesetzt und durch vorsichtiges Überschichten mit der 0,5%igen Agarose (Tabelle 11) fixiert. Die 2D-Kammer wurde ca. 1 h zuvor mit Laufpuffer (Zusammensetzung in Tabelle 10) gefüllt und die Temperatur auf 20°C unter Pumpentätigkeit eingestellt. Dann sind die Platten in die Apparatur eingesetzt, das System verschlossen und die Elektrophorese wurde gestartet. Die Elektrophorese lief bei insgesamt 2 W bis die Hälfte der Gele (Laufstrecke 12 cm) von der Probe durchlaufen wurde.

#### **4.8.3.7 Darstellung und Auswertung der Gele**

Jede der 9 Proben: Myrtol stand.  $t[h] = \{0, 1, 4, 8, 24\}$ , Kontrolle  $t[h] = \{1, 4, 8, 24\}$  wurde mit G-Dye200 markiert und in zwei Gelen (Doppelansatz) aufgetrennt. Parallel wurde in jedem dieser 18 Gele noch eine weitere Probe mit G-Dye300 markiert aufgetrennt. Zusätzlich wurde in jedem der Gele der interne Standard mit G-Dye100 markiert aufgetrennt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit einem Typhoon 9400 der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Uwe Völker der funktionellen Genomforschung der Universität Greifswald gescannt und so für jeden Farbstoff in allen Gelen ein digitales Abbild der Proteinverteilung erstellt (Gelbild). Jedes Gel ist Träger von 3 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen und somit von 3 Gelbildern. Es konnten insgesamt 36 Gelbilder zur Analyse und 18 Gelbilder des Standards genutzt werden. In das Analyse-Programm Delta2D geladen, konnten die Bilder dann auf den Standard

angeglichen und die jeweils vier Replikate jedes Versuches miteinander fusioniert werden (Fusionsgele). Diese wurden mittels Delta 2D Software auf interne Standards gematcht und final zu einem Gelbild pixelweise fusioniert. Die Detektion der Proteinspots wurde sowohl durch das Programm, als auch manuell durchgeführt. Bei direktem Vergleich der Bilder von behandelten Proben und Kontrolle zu jedem Zeitpunkt konnten so veränderte Spots ermittelt werden. Die statistische Analyse erfolgte zum mittleren normalisierten Volumen der Spots im Vergleich. Außerdem wurden nur Spots mit Volumenratio zwischen den zu vergleichenden Gelen im Bereich  $r \leq 0,667$  und  $r \geq 1,5$  weiter analysiert. Die Spots wurden dann auf das statistisch valide Vorhandensein in mehreren Gelen überprüft und so eine gezielte Auswahl von Spots aus IC (intrazellulär)- und EC (extrazellulär)-Vergleichen getroffen. Die ausgewählten Spots sind mindestens in allen drei Overlays 4 h, 8 h, und 24 h signifikant verändert und z.T. auch im Vergleich 1 h nach Behandlung signifikant verändert.

### **4.8.3.8 Coomassie Färbung**

Zunächst wurden die Gele in 40% Methanol und 10% Essigsäure für ca. eine Stunde fixiert und danach 2-fach mit Aqua dest. gewaschen. Für die Färbung wurden sie über Nacht bis zu 7 Tage mit der Coomassie Färbelösung, wie in Tabelle 13, eingefärbt. Die Waschung erfolgte mit 20% Methanol und anschließender Spülung mit 2x 1 h. Nach der Färbung waren die Gele zusätzlich zu den drei fluoreszierenden Farbstoffen auch Träger des Coomassie Farbstoffes.

### **4.8.4 Identifikation der Proteine**

Der nächste Analyseschritt war die Identifikation der einzelnen Proteinspots aus der oben beschriebenen Auswahl (Seite 44) und Erstellung des Peptidmassenfingerprints (PMF) mittels Massenspektrometrie (MS). Dafür ist zunächst eine Selektion und der tryptische Verdau der Proben notwendig gewesen.

#### **4.8.4.1 In-Gel Trypsin Verdau für MS**

Bei allen selektierten Spots ist die Intensität unter Myrtol stand. zu den Zeitpunkten  $t[h] = \{4, 8, 24\}$  signifikant mindestens 1,5-fach erhöht oder vermindert im Vergleich zur Kontrolle. Ein Teil der Spots ist zusätzlich auch zum Zeitpunkt  $t[h] = \{1\}$  signifikant verändert. Zur Auswahl der Spots wurde nach der Lage auf dem Gel in Bezug auf Überlappungen der Spots im Coomassiegel ausgewählt. Für das Ausschneiden der Spots (Cutting) sind nur Spots geeignet, die eindeutig von anderen getrennt liegen und keine Überlappungen mit anderen aufweisen. Diese wurden durch Vergleichen der Coomassiegele mit den digitalen Bildern der GDye-Farbstoffe ermittelt.

Zu Beginn wurden die ausgewählten Spots aus Gelen der Proben 8 h nach Behandlung mit Hilfe von Pipettenspitzen individuell adäquater Größe ausgestanzt. Anschließend wurde zur Entfärbung vom Coomassie Farbstoff zunächst 200 µl Ammoniumbicarbonat (Tabelle 9) zu jedem Gelstück hinzugegeben und auf dem Thermomixer für 15 min inkubiert. Bei Farbrückständen wurde dieser Schritt bis zur vollständigen Entfärbung wiederholt. Danach wurde 2x mit 100 µl Acetonitril (ACN) inkubiert und so die Proteine dehydratisiert. Der tryptische Verdau fand mit 15-20 µl Trypsin Lösung (Tabelle 12) für einige Minuten bei Raumtemperatur statt, um das Einquellen der Lösung in die Gelstücke zu ermöglichen. Der verbleibende Trypsin Überstand wurde anschließend entfernt. Danach wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und die resultierenden Peptide extrahiert und in Microvials überführt.

Für die 1. Extraktion der Proteine wurden 15-20 µl Maldi H<sub>2</sub>O (HPLC grade) mit 0,1% Essigsäure für 45 min den Proben hinzugefügt und kurz bei maximal 6000 rpm zentrifugiert. Die 2. Extraktion wurde in gleicher Weise mit 50% ACN und 0,05% Essigsäure durchgeführt und danach beide Überstände zusammengeführt. Danach wurde das Volumen mittels SpeedVac auf 2-5 µl eingengt um das ACN zu entfernen. Zuletzt wurde mit 0,1% Essigsäure in 2% ACN auf 12 µl aufgefüllt. Die Proben konnten im Anschluss der Massenspektrometrie übergeben oder zur Lagerung bei -20°C eingefroren werden.

#### **4.8.4.2 Massenspektrometrische Analysen**

In der Analyse der 2D-DIGE Gele konnte gezeigt werden, dass bei dem Referenzstamm *S. aureus* COL unter Behandlung mit 0,25% Myrtol stand. eine deutliche Veränderung der Proteinexpression stattfindet (IC und EC). Um Aussagen über spezifische Wirkungen auf den Stoffwechsel der Bakterienzellen und Ursachen für die, bereits in den CFU-Bestimmungsexperimenten und der Elektronenmikroskopie gezeigten Effekte zu finden, wurden die Proteinspots ausgeschnitten, verdaut und mit einer Kombination aus Flüssigchromatographie und anschließender Massenspektrometrie (LC-MS) erst getrennt und dann identifiziert. Die Ionisierung erfolgte unter Verwendung der Elektrosprayionisierung (ESI) [106, 112].

Für massenspektrometrische Analysen werden die zu untersuchenden Proben zunächst ionisiert, in die Gasphase überführt und von einem elektrischen Feld im Vakuum auf einen Detektor beschleunigt. In Abhängigkeit zu ihrer Masse und Ladung werden sie im elektrischen Feld unterschiedlich abgelenkt und so in Spektren aufgetrennt. Bei bekannter Ladung kann ihre Masse dann anhand der Intensitäten auf dem Detektor identifiziert werden. Die LC-MS

wurde mit Hilfe des Proxeon Easy nano-LC System und einer Orbitrap Velos mit kombinierter ESI durchgeführt.

### **4.8.4.3 Datenbankabgleich**

Die Massenspektren einzelner Peptide ermöglichen nun das Erstellen eines PMF. Zum Abgleich werden große Proteindatenbanken genutzt, in denen alle bekannten Proteine anhand ihrer Genome virtuell erstellt und in ihre Peptide in-silico gespalten worden sind. In dieser Arbeit wurden die Proben mit Hilfe der Software Sorcerer (Sage-N Research Inc., USA) gegen die Datenbank UniProtKB/Swiss-Prot 2014 (UniProt Knowledgebase [153]) durchsucht und verglichen.

Für den Vergleich wurde eine Reihe von Parametern festgelegt, um die Suche einzuschränken und z.T. Sensitivität und Spezifität der Messung zu verbessern. Dazu zählen die Massengenauigkeit von 10 ppm und Proteinmodifikationen wie Carboamidomethylierung (+57 amu) und Methioninoxidation (+16 amu). Letztere können bei den Reduzierungen und Alkylierungen bei der Probentrennung in der 2D-DIGE entstanden sein. Zum Zeitpunkt des Abgleiches wurde mit einer Datenbank, aller bis dato sequenzierten *S. aureus* gearbeitet und gegen über 1,1 Millionen Datenbankeinträge verglichen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden dann im Anschluss mit Hilfe der Software Scaffold (Proteome Software Inc., USA) selektiert. Als Einschlusskriterien dienten hierfür ein Schwellenwert von 95% Identifizierungswahrscheinlichkeit für Proteine, mindestens zwei identifizierte Peptide je Eintrag sowie ein Kreuzkorrelationswert für die Peptide (Xcorr) von 2,5 für 2-fach, 3,0 für 3-fach und 3,5 für 4-fach geladene Peptide .

Aufgrund der sehr sensitiven LC-MS Analyse werden für die einzelnen Spots z.T. mehrere Proteine oder Peptide als mögliche Identifikationen angeboten. Um diese weiter einschränken zu können, wurden IEP und MW der detektierten Proteine mit der Lage des Spots auf den 2D- Gelen sowie mit den parallel am gleichen Spot detektierten Proteinen verglichen und so deutlich falsch positive Identifikationen ausgeschlossen. Außerdem wurden unbekannte Proteine (unknown putative Protein) entfernt. Im letzten Schritt wurden die Proteine den Ratios aus den Intensitätsvergleichen der Fusionsgele nach den DIGE-Experimenten zugeordnet, sodass Aussagen über die Veränderung der Proteine zwischen behandelter Gruppe und Kontrolle zu den Messzeitpunkten getroffen werden können.

#### **4.8.4.4 Voronoi Treemap**

Mittels KEGG-pathway Analyse (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome, Kanehisa Laboratories, Kyoto University, Japan) wurden die identifizierten Proteine in Voronoi Treemaps [6, 17, 24] ihren Stoffwechselwegen bzw. Funktionen zugeordnet. Diese zeigen die Proteine eingebettet in ihre Stoffwechselwege und visuell direkt neben funktionell verwandten Proteinen. Zusätzlich wird die Ratio für jedes Protein farblich kodiert und so die Veränderungen gut sichtbar gemacht. Die im Vergleich zur Kontrolle nicht veränderten Proteine sind als unverändert und grau abgebildet.

Die Zuordnung zu den Proteinfamilien erfolgte durch Vergleiche in der TIGRFam-Datenbank analog zur beschriebenen Literatur [62, 63]. Die eingefügten Proteine wurden eindeutig einem bekannten Pathway zugeordnet oder wenn nicht möglich, als unbekannt gekennzeichnet. Für die Analyse wurden alle Proteine aus IC und EC Proben genutzt. Die angegebenen Funktionen der identifizierten Proteine wurden der bereits beschriebenen Datenbank UniProt KB entnommen.

#### **4.8.4.5 Direkter Flüssigverdau mit $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$**

Zur Validierung der Ergebnisse aus den In-Gel verdauten Proteinen und für weitere Untersuchungen sollte ein zweiter massenspektrometrischer Ansatz den direkten Vergleich der Proteinzusammensetzung von behandelten Kulturen und Kontrolle ermöglichen. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen Sauerstoffisotopen ( $^{16}\text{O}$  Sauerstoff und  $^{18}\text{O}$  angereicherter Sauerstoff) in den jeweils zu vergleichenden Ansätzen und anschließender Analyse der Verteilung auf die untersuchten Proteine sind semiquantitative Vergleiche über die Proteinverteilung in den Proben möglich. Für das Experiment wurden die Proteinproben aus Kontrolle und behandelter Gruppe zum Zeitpunkt 8 h nach Medikamentengabe, getrennt sowohl von IC als auch EC, verwendet.

Zunächst wurden jeweils 2  $\mu\text{g}$  jeder Probe wie in Abbildung 5 tryptisch verdaut, in einem Ansatz mit  $^{16}\text{O}$ -und in einem parallelen Ansatz mit  $^{18}\text{O}$ -enthaltendem Wasser. Danach wurden die zu vergleichenden Proben paarweise kombiniert (je 50%): 8 h Kontrolle mit  $^{16}\text{O}$  und 8 h nach Behandlung mit Myrtol stand. mit  $^{18}\text{O}$  sowie 8 h Kontrolle mit  $^{18}\text{O}$  und 8 h nach Behandlung mit Myrtol stand. mit  $^{16}\text{O}$ . Zum Stoppen der Proteinspaltung wurden die kombinierten Proben mit Essigsäure bis zur Endkonzentration von 1% Essigsäure aufgefüllt.



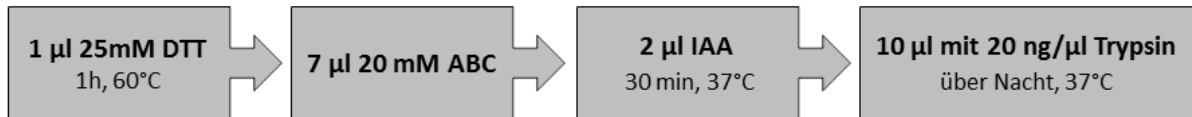


Abbildung 5: Arbeitsablauf Inkubation mit Sauerstoffisotopen und Verdau

DTT, Dithiothreitol; ABC, Ammoniumbicarbonat; IAA, Iodacetamid; Probenvorbereitung zur LC-MS,

#### 4.8.4.6 Entsalzung von Peptidextrakten an C18 Material/ Zip-Tip

Um die Aussagekraft der späteren massenspektrometrischen Analysen zu verbessern wurden die Proben nach dem Verdau mittels ZipTip-Methode von kleinsten Verunreinigungen befreit und das UT entfernt. Folgende Lösungen wurden zur Waschung genutzt: 100%, 80%, 50% und 30% Acetonitril (ACN), alle Lösungen enthielten 1% Essigsäure.

Zunächst wird die Zip-Tip- Säule in 3 Schritten mit 10 µl 100% ACN äquilibriert. Danach folgen schrittweise jeweils 5 Äquilibrierungen mit 10 µl der oben beschriebenen 3 Lösungen von ACN in 1% Essigsäure. Im Anschluss wurde 2x mit 10 µl 1% Essigsäure gewaschen, die Proben auf den Zip-Tip gebracht und 10-fach mittels Pipette vermischt. Dann wurden erneut 5 Waschungen mit 1% Essigsäure durchgeführt und die Peptide jeweils 5x mit 5 µl der 50% ACN - und 80% ACN Lösung eluiert. Zum Schluss wurden beide Eluate vereinigt und im Microvial auf 2 µl in der Speedvac eingeeengt. Für die Messungen war es nötig die Proben auf 20 µl mit Puffer A (Tabelle 14: Zusammensetzung Puffer A) einzustellen. Im Anschluss wurde bei -20 °C gelagert oder direkt an die Massenspektrometrie übergeben.

#### 4.8.4.7 Analyse der <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O Proben

Die Proben aus dem Direktverdau wurden analog zum Vorgehen nach dem In-Gel Verdau mittels LC-MS gemessen und nach gleichem Protokoll durch Datenbanksuche ausgewertet. Aufgrund der Mehrfachidentifikationen nach der InGel LC-MS, wurden die Veränderungen der Expression nach Behandlung durch den Direktverdau der Proteinproben 8 h mittels <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O Methode geprüft. Hierzu wurden die Proteinidentifikationen in Scaffold nach Peptiden mit <sup>18</sup>O untersucht und mit den <sup>16</sup>O Kontrollen quantitativ verglichen und das Verhältnis gebildet (abundance ratio). Parallel wurde ein Replikat mit entgegengesetzten Sauerstoffisotopen durchgeführt.

## 5 Ergebnisse Multiplex PCR-Analyse

Zur Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten Patientenisolat und des Referenzstammes *S. aureus* COL wurde mittels Multiplex PCR-Analyse ein genetisches Profil verschiedener Virulenzfaktoren erstellt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 23 aufgelistet. Mit dem Nachweis der Gene für die *S. aureus*-spezifischen Gyrase, thermostabile Nuklease und die 16S rRNA konnten alle Isolate als Individuum der Familie *Staphylococcus aureus* identifiziert werden [71, 96]. Alle vier getesteten Isolate wurden zudem der agr (accessory gene regulator) Gruppe 1 zugeordnet. Beide Isolate von Patient B und Laborisolat COL wurden positiv auf die Pathogenitätsfaktoren Superantigen-Enterotoxine (SE): seb, sek und seq getestet. In der Probe von Patient A konnten sed, sej und ser amplifiziert werden.

**Tabelle 23: PCR-Analyse der Patientenisolat und des Referenzstammes COL**

Dargestellt sind die Ergebnisse der Multiplex PCR-Analyse von den 3 Patientenisolaten (A1, B1a, B1b) und dem Laborstamm COL. In der Auflistung sind nur die positiv getesteten Gene dargestellt. Mpx: Multiplex, agr: accessory gene regulator, seb, sed, sej, sek, seq, ser: Superantigen-Enterotoxine mit Bezeichnung, nuc: thermostable nuclease, mecA: methicillin-resistance, gyr: gyrase

Proben	Agr	Mpx I	Mpx II	Mpx III	Mpx IV	Mpx V	Single PCR
<b>A1</b>	1	16srRNA	sed, nuc	----	sej	ser	16srRNA, gyr
<b>B1a</b>	1	16srRNA	nuc, sek	seb	seq	----	16srRNA, gyr
<b>B1b</b>	1	16srRNA	nuc, sek	seb	seq	----	16srRNA, gyr
<b>COL</b>	1	16srRNA	nuc, sek	seb	seq	----	16srRNA, gyr, mecA

Für das Laborisolat COL konnte das Methicillinresistenz-assoziierte Gen *mecA* nachgewiesen werden. Bei Auftreten weiterer genetischer Faktoren besteht die Möglichkeit einer Resistenz gegen Penicilline, wie z.B. Methicillin [101]. Phänotypisch zeigt der Stamm keine Resistenz<sup>1</sup>. Das Patientenisolat A1 konnte mit der Kombination sed, j, r und die Patientenisolat B1a und B1b und der Referenzstamm COL konnten mit der Kombination seb, k, q, alle dem clonal cluster CC8 zugeordnet werden [70].

<sup>1</sup> Information des Institutes für Immunologie der Universitätsmedizin Greifswald

## 6 Ergebnisse BNO 101

### 6.1 Kultivierung

#### 6.1.1 Dosisbestimmung

Um eine geeignete Konzentration von BNO 101 für die Wachstumskurven zu finden, wurden mehrere Ausplattierungsexperimente mit verschiedenen Konzentrationen des Medikamentes durchgeführt (s. Seite 33). Erste Versuche bei niedrigen Dosierungen zeigten keine eindeutigen Unterschiede zwischen Behandlung und Kontrollen (Daten nicht gezeigt). Für Konzentrationen ab 1,25% konnte eine Verringerung der CFUs im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden (Abbildung 6).

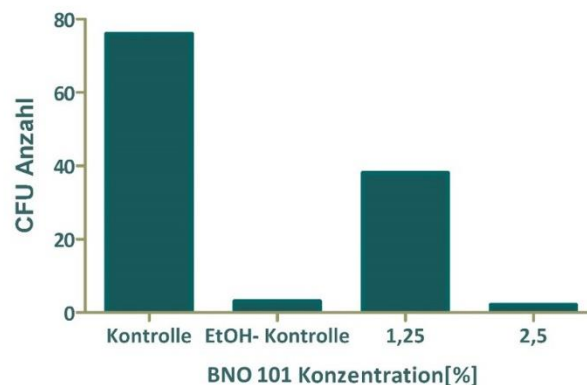


Abbildung 6: Dosisbestimmung BNO 101

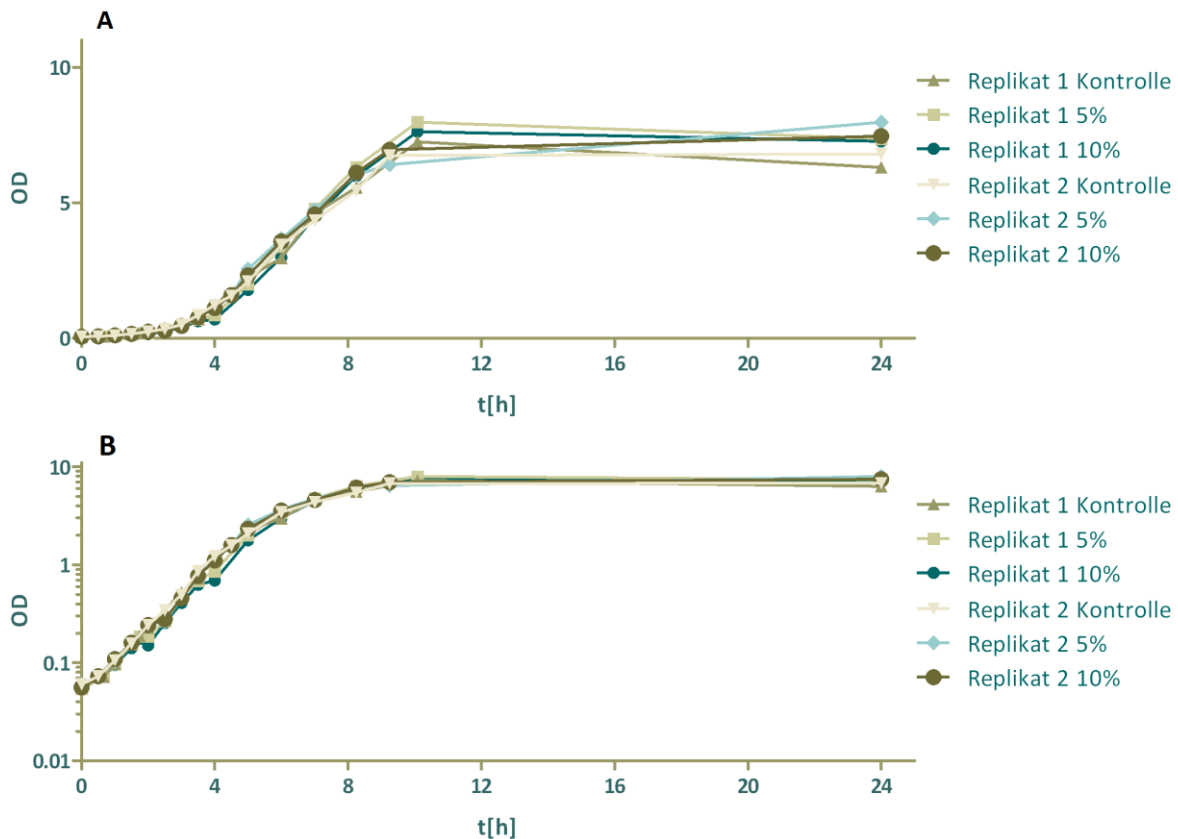
CFU, colony forming units; Die Abbildung zeigt die CFUs zweier verschiedener BNO 101 Konzentrationen (1,25%; 2,5%) und der Kontrollen bei der OD= 0,5. Zur Ermittlung der Einzelwerte wurde, wie in Material und Methoden auf Seite 33 beschrieben verdünnt. EtOH- Kontrolle= 0,475% EtOH, entspricht der Menge an EtOH in der BNO 101 Konzentration 2,5%. 1,25% und 2,5% BNO 101 zeigen im Vergleich zur Kontrolle weniger CFUs. Die EtOH-Kontrolle zeigt ebenfalls eine geringere CFU Menge.

Die parallele Kontrolle mit dem Lösungsmittel Ethanol zeigte deutliche bakteriostatische Effekte (Menge äquivalent zu der Konzentration enthalten in BNO 101 2,5%). Diese Effekte sind vergleichbar mit denen der BNO 101 Konzentration 2,5%.

#### 6.1.2 Wachstumskurven

Nach Festlegung der Konzentrationen von 5 und 10% des BNO 101 Lyophilisats wurde die OD der Kulturen über den Zeitraum von 24 Stunden gemessen und Wachstumskurven erstellt. Abbildung 7 A) zeigt den Vergleich der behandelten Gruppen mit den Kontrollen. Die Wachstumskurven verlaufen ähnlich. Testungen mit den Patientenisolaten zeigen ebenfalls ähnliche Kurvenverläufe (Bspw. Patientenisolat B1a, Abbildung 8).

Verglichen mit den Ergebnissen der Wachstumskurven der Patientenisolate, lassen sich Aussagen über das Wachstum der Bakterien im Vergleich zur Kontrolle machen. In der exponentiellen Wachstumsphase zeigen alle Graphen einen ähnlichen Verlauf, wie in B) beider Abbildungen dargestellt. Insgesamt zeigt sich in beiden Experimenten ein nahezu gleicher Kurvenverlauf. Somit hat BNO 101 in den hier untersuchten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *S. aureus*.



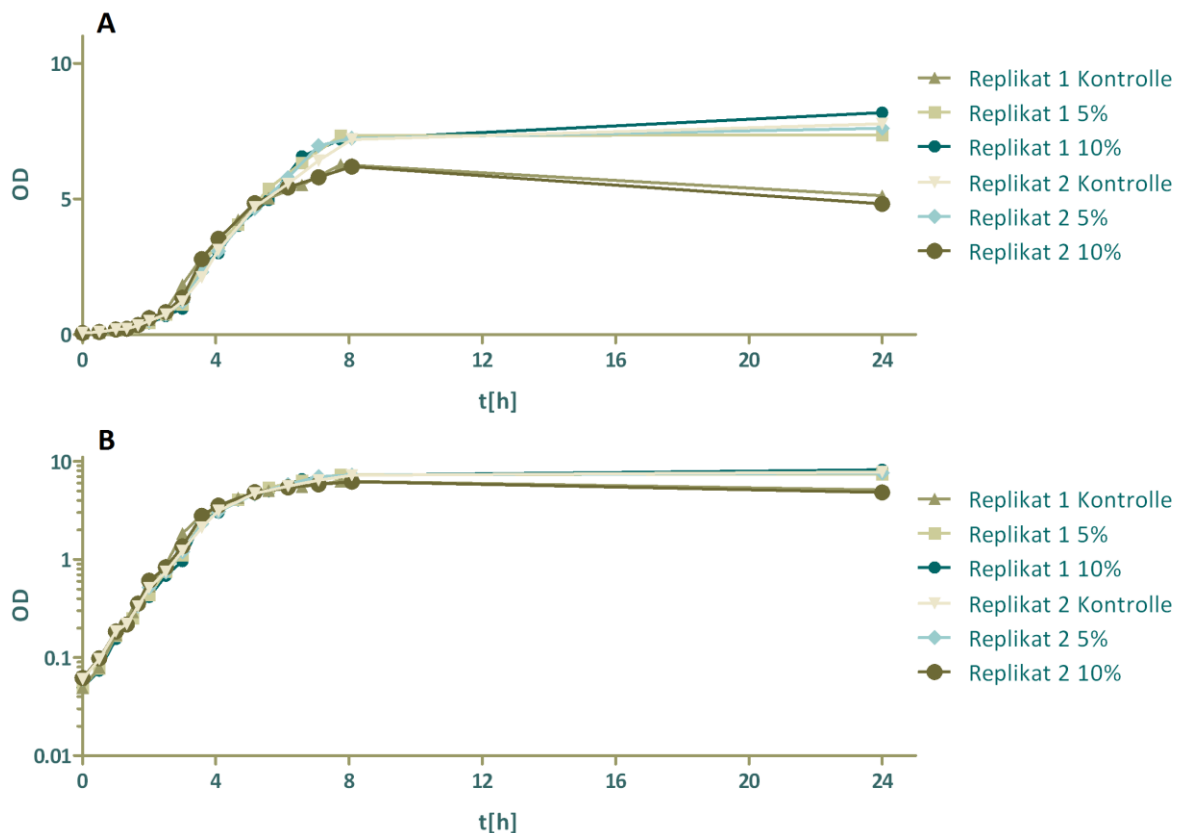
**Abbildung 7: Wachstumskurven COL mit BNO 101**

OD, Optische Dichte, **A)** Das Diagramm zeigt die OD von Laborstamm *S. aureus* COL in Abhängigkeit von der Zeit t[h]. In zwei Durchgängen wurden Kulturen mit 5%- und 10%- iger Konzentration BNO 101 gemeinsam mit der unbehandelten Kontrollgruppe gemessen. Das Medikament wurde bei OD 0,2 hinzugegeben. **B)** entspricht der Darstellung von A) mit logarithmischer Skalierung der OD auf der y- Achse.

In einzelnen Fällen, liegt die OD einzelner Kulturen 24 h nach Behandlung niedriger als bei den anderen Kurven aus dem gleichen Versuch. Dieser Effekt tritt unabhängig von der Medikamentengabe auf. Er konnte bei 10% BNO 101 und in der Kontrolle ebenfalls nachgewiesen werden (Vergleich A) Abbildung 8).

## Ergebnisse BNO 101

Keiner der Kurvenverläufe zeigt einen Einfluss von BNO 101 auf die bakteriellen Wachstumskurven, sodass in den hier durchgeführten Experimenten keine antibakteriellen Effekte gezeigt werden konnten.



**Abbildung 8: Wachstumskurve B1a mit BNO 101**

OD, Optische Dichte, **A)** Das Diagramm zeigt die OD vom *S. aureus* Patientenisolat B1a in Abhängigkeit von der Zeit  $t$ [h]. In zwei Durchgängen wurden Kulturen mit 5%- und 10%- iger Konzentration BNO 101 gemeinsam mit der unbehandelten Kontrollgruppe gemessen. Das Medikament wurde bei OD 0,2 hinzugegeben. **B)** entspricht der Darstellung von A) mit logarithmischer Skalierung der OD auf der y- Achse.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus den Experimenten zur Dosisbestimmung und der Literatur wurden zur Bestimmung der Lebendzellzahlen im Anschluss Ausplattierungsexperimente mit Zählung der CFUs durchgeführt. Die Messung wurde zum Zeitpunkt des Erreichens der OD=0,5 durchgeführt, weil zu diesem Zeitpunkt das Wachstum in allen Wachstumskurven linear verläuft. Somit war eine Bestimmung von eventuellen Unterschieden bezüglich der Lebendzellzahlen möglich.

## 6.1.3 CFU-Bestimmung und Überlebensraten

### 6.1.3.1 Bestimmung bei OD=0,5

Die ersten Experimente zur Bestimmung der CFUs unter Behandlung mit BNO 101 wurden zum Zeitpunkt des Erreichens der OD=0,5 durchgeführt.

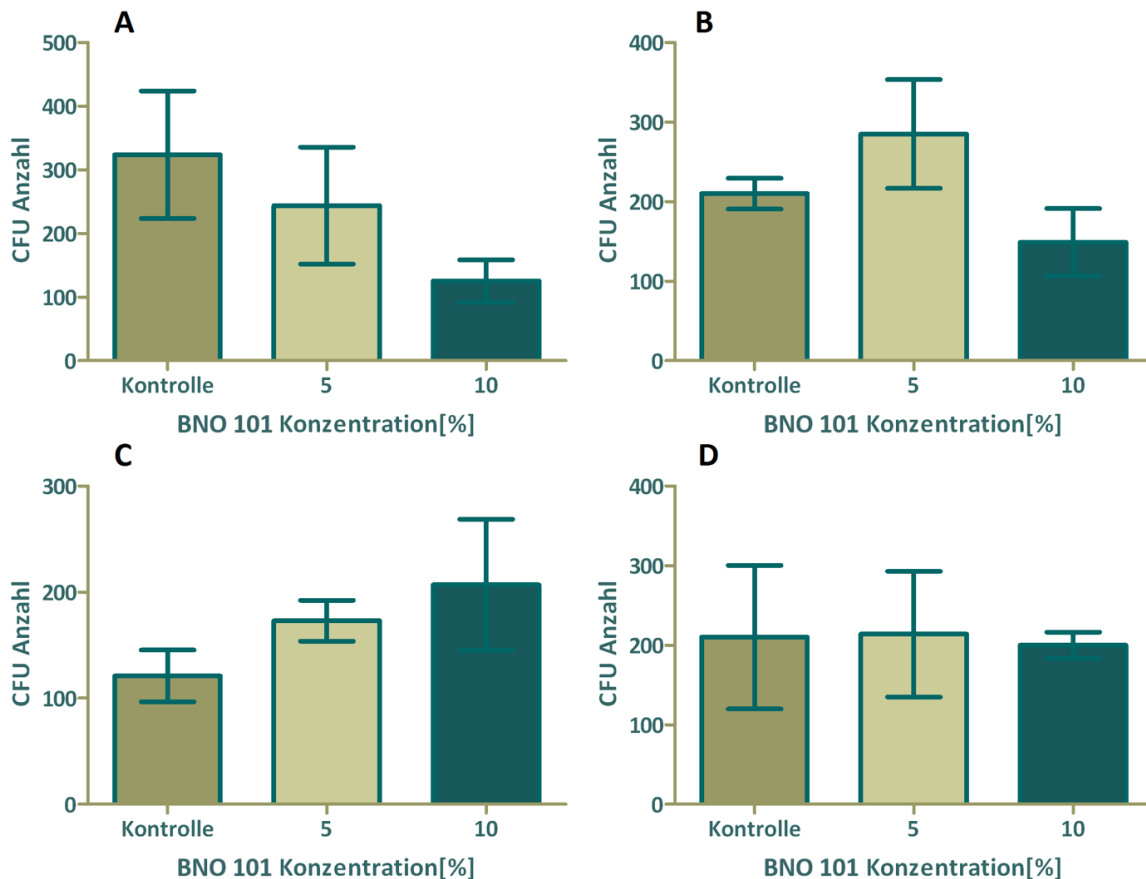


Abbildung 9: CFU-Bestimmung bei OD=0,5 mit BNO 101

CFU, colony forming unit; Die Abbildung zeigt die CFUs und deren Standardabweichung aus drei technischen Replikaten bei OD= 0,5 nach Anwendung der BNO 101 Konzentrationen 5% und 10% auf alle verwendeten Kulturen **A)** Referenzstamm COL, und Patientenisolat **B)** A1, **C)** B1a, **D)** B1b. Die Ergebnisse für die einzelnen Isolate sind z.T. sehr unterschiedlich und aufgrund der hohen Standardabweichungen sind keine verlässlichen Aussagen möglich.

Für *S. aureus* COL und die Patientenisolate konnten z.T. unterschiedliche Effekte von BNO 101 gezeigt werden (Abbildung 9 A) bis D)). In B) und D) zeigen sich nahezu gleiche Mengen an Lebendzellen und somit kein medikamenteninduzierter Effekt. Aufgrund der hohen Standardabweichungen können mit Hilfe dieser Ergebnisse keine verlässlichen Aussagen getroffen werden.

### 6.1.3.2 Bestimmung in Abhängigkeit von der Zeit $t[h]$ nach Behandlung

Für Darstellung nach Bestimmung der CFUs nach Zeit wurde jeweils die Kontrolle als 100% gesetzt. Somit sind die Angaben für die CFUs der behandelten Proben Überlebensraten im Vergleich zur Kontrolle. In Abbildung 10 A) liegen die Überlebensraten für den Referenzstamm *S. aureus* COL zunächst 1 h nach Behandlung unterhalb von 50% und nach 4 h unterhalb von 75%. Beim Patientenisolat A1 in B) liegen sie zu beiden Zeitpunkten ebenfalls unterhalb von 50%, zu den späteren Zeitpunkten insbesondere bei B) nicht. Außerdem fällt für B1a in C) die nach 1 h bei ca. 180% liegende Überlebensrate auf, was mehr CFUs in der behandelten als in der Kontrollgruppe bedeutet. Auch in D) für das Isolat B1b wachsen die CFUs der behandelten Kulturen über die der Kontrollen. Dies ist durch Überlebensraten über 100% nach 4 h und 8 h gezeigt.

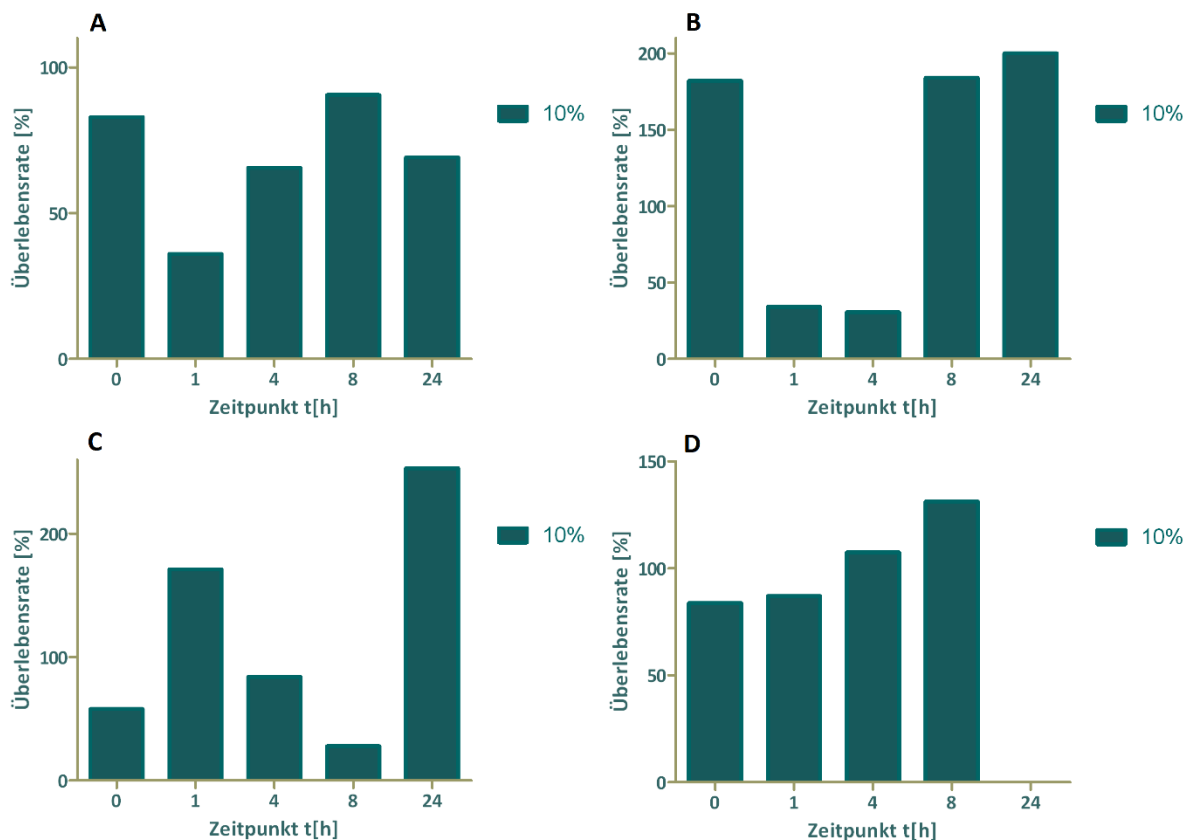


Abbildung 10: CFU-Bestimmung nach Zeit mit BNO 101

Die Abbildung zeigt die durchschnittlichen prozentualen Überlebensraten aller Patientenisolats und COL als Quotient aus CFU der jeweiligen Kultur und der unbehandelten Kontrolle (100%) zu den Messzeitpunkten  $t[h]=0$  vor der Behandlung und  $t[h]=1, 4, 8, 24$  nach Behandlung mit BNO 101 10%. A) COL, B) A1, C) B1a, D) B1b. Häufig lagen die CFUs vor Behandlung schon unterhalb der Kontrollen. Auch unter Berücksichtigung dieser Abweichung lässt sich kein eindeutiger Effekt ermitteln.

Insgesamt lässt sich über Replikate und Vergleich der Kulturen kein signifikanter und konstanter Effekt weder in wachstumsfördernder, noch wachstumshemmender Richtung erkennen.

## 7 Ergebnisse Myrtol standardisiert

### 7.1 Kultivierung

#### 7.1.1 Dosisbestimmung

Zur Bestimmung der CFUs wurden verschiedene Verdünnungsstufen ausplattiert und analysiert. Gesucht wurde eine Dosis, bei der weniger als 50% der CFUs im Vergleich zur Kontrolle messbar und somit eine klare bakteriostatische Wirkung nachweisbar ist.

Zum Zeitpunkt  $t=0$  weichen die CFUs der parallelen Proben gering von der Kontrolle ab (Abbildung 42 im Anhang S. 146). Dies lässt sich auf die vergleichsweise geringe Verdünnung und somit hohe Anzahl an zählbaren CFUs zurückführen. Da die gleichen ODs bei der Inokulation erzielt worden sind, wird von einem vergleichbaren Wachstum der Zellen ausgegangen.

Es wurden folgende Myrtol stand. Konzentrationen untersucht: 0,31; 0,625; 1,25; 2,5 und 5%. In Abbildung 11 sind die Quotienten aus behandelten und unbehandelten Proben der

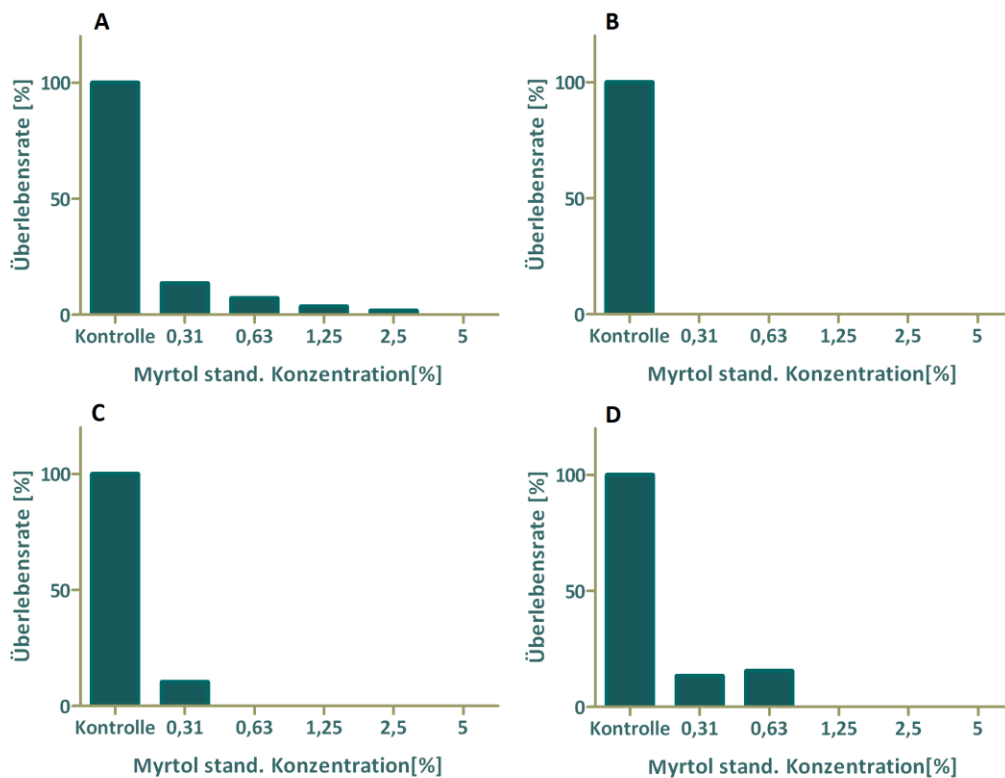


Abbildung 11: Überlebensraten Dosisbestimmung Myrtol stand.

Die Abbildung zeigt die durchschnittlichen prozentualen Überlebensraten des Patientenisolates B1a als Quotient aus CFU der jeweiligen Kultur und der korrespondierenden Kontrolle (100%) zu jeweiligen Messzeitpunkten **A**)  $t[h]=1$ ; **B**)  $t[h]=4$ ; **C**)  $t[h]=8$ ; **D**)  $t[h]=24$  nach Behandlung mit Myrtol stand. in verschiedenen Konzentrationen[%]. Zugabe von Myrtol stand. bei OD 0,2. Nach Gabe von Myrtol stand. zeigen sich in allen untersuchten Proben stark herabgesetzte Überlebensraten. In **A**) zeigt sich eine Dosisabhängigkeit der Überlebensraten 1 h nach Behandlung. Während 4 h nach Behandlung keine CFUs gemessen werden konnten, wurden nach 8 h und 24 h erneut Kolonien gezählt (Abb. **B-D**).



## Ergebnisse Myrtol standardisiert

verwendeten Konzentration zu den Zeitpunkten  $t[h]= 1, 4, 8$  und  $24$  nach Behandlung dargestellt.

Bereits eine Stunde nach Behandlung zeigt die geringste Endkonzentration von  $0,3125\%$  Überlebensraten von unter  $14\%$  (Abbildung 11, A)). Hier zeigt sich ebenfalls eine Dosisabhängigkeit mit Halbierungen der Überlebensraten bei Verdoppelung der Konzentrationen bis hin zu keinen zählbaren CFUs bei einer Myrtol stand. Konzentration von  $5\%$ .

Vier Stunden nach Behandlung (B)) zeigt sich, dass unter Myrtol stand. auf den Agarplatten der behandelten Kulturen bei keiner Konzentration CFUs gezählt werden konnten und somit die Überlebensraten bei  $0\%$  liegen. Nach  $8\text{ h}$  (C)) treten bei  $0,31\%$  und nach  $24\text{ h}$  auch bei  $0,625\%$  wieder Kolonien auf (D)) und die Überlebensraten liegen im Bereich unter  $20\%$ .

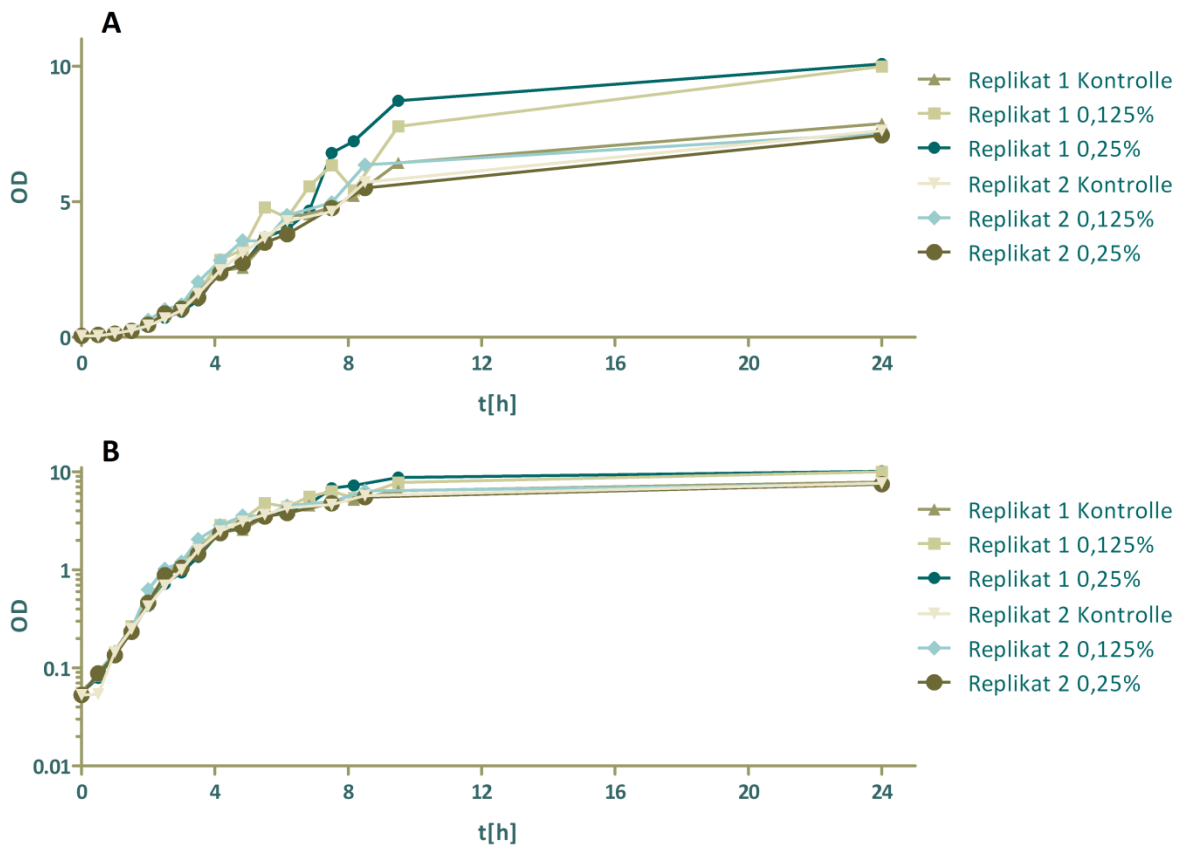
Bei einer Konzentration von  $0,31\%$  zeigt sich eine deutliche bakterizide Wirkung. Um vergleichbare CFU Werte messen zu können, wurden die Konzentrationen  $0,25\%$  und  $0,125\%$  für die weiteren Experimente ausgewählt.

### **7.1.2 Wachstumskurven**

Nach Ermittlung der geeigneten Konzentrationen wurde die OD der Kulturen über den Zeitverlauf gemessen und Wachstumskurven erstellt. In Vorexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass durch Hinzugeben des Tensids und Myrtol stand. die OD sich nicht maßgeblich verändert. Die entsprechenden Daten sind in Tabelle 43 im Anhang auf Seite 146 dargestellt. Außerdem wurde eine bakteriostatische Wirkung des Tensids ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

Zu allen Patientenisolaten und dem Laborstamm COL wurden in Replikaten sehr ähnliche Kurvenverläufe von behandelten Gruppen und Kontrollen ermittelt. Die Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Messungen am Laborstamm COL.

Angeimpft bei einer OD von 0,05 wachsen die Kulturen etwa 90 min bis sie die OD von 0,2 erreicht haben und mit Myrtol stand. behandelt worden sind.



**Abbildung 12: Wachstumskurven COL mit Myrtol stand.**

OD, Optische Dichte, **A)** Das Diagramm zeigt die OD vom Referenzstamm COL in Abhängigkeit von der Zeit t[h]. In zwei Replikaten wurden unbehandelte Kontrollen mit 0,25 -und 0,125% Myrtol stand. verglichen. Therapiebeginn bei OD 0,2. Im zweiten Durchgang (Replikat 2) wurde zusätzlich ein Tensid verwendet. **B)** entspricht der Darstellung von A) mit logarithmischer Skalierung der OD auf der y- Achse.

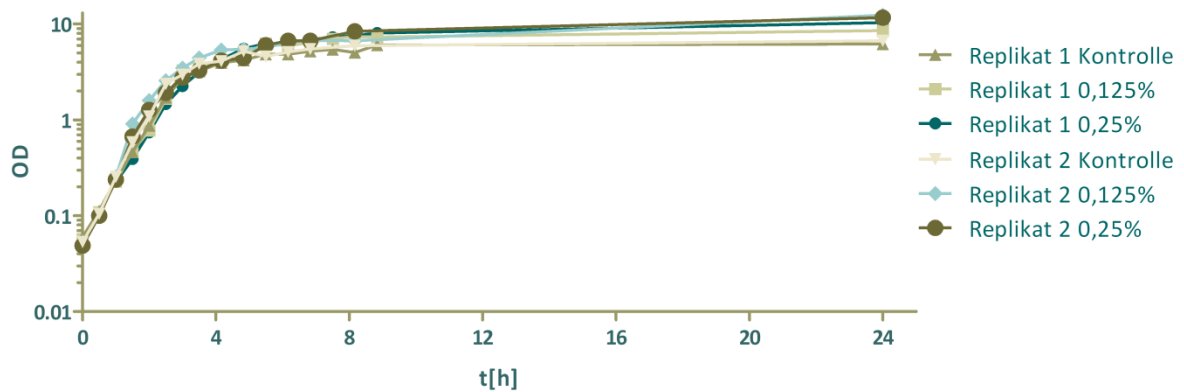
Abbildung 12 A) zeigt bis 4 h nach Behandlung bei allen Replikaten einen exponentiellen Kurvenverlauf. Dieser ist in der logarithmischen Darstellung B) als linearer Anstieg des Graphen dargestellt. In Abbildung 12 A) verlaufen die Kurven nach 4 h gleich. Nach 8 h und 24 h konnten für die Konzentrationen 0,125% und 0,25% Myrtol stand. erhöhte ODs gemessen werden. In der logarithmischen Darstellung von Abbildung 12 B) ist kein Unterschied erkennbar.

Nach 5-6 h zeigt der Kurvenverlauf in A) den Übergang in die stationäre Phase. Im Bereich nach 8 h entspricht der Kurvenverlauf einer stationären Phase.

Sehr ähnliche Ergebnisse konnten in den Experimenten mit Patientenisolaten ermittelt werden. Als exemplarisches Beispiel dient hierfür B1a in der Abbildung 13 auf Seite 59. Der Anstieg in der exponentiellen Phase (log. Y-Achse) fällt hier größer aus und konnte so bei allen

## Ergebnisse Myrtol standardisiert

Patientenisolaten beobachtet werden. Trotzdem lässt sich ein vergleichbares Wachstum erkennen und die beiden oben beschriebenen Phasen sind auch in gleichem Maße ausgeprägt.



**Abbildung 13: Wachstumskurven B1a mit Myrtol stand.**

OD, Optische Dichte, Das Diagramm zeigt die OD mit logarithmischer Skalierung von B1a in Abhängigkeit von der Zeit t[h]. In zwei Replikaten wurden unbehandelte Kontrollen mit 0,25%-und 0,125% Myrtol stand. verglichen. Therapiebeginn bei OD 0,2. Im zweiten Durchgang (Replik 2) wurde zusätzlich ein Tensid verwendet.

Die unbehandelten Kontrollen weisen zum letzten Messpunkt nach 24 h eine geringere OD auf als die behandelten Gruppen. Eine Dosisabhängigkeit konnte bei dieser höheren OD nicht festgestellt werden. Keiner der Kurvenverläufe in den Wachstumsexperimenten weist auf eine bakteriostatische oder bakterizide Wirkung hin. Die Kurvenverläufe unter Behandlung und in den Kontrollen entsprechen normalem Bakterienwachstum und unterscheiden sich nur in den Endpunkten. Zur Absicherung dieser Ergebnisse wurden vergleichend die Lebendzellzahlen in Plattierungsexperimenten bestimmt.

### 7.1.3 CFU-Bestimmung und Überlebensraten

Als 100% wurden zum jeweiligen Zeitpunkt die CFUs der Kontrolle gesetzt und so die Überlebensraten der behandelten Proben berechnet.

### 7.1.3.1 Einzelexperiment B1a

Grundlage der Berechnung der Überlebensraten waren die CFUs aus den Einzelexperimenten. Abbildung 14 zeigt, wie die CFU Werte unter Behandlung mit Myrtol stand. zu allen Zeitpunkten geringer sind als die der unbehandelten Kontrolle. Es lässt sich weiterhin bis nach 4 Stunden eine Dosisabhängigkeit erkennen.

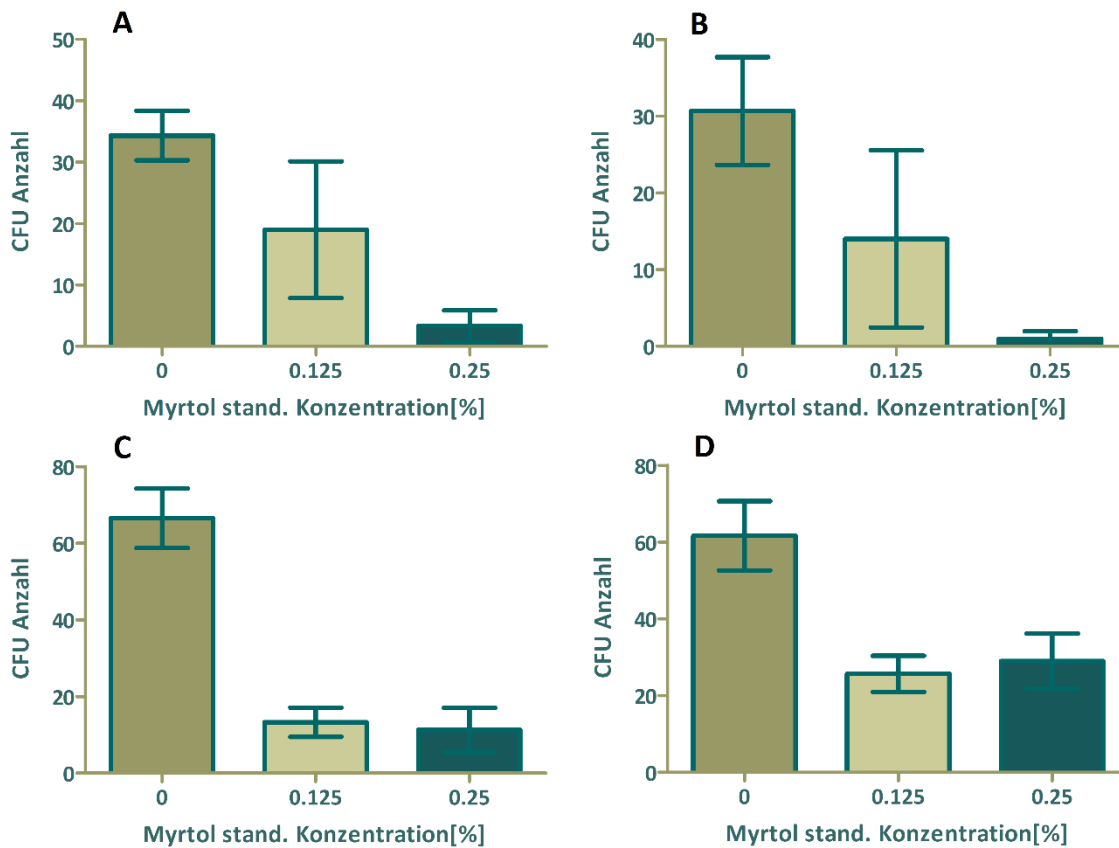


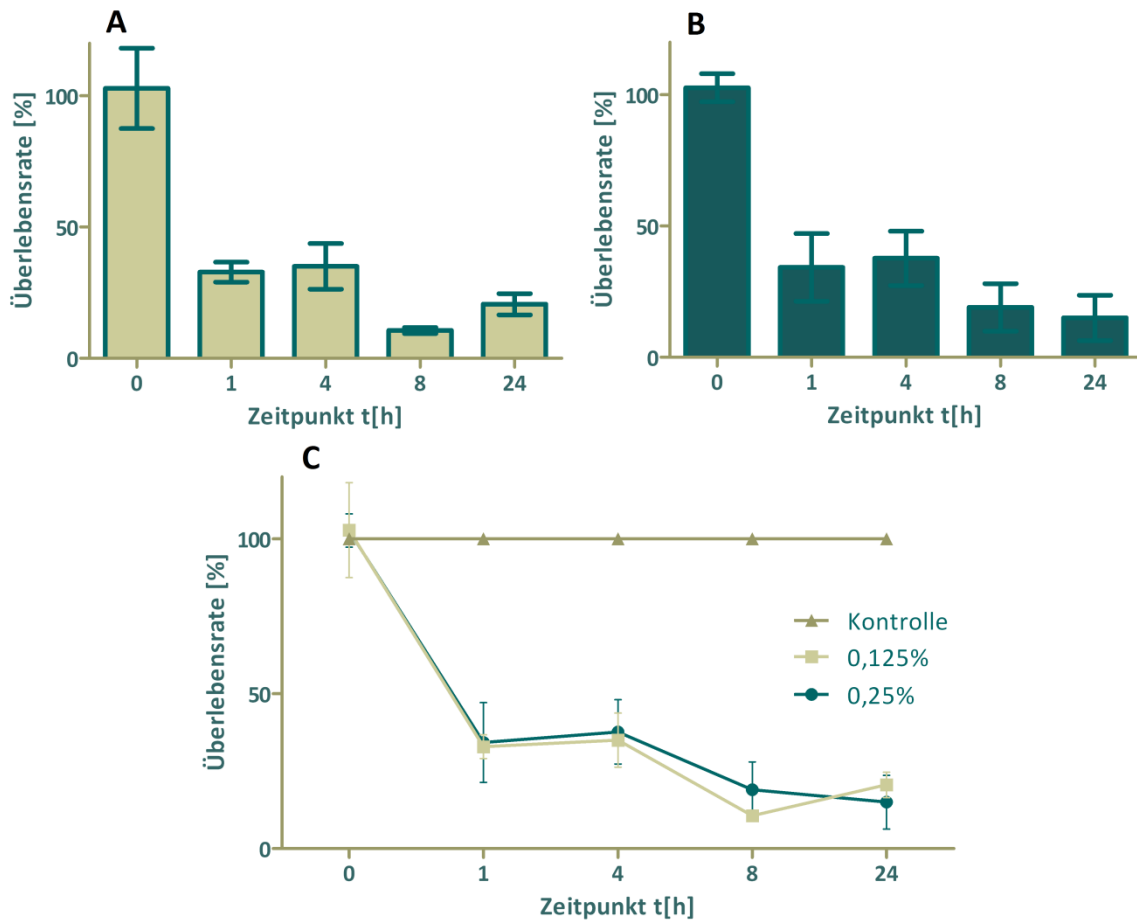
Abbildung 14: CFU Auswertung Einzelexperiment B1a mit Myrtol stand.

CFU, colony forming unit; In der Abbildung sind die CFU Anzahl und deren Standardabweichung bei Anwendung der Myrtol stand. Konzentrationen 0,25% und 0,125% auf das Isolat B1a dargestellt. **A): 1 h, B) 4 h, C) 8 h, D) 24 h** nach Behandlung. Therapiebeginn bei OD 0,2. Beide Konzentrationen von Myrtol stand. zeigen in über den gesamten Zeitraum von 24 h nach Behandlung verminderte CFUs (<50%) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach 1 h und 4 h ist eine Dosisabhängigkeit zu erkennen.

Die Einzelexperimente des Referenzstammes *S. aureus* COL und der anderen Patientenisolate (A1 und B1b) befinden sich im Anhang.

### 7.1.3.2 Überlebensraten COL

Für den Laborstamm *S. aureus* COL konnten die in Abbildung 15 gezeigten Überlebensraten unter Behandlung mit Myrtol stand. ermittelt werden. A) und B) zeigen eine wachstumshemmende Wirkung auf *S. aureus* COL. In den behandelten Proben konnten weniger als 45%, der in der Kontrolle gezählten CFUs ermittelt werden. Ein dosisabhängiger Unterschied in der Hemmung lässt sich hier nicht erkennen und wird im direkten Vergleich C) nicht deutlich.



**Abbildung 15: COL Überlebensraten mit Myrtol stand.**

Dargestellt sind die durchschnittlichen prozentualen Überlebensraten von *S. aureus* COL und deren Standardabweichung unter A) 0,125%iger und B) 0,25%iger Myrtol stand. Konzentration in Abhängigkeit vom Zeitpunkt  $t[h]=\{0,1,4,8,24\}$ . Therapiebeginn bei OD 0,2. Die dargestellten Werte sind arithmetische Mittel von zwei biologischen Replikaten. In C) sind die Daten aus A) und B) im direkten Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Unter Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen sinken die Überlebensraten im gesamten Zeitraum auf unter 45%.

### 7.1.3.3 Überlebensraten A1

Für das Patientenisolat *S.aureus* A1 konnte eine wachstumshemmende Wirkung auf die Proben durch Myrtol stand. in Abbildung 16 A) und B) gezeigt werden. Weniger als 50% der Zellzahl in der Kontrolle konnten ermittelt werden. Im direkten Vergleich C) zeichnet sich eine Dosisabhängigkeit nach 1 h und 4 h ab. Dieser Effekt ist nach 8 h in der stationären Wachstumsphase nicht nachweisbar.

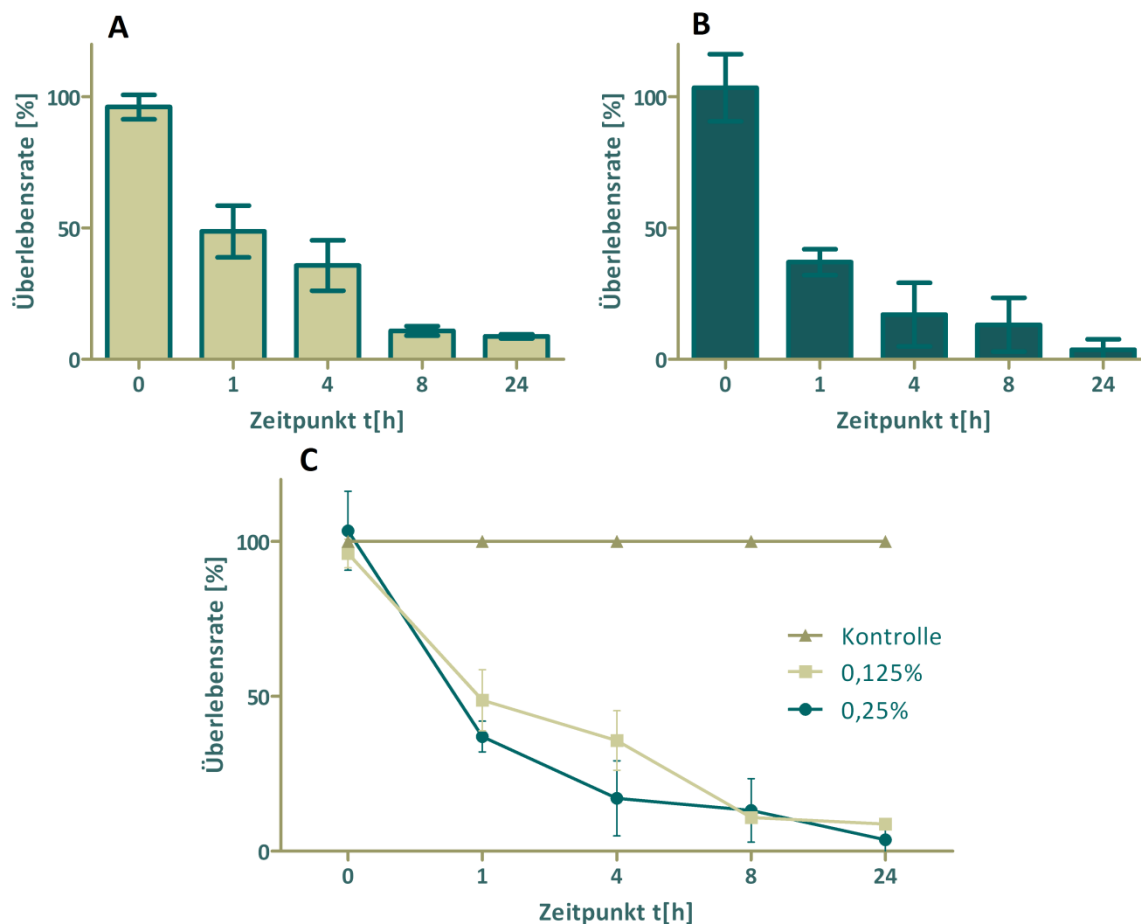
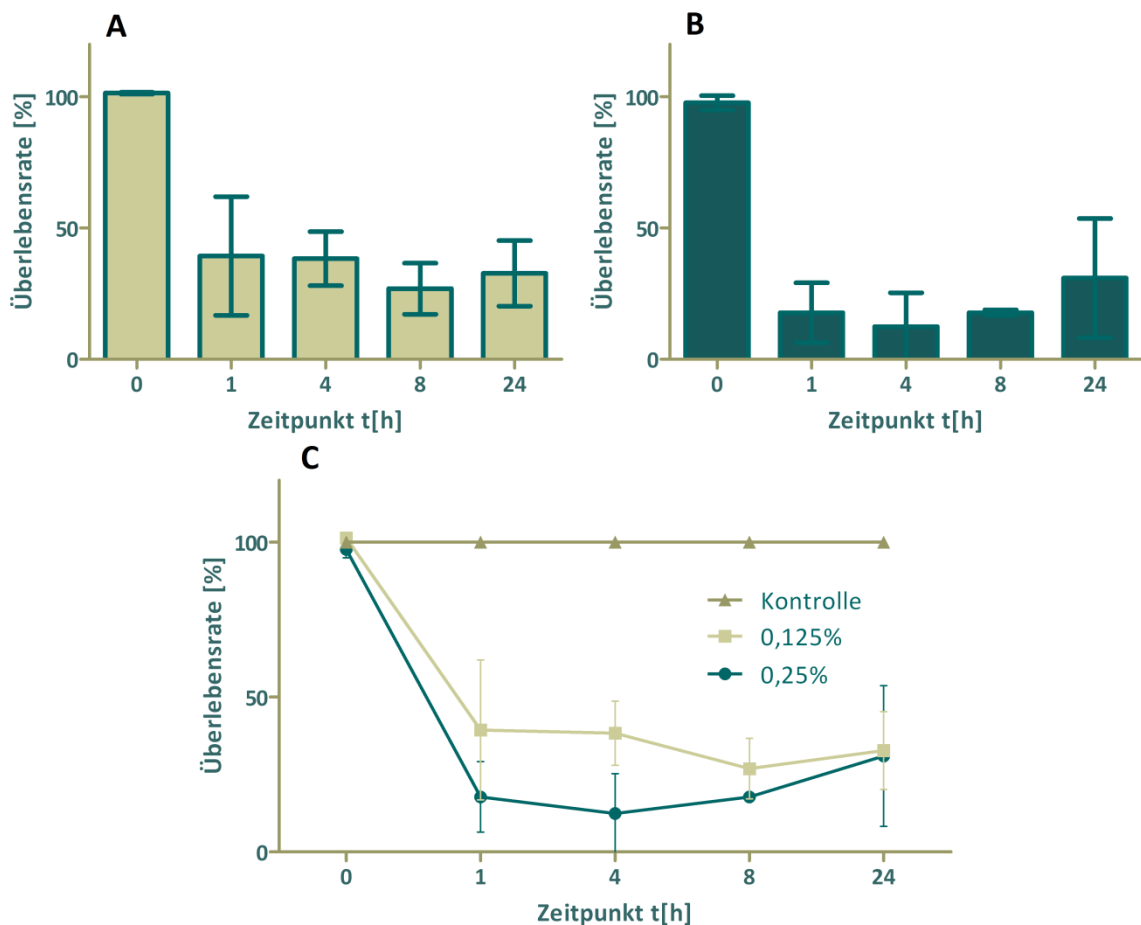


Abbildung 16: A1 Überlebensraten mit Myrtol stand.

Dargestellt sind die durchschnittlichen prozentualen Überlebensraten von *S. aureus* A1 und deren Standardabweichung unter A) 0,125%iger und B) 0,25%iger Myrtol stand. Konzentration in Abhängigkeit vom Zeitpunkt t[h]={0,1,4,8,24}. Therapiebeginn bei OD 0,2. Die dargestellten Werte sind arithmetische Mittel von zwei biologischen Replikaten. In C) sind die Daten aus A) und B) im direkten Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Unter Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen sinken die Überlebensraten im gesamten Zeitraum auf unter 50%.

### 7.1.3.4 Überlebensraten B1a

Parallel wurde das Patientenisolat *S. aureus* B1a untersucht und eine wachstumshemmende Wirkung auf die Kultur unter Myrtol stand. Behandlung. Abbildung 17 A) und B) zeigen den Effekt mit Überlebensraten unter 50%. Eine Dosisabhängigkeit zeichnet sich im direkten Vergleich nach 1 h, 4 h und 8 h ab, siehe C). So ist unter Berücksichtigung der Wachstumskinetiken, die nach 8 h bereits eine stationären Phase zeigen, von relevanten konzentrationsabhängigen Unterschieden der Hemmung in diesem Experiment, nur im Bereich bis 4 h nach Behandlung auszugehen.

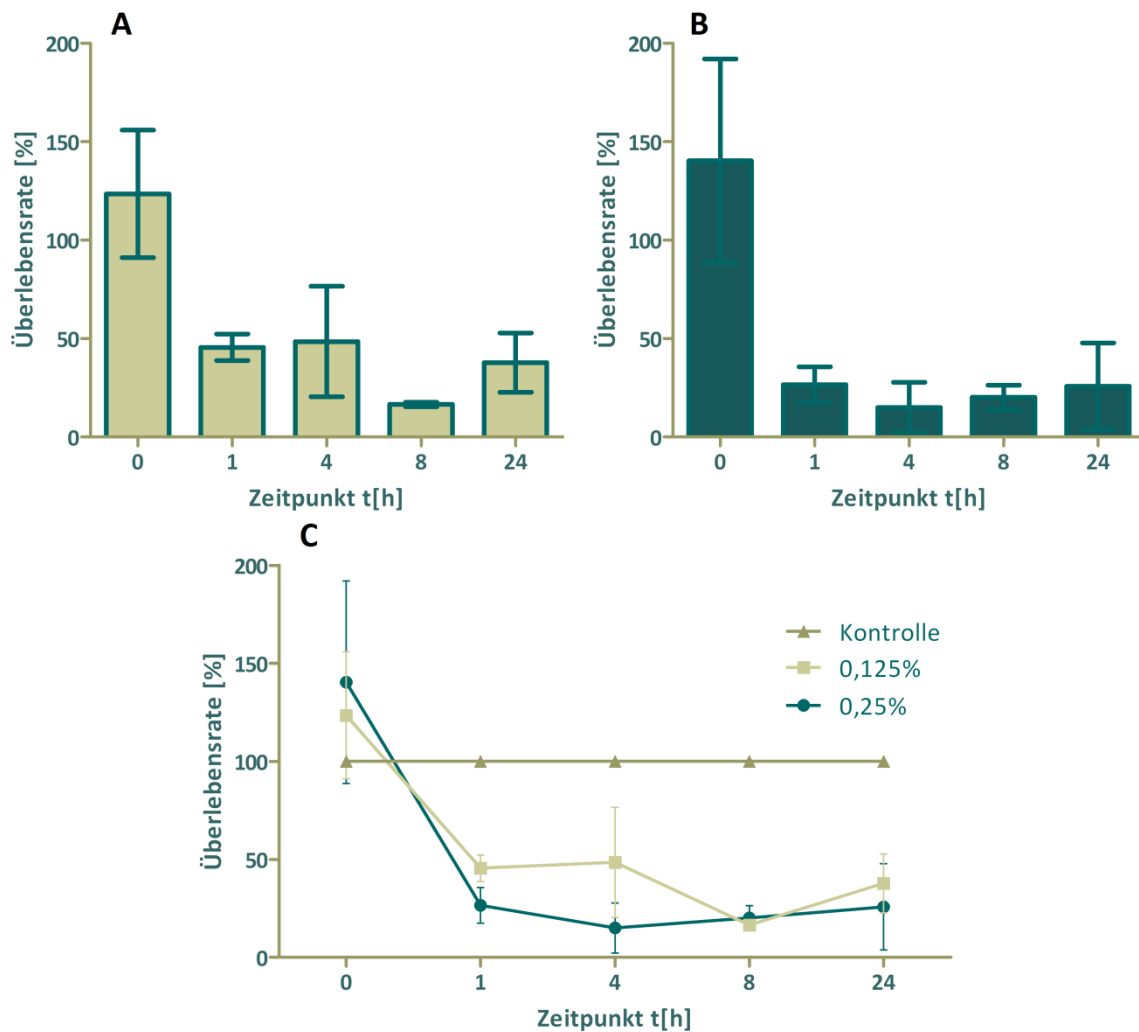


**Abbildung 17: B1a Überlebensrate mit Myrtol stand.**

Dargestellt sind die durchschnittlichen prozentualen Überlebensraten von *S. aureus* B1a und deren Standardabweichung unter **A**) 0,125%iger und **B**) 0,25%iger Myrtol stand. Konzentration in Abhängigkeit vom Zeitpunkt  $t[h]=\{0,1,4,8,24\}$ . Therapiebeginn bei OD 0,2. Die dargestellten Werte sind arithmetische Mittel von zwei biologischen Replikaten. In **C**) sind die Daten aus A) und B) im direkten Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Unter Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen sinken die Überlebensraten im gesamten Zeitraum auf unter 50%.

### 7.1.3.5 Überlebensraten B1b

Für das Patientenisolat *S.aureus* B1b konnten die in Abbildung 18 gezeigten Überlebensraten unter Behandlung mit Myrtol stand. ermittelt werden. A) und B) zeigen die wachstumshemmende Wirkungen auf die Proben. Es konnten weniger als 55%, der in der Kontrolle gezählten CFUs ermittelt werden. In der Übersicht C) zeichnet sich eine Dosisabhängigkeit nach 1 h und 4 h ab.



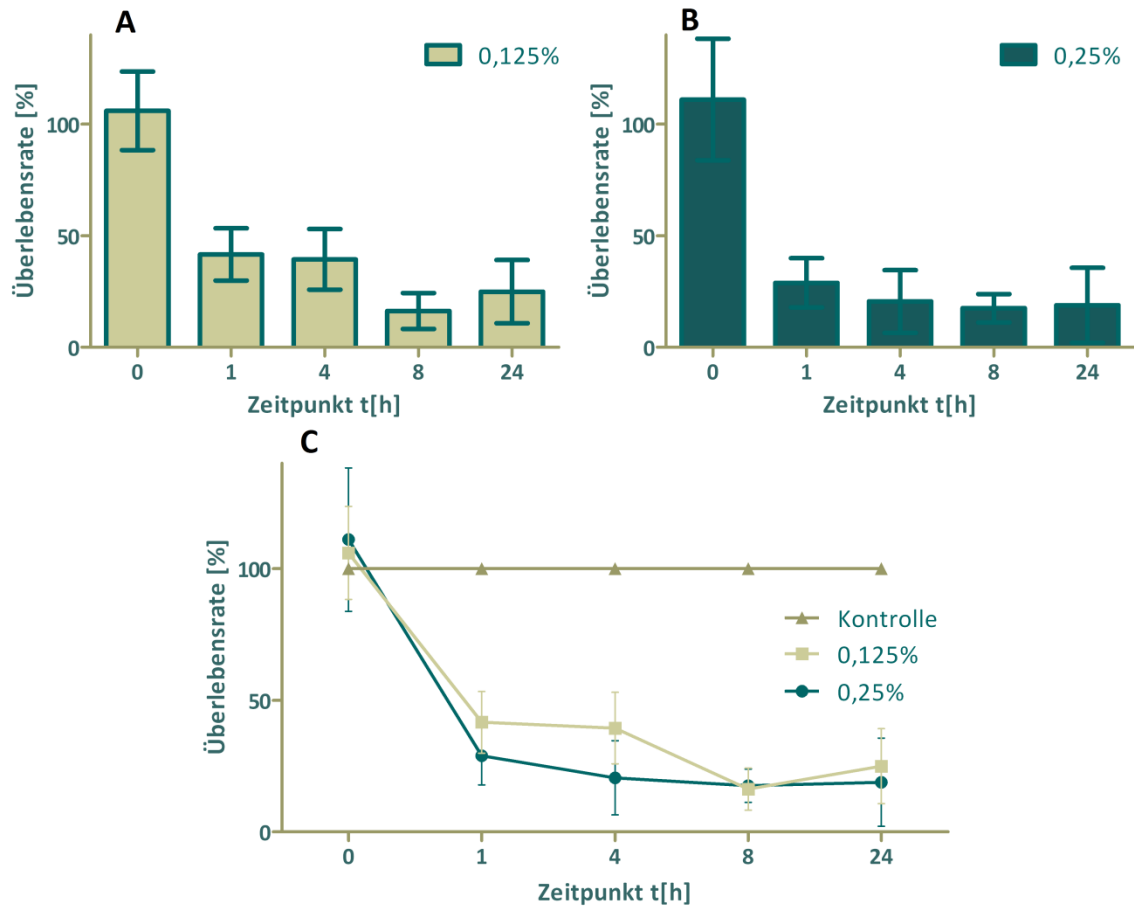
**Abbildung 18: B1b Überlebensraten mit Myrtol stand.**

Dargestellt sind die durchschnittlichen prozentualen Überlebensraten von *S. aureus* B1b und deren Standardabweichung unter **A)** 0,125%iger und **B)** 0,25%iger Myrtol stand. Konzentration in Abhängigkeit vom Zeitpunkt  $t[h]=\{0,1,4,8,24\}$ . Therapiebeginn bei OD 0,2. Die dargestellten Werte sind arithmetische Mittel von zwei biologischen Replikaten. In **C)** sind die Daten aus A) und B) im direkten Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Unter Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen sinken die Überlebensraten im gesamten Zeitraum auf unter 55%.



### 7.1.3.6 Überlebensraten *Staphylococcus aureus*

Die untersuchten Patientenisolat und der Referenzstamm sind unterschiedliche Genotypen von *S. aureus*. In den Experimenten der CFU-Bestimmung konnte jedoch ein ähnlicher Effekt unter Behandlung gezeigt werden. Aus diesem Grund wurde vergleichend das arithmetische Mittel der Ergebnisse in Abbildung 19 dargestellt.



**Abbildung 19: Staphylococcus aureus Überlebensraten mit Myrtol stand.**

Dargestellt sind die durchschnittlichen prozentualen Überlebensraten aller verwendeten Isolate und des Laborstammes mit deren Standardabweichung unter **A)** 0,125%iger und **B)** 0,25%iger Myrtol stand.-konzentration in Abhängigkeit vom Zeitpunkt  $t[h]=\{0;1;4;8;24\}$ . Therapiebeginn bei OD 0,2. In **C)** sind die Daten aus A) und B) im direkten Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Die Überlebensraten liegen unter Behandlung mit 0,125% und 0,25% Myrtol stand. auf unter 42% bzw. 29% im gesamten Zeitraum.

Bereits eine Stunde nach der Behandlung mit 0,25% Myrtol stand. sind verglichen mit der unbehandelten Kontrolle nur noch 29% und nach 4 h nur noch 21% der CFUs nachweisbar, wie in Abbildung 19 A) gezeigt. Die Überlebensraten bei 0,125% Myrtol stand. liegen 1 Stunde nach Behandlung bei 42% und nach 4 Stunden bei ca. 39%, siehe B). Für den Zeitraum des exponentiellen Wachstums der Bakterien zeigen die Daten eine dosisabhängige Wirkung, wobei die Messwerte eine Proportionalität vermuten lassen.

Acht Stunden nach Behandlung sind die Überlebensraten bei beiden Konzentrationen 0,125% und 0,25% sehr ähnlich zwischen 16 bzw. 18%. Dies spricht sowohl für eine lang anhaltende Wirkung von Myrtol stand., als auch dafür, dass in der stationären Wachstumsphase keine Dosisabhängigkeit mehr besteht. Für den Messpunkt 24 h nach Behandlung zeigt die halbe Dosierung mit 25% eine höhere Überlebensrate als 0,25 % Myrtol stand. mit 19%.

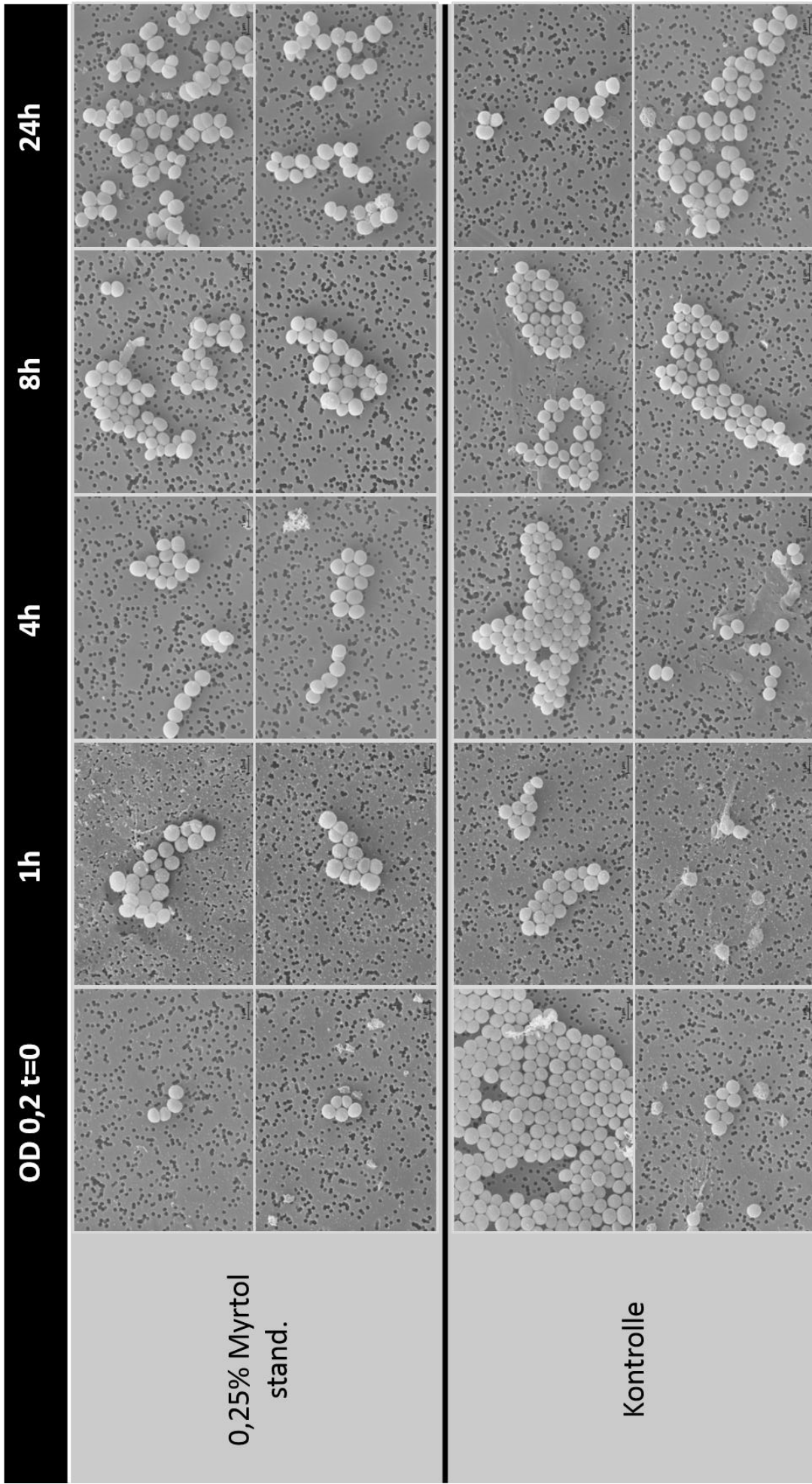
## 7.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die REM diente zur morphologischen Untersuchungen der Zellen vom Referenzstamm *S. aureus* COL nach Behandlung mit Myrtol stand. in der Konzentration 0,25%. Die Zellen wiesen in allen untersuchten Proben, wie in den Beispielaufnahmen aus Abbildung 20 zu sehen, keine wesentlichen Formunterschiede auf. Behandelte Zellen und Kontrolle liegen in Aggregaten oder solitär vor. Zellteilungen und zerstörte Zellen konnten ebenfalls beobachtet werden.

Eine weitere Gemeinsamkeit beider Gruppen sind die zahlreichen kleinen Partikel im Hintergrund der Bildern OD 0,2 und 1 h nach Behandlung sowie in einigen Aufnahmen an der Zelloberfläche. Die Partikel entsprechen Proteinen und deren Fragmenten.

Ein weiteres morphologisches Merkmal ist die Zellgröße bzw. das Zellvolumen. Zwischen den meisten nahezu gleich großen Zellen innerhalb beider Gruppen lagen vereinzelt auch kleinere und größere Zellen. Unter Annahme einer Kugelform konnten die in Tabelle 24 dargestellten Zellgrößen berechnet werden. Vor Behandlung zeigen alle Proben ähnliche Volumina bei Signifikanzniveau  $p=0,01$ . Zum Zeitpunkt vor der Behandlung sind die Zellen identisch. Das Volumen der Zellen vergrößert sich nach Behandlung mit 0,25% Myrtol stand. in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach Gabe. Nach 1 h liegen die Volumina der behandelten Zellen bereits ca. 36% höher als die der Kontrolle, nach 4 h sogar ca. 69% höher. Nach 8 h beträgt die Vergrößerung ca. 50% (Tabelle 24). 24 h nach der Behandlung erreichen die Unterschiede das Signifikanzniveau  $p=0,01$  nicht mehr. In Abbildung 21 ist ein vergrößerter Ausschnitt der Zellen 8 h nach Behandlung im direkten Vergleich mit der Kontrolle dargestellt.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen nach Behandlung mit Myrtol stand. eine Volumenänderung der Zellen zwischen 1 h und 8 h nach Gabe des Medikaments. Die Größenunterschiede zeigen nach 4 h ein Maximum von ca. 69% und nehmen im Anschluss wieder ab. Weitere morphologische Unterschiede konnten nicht festgestellt werden.



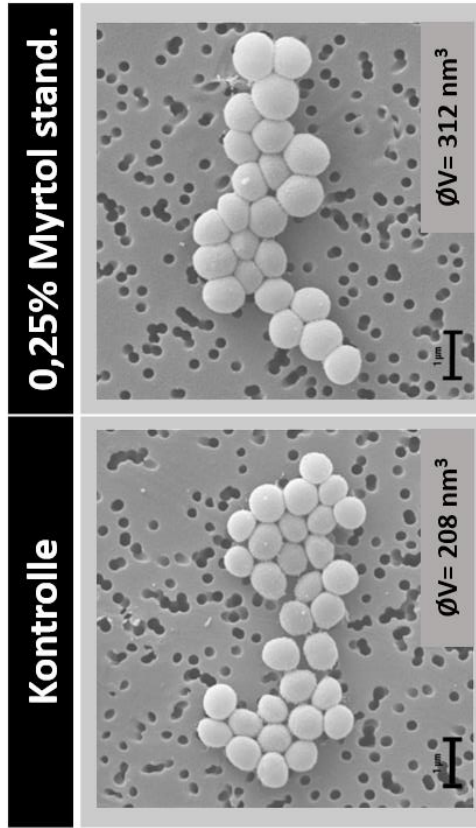
**Abbildung 20: REM-Bilder unter Behandlung mit Myrtol stand.**

Vergrößerung der Einzelbilder 8000-fach; Dargestellt sind jeweils zwei Bilder der Rasterelektronenmikroskopie von *S. aureus* COL unter 0,25%iger Myrtol stand.- Konzentration vor Behandlung bei OD 0,2(t=0) und zu den Zeitpunkten t[h]={1; 4; 8; 24} nach Behandlung sowie zum Vergleich die Bilder der unbehandelten Kontrollgruppe. Der Maßbalken befindet sich jeweils unten rechts. Hintergrund: Poren im Polycarbonat- Filter (schwarz), Protein-Komplexe (weiß). Die behandelten Zellen sind im Zeitraum zwischen 1 h - 8 h nach Behandlung größer als die unbehandelten Zellen der Kontrolle (vgl. Tabelle 24).

**Tabelle 24: Veränderungen der Volumina unter Behandlung mit Myrtol stand. 0,25%**

Die Tabelle zeigt die errechneten durchschnittlichen Volumina und deren Standardabweichung der Zellen von *S. aureus* COL unter 0,25%iger Myrtol stand.- Konzentration vor Behandlung bei OD 0,2(t=0) und zu den Zeitpunkten t[h]={1, 4, 8, 24} gemeinsam mit der entsprechenden Kontrolle. Dazu wurden die Veränderung im Vergleich zur Kontrolle und die Signifikanz der Werte nach Analyse im t-Test berechnet. Die Zellen sind im Zeitraum zwischen 1 h und 8 h nach Behandlung signifikant größer mit einem Maximum von ca. 70% nach 4 h. Die einzelnen Stichproben hatten Probenzahlen von 39≤n≤92 und wurden aus mindestens fünf verschiedenen Bildern gemessen.

Probe	OD 0,2 (t=0)		1 h		4 h		8 h		24 h	
	Kontr.	Myrtol s. 0,25%	Kontr.	Myrtol s. 0,25%	Kontr.	Myrtol s. 0,25%	Kontr.	Myrtol s. 0,25%	Kontr.	myrtol s. 0,25%
<b>Ø Volumen in nm<sup>3</sup></b>	262	277	231	314	199	337	208	312	280	313
<b>SD</b>	0,06	0,08	0,08	0,1	0,07	0,09	0,07	0,1	0,1	0,09
<b>Volumen in %</b>	<b>100</b>	<b>105,65</b>	<b>100</b>	<b>135,93</b>	<b>100</b>	<b>168,95</b>	<b>100</b>	<b>149,94</b>	<b>100</b>	<b>111,54</b>
<b>t-Test p-Wert</b>		<b>0,38</b>		<b>9,91×10<sup>-8</sup></b>		<b>1,4×10<sup>-20</sup></b>		<b>2,43×10<sup>-11</sup></b>		<b>0,03</b>



**Abbildung 21: REM 8 h nach Behandlung mit Myrtol stand.**

Ausschnittsvergrößerung der REM Bilder zur behandlungsspezifischen Größenveränderung 8 h nach Behandlungsbeginn. Links ist die unbehandelte Kontrolle dargestellt und rechts Zellen nach Behandlung mit 0,25% Myrtol stand.. Die behandelten Zellen sind signifikant größer als die Kontrolle. Zum Vergleich sind Durchschnittsvolumina und Maßbalken (1 µm) angegeben.

## 7.3 2D-DIGE Gelelektrophorese

In der Analyse der 2D-DIGE Gelelektrophorese zeigten sich für intrazelluläre (IC) und extrazelluläre (EC) Proben des Laborisolats *S. aureus* COL zu allen Zeitpunkten spezifische Proteinmuster (Abbildung 25, Seite 75). Durch Erstellen von Dual Channel Overlays der gescannten Proteinbilder von behandelten und unbehandelten Zellen wurde eine Vielzahl von differenziell exprimierter Proteinspots visualisiert. Abbildung 25 zeigt die Overlays getrennt für intrazelluläre und extrazelluläre Proteine.

### 7.3.1 Quantitative Analyse

Nach Spot-Detektion konnten für IC 1223 Proteinspots und für EC 610 Proteinspots eindeutig separiert werden.

**Tabelle 25: 2D-DIGE quantitative Spotanalyse**

IC, intrazelluläre Proteine; EC, extrazelluläre Proteine, MS, Massenspektrometrie

	IC				EC			
Zeit nach Behandlung	1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h
Spot-Detektion im Gel	1223				610			
Statistik der Overlays + Signifikanzanalyse	381	273	491	589	137	251	358	355
Spot-Cutting für MS	21				85			
Proteinidentifikationen durch MS	136				347			

Zur quantitativen Analyse der Proteinverteilung aus den Overlays wurden alle Spots mit mindestens 1,5-fach veränderter Expression im Vergleich zur Kontrolle ( $\text{ratio} \leq 0,667$ ,  $\text{ratio} \geq 1,5$ ,  $p \leq 0,05$ ) selektiert.

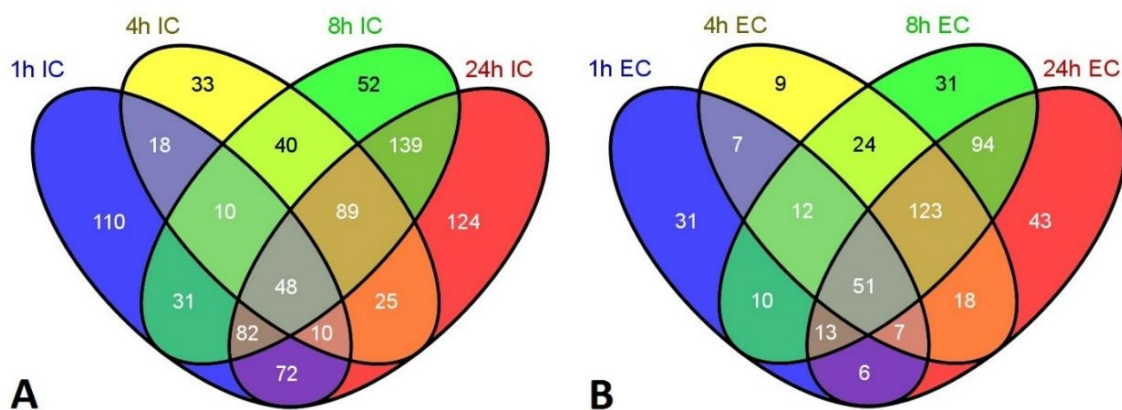
Die Anzahl der differenziell exprimierten Spots nimmt über den Zeitverlauf zu (Tabelle 26). Direkt 1 h nach Behandlung sind für IC 381 Proteinspots ermittelt worden. Nach 4 h sind nur noch 273 Spots detektiert worden, von denen 86 Spots bereits nach 1 h detektiert werden konnten. Im weiteren Zeitverlauf nimmt die Anzahl der Spots deutlich zu auf 491 nach 8 h und 589 nach 24 h. Für die extrazellulären Proteine konnten 1 h nach Behandlung 137 Proteinspots ermittelt werden. Im Zeitverlauf steigt die Anzahl der veränderten Spots stetig an, 251 nach 1 h und 358 nach 4 h nach Behandlung mit Myrtol stand. Zum letzten Messpunkt nach 24 h konnten 355 Spots detektiert werden, von denen die überwiegende Mehrheit (281) mit dem

## Ergebnisse Myrtol standardisiert

Zeitpunkt nach 4 h übereinstimmt. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass die Veränderungen auf die Proteinzusammensetzung durch Myrtol stand. zeitabhängig sind. Auch nach Eintritt in die stationäre Phase nach 8 h steigt die Zahl der in Kontrolle und behandelter Kultur unterschiedlich exprimierten Spots bei IC noch an. Für EC konnte eine sukzessive Erhöhung der veränderten Spots von 1 h bis 8 h nach Behandlung um 221 gezeigt werden. Nach Eintritt in die stationäre Phase bleibt der Unterschied zur Kontrolle hier konstant. Über alle Messpunkte hinweg konnten 883 komplett verschiedene Spots für IC und 479 für EC gefunden werden. Detaillierte Ergebnisse zeigt Tabelle 26.

**Tabelle 26: Differenziell exprimierte Proteinspots zum jeweiligen Zeitpunkt nach Gabe von 0,25% Myrtol stand.**  
Die Angaben sind für IC und EC. (ratio<0,667, ratio>1,5, p<0,05)

	1 h	4 h	8 h	24 h
<b>IC</b>	381	273	491	589
<b>EC</b>	137	251	358	355



**Abbildung 22: Venn- Diagramme der Spots für IC und EC**

IC, intrazelluläre Proteine; EC, extrazelluläre Proteine. In der Abbildung sind die Spotmengen zu den genannten Zeitpunkten nach der Behandlung mit Myrtol stand. dargestellt. **A)** Spots aus den IC Overlays, **B)** Spots aus den EC Overlays. Die Zahlen entsprechen der gemeinsamen Spotanzahl in den jeweiligen Teilmengen. (ratio≤0,667; ratio≥1,5; p<0,05). Über alle Messpunkte verteilt konnten für IC 883 und für EC 479 komplett verschiedene Spots gefunden werden. Es konnten 48 bzw. 51 Spots gefunden werden, die in der Schnittmenge aller Zeitpunkte von IC und EC liegen.

Im Anschluss wurden die Überlappungen der einzelnen Spots zu den Messzeitpunkten untersucht. Abbildung 22 veranschaulicht alle Schnittmengen in einem Venn-Diagramm. Auffällig sind die großen Schnittmengen zu den Zeitpunkten 8 h und 24 h. Diese Teilmengen enthalten mehr Spots, als die jeweilig anderen Teilmengen. Parallel findet zwischen 8 h und 24 h eine wesentlich geringere Änderung der Proteinzusammensetzung als zwischen den anderen Messzeitpunkten statt.

Nach Behandlung mit Myrtol stand. änderte sich die Proteinzusammensetzung im Vergleich zur Kontrollkultur von *S. aureus* COL signifikant. Über alle Zeitpunkte hinweg konnten

veränderte Spots Mengen auf den 2D-Gelen gefunden werden. Aufgrund des direkten Vergleiches mit einer Kontrollkultur zum gleichen Zeitpunkt sind die Unterschiede unabhängig von den Phasen des Bakterienwachstums in Kultur. Die Wirkung des Phytotherapeutikums auf die Mikroorganismen ist zeitabhängig (Ausnahme IC nach 4 h). Zu jedem Messpunkt konnten zudem individuell signifikante Spots gefunden werden. Intrazellulär und extrazellulär konnten 48 bzw. 51 Spots gefunden werden, die über den gesamten Messzeitraum durch Myrtol stand. in ihrer Expression, Modifikation, Synthese oder Metabolisierung verändert werden. Dies entspricht ca. 5,4% bzw. 10,6% aller veränderten Spots über alle Messpunkte.

### 7.3.2 Principle component analysis (PCA)

Mit Hilfe der PCA können komplexe und umfangreiche Datensätze übersichtlich dargestellt werden. Dazu werden Korrelationen der Variablen analysiert und Hauptkomponenten ermittelt. So kann die Qualität der Gelreplikate zu den jeweiligen Messzeitpunkten geprüft werden. Außerdem lassen sich Hauptkomponenten ermitteln in denen sich die Proben am stärksten unterscheiden.

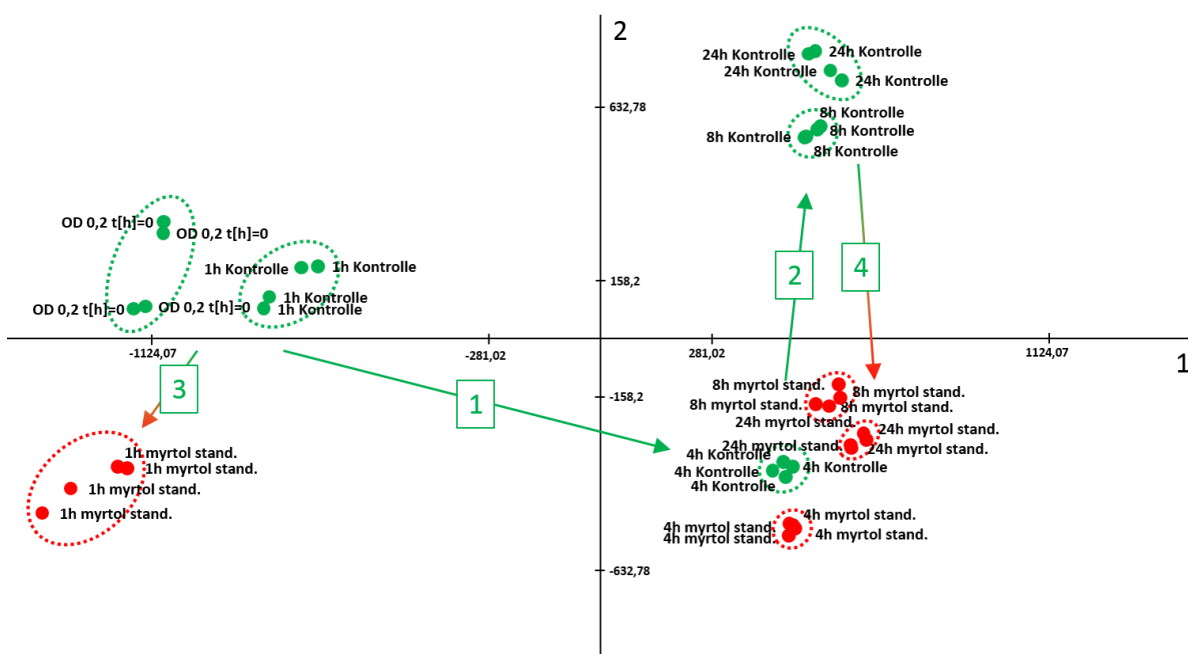


Abbildung 23: Principle Component Analyse IC Hauptkomponenten 1.2

IC, intrazellulär; Schematische Darstellung der PCA aller IC Proben in jeweils vier technischen Replikate zu den Messzeitpunkten. Grün: unbehandelte Kontrollen, Rot: 0,25% Myrtol stand.. x- Achse: Hauptkomponente 1, y- Achse Hauptkomponente 2. Alle vier Replikate jeder Probe liegen dicht beieinander (Kreise, gepunktet) und zeigen somit eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Pfeile verdeutlichen Unterschiede zwischen den jeweiligen Proben. **1:** Wachstum der Kontrolle in exponentiellen Phase, **2:** Übergang der Kontrolle in die stationäre Phase, **3:** Myrtol stand. spezifischer Effekt 1 h nach Behandlung, **4:** Effekt 4 h und 8 h nach Behandlung. Die PCA Analyse wurde mittels Delta 2D erstellt.

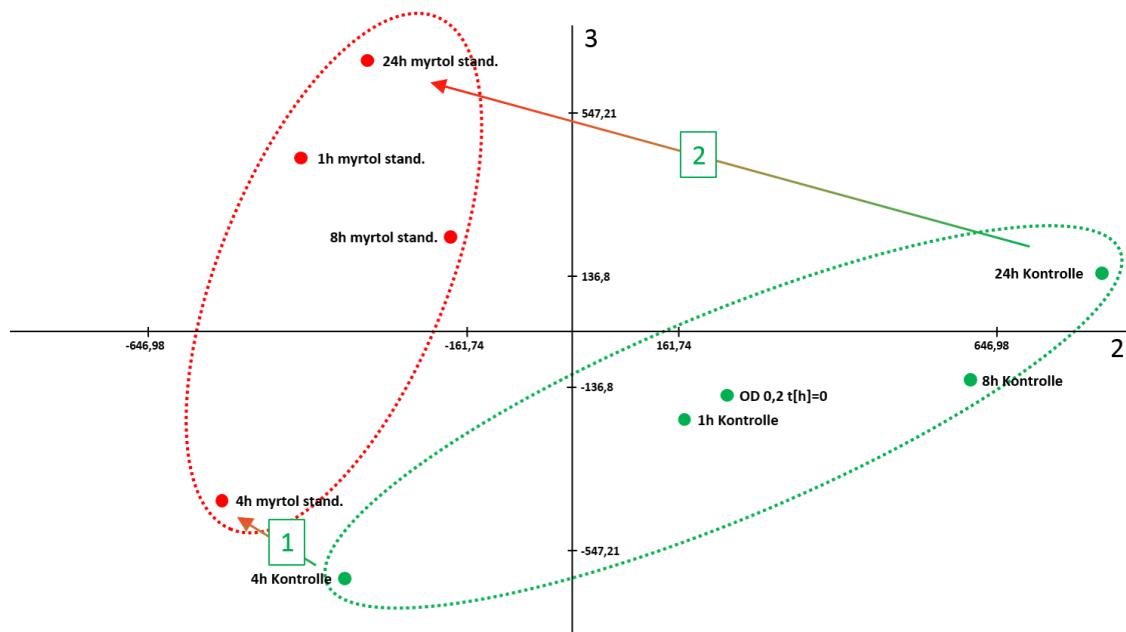
Die Qualitätsanalysen der vier technischen Replikate aller Proben zeigten jeweils starke Übereinstimmungen. Die Datenpunkte der Replikate sind in der PCA, wie in den Beispielen aus Abbildung 23 (IC) und Abbildung 44 (EC, im Anhang) dargestellt dicht lokalisiert, insbesondere



## Ergebnisse Myrtol standardisiert

im Vergleich zu den anderen Proben und bestätigen die technisch gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Hauptkomponente 1 (x-Achse) verdeutlicht die größten Unterschiede zwischen den Proben bzw. der Zusammensetzung der Spots und ihren Intensitäten. In der zweiten Hauptkomponente (y-Achse) werden die nächstkleineren Unterschiede aufgetragen. In der hier vorgelegten Untersuchung entspricht Hauptkomponente 1 dem im Wachstumsverlauf der Kulturen über die Zeit. Pfeil 1 in Abbildung 23 stellt hierbei die Veränderung in der Proteinzusammensetzung zum Wachstum der Kultur in der log-Phase dar. Anschließend folgt der Übergang in die stationäre Phase (Pfeil 2) mit massiver Veränderung in der 2. Hauptkomponente. Pfeil 3 und 4 zeigen die Myrtol stand. spezifischen Veränderungen im Proteom zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die deutliche Entfernung der Punktwolken von behandelten Zellen und Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt zeigt, wie stark die Veränderungen durch das Medikament sind. Anhand von Abbildung 24 lassen sich die Veränderungen der



**Abbildung 24: Principle Component Analyse IC 2.3**

IC, intrazellulär; Die Punkte kennzeichnen die Mittelwerte aller vier Replikate jeder einzelnen Probe zum entsprechenden Messzeitpunkt. Auf den Achsen sind die Hauptkomponenten der Veränderungen zwischen behandelter Gruppe und unbehandelter Kontrolle aufgetragen. x-Achse: Hauptkomponente 2, y- Achse: Hauptkomponente 3. Anhand der Hauptkomponente 2 lassen sich die Myrtol stand.- spezifischen Veränderungen erkennen. Die PCA Analyse wurde mittels Delta 2D erstellt. Das Wachstum der Kultur zwischen 4 h und 24 h korreliert mit der Entfernung zwischen behandelten Zellen und Kontrolle (Pfeile 1 und 2)

Proteinzusammensetzung zwischen den Proben für IC nach 0,25% Myrtol stand.-Gabe und den unbehandelten Kontrollen gut verdeutlichen. In diesem Fall sind die Overlays als Punkte im Koordinatensystem eingezeichnet. Die Distanz in der 2. Hauptkomponenten (hier x-Achse) zeigt die Myrtol stand. spezifischen Veränderungen. Je länger das Wachstum der Kultur, desto

größer wird die Entfernung zwischen behandelten Zellen und Kontrolle (Pfeile 1 und 2 in Abbildung 24)

### 7.3.3 Qualitative Analyse

Dual Channel Overlays (Abbildung 25) der IC Proben zeigen deutliche zeitabhängige Veränderungen des Spotmusters. Besonders in den Vergleichen 8 h und 24 h nach Behandlung die zeigt Farbcodierung (rot/grün) viele regulierte Spots. Sie entsprechen einer deutlichen Veränderung im intrazellulären Proteom der Zellen durch Gabe von Myrtol stand..

In den Dual Channel Overlays der EC Proteine (Abbildung 25) zeigen die einzelnen Spots größere Volumina (Fläche  $\times$  Intensität je Pixel) als in den IC Overlays. Mittels der Farbcodierung konnte auch hier klar eine zeitabhängige Veränderung der Proteinmuster gezeigt werden. Demzufolge muss von einer massiven Veränderung der Proteinzusammensetzung im extrazellulären Raum von *S. aureus* COL nach Gabe des Medikamentes ausgegangen werden. In den Overlays zeigt sich ein Großteil der veränderten Proteine im Bereich niedriger Molekulargewichte und höherer pH-Werte.

Die Gelbilder von intrazellulären und extrazellulären Proteinen weichen komplett voneinander ab. Proteine des Zytoplasmas sind nicht vollständig extrazellulär vorhanden. Die Zellen sind nicht lysiert. Zur Betrachtung eignen sich insbesondere die dataillierten Abbildung 27 und Abbildung 26.

Ergebnisse Myrtol standardisiert

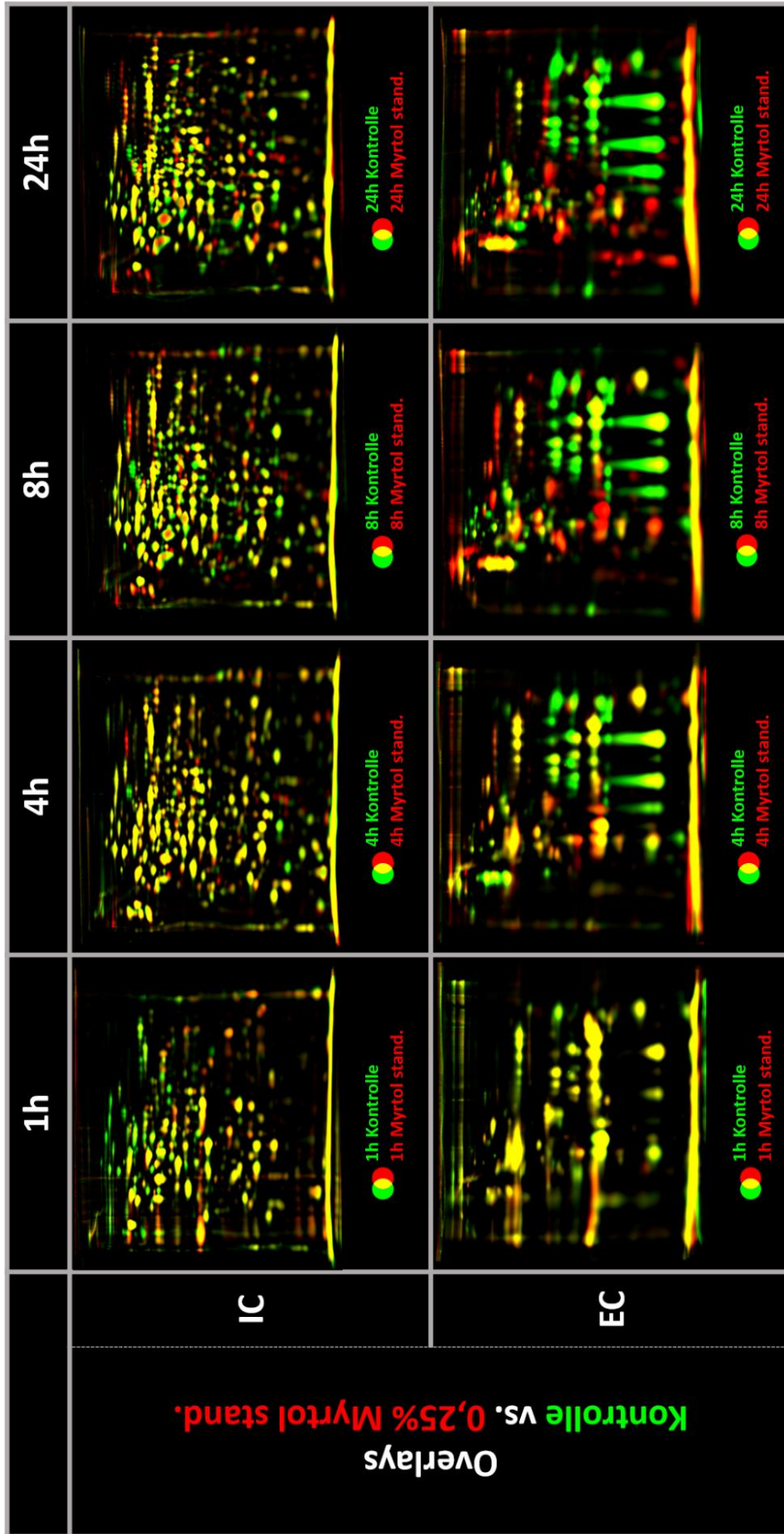


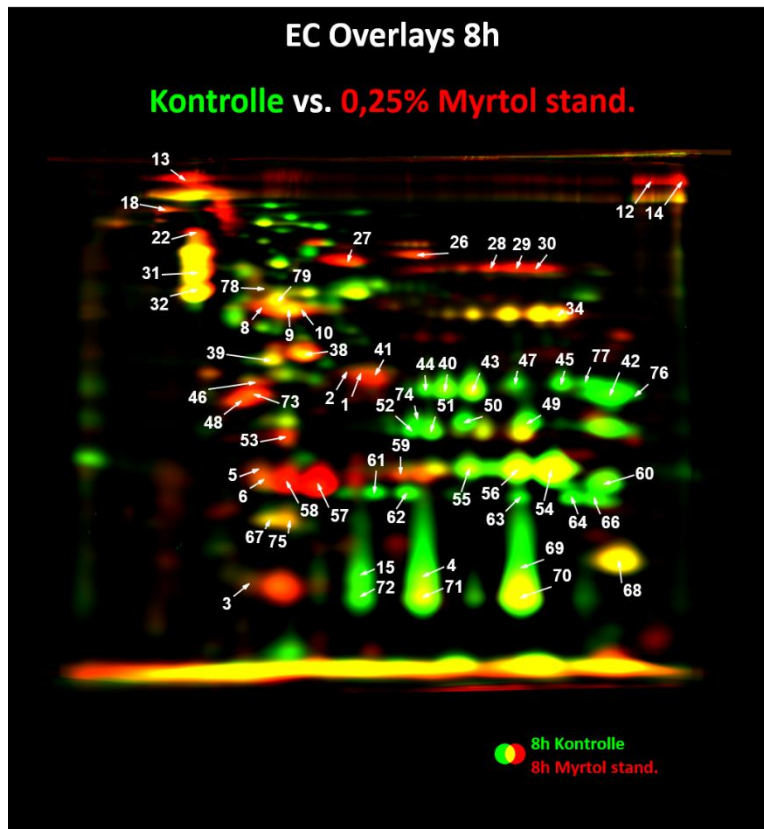
Abbildung 25: 2D-DIGE Overlays Kontrolle vs. Myrtol stand. 0,25%

IC, intrazellulär; EC, extrazellulär. Darstellung der 2D-DIGE Dual Channel Overlays 1 h, 4 h, 8 h, und 24 h nach Gabe von 0,25 % Myrtol stand. im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die Einzelbilder sind Overlays der errechneten Fusionsgele der einzelnen Proteinproben (jeweils 4). Die Auftrennung erfolgte in der ersten Dimension im pH-Bereich von 4-7 und in der zweiten Dimension nach Molekulargewicht von 10 bis 120 kDa. Rote Markierungen zeigen erhöhte und grüne Markierungen verringerte Proteinmengen nach Behandlung.

## 7.4 Proteinidentifikation InGel

### 7.4.1 Datenbankabgleich

Aufgrund der hohen Sensitivität der LC-MS konnten mehr Proteinspots identifiziert werden. Aus den EC-Gelen wurden 63 Proteinspots ausgeschnitten. Für diese konnten 351 Proteine identifiziert werden. Davon sind 171 unterschiedliche Proteinidentifikationen, 69 der Proteine wurden in mehreren Spots identifiziert. Aus den Gelen der IC Proben konnten für 22 Spots insgesamt 136 Proteine identifiziert werden. Hiervon sind 105 unterschiedliche Proteinidentifikationen. 23 der Proteine wurden in mehreren Spots identifiziert. Die ausgeschnittenen Spots mit den Identifizierungen sind in Abbildung 26 für EC und Abbildung 27 für IC dargestellt. Zusätzlich zeigt Tabelle 44 im Anhang Seite 151 alle ausgeschnittenen und tryptisch verdauten Spots mit Identifikationen und detaillierten Informationen zu Peptidanzahlen und Molekulargewicht (MW).



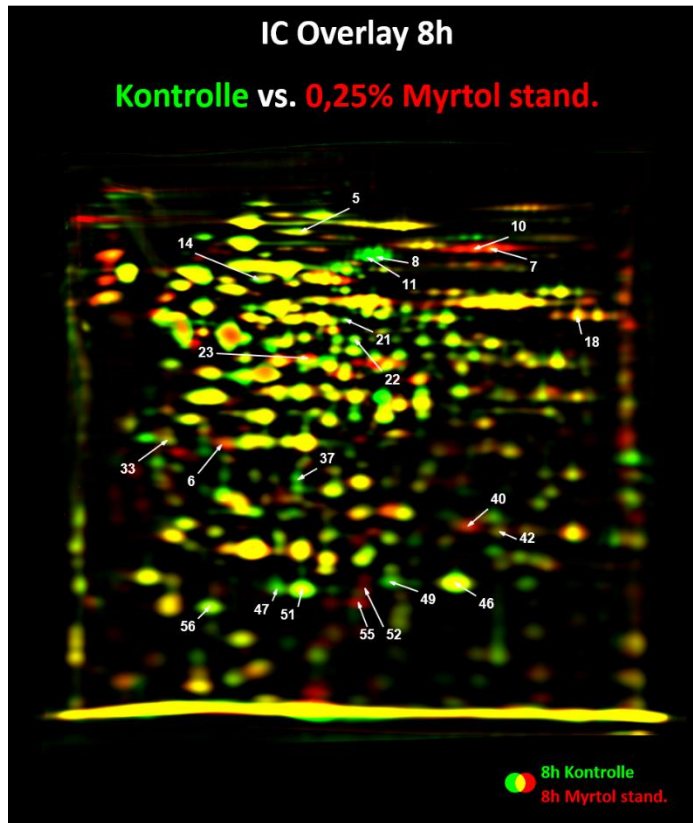
**Abbildung 26: Dual Channel Overlay der extrazellulären Proteine 8 h nach Behandlung mit 0,25% Myrtol stand., gelabelt mit Identifikationsnummern**

Die Abbildung zeigt das 8 h Dual Channel Overlay der extrazellulären Proteine. Rote Spots: erhöhte Proteinmengen nach Gabe von Myrtol stand., grüne Spots: verminderte Proteinmengen nach Behandlung, gelbe Markierungen: keine Veränderungen. Die Pfeile markieren mittels LC-MS identifizierte Proteinspots. Die Proteinidentifikationen sind in der nachfolgenden Tabelle 27 mit ihren Genbezeichnungen aufgelistet.

## Ergebnisse Myrtil standardisiert

**Tabelle 27: Proteinidentifikationen LC-MS EC**

ID	Proteinidentifikationen, aufgeführt mit Genbezeichnung
1	SACOL2152, SACOL2666, lytM, hlb, thrC
2	SACOL2152, SACOL2666, lytM, pfkA, SACOL2367
3	ftnA, rplJ, tpx, gapA1, SACOL2711, SACOL2295, SACOL0376, isaA, greA
4	SACOL0908, mecA
5	tpiA, tal, tuf, seb, adk, isaA, butA, SACOL0633, deoD2, ureG, sceD, SACOL1835, SACOL0914, arlR, SACOL0723, eno, ldh2, mttnN
6	tpiA, adk, tal, deoC2, isaA, deoD2, ureG, SACOL0914, sceD, SACOL0375
8	SACOL0050, eno, atpA, glpK, tuf, rpsA, esaA, SACOL1801, pdhD, nusA, ftsZ, dltA, SACOL2019, dnaN, ftsY, glnA, sspB, gnd
9	serS, glnA, glyQS, gatB, atpA, aldA, SACOL0050, SACOL2114, pdhD, gcvPA, glpK, SACOL2019, eno, SACOL1801, spa
10	glnA, cysS, gcvPA, SACOL0384, spa, SACOL2019, SACOL0050
12	SACOL0050
13	SACOL0050
14	SACOL0050, butA
15	SACOL0908, glmS, isaA
18	sdrE, SACOL0050
22	sdrE, SACOL0050
26	lip1, grpE
27	SACOL2666, seb
28	mecA, lip1, asp23
29	mecA
30	mecA, seb
31	SACOL0050, tig
32	SACOL0050, tuf
34	ltaS, lip1
38	sspB, SACOL0426, pgk, pepA1, SACOL0959, rocD2, SACOL0368, SACOL0050, sucC, camS, hemL1, nagA
39	sucC, SACOL2561, gapA1, ldh2, rpoA, gcvT, esaA, sspB, SACOL0050, sdrE, SACOL1616, ftsH
40	hlb, tuf
41	SACOL2152, lytM, cbf1, seb, thrC, plsX
42	hlgB, SACOL2006, lukD, lip1, truB
43	hlb, SACOL2004
44	hlb, guaC
45	SACOL2004, lukD, mecA, hlgB, SACOL2006
46	pta, pdhB, nrdF, sspA, SACOL0050, ppaC, dnaK, fabH, SACOL0198
47	SACOL2004, hlb, trpS, hlgB
48	SACOL2597, sspA, rpoA
49	hiY, SACOL0962, hlgC
50	hiY, SACOL0962, hlb
51	plc, SACOL0962, seb, ssaA2
52	plc, SACOL0962, seb, hiY, SACOL0050, ssaA2, SACOL0688
53	foIE2, sceD, SACOL0370, SACOL0763, isaA, srrA, SACOL0303, map, lip1, fba, sasF, walR, SACOL0427, SACOL0534
54	seb
55	seb
56	seb, hlb, atl
57	sspA, fda, SACOL2597, SACOL1561, SACOL0050, asp23
58	tpiA, SACOL1835, SACOL0633, isaA, asp23, adk, SACOL0723
59	seb, sek, sei, mecA, isaA, cysS, SACOL2302, SACOL0776, SACOL2666, SACOL0578
60	splB, rplA, seb, ssaA2
61	splC, mecA, SACOL0478, isaA, upp
62	splC, splF, mecA, asp23, sek, splF, seb, splD, pflB, splE
64	splF, seb, splE, splD
66	splF, splE, seb, splB, splD, aur, sasD
67	ahpC, sodA, SACOL0050, isaA, tuf, SACOL1885, tal, deoC2, clpP, SACOL1992, SACOL1933
68	nuc, hlb, SACOL2006, SACOL0442
69	SACOL0908, seb, isaA
70	SACOL0908, isaA
71	SACOL0908, mecA, seb, ssb-p
72	SACOL0908, SACOL1541
73	fda, sspA, pta, hlb, SACOL1561, nrdF, pdhB, SACOL0198, SACOL2596, ezrA, lip1
74	hiY, seb, plc, SACOL1225, SACOL0962, mecA, hlb, SACOL0050
75	sodA, ahpC, dut, SACOL0444, clpP, SACOL1992, SACOL0270, rpe, isaA, SACOL1912, sodM
76	SACOL2006, hlgB, lukD
77	lukD, SACOL2006, hlgB, lip2, SACOL2004, mecA
78	SACOL0050, SACOL0479, odhB, esaA, atl, SACOL0455, ptsI, gpml
79	rocA, argS, SACOL0050, lysS, pdhD, gatA, ipdC, SACOL0918, katA, guaA, glnA



**Abbildung 27: Dual Channel Overlay der intrazellulären Proteine 8 h nach Behandlung mit 0,25% Myrtol stand., gelabelt mit Identifikationsnummern**

Die Abbildung zeigt das 8 h Dual Channel Overlay der intrazellulären Proteine. Rote Spots: erhöhte Proteinmengen nach Gabe von Myrtol stand., grüne Spots: verminderte Proteinmengen nach Behandlung, gelbe Markierungen: keine Veränderungen. Die Pfeile markieren mittels LC-MS identifizierte Proteinspots. Tabelle 28 zeigt die Proteinidentifikationen mit ihren Genbezeichnungen.

**Tabelle 28: Proteinidentifikationen LC-MS IC**

## **ID Proteinidentifikationen, aufgeführt mit Genbezeichnung**

5	alaS, polA, leuS, valS, pyc
6	SACOL0973, fda, tuf, fabD, efp, SACOL2121, tkt, ispA, dat, SACOL0727, tal, SACOL2321
7	SACOL0212, pflB
8	hlgB
10	SACOL0212
11	pflB, lukD, kata
14	glmS, acnA, ptsI, tkt, pdhC, clpL, gpml, fusA, ftsZ, pyrG, isaA, asp23
18	mqo2, mqo1
21	cysS, glnA, gcvPA, tkt, dnaA, aldA, crtN, glmU, nuc, bgIA, hlb, ilvB
22	cdr, gluD, accC, SACOL0596, mnmA, recA, cap5F, purD
23	hutI, SACOL1749, hemL2, SACOL1483, SACOL0211, ald1, pgk, pdhA, tkt, SACOL0426, pyk, SACOL0805, icd, SACOL0213, SACOL0596, atpA, SACOL2114
33	grpE, tuf, dnaK, rpsA, rplY
37	SACOL1835, butA, ftsZ, SACOL0815, isaA, glmS, SACOL0633
40	fabG, def, leuD, SACOL1905, ilvE, upp, pdxT, udk
42	def, pdxT, upp
46	SACOL1759, hslV, moaB
47	asp23, ssb, pyk
49	SACOL1759, hslV, SACOL0413, ltaS, bcp
51	asp23, ssb, seb, tuf, ftnA, SACOL2711
52	ureB, ureE, queF, asp23, katA, alaS
55	ureB, ureE, tuf, bcp, luxS, isaA, SACOL1163
56	ftnA, SACOL2711, SACOL1558, isaA, rplJ, SACOL1630, ptpA, greA

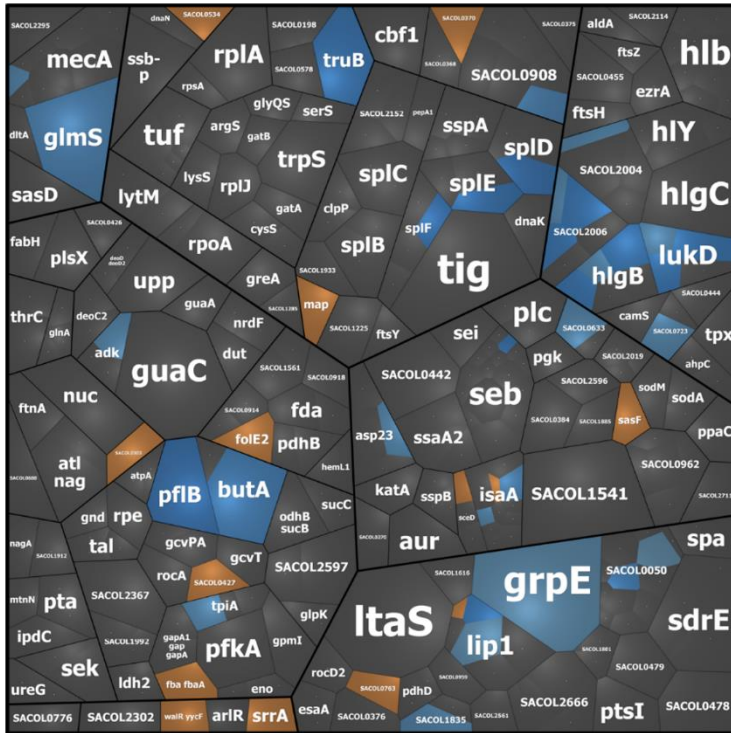
#### **7.4.2 Voronoi Treemaps/KEGG-Pathway-Analyse**

Voronoi Treemaps sind, insbesondere bei großen, komplexen Proteomdaten ein effektives Mittel zur Darstellung regulierter Stoffwechselprozesse. Alle identifizierten intrazellulären und extrazellulären Proteine wurden mittels KEGG-pathway Analyse einem Stoffwechselweg zugeordnet und in die Voronoi Treemaps integriert. Detaillierte Beschreibungen zur Erstellung der Treemaps ab Seite 48.

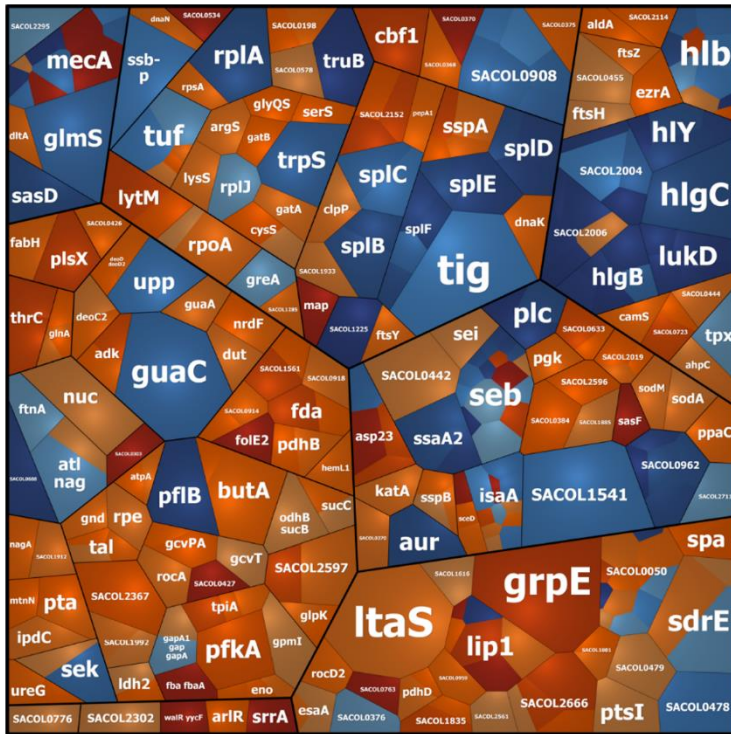
Die Voronoi Treemaps der behandelten Zellen zeigen eine deutliche Veränderung der Proteinmengen der untersuchten Proteine im Messzeitraum. Es folgen die Voronoi Treemaps der EC Proteinanalysen und IC Proteinanalysen, die Beschriftungen sind nachfolgend aufgelistet.

# Voronoi Treemaps EC

1h



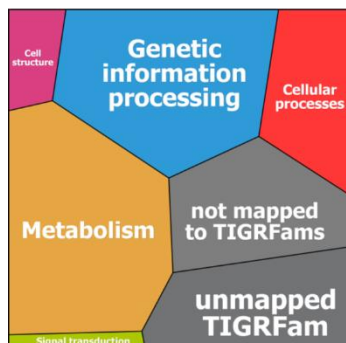
4h



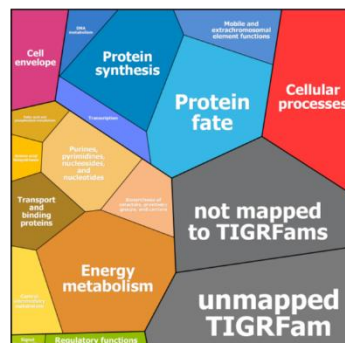
log2ratio

-5

Level 1

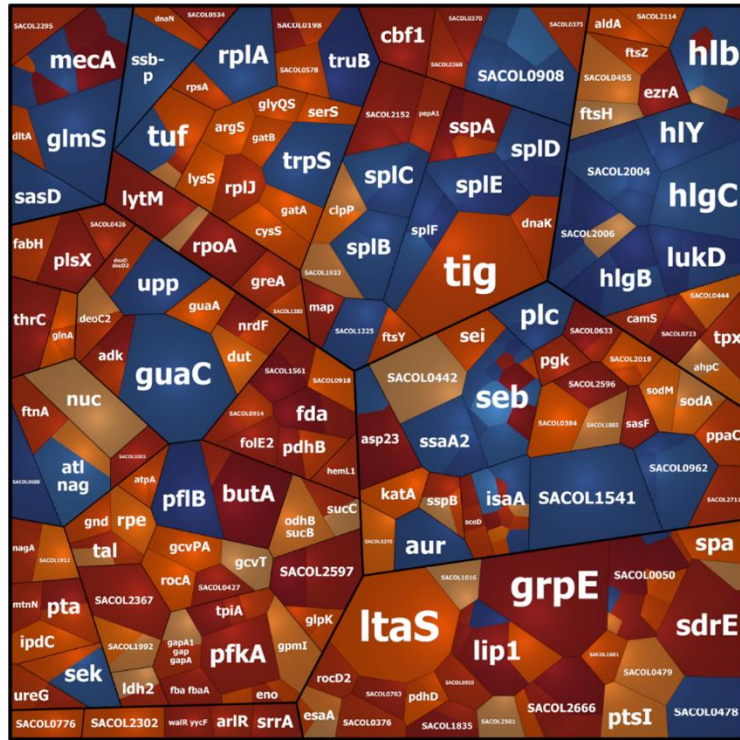


Level 2

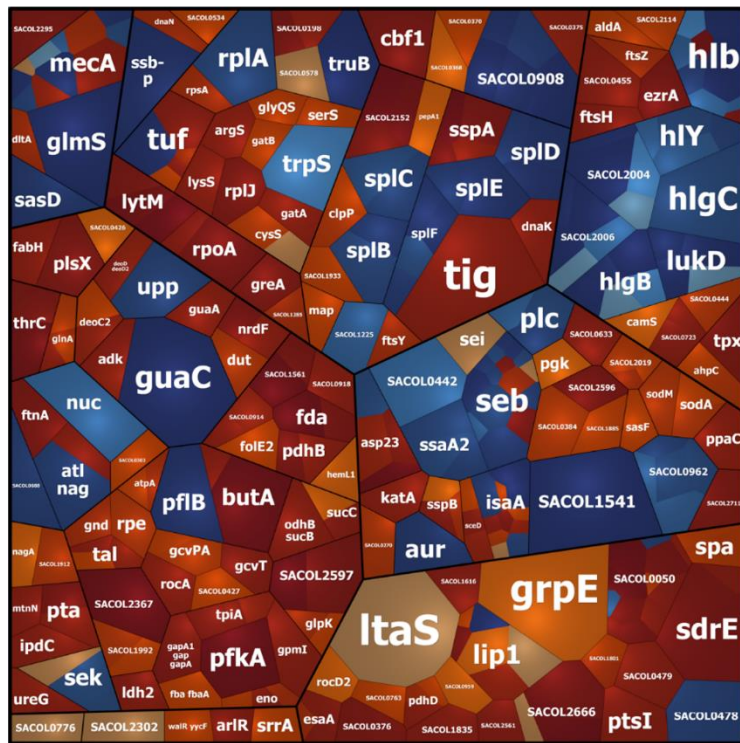




# Voronoi Treemaps EC



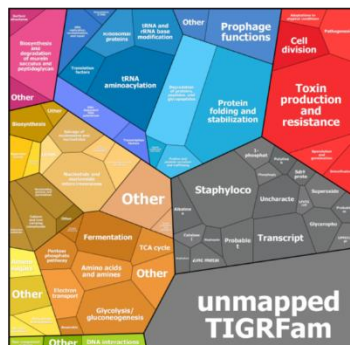
8h



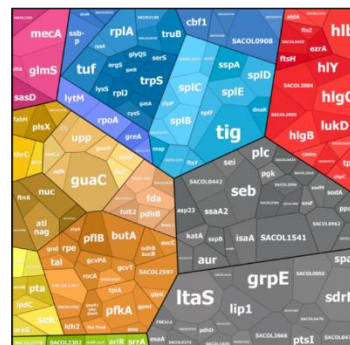
24h



Level 3

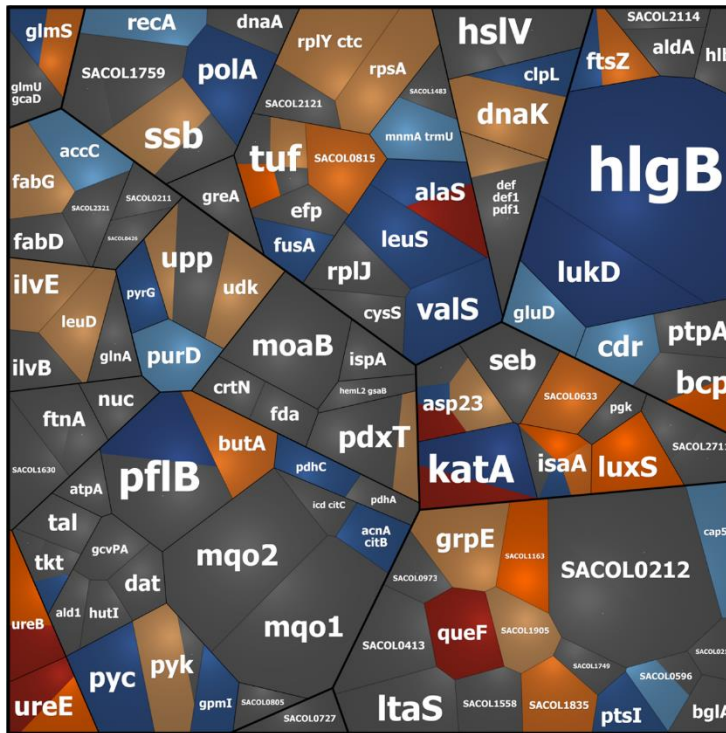


Level 4

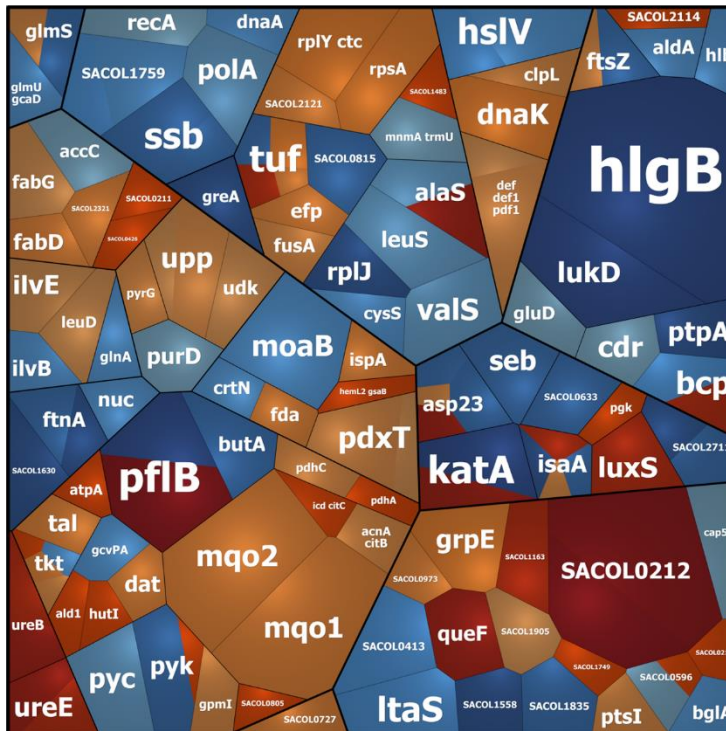


# Voronoi Treemaps IC

1h



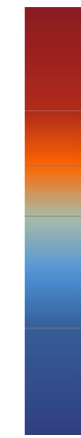
4h



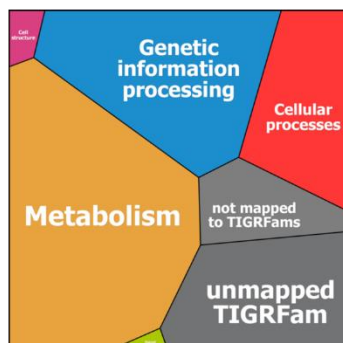
5

-5

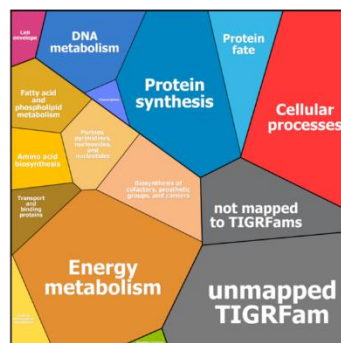
log2ratio



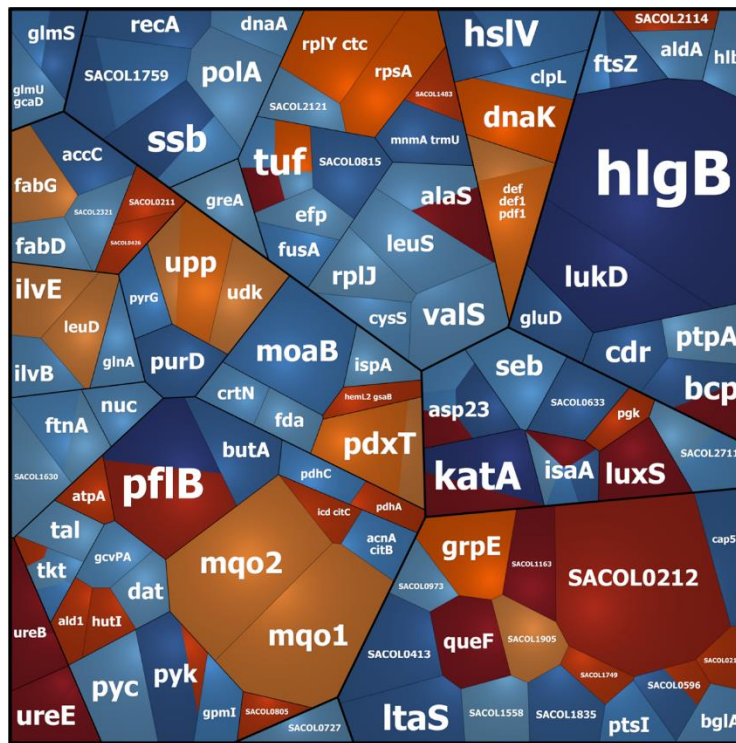
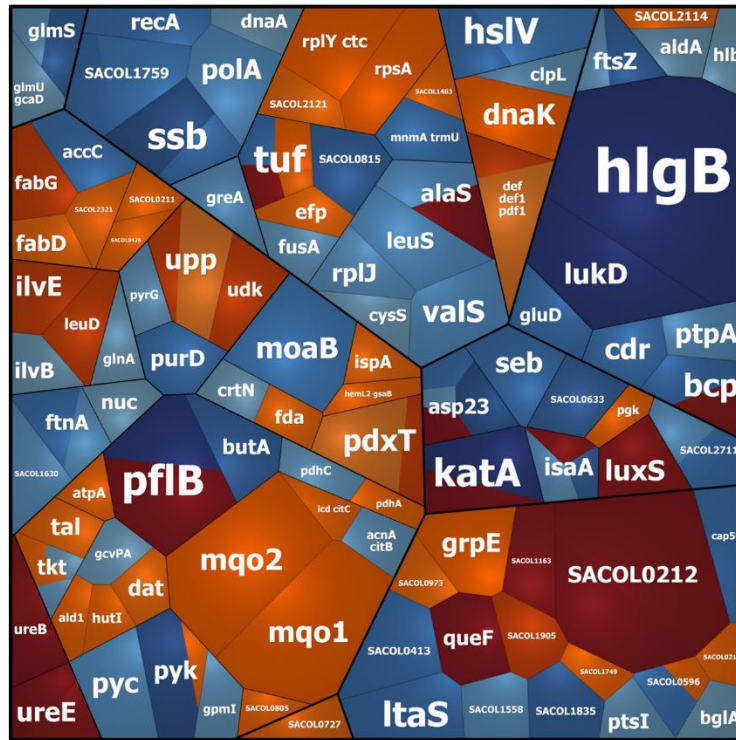
Level 1



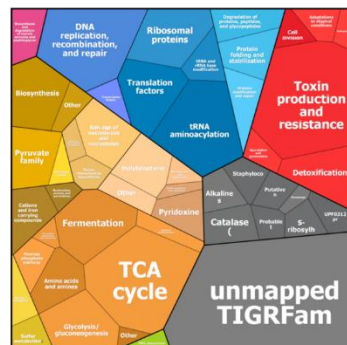
Level 2



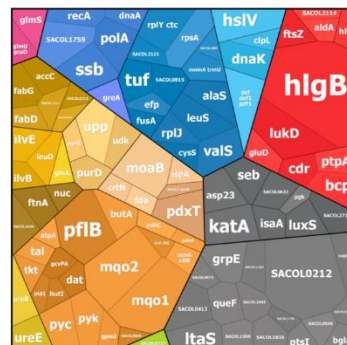
# Voronoi Treemaps IC



Level 3



Level 4



#### **Abbildung 29: Voronoi Treemaps der extrazellulären Proteine EC, Seite 80 f.**

Voronoi Treemaps der Veränderung der Proteinmengen der extrazellulären Proteine von *S. aureus* COL zu den Zeitpunkten  $t[h] = \{1, 4, 8, 24\}$  nach Behandlung mit Myrtol stand.. Unten: Legende mit Darstellung der Level 1-4. Level 1: Gruppierung nach Kegg-pathway Analyse, Level 2: einzelne Bereiche der Stoffwechselfunktionen nach TIGRFam, Level 3: Gruppierung der Proteine im gleichen Stoffwechselweg, Level 4: Kacheln entsprechen je einem identifizierten Protein. Die Proteine sind mit ihren Genbezeichnungen beschriftet.

Eine rote Farbgebung der Kachel beschreibt erhöhte Proteinmengen, blaue Farbgebung beschreibt verringerte Proteinmengen. Farbgradienten nach normalisierten gemittelten und logarithmierten Proteinmengen (%-Volumen, normalisiert auf interne Standards). Maximale Farbgebung nach Erreichen einer 5-fachen Veränderung im Vergleich zur Kontrolle. Kachelgrößen wurden maschinell berechnet. Bei Identifikation einzelner Proteine in mehreren Spots wurden die Kacheln der Proteine unterteilt und entsprechend der gemessenen einzelnen Spotratios farblich kodiert.

Durch Vergleich mit der Legende lassen sich Stoffwechselbereiche bzw. Funktionen ermitteln in denen mehrere Proteine ähnliche Regulationstendenzen unter Behandlung zeigen. Für die meisten Proteine konnte dabei gezeigt werden, dass ihre Proteinmengen über den gesamten Messzeitraum die gleiche Tendenz im Vergleich zur Kontrolle behält und lediglich in der Intensität zunimmt. Bereits 1 h nach Behandlung mit Myrtol stand. sind Proteine verschiedener Stoffwechselwege reguliert. Nach 4 h zeigen die meisten der dargestellten Proteine eine erhöhte Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle. Diese steigt im Verlauf über 8 h und 24 h weiter. Vor allem die Proteinmengen aus dem Energiestoffwechsel und damit zusammenhängenden Funktionen sind im Verlauf über 24 h erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu sind Proteinmengen der Toxine, wie HIY, HlgB, HlgC, LukD, Hlb und Seb stark verringert.

#### **Abbildung 28: Voronoi Treemaps der intrazellulären Proteine IC, Seite 82 f.**

Voronoi Treemaps der Veränderung der Proteinmengen der intrazellulären Proteine von *S. aureus* COL zu den Zeitpunkten  $t[h] = \{1, 4, 8, 24\}$  nach Behandlung mit Myrtol stand.. Unten: Legende mit Darstellung der Level 1-4. Level 1: Gruppierung nach Kegg-pathway Analyse, Level 2: einzelne Bereiche der Stoffwechselfunktionen nach TIGRFam, Level 3: Gruppierung der Proteine im gleichen Stoffwechselweg, Level 4: Kacheln entsprechen je einem identifizierten Protein. Die Proteine sind mit ihren Genbezeichnungen beschriftet.

Eine rote Farbgebung der Kachel beschreibt erhöhte Proteinmengen, blaue Farbgebung beschreibt / erniedrigte Proteinmengen. Farbgradienten nach normalisierten gemittelten und logarithmierten Proteinmengen (%-Volumen, normalisiert auf interne Standards). Maximale Farbgebung nach Erreichen einer 5-fachen Veränderung im Vergleich zur Kontrolle. Kachelgrößen wurden maschinell berechnet. Bei Identifikation einzelner Proteine in mehreren Spots wurden die Kacheln der Proteine unterteilt und entsprechend der gemessenen Spotratios farblich kodiert.

Der Vergleich mit der Legende zeigt Stoffwechselbereiche bzw. Funktionen, in denen mehrere Proteine ähnliche Regulationstendenzen unter Behandlung zeigen. Die Mehrheit der Proteine zeigt nach Behandlung verringerte Proteinmengen. Ausserdem ist für fast alle Proteine die Tendenz der Regulation über den gesamten Messzeitraum konstant. Im Bereich des Energie Metabolismus lassen sich mehrheitlich Proteine mit erhöhter Proteinmenge (gelb bis rot) identifizieren. Im Gegensatz dazu zeigen Proteine, deren Funktion zelluläre Prozesse umfassen im Wesentlichen verringerte Proteinmengen (hellblau bis dunkelblau). Die am stärksten im Vergleich zur Kontrolle verringerten Proteinmengen konnten bei den beiden Enterotoxine HlgB und LukD gemessen werden. Für die Proteine UreE, UreB, Tuf, AlaS, Bcp, Asp23, KatA, IsaA, LuxS, QueF konnte eine starke Zunahme der Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden.

### 7.4.3 Spezifische Veränderung der Proteinmengen durch Myrtol stand.

Durch Auswertung der Voronoi Treemaps konnten gezielt 54 identifizierte Proteine bestimmten Stoffwechselwegen zugeordnet werden. In den folgenden Abschnitten werden diese Proteine, entsprechend ihrer Funktionen gruppiert und die Veränderungen der Proteinmengen unter Behandlung mit Myrtol stand. im Vergleich zur Kontrolle tabellarisch dargestellt. Zusätzlich sind die Tendenzen aus dem Direktverdau dargestellt (ab S. 96).

#### 7.4.3.1 Superantigen-Enterotoxine

Durch Behandlung mit Myrtol stand. konnten für mehrere Superantigen-Enterotoxine verminderte Proteinmengen gemessen werden. Seb und Sek zeigen IC zwischen 4 h und 24 h geringere Proteinmengen. Ausserdem konnte für Seb auch EC eine starke Verminderung der Proteinmenge ermittelt werden. Die Ergebnisse wurden im Direktverdau bestätigt. Das Protein Ssa wurde EC zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung vermindert detektiert.

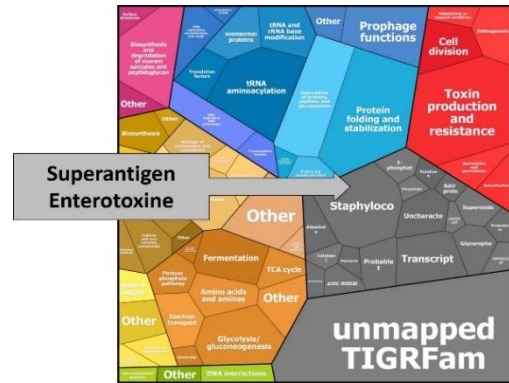


Abbildung 30: Superantigen-Enterotoxine

Tabelle 29: Superantigen-Enterotoxine, Myrtol stand. spezifische Veränderungen

Darstellung der Proteine mit Genbezeichnung und Funktion, sowie der ermittelten Myrtol stand.-spezifischen Veränderungen der Proteinmengen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Behandlung in der 2D-DIGE (InGel) und <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O Direktverdau 8 h nach Behandlung. IC: intrazelluläre Proteine, EC: extrazelluläre Proteine, DV 8 h: Direktverdau bei t[h]=8, grün: verminderte Proteinmenge, rot: erhöhte Proteinmenge Pfeil: Gesamttendenz der Proteinmenge.

Gen	Identifiziertes Protein Funktion, Lokalisation	Myrtol stand. spezifische Veränderung in 2D DIGE und <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O Direktverdau						
ssa/ ssaA-	<b>Staphylococcal secretory antigen, Ssa like Protein,</b> Das Protein ist als Immunogen bekannt.	IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
Das Enzym zeigte extrazellulär zwischen 4 h und 24 h nach der Behandlung erhöhte Proteinmengen. Im Direktverdau der EC Proben konnte dies bestätigt und auch für die IC Proben erhöhte Proteinmengen zum Zeitpunkt nach 8 h ermittelt werden.								
seb	<b>Superantigen-Enterotoxin B</b> Enterotoxine von Staphylokokken können Lebensmittelvergiftungen wie das „staphylococcal food poisoning syndrome“, verursachen.	IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
Das Toxin zeigte intrazellulär zwischen 4 h und 24 h verringerte Proteinmengen. Extrazellulär zeigten sich zwischen 1 h und 24 h stark verringerte Proteinmengen. Im Direktverdau der Proben konnte dies jeweils bestätigt werden.								

Gen	Identifiziertes Protein Funktion, Lokalisation	Myrtol stand. spezifische Veränderung in 2D DIGE und <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O Direktverdau
-----	---	---

**sek** **Superantigen-Enterotoxin K**  
 Enterotoxine von Staphylokokken können Lebensmittelvergiftungen wie das „staphylococcal food poisoning syndrome“, verursachen.

IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h

Für das Toxin konnten extrazellulär nach Analyse von 2D-DIGE zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung verringerte Proteinmengen gezeigt werden.

### 7.4.3.2 Leukotoxine und Hämolyse

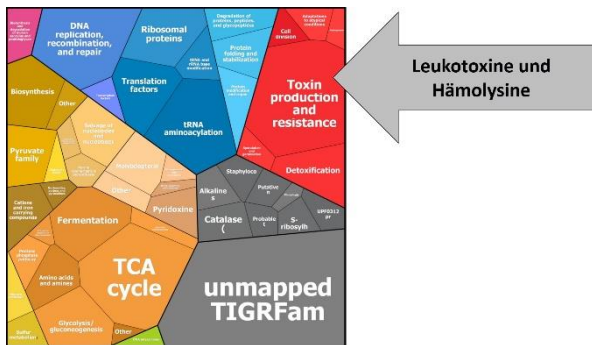


Abbildung 31: Leukotoxine und Hämolyse in Treemaps

Alle in diesem Abschnitt untersuchten Proteine zeigen nach Behandlung mit Myrtol stand. mindestens extrazellulär verminderte Proteinmengen und zum Teil auch intrazellulär. Viele Identifikationen der Leukotoxine und Hämolyse erfolgten in den gleichen oder naheliegenden Spots. HlgB und LukD wurden bspw. häufig in den gleichen Spots identifiziert und es wurden sowohl für IC als auch EC im gesamten Messzeitraum verminderte Proteinmengen gemessen. Für EC konnte dies auch im Direktverdau bestätigt werden. Die beiden Hämolyse HIY und HIB, sowie die beiden Leukozidin-ähnlichen Proteine SACOL 2004 und SACOL 2006 zeigen IC und EC nach Behandlung stark verminderte Proteinmengen. Für HIY konnte das im EC Direktverdau bestätigt werden.

Tabelle 30: Leukotoxine und Hämolyse, Myrtol stand. spezifische Veränderungen

Darstellung der Proteine mit Genbezeichnung und Funktion, sowie der ermittelten Myrtol stand.-spezifischen Veränderungen der Proteinmengen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Behandlung in der 2D-DIGE (InGel) und <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O Direktverdau 8 h nach Behandlung. IC: intrazelluläre Proteine, EC: extrazelluläre Proteine, DV 8 h: Direktverdau bei t[h]=8, grün: verminderte Proteinmenge, rot: erhöhte Proteinmenge Pfeil: Gesamttendenz der Proteinmenge.

Gen	Identifiziertes Protein Funktion, Lokalisation	Myrtol stand. spezifische Veränderung in 2D DIGE und <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O Direktverdau
-----	---	---

**lukD** **Leukotoxin LukD**  
 Als Teil eines Zwei-Komponenten Leukotoxin aus LukE und LukD ist es beteiligt an der Bildung von Poren in Zellmembranen der Zielzellen. Es wirkt somit gering leukotoxisch auf humane Blutzellen und nicht hämolytisch im Vergleich zu anderen Leukotoxinen von *S. aureus*.

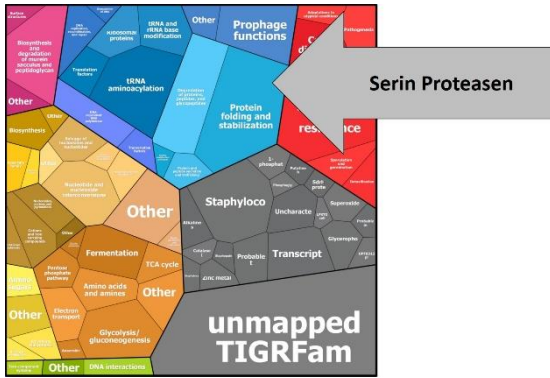
IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h

Für das Protein wurden intrazellulär und extrazellulär zwischen 1 h und 24 h nach der Behandlung verringerte Proteinmengen gemessen.

Ergebnisse Myrtol standardisiert

Gen	Identifiziertes Protein Funktion, Lokalisation	Myrtol stand. spezifische Veränderung in 2D DIGE und <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O Direktverdau						
hlgB	<b>Gamma-hemolysin component B</b> Das Protein zeigt hämolytische und leukotoxische Wirkung durch Bildung von Poren in Zellmembranen der Hostzellen. Wirkung nur bei Bildung eines Komplexes aus C- und B Komponenten durch sequenzielle Bindung.	IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Für das Protein wurde intrazellulär und extrazellulär zwischen 1 h und 24 h nach der Behandlung stark verringerte Proteinmengen gemessen. Im Direktverdau der EC Proben konnte dies bestätigt werden.						
hlgC	<b>Gamma-hemolysin component C</b> Beschreibung bei hlgB (siehe oben)	IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Dieser Teil des Hämolysins zeigte extrazellulär zwischen 4 h und 24 h nach der Behandlung verringerte Proteinmengen.						
hly	<b>Alpha-hemolysin</b> Alpha-hemolysin bindet an der Membran eukaryotischer Zellen und bewirkt über Porenbildung die Freisetzung niedermolekularer Bestandteile und damit verbundene osmotische Lyse der Zelle. Die aktive Form des Proteins ist ein Heptamer.	IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Für das Toxin wurden intrazellulär und extrazellulär zwischen 4 h und 24 h nach der Behandlung stark verringere Proteinmengen gemessen. Im Direktverdau konnte dies bestätigt werden.						
hIb	<b>Beta-hemolysin</b> Das Exotoxin ist eine Phospholipase C und führt zur Zellmembranruptur der Blutzellmembranen mit hoher spezifischer Aktivität gegen Sphingomyeline. Zusätzlich katalysiert das Enzym mehrere Teilschritte im Glycerophospholipidstoffwechsel der Bakterienzelle zur Bildung von Sphingolipiden. Dabei ist es mehrheitlich im Extrazellularraum lokalisiert.	IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Dieses Toxin zeigte intrazellulär und extrazellulär zwischen 4 h und 24 h nach der Behandlung stark verringerte Proteinmengen. Im Direktverdau der EC Proben konnte dies bestätigt werden.						
SACOL 2004, SACOL 2006	<b>Uncharacterized leukocidin-like protein 1 und 2</b> Diese beiden Leukozidin-ähnlichen Proteine führen zur Zytolyse der Zielzellen, sind aber bisher wenig untersucht.	IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Für beide Proteine wurden extrazellulär zwischen 4 h und 24 h nach der Behandlung stark verringerte Proteinmengen gemessen.						

### 7.4.3.3 Serin-Proteasen/ Extrazelluläre Proteine



Die Serin-Proteasen zählen zu den extrazellulären Enzymen von *S. aureus*, die bei Infektionen vermehrt auftreten und Antikörperreaktionen auslösen. Für den in dieser Arbeit untersuchten Referenzstamm *S. aureus* COL konnten mittels 2D-DIGE und Direktverdau fünf Serin-Proteasen (SplA-E) identifiziert werden. SplB-E zeigen nach Behandlung zwischen 4 h und 24 h EC

Abbildung 32: Superantigen-Enterotoxine

verminderte Proteinmengen und für SplA konnte eine Verminderung im Direktverdau 8 h nach Behandlung gemessen werden.

Tabelle 31: Serin-Proteasen, Myrtil stand. spezifische Veränderungen

Darstellung der Proteine mit Genbezeichnung und Funktion, sowie der ermittelten Myrtil stand.-spezifischen Veränderungen der Proteinmengen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Behandlung in der 2D-DIGE (InGel) und <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O Direktverdau 8 h nach Behandlung. IC: intrazelluläre Proteine, EC: extrazelluläre Proteine, DV 8 h: Direktverdau bei t[h]=8, grün: verminderte Proteinmenge, rot: erhöhte Proteinmenge Pfeil: Gesamttendenz der Proteinmenge.

Gen	Identifiziertes Protein Funktion, Lokalisation	Myrtil stand. spezifische Veränderung in 2D DIGE und <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O Direktverdau														
<b>splA</b>	<b>Serin Protease A</b> Serin Proteasen werden sekretiert und können bei den Hostzellen Antikörperreaktion auslösen.	<table border="1"> <tr> <td>IC</td> <td></td> <td>1h</td> <td>4h</td> <td>8h</td> <td>24h</td> <td>DV 8h</td> </tr> <tr> <td>EC</td> <td>↓</td> <td>1h</td> <td>4h</td> <td>8h</td> <td>24h</td> <td>DV 8h</td> </tr> </table> <p>Für das Enzym konnte im Direktverdau von EC 8 h nach Behandlung eine deutliche Verringerung der Proteinmengen gezeigt werden.</p>	IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h	EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h										
EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h										
<b>splB</b>	<b>Serin Protease B</b> Siehe splA.	<table border="1"> <tr> <td>IC</td> <td></td> <td>1h</td> <td>4h</td> <td>8h</td> <td>24h</td> <td>DV 8h</td> </tr> <tr> <td>EC</td> <td>↓</td> <td>1h</td> <td>4h</td> <td>8h</td> <td>24h</td> <td>DV 8h</td> </tr> </table> <p>Das Enzym zeigte EC zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung verringerte Proteinmengen. Dies konnte im Direktverdau bestätigt werden.</p>	IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h	EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h										
EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h										
<b>splC</b>	<b>Serin Protease C</b> Siehe splA.	<table border="1"> <tr> <td>IC</td> <td></td> <td>1h</td> <td>4h</td> <td>8h</td> <td>24h</td> <td>DV 8h</td> </tr> <tr> <td>EC</td> <td>↓</td> <td>1h</td> <td>4h</td> <td>8h</td> <td>24h</td> <td>DV 8h</td> </tr> </table> <p>Das Enzym zeigte EC zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung verringerte Proteinmengen. Dies konnte im Direktverdau bestätigt werden.</p>	IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h	EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h										
EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h										



Gen	Identifiziertes Protein Funktion, Lokalisation	Myrtol stand. spezifische Veränderung in 2D DIGE und <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O Direktverdau						
splD	Serin Protease D Siehe splA.	IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
splE	Serin Protease E Siehe splA.	IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h

Das Enzym zeigte EC zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung verringerte Proteinmengen. Dies konnte im Direktverdau bestätigt werden.

Das Enzym zeigte EC zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung verringerte Proteinmengen.

### 7.4.3.4 Zellwand- und Zellmembransynthese

Mehrere Enzyme der Zellwand- und Zellmembransynthese zeigen nach Behandlung mit Myrtol stand. veränderte Proteinmengen.

Für die beiden Enzyme glmS und glmU konnte intrazellulär (IC) eine Verminderung der Proteinmengen gezeigt werden, die auch durch den

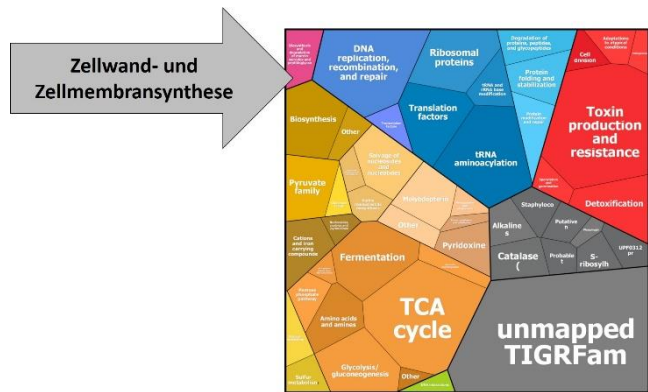


Abbildung 33: Zellwand- und Zellmembransynthese Treemaps

Direktverdau bestätigt wurde. Beide Enzyme katalysieren Schritte in der Zellwandbildung. Dabei wird von GlmS das Glucosamin-6 Phosphat gebildet -in der Zellwandsynthese als Vorstufe genutzt und über GlmM und GlmU mit UDP beladen [13, 86, 156].

Das am häufigsten identifizierte Protein in der vorliegenden Arbeit ist das Plasmin sensitive surface Protein (Pls oder SACOL0050). Es wurde insgesamt in 19 verschiedenen regulierten Spots der extrazellulären Proteine identifiziert und zeigt eine deutliche Erhöhung der Proteinmengen nach Behandlung. Ein weiteres mehrfach identifiziertes Protein ist das Penicillin binding Protein MecA. Für dieses Protein zeigten die Spots z.T. Unterschiede in der Tendenz. Durch Analyse der Peptidmengen der Spots und Vergleich mit dem Direktverdau konnte zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung eine Zunahme der extrazellulären Proteinmengen im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden.

Ebenfalls für die Pathogenität von *S. aureus* verantwortlich sind die Adhesine aus der Gruppe der Serine-Aspartat repeat containing Proteine [97]. Im Rahmen der Pathway-Analyse

konnten die beiden Vertreter SdrH (SACOL2019) und sdrE identifiziert werden. Sie zeigen nach Behandlung deutlich erhöhte Proteinmengen. Für das membrangebundene Enzym Lip1 (Lipase) zeigt sich eine deutliche Zunahme der extrazellulären Proteinmengen. Ein weiteres Protein aus dem Lipidstoffwechsel ist SACOL0212. Es ist an der  $\beta$ -Oxidation beteiligt und zeigt in den IC Proben zwischen 8 h und 24 h nach Behandlung ebenfalls erhöhte Proteinmengen. Das transmembranäre Protein sasD wurde zu den Zeitpunkten zwischen 4 h und 24 h EC vermindert identifiziert. In Tabelle 32 sind die untersuchten Proteine mit Funktion und Regulation nach Behandlung mit Myrtilol stand. dargestellt.

**Tabelle 32: Zellwand/Zellmembransynthese, Myrtilol stand. spezifische Veränderungen**

Darstellung der Proteine mit Genbezeichnung und Funktion, sowie der ermittelten Myrtilol stand.-spezifischen Veränderungen der Proteinmengen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Behandlung in der 2D-DIGE (InGel) und  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  Direktverdau 8 h nach Behandlung. IC: intrazelluläre Proteine, EC: extrazelluläre Proteine, DV 8 h: Direktverdau bei t[h]=8, grün: verminderte Proteinmenge, rot: erhöhte Proteinmenge Pfeil: Gesamttendenz der Proteinmenge.

Gen	Identifiziertes Protein Funktion, Lokalisation	Myrtilol stand. spezifische Veränderung in 2D DIGE und $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Direktverdau						
<b>glmS</b>	<b>Glutamin Fructose 6-Phosphat-isomerase</b> Katalysiert den ersten Schritt im Hexosamin Metabolismus durch Umwandlung von Fructose-6P in Glucosamin-6P unter Verwendung von Glutamin als N-Quelle. Das Enzym ist an der Zellwandsynthese beteiligt.	IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Das Protein zeigte intrazellulär zwischen 8 h und 24 h und extrazellulär zwischen 1 h und 24 h nach Behandlung deutlich verringerte Proteinmengen. Im Direktverdau der IC und EC Proben konnte dies bestätigt werden.						
<b>glmU</b>	<b>bifunktionelles Protein glmU</b> Das Enzym katalysiert die letzten beiden Schritte der „de novo“-Synthese des N-acetyl Glucosamin einem Teil der äußeren Zellmembran.	IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Für das Enzym konnten intrazellulär zwischen 4 h und 24 h nach der Behandlung verringerte Proteinmengen gezeigt werden. Im Direktverdau der IC Proben konnte dies bestätigt werden.						
<b>sdrE</b>	<b>Serin-Aspartat repeat Protein E</b> Das Protein ist integraler Bestandteil der Bakterienmembran.	IC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Dieses transmembranäre Protein zeigte extrazellulär zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung erhöhte Proteinmengen. Im Direktverdau zeigte das Protein IC und EC erhöhte Proteinmengen.						
<b>SACOL 2019, sdrH</b>	<b>Serin-Aspartat repeat Protein H</b> Das Protein ist integraler Bestandteil der Bakterienmembran.	IC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Dieses transmembranäre Protein zeigte extrazellulär zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung erhöhte Proteinmengen. Im Direktverdau zeigte das Protein IC und EC ebenfalls erhöhte Proteinmengen.						

## Ergebnisse Myrtol standardisiert

Gen	Identifiziertes Protein Funktion, Lokalisation	Myrtol stand. spezifische Veränderung in 2D DIGE und <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O Direktverdau						
<b>atl</b>	<b>bifunktionelles Autolysin</b> Das Enzym ist beteiligt an der Spaltung von Peptidoglycan-Verbindungen der Zellwände und Brücken zwischen Mutter- und Tochterzelle bei der Zellteilung.	IC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Das Protein wurde extrazellulär als Teil von Mehrfachidentifikationen detektiert. Aufgrund der Identifikation mit deutlich abweichendem Molekulargewicht (bspw. durch Modifikation, Signalpeptide) ist keine eindeutige Angabe der Tendenz möglich. Im Direktverdau 8 h nach Behandlung konnten deutlich erhöhte Proteinmengen für IC und EC im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden.						
<b>mecA</b>	<b>Penicillin binding Protein 2,</b> Das Enzym ist wesentlich an den Peptidoglycansynthese beteiligt, ist ein transmembranäres Protein und ermöglicht Resistenzen gegen Betalactamantibiotika	IC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Das Protein wurde extrazellulär in mehreren Spots als Teil von Mehrfachidentifikationen identifiziert. Zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung zeigte es erhöhte Proteinmengen. Dies konnte im Direktverdau bestätigt werden. IC zeigte es im Direktverdau ebenfalls erhöhte Proteinmengen.						
<b>lip1</b>	<b>Lipase, Lipase 1,</b> Das Enzym ist membranständig oder wird von den Bakterienzellen sekretiert und ist dann extrazellulär lokalisiert.	IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Für dieses Enzym wurde extrazellulär 1 h nach Behandlung verringerte und anschließend zwischen 4 h und 24 h deutlich erhöhte Proteinmengen im Vergleich zur Kontrolle gezeigt. Im Direktverdau konnte dies in einem Replikat bestätigt werden.						
<b>SACOL 0050, PLS</b>	<b>Methicillin resistance surface protein, Plasmin sensitives surface Protein</b> Das Protein ist in der Zellwand und dem Extrazellularraum lokalisiert.	IC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Das Protein zeigt extrazellulär zwischen 4 h und 24 h in mehreren Spots erhöhte Proteinmengen und ist das am häufigsten identifizierte Protein im Rahmen dieser Arbeit (in 19 Spots identifiziert). Dies konnte im Direktverdau bestätigt werden. Intrazellulär zeigte es im Direktverdau erhöhte Proteinmengen.						
<b>SACOL 0212</b>	<b>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase protein</b> Das Enzym ist an der β-Oxidation der Fettsäuren beteiligt und intrazellulär lokalisiert.	IC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Für das Enzym wurden intrazellulär zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung deutlich erhöhte Proteinmengen gezeigt. Im Direktverdau konnte dies in beiden Proben bestätigt werden.						

Gen	Identifiziertes Protein Funktion, Lokalisation	Myrtol stand. spezifische Veränderung in 2D DIGE und <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O Direktverdau
-----	---	---

**SACOL 0211, th1** **Acetyl-CoA Acetyltransferase,**  
Das Enzym ist eine transmembranäre Acyltransferase.

IC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
EC		1h	4h	8h	24h	DV 8h

Für das Enzym wurden als Teil einer Mehrfachidentifikation zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung IC erhöhte Proteinmengen gezeigt.

**SACOL 0426** **Acetyl-CoA Acyltransferase**  
Das Enzym ist eine cytoplasmatische Acyltransferase.

IC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
EC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h

Dieses Enzym zeigte intrazellulär und extrazellulär, als Teil von Mehrfachidentifikation zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung erhöhte Proteinmengen. Im Direktverdau konnte dies für IC bestätigt werden. Extrazellulär zeigten sich im Direktverdau verminderte Proteinmengen im Vergleich zur Kontrolle.

### 7.4.3.5 Zytoplasmatische Proteine

Es konnten sowohl Enzyme des Energiehaushaltes als auch eine Reihe von cytosolischen Proteinen mit cytotoxischen Eigenschaften identifiziert werden. Diese können von Bakterien ausgeschüttet werden und sowohl Adhärenz als auch die Lyse der Hostzellen fördern [54]. UreB und UreE sind wesentlich an der Funktion der Urease beteiligt. Beide Proteine zeigen intrazellulär im gesamten Messzeitraum nach Behandlung deutlich erhöhte Proteinmengen. Für die Formiat Acetyltransferase pflB wurden über den gesamten Messzeitraum IC und EC geringere Proteinmengen in der 2D DIGE und dem Direktverdau gemessen. Die am Citratzyklus beteiligten Enzyme Mqo1 und 2 zeigten IC durch die Behandlung mit Myrtol stand. erhöhte Proteinmengen. Ebenfalls identifiziert werden konnte die (S)-Acetoin-bildende Diacetyl Reductase ButA. Sie wurde 1 h nach Behandlung IC mit erhöhten und im Anschluss zwischen 4 h und 24 h verminderten Proteinmengen gemessen. Extrazellulär verhielten sich die gemessenen Proteinmengen revers. Die beiden Enzyme TpiA und GapA1 zeigen zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung erhöhte Proteinmengen, ebenso wie die Transaldolase Tal IC nach 1 h. Anschließend wurden für Tal verminderte Proteinmengen gemessen. Alle Ergebnisse konnten im Direktverdau bestätigt werden.

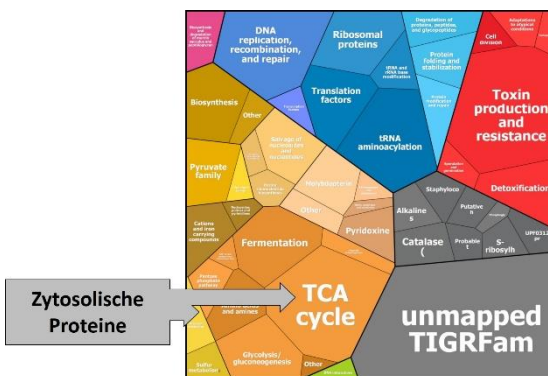


Abbildung 34: Zytoplasmatische Proteine Treemaps

Es konnten sowohl Enzyme des Energiehaushaltes als auch eine Reihe von cytosolischen Proteinen mit cytotoxischen Eigenschaften identifiziert werden. Diese können von Bakterien ausgeschüttet werden und sowohl Adhärenz als auch die Lyse der Hostzellen fördern [54]. UreB und UreE sind wesentlich an der Funktion der Urease beteiligt. Beide Proteine zeigen intrazellulär im gesamten Messzeitraum nach Behandlung deutlich erhöhte Proteinmengen. Für die Formiat Acetyltransferase pflB wurden über den gesamten Messzeitraum IC und EC geringere Proteinmengen in der 2D DIGE und dem Direktverdau gemessen. Die am Citratzyklus beteiligten Enzyme Mqo1 und 2 zeigten IC durch die Behandlung mit Myrtol stand. erhöhte Proteinmengen. Ebenfalls identifiziert werden konnte die (S)-Acetoin-bildende Diacetyl Reductase ButA. Sie wurde 1 h nach Behandlung IC mit erhöhten und im Anschluss zwischen 4 h und 24 h verminderten Proteinmengen gemessen. Extrazellulär verhielten sich die gemessenen Proteinmengen revers. Die beiden Enzyme TpiA und GapA1 zeigen zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung erhöhte Proteinmengen, ebenso wie die Transaldolase Tal IC nach 1 h. Anschließend wurden für Tal verminderte Proteinmengen gemessen. Alle Ergebnisse konnten im Direktverdau bestätigt werden.

## Ergebnisse Myrtol standardisiert

**Tabelle 33: Zytoplasmatische Proteine, Myrtol stand. spezifische Veränderungen**

Darstellung der Proteine mit Genbezeichnung und Funktion, sowie der ermittelten Myrtol stand.-spezifischen Veränderungen der Proteinmengen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Behandlung in der 2D-DIGE (InGel) und <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O Direktverdau 8 h nach Behandlung. IC: intrazelluläre Proteine, EC: extrazelluläre Proteine, DV 8 h: Direktverdau bei t[h]=8, grün: verminderte Proteinmenge, rot: erhöhte Proteinmenge Pfeil: Gesamttendenz der Proteinmenge.

Gen	Identifiziertes Protein Funktion, Lokalisation	Myrtol stand. spezifische Veränderung in 2D DIGE und <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O Direktverdau						
<b>ureB</b>	<b>Urease Untereinheit Beta</b> Die Untereinheit Beta ist am 1. Schritt der Synthese von CO <sub>2</sub> und NH <sub>3</sub> aus Harnstoff beteiligt.	IC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Für das Enzym wurden intrazellulär zwischen 1 h und 24 h nach der Behandlung stark erhöhte Proteinmengen gezeigt. Im Direktverdau der IC Proben konnte dies bestätigt werden. Extrazellulär zeigte es im Direktverdau ebenfalls erhöhte Proteinmengen.						
<b>ureE</b>	<b>Urease akzessorisches Protein E</b> Nickel-bindender Bestandteil der Metallocenter Region der Urease.	IC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Das Enzym zeigte intrazellulär zwischen 1 h und 24 h nach der Behandlung stark erhöhte Proteinmengen. Im Direktverdau der IC Proben konnte dies bestätigt werden. Extrazellulär zeigte es im Direktverdau ebenfalls erhöhte Proteinmengen.						
<b>pflB</b>	<b>Formiat Acetyltransferase</b> Wird durch ein pfl-aktivierendes Enzym unter anaeroben Bedingungen über die Bildung eines organischen freien Radikals aktiviert. Bei Sauerstoffexposition hingegen wird der Stoffwechselweg der Pyruvat Gärung aktiviert.	IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Für das Enzym wurden intrazellulär und extrazellulär zwischen 4 h und 24 h nach der Behandlung deutlich verringerte Proteinmengen. Im Direktverdau der IC Proben konnte dies bestätigt werden.						
<b>mqo1</b>	<b>Malat-Chinonoxidoreduktase</b> Das Enzym ist Bestandteil des Citrat-Zyklus und in den 1. Schritt der Synthese von Oxalacetat aus Malat involviert.	IC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Das Enzym zeigte intrazellulär nach Analyse von 2D-DIGE und Direktverdau zwischen 4 h und 24 h nach der Behandlung erhöhte Proteinmengen.						
<b>mqo2</b>	<b>Malat-Chinonoxidoreduktase</b> Das Enzym ist Bestandteil des Citrat-Zyklus und in den ersten Schritt der Synthese von Oxalacetat aus Malat involviert.	IC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Für das Enzym wurden intrazellulär nach Analyse von 2D-DIGE zwischen 4 h und 24 h nach der Behandlung erhöhte Proteinmengen gezeigt.						

Gen	Identifiziertes Protein Funktion, Lokalisation	Myrtol stand. spezifische Veränderung in 2D DIGE und <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O Direktverdau					
-----	---	---	--	--	--	--	--

**butA** (S) – Acetoin bildende Diacetyl Reductase  
Katalysiert die Reduktion von 2,3-Butandiol zu (S)-Acetoin irreversibel.

IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
EC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h

Für das Enzym wurde intrazellulär 1 h nach der Behandlung erhöhte und im Anschluss zwischen 4 h und 24 h verringerte Proteinmengen gezeigt. Extrazellulär zeigte das Protein zunächst nach 1 h verringerte und im Anschluss zwischen 4 h und 24 h nach der Behandlung erhöhte Proteinmengen.. Im Direktverdau der IC und EC Proben konnte dies bestätigt werden.

**tpiA** Triosephosphatisomerase  
Enzym der Gluconeogenese, katalysiert die Umwandlung von Dihydroxyaceton zu D-Glycerinaldehyd 3-Phosphat.

IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
EC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h

Das Enzym zeigte extrazellulär zwischen 4 h und 24 h nach der Behandlung erhöhte Proteinmengen.. Im Direktverdau der EC Proben konnte dies bestätigt werden.

**gapA1/  
gap** Glycerinaldehyd 3-phosphatdehydrogenase  
Das Enzym katalysiert die oxidative Phosphorylierung von Glycerinaldehyd 3-Phosphat zu 1,3 Bisphosphoglycerat unter Verwendung des Cofaktors NAD.

IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
EC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h

Für das Enzym wurden extrazellulär zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung erhöhte Proteinmengen gezeigt. Im Direktverdau der EC Proben konnte dies bestätigt werden. Zusätzlich zeigte der Direktverdau verringerte Proteinmengen nach 8 h.

**tal** Transaldolase  
Das Enzym katalysiert eine Teilreaktion des Pentosephosphatweges.

IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
EC		1h	4h	8h	24h	DV 8h

Das Enzym zeigt intrazellulär nach 1 h erhöhte und im Anschluss zwischen 4 h und 24 h nach der Behandlung verringerte Proteinmengen. Im Direktverdau der IC Proben konnte dies bestätigt werden.

### 7.4.3.6 Diverse Proteine

In der nachfolgenden Tabelle sind weitere identifizierte Proteine mit der gemessenen Veränderung der Proteinmengen nach Behandlung aufgelistet. Sie wurden in der Pathway Analyse verschiedenen Stoffwechselfunktionen zugeordnet.

## Ergebnisse Myrtol standardisiert

**Abbildung 35: Proteinidentifikationen verschiedener Stoffwechselwege**

Darstellung der Proteine mit Genbezeichnung und Funktion, sowie der ermittelten Myrtol stand.-spezifischen Veränderungen der Proteinmengen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Behandlung in der 2D-DIGE (InGel) und <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O Direktverdau 8 h nach Behandlung. IC: intrazelluläre Proteine, EC: extrazelluläre Proteine, DV 8 h: Direktverdau bei t[h]=8, grün: verminderte Proteinmenge, rot: erhöhte Proteinmenge Pfeil: Gesamttendenz der Proteinmenge.

Gen	Identifiziertes Protein Funktion, Lokalisation	Myrtol stand. spezifische Veränderung in 2D DIGE und <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O Direktverdau						
<b>ftsZ</b>	<b>Cell division protein</b> Das Protein ist essentiell an der Zellteilung beteiligt. Es bildet eine kontraktile Ringstruktur an der Linie der Zellteilung (Z-Ring).	IC	1h	4h	8h	24h	DV 8h	
		EC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Das Protein wurde intrazellulär als Teil von Mehrfachidentifikationen detektiert. Zwischen 8 h und 24 h nach Behandlung zeigte es IC verringerte Proteinmengen. Im Direktverdau 8 h wurde eine erhöhte Proteinmenge gemessen. Extrazellulär zeigte das Protein zwischen 4 h und 24 h erhöhte Proteinmengen.						
<b>ssB</b>	<b>Single- stranded DNA- binding protein 1</b> Das Protein ist wesentlich am DNA Metabolismus beteiligt. Es bindet an ssDNA und weitere Proteine und ermöglicht die Allokation in der Replikation, Rekombination und DNA-Reparatur.	IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Das Protein zeigte zwischen 4 h und 24 intrazellulär und extrazellulär verringerte Proteinmengen. Im Direktverdau nach 8 h zeigten sich IC erhöhte und EC verringerte Proteinmengen.						
<b>recA</b>	<b>Protein RecA</b> Das Enzym katalysiert ATP-abhängig die Bindung von Einzelstrang-DNA an Doppelstrang-DNA, sowie die Hybridisierung von Einzelstrang-DNA unter Hydrolyse des ATP.	IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Das Enzym zeigte intrazellulär zwischen 1 h und 24 h nach der Behandlung verringerte Proteinmengen. Im Direktverdau zeigten sich keine eindeutigen Ergebnisse.						
<b>polA</b>	<b>DNA polymerase I</b> Das Enzym katalysiert der DNA-Polymerisation und wirkt als 5'-3' Exonuklease.	IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Das Enzym zeigt intrazellulär zwischen 1 h und 24 h nach der Behandlung verringerte Proteinmengen. Im Direktverdau zeigten sich keine eindeutigen Ergebnisse.						
<b>katA</b>	<b>Catalase</b> Das Enzym schützt die Zelle vor toxischem H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durch Katalyse der Spaltung zu H <sub>2</sub> O und O <sub>2</sub> .	IC		1h	4h	8h	24h	DV 8h
		EC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
		Für das Protein wurden extrazellulär zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung erhöhte Proteinmengen gezeigt.						

Gen	Identifiziertes Protein Funktion, Lokalisation	Myrtol stand. spezifische Veränderung in 2D DIGE und <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O Direktverdau
-----	---	---

**bcp** **Bacterioferritin comigratory protein**  
Das Protein ist Teil von antioxydativen Redoxsystemen in der Homöostase der Zelle.

IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
EC		1h	4h	8h	24h	DV 8h

Das Protein wurde IC als Teil von Mehrfachidentifikationen detektiert. Das Protein zeigte zwischen 4 h und 24 h extrazellulär verringerte Proteinmengen. Der Direktverdau 8 h bestätigt dies.

**fabD** **Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase**  
Das Enzym ist Teil der Fettsäuresynthese und wird dem Lipidmetabolismus zugeordnet.

IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
EC		1h	4h	8h	24h	DV 8h

Das Enzym zeigte intrazellulär zwischen 4 h und 8 h erhöhte und nach 24 h durch die Behandlung verringerte Proteinmengen im Vergleich zur Kontrolle. Im Direktverdau konnte IC eine Verringerung der Proteinmengen gezeigt werden.

**fabG** **3-oxoacyl-acyl-carrier-protein reductase FabG**  
Das Enzym ist Teil der Fettsäuresynthese und wird dem Lipidmetabolismus zugeordnet.

IC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h
EC		1h	4h	8h	24h	DV 8h

Für das Enzym wurden intrazellulär zwischen 1 h und 24 h nach Behandlung erhöhte Proteinmengen gezeigt. Im Direktverdau 8 h IC konnte dies bestätigt werden.

**fabH** **3-oxoacyl-acyl-carrier-protein synthase 3**  
Das Enzym ist Teil der Fettsäuresynthese und wird dem Lipidmetabolismus zugeordnet.

IC	↓	1h	4h	8h	24h	DV 8h
EC	↑	1h	4h	8h	24h	DV 8h

Das Protein zeigte extrazellulär zwischen 4 h und 24 h erhöhte Proteinmengen. Der Direktverdau 8 h zeigte intrazellulär eine Verringerung der Proteinmengen.

## 7.5 Proteinidentifikation Direktverdau

Aus dem Direktverdau der intrazellulären und extrazellulären Proteine 8 h nach Behandlung mit Myrtol stand. konnten insgesamt 1492 verschiedene Proteine identifiziert werden. 425

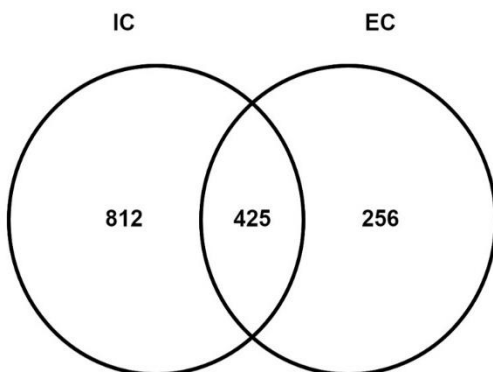


Abbildung 36: Venn-Diagramm Direktverdau 8 h

IC, intrazelluläre Proteine; EC, extrazelluläre Proteine. In der Abbildung ist die Anzahl der identifizierten Proteine aus den Proben 8 h nach der Behandlung mit Myrtol stand. und der entsprechenden Kontrolle dargestellt. Insgesamt konnten 1492 Proteine identifiziert werden, 1237 Proteine bei den IC Proben und 682 bei den EC Proben. 425 der Proteine konnten IC und EC identifiziert werden.



der Proteine wurden sowohl intrazellulär als auch extrazellulär identifiziert. Abbildung 36 zeigt die Anzahl der jeweils identifizierten Proteine mit ihrer Schnittmenge.

### 7.5.1 Bestätigung der Ergebnisse aus dem 2D-DIGE -Experiment

Die Proteine aus dem 2D-DIGE InGel Verdau wurden mittels Pathway-Analyse einem Stoffwechselweg zugeordnet. Aufgrund der beschriebenen Mehrfachidentifikationen wurde der Direktverdau 8 h nach Behandlung genutzt um die Tendenz der Ergebnisse zu verifizieren. Es wurden 54 Proteine nach Pathway-Analyse mittels Direktverdau überprüft, 44 der untersuchten Proteine konnten im Direktverdau identifiziert werden. Für 29 Proteine konnte mindestens eine Tendenz (IC oder EC) aus dem InGel Verdau bestätigt werden. Eine Auflistung der Proteine befindet sich in Tabelle 34. Zusätzlich sind die ermittelten Verhältnisse der Proteinmengen im Vergleich zur Kontrolle und zu den Proteinen aus dem InGel Verdau in Tabelle 44 im Anhang Seite 151 dargestellt.

**Tabelle 34: Bestätigung der Proteinidentifikationen durch <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O-Direktverdau**

Die Tabelle zeigt die im <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O Direktverdau 8 h nach Behandlung speziell untersuchten Proteine aus den Pathway Analysen der InGel Proteinidentifikationen. Angabe der Tendenz aus dem Direktverdau im Vergleich zum InGel Verdau. Das identifizierte Protein atl ist aufgrund der Abweichung des Molekulargewichts (MW) im InGel Verdau hier nicht aufgeführt. 1) mindestens eine intrazelluläre oder extrazelluläre Probe konnte in der Tendenz bestätigt werden.

Tendenz aus InGel Verdau bestätigt <sup>1</sup>		Tendenz aus InGel Verdau nicht bestätigt	Im DV nicht identifiziert
Bcp	SACOL 0212	FabD	ACCC
ButA	SACOL 0426	FabH	Lip 2
FabG	Sdre	KatA	SasD
GapA1/ Gap	Seb	FtsZ	Sea
GlmS	SplA	LukD	Sec
GlmU	SplB	Mqo2	See
Hlb	SplC	PoIA	Seh
HlgB	SplD	RecA	Sei
HlgC	SsaA	SACOL 0211, th1	Set
Hly	SsB	SACOL 2004	SplE
Lip 1	Tal	SACOL 2006	
MecA	TpiA	Sek	
Mqo1	UreB	SplE	
PfIB	UreE		
SACOL 0050			

### 7.5.2 Ergänzende Proteinidentifikationen

Die Analyse weiterer Identifikationen aus dem <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>O-Direktverdau zeigte veränderte Proteinmengen einer Reihe weiterer Proteine, die im InGel Verdau nicht identifiziert wurden. Beispielsweise konnte eine deutliche Erhöhung der intrazellulären Proteinmenge von UreA und eine Verringerung der Proteinmengen für GlmM 8 h nach Behandlung mit Myrtol stand. im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Detaillierte Darstellungen zeigen Abbildung 38 auf S. 112 und Abbildung 39 auf S.116.

## 8 Diskussion

### 8.1 Multiplex PCR Analyse/Typisierung

Mittels Multiplex PCR-Analyse wurde für die verwendeten Patientenisolat und den Referenzstamm *S. aureus* COL ein genetisches Profil erstellt und die Zugehörigkeit zur Familie *Staphylococcus aureus* bestätigt. Die PCR-Analysen sind dafür eine etablierte Methode [70, 72, 73]. Anhand weniger Gene kann hier bei relativ geringem Aufwand die Typisierung der Isolate und des Referenzstammes vorgenommen werden.

Alle vier getesteten Isolate wurden der agr Gruppe 1 zugeordnet. Als zentraler Transkriptionsregulator beeinflusst Agr die Genexpression vieler potentiell virulenter Faktoren. Die Gruppe 1 wird häufig in Verbindung mit Erkrankungen gebracht, die Superantigen-Enterotoxin-vermittelt sind [70, 79, 157].

Holtfreter et. al konnten 107 nasal entnommene *S. aureus* Isolate von Trägern aus dem Raum Vorpommern mittels spa-Typisierung den verschiedenen clonal clusters (CC) zuordnen und jeweils ein Profil der Virulenzfaktoren der Isolate mit Multiplex PCR erstellen [70]. Im Rahmen der umfangreichen epidemiologischen Studie SHIP (Study of Health in Pommerania) wurden zudem *S. aureus* Isolate aus 1024 Nasenabstrichen 30 verschiedenen CCs zugeordnet [73]. 78% aller Isolate sind in den sieben von insgesamt 30 am häufigsten vertretenen CCs enthalten. Die drei hier verwendeten Isolate und der Referenzstamm COL konnten CC8 zugeordnet werden, welcher ca. 9,4 % aller getesteten Isolate enthält [73]. Die genetische Kombination der Superantigen-Enterotoxine vom Patientenisolat A1 (sed, j und r) wurde bei Patientenproben aus Mecklenburg-Vorpommern sehr häufig festgestellt [70].

Die Zuordnung der verwendeten Isolate zu dem epidemiologisch und klinisch [25] sehr wichtigen CC8, zeigt eine hohe Relevanz und Validität der durchgeführten Experimente für die im weiteren Verlauf diskutierten klinischen Therapiemöglichkeiten.

## 8.2 BNO 101

Zur Untersuchung antimikrobieller Effekte von BNO 101 auf *S. aureus* wurden Wachstumskurven erstellt und Experimente zur CFU-Bestimmung durchgeführt. Aufgrund der Untersuchung in Flüssigkultur wurde die flüssige Wirkstoffform gewählt.

Kontrollkulturen zur Testung des enthaltenen Lösungsmittels Ethanol in Konzentrationen, wie sie bei Behandlung mit BNO 101 Tropfen vorherrschen, zeigten antimikrobielle Effekte und bestätigen die Ergebnisse von Maune S. [100]. Analog zu der Arbeit von Maune S. wurden nachfolgend durch Lyophilisation verlässlich alle flüssigen Bestandteile inklusive des gelösten Ethanols aus den Tropfen entfernt. Die direkten Effekte der Lyophilisation auf die enthaltenen ätherischen Öle sind nicht explizit untersucht worden. Aus diesem Grund ließ sich eine Veränderung der Wirksamkeit nicht sicher ausschließen. Die Untersuchungen von Maune S. zeigten nach Lyophilisation antimikrobielle Effekte, sodass hier von ausreichender Wirksamkeit auszugehen war. Nach methodischen Überlegungen wurden die CFU-Experimente mit vier Messungen über einen Zeitraum von 24 h nach Behandlung durchgeführt. Dies ermöglichte erstmals die Untersuchung der Effekte des Medikaments in einer flüssigen Bakterienkultur zu verschiedenen Zeitpunkten.

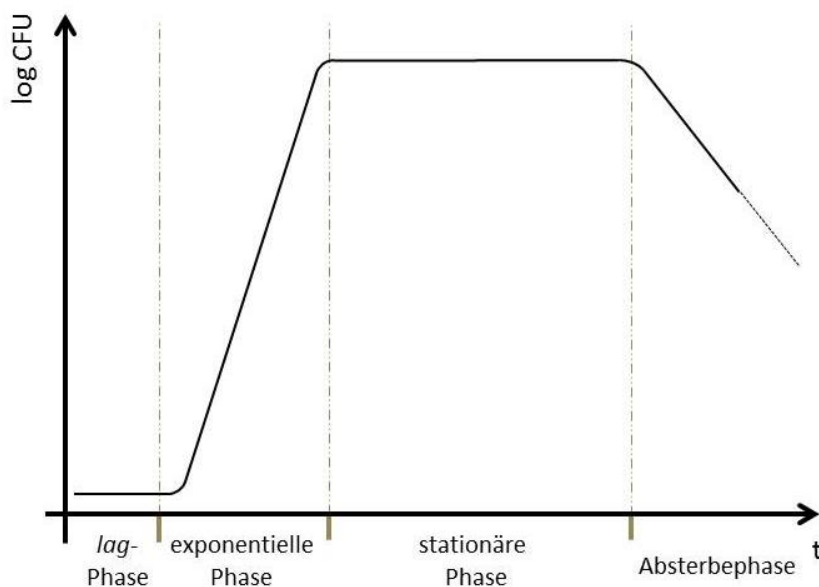
Unter Behandlung mit BNO 101 konnten in keinem der durchgeführten Experimente antimikrobielle Effekte gezeigt werden. Im Gegensatz dazu konnte Maune S. bei einer Verdünnung von 1:1000 (0,1% BNO 101) Überlebensraten für *S. aureus* von unter 10% ermitteln. Ursachen für die Unterschiede können bspw. die Art der Lyophilisation oder tatsächlich fehlende Effekte gegen die verwendeten Bakterienstämme bspw. selektionsbedingt, sein. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die belegten positiven Effekte des Medikamentes auf Symptome und Gesundheitsbefinden von Patienten mit ARS und CRS [85], nicht durch die Reduktion des häufig beteiligten Bakteriums *S. aureus* begründet sind. Ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen ist die Verwendung des Inhaltes der kapselförmigen BNO 101 Zubereitungen und eine Wiederholung der Experimente mit anderen Isolaten. Aufgrund der fehlenden antimikrobiellen Wirkung wurde im Rahmen dieser Arbeit auf weitere Untersuchungen von BNO 101-behandelten *S. aureus* Zellen verzichtet. Der Fokus dieser Arbeit wurde auf die Experimente mit Myrtol stand. gelegt, welches bereits in parallelen Vorexperimenten eindeutige bakteriostatische Effekte und damit eine höhere Wirksamkeit gezeigt hatte.

## 8.3 Myrtol standardisiert

Für die feste Wirkstoffkombination in Myrtol stand. konnte in klinischen Studien bereits eine gute Wirksamkeit bei der Behandlung von akuten und chronischen Bronchitiden und Sinusitiden gezeigt werden [45, 57, 99]. Während die Wirkung vor Allem mit der Verbesserung der mukozillären Clearance erklärt wird, sind molekulare Ursachen und Umfang der antimikrobiellen Effekte wenig bekannt [172].

### 8.3.1 Wachstumskurven und CFU-Bestimmung

Analog zu den Untersuchungen mit BNO 101 wurden Wachstumskurven erstellt und Experimente zur CFU-Bestimmung durchgeführt, um antimikrobielle Effekte von Myrtol stand. auf *S. aureus* zu untersuchen. Für die Kultivierung von Bakterien in flüssigen Nährmedien sind charakteristische Verläufe des Wachstums bekannt. (Abbildung 37) Vor Allem das exponentielle Wachstum in der zweiten Phase ist bei der Analyse von Effekten der Medikamente im Rahmen dieser Arbeit relevant. Die sich durch Zweiteilung vermehrenden Bakterien verdoppeln die Zellzahlen hier bei jedem Zellzyklus. Sie sind als Standardzellen mit gleicher Größe und Proteingehalt zu bezeichnen. Auch das Niveau der stationären Phase mit dem Gleichgewicht zwischen Zellteilung und -tod spielt aufgrund ihrer verhältnismäßig langen Dauer eine große Rolle [52].



**Abbildung 37: Ideale Wachstumskurve einer Bakterienkultur in Flüssigmedium**

CFU, colony forming units; Das bakterielle Wachstum im geschlossenen System einer statischen Kultur zeigt im Idealfall 4 Phasen. Nach Gewöhnung an die Kulturbedingungen in der Latenz(lag) -Phase, kommt es zu exponentiellem Wachstum, dargestellt durch einen linearen Verlauf bei log-Skalierung der y-Achse. Nach Erschöpfung der verwertbaren Nährstoffe und Anhäufung wachstumshemmender Stoffwechselendprodukte kommt es zur stationären Phase, in der Teilungsrate und Sterberate im Gleichgewicht liegen. Sobald mehr Bakterienzellen sterben, als durch Teilung entstehen, beginnt die Absterbephase. Modifiziert nach Fuchs et al. 2014

## Diskussion

Zur Erstellung der Wachstumskurven im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem parallelen Ansatz zusätzlich zum Wirkstoff das Tensid Tween 80 hinzugefügt. Es erhöht die Löslichkeit der enthaltenen ätherischen Öle und verhindert dadurch Effekte auf die Messung der optischen Dichte. Auswirkungen auf das Zellwachstum wurden in Voruntersuchungen ausgeschlossen. Das Verfahren entspricht den Arbeiten von Christoph [32] und Bomblies et al. [23].

Zusätzlich wurden Experimente zur CFU-Bestimmung durchgeführt und so erstmals die antimikrobiellen Effekte des Medikaments über einen Zeitraum von 24 h untersucht. Die Myrtol stand.-spezifischen Effekte sind signifikant. Die ermittelten Überlebensraten vor Behandlung unterscheiden sich z.T. minimal. Dies ist durch Abweichungen der Zellzahlen nach Animpfung in der Zellkultur möglich. Aufgrund der deutlichen Reduktion der Zellzahlen bereits bereits 1 h nach Behandlung ist der Effekt zu vernachlässigen.

Die Ergebnisse der OD-Messungen zeigten keine signifikante Veränderung, der mit dem Medikament behandelten Zellen, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dementsprechend wurde davon ausgegangen, dass die Bakterienkulturen ein Wachstum nach den bekannten Wachstumsphasen und ihren jeweiligen Einflüssen auf das Proteom und somit Morphologie der individuellen Zellen durchlaufen. In den Experimenten zur CFU-Bestimmung konnte im Gegensatz dazu ein deutlicher, antimikrobieller Effekt gezeigt werden. Die Überlebensraten betragen im Durchschnitt aller untersuchten Isolate bei 0,125% Myrtol stand. 42% und bei 0,25% Myrtol stand. 29%. Im Vergleich wurden in anderen Untersuchungen z.T. deutlich höhere Hemmkonzentrationen ermittelt. Eine Untersuchung von Bomblies et al. [23] mit Myrtol stand. konnte in vitro eine minimale Hemmkonzentration (MHK) von 2,5% zeigen. Das entspricht der zehnfachen Dosis der hier verwendeten Menge. Christoph et al. [32] konnten mit einer Wirkstoffkombination gleicher Komponenten von Myrtol stand. eine MHK von 0,16% und eine minimal bakterizide Konzentration (MBC) von 0,32% ermitteln. Diese Werte können durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden. Allerdings zeigte sich in den hier methodisch unabhängig durchgeführten Untersuchungen bereits für 0,125% Myrtol stand. eine bakteriostatische Wirkung für die hier verwendeten Isolate. Dementsprechend liegt die MHK unter 0,16%. Eine bakterizide Wirkung (<1% Überlebensrate nach 4 h) konnte in der Dosisbestimmung bei 0,3125% ermittelt werden und entspricht der MBC von Christoph et al. [32] mit (0,32%). Die CFU-Messung in dieser Arbeit

zeigte ein erneutes Wachstum zwischen 8 h und 24 h nach Behandlung, sogar bei Konzentrationen bis zu 0,625%. Dies weist auf eine MBC >0,32% hin.

Die ermittelten Hemmkonzentrationen liegen im Bereich bisheriger Publikationen und präzisieren die Informationen über den zeitlichen Verlauf nach Behandlung. In Wachstumskurven nach OD-Messung zeigten die Zellen unter Behandlung normales Wachstum, während die Bestimmung der CFU zu gleichen Zeitpunkten eine deutliche Einschränkung der Teilungsfähigkeit der Zellen belegen. Als Ursache dieser Diskrepanz wurden Veränderungen der Zellmorphologie und die Wirkungsweise der ätherischen Öle vermutet. Nachfolgend wurden deshalb morphologische Untersuchungen der Zellen mittels Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt.

### **8.3.2 Rasterelektronenmikroskopie**

Zur morphologischen Untersuchung von Mikroorganismen ist die Rasterelektronenmikroskopie (REM) aufgrund der starken Vergrößerung und ihrer hohen Sensitivität eine sehr geeignete Methode. Veränderungen der Bakterienmorphologie unter Behandlung mit ätherischen Ölen, einzeln oder in Kombination konnten bereits in mehreren Studien gezeigt werden [56, 74, 78, 129, 139, 169, 178, 182]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals die morphologischen Veränderungen von *S. aureus* unter Behandlung mit Myrtol stand. untersucht.

Die gemessenen Zellgrößen der unbehandelten Zellen von ca. 0,7 µm Durchmesser, entsprechen Angaben zu *S. aureus* aus der Literatur [169, 179]. Zwischen 1 h und 8 h nach Behandlung konnte ein signifikant größeres Volumen der behandelten Zellen (0,25% Myrtol stand.) verglichen mit der Kontrolle gemessen werden. Der größte Unterschied zur Kontrolle konnte 4 h nach Behandlung gemessen werden (69% Volumenzunahme). Bei Normalverteilung und homogener Varianz der Volumina wurde zur Prüfung der Signifikanz der t-Test genutzt.

Veränderungen der Zellgrößen und Formen bei *S. aureus* unter Behandlung mit ätherischen Ölen bzw. deren Bestandteilen wurden bereits gezielt untersucht. So konnten für 1,8-Cineol, Linalool und  $\alpha$ -Terpineol Zengin et al. [182], ätherisches Bohnenkrautöl Vitanza et al. [169] und für Carvacrol und Thymol Garcia-Salinas et al. [56] mittels REM eine Reihe von morphologischen Veränderungen beschreiben.

## Diskussion

Die wirksamen Hauptbestandteile von Myrtol stand. sind 1,8 Cineol, D-Limonen und  $\alpha$ -Pinen. Sie zählen zu den cyclischen Monoterpenen. Diese zeigen lipophile Eigenschaften und damit eine hohe Affinität zum hydrophoben Kern von biologischen Membranen. Die oxygenierten Kohlenwasserstoffverbindungen aus den ätherischen Ölen werden als Terpenoide (z.B. Carvacrol, Thymol) bezeichnet. Sie sind weniger lipophil, haben jedoch isoliert stärkere antimikrobielle Effekte als die Terpene [107, 135, 136, 158]. Durch Integration der Terpene in die äußere Schicht der zytoplasmatischen Membran oder Zellwand vergrößert sich deren Oberfläche. Zusätzlich kommt es zu erhöhter Permeabilität, Porenbildung und dem Verlust vesikelähnlicher Strukturen mit überlebenswichtigen Proteinen aus dem Zytoplasma [74, 182]. Es folgt die Zelllyse. Einhergehend ist die parallele Verdrängung der integralen Bestandteile der Membranen, die für den transmembranären Transport oder die Aufrechterhaltung von Potentialen notwendig sind [29, 139]. Für 1,8 Cineol konnte bspw. ein direkter Einfluss auf die NaCl-Toleranz gemessen werden [29].

Während in den vorliegenden REM Aufnahmen dieser Arbeit die behandelten Zellen vor Allem durch die Größenveränderung auffallen, konnten Zengin et al. [182], unter Behandlung mit hohen Konzentrationen von 1,8 Cineol (2%), *S. aureus* Zellen mit Einkerbungen zeigen. Im Zusammenhang mit den Experimenten zur CFU-Bestimmung kann davon ausgegangen werden, dass die Komponenten von Myrtol stand. in die Zellmembranen integriert werden. Durch konsekutive Prozesse, wie den Verlust großer Mengen überlebenswichtiger Moleküle und Zellbestandteile oder initiierte Autolyse folgt der Zelltod [182].

Zu der ausgeprägten Wirkung einzelner ätherischer Öle auf die Bakterienzellen kommt in vielen Fällen der Kombination mehrerer wirksamer Bestandteile ein synergistischer Effekt. Dieser lässt sich gut erklären, wenn man die lipophilen Eigenschaften der Terpene mit den stärkeren antimikrobiellen Eigenschaften der oxidierten funktionellen Gruppen der Terpenoide kombiniert. Die Wirkstoffe als Verbindung sind effektiver als die Addition der Einzeleffekte. Solche Effekte konnten bereits für eine Reihe von Wirkstoffverbindungen wie die Kombinationen Thymol und Eugenol oder  $\alpha$ -Pinen und Limonen nachgewiesen werden [28, 74, 182]. Auch wenn die drei Hauptkomponenten von Myrtol stand. den Terpenen zuzuordnen sind, ist wegen der Vielzahl von Inhaltsstoffen von synergistischen sowie antagonistischen Effekten auszugehen.

Aufgrund der Wirkungsweise der Terpene durch Zerstörung/Modifikation der Membranintegrität ist eine Anpassung für die Bakterienzellen bei sehr kurzem Zeitintervall

zwischen Exposition und Zelllyse nicht möglich. Die Zellen entwickeln keine Resistenzen, insbesondere keine Kreuzresistenzen. Durch Behandlung mit Kombinationspräparaten können niedrigere Dosierungen gewählt und damit Nebenwirkungen gemindert werden.

Die Messung der Volumina 24 h nach Behandlung zeigt nur noch geringfügig größere Zellen als die Kontrolle (bei  $\alpha=0,01$  nicht signifikant). Mögliche Erklärungsansätze könnten die Reduktion der Wirkung über die Zeit sein bspw. durch aktive Reparatur der Bakterienmembran oder auch die Verteilung des Wirkstoffes auf die bereits zerstörten Zellen, sodass die effektive Konzentration für die verbleibenden Zellen abnimmt. Bei der Behandlung von Patienten wird das Medikament mehrmals täglich eingenommen und so eine konstante Konzentration der Wirkstoffe im Blut erreicht. Abhängig von der Durchblutung im Rahmen der Entzündungen im Bereich der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen ist jedoch erst bei langfristiger Einnahme von stetigen Wirkstoffmengen auszugehen.

Die ermittelte Volumenzunahme der Zellen kann Hinweise auf die unveränderte Optische Dichte in den Wachstumskurven liefern. Mit Volumenzunahme der einzelnen Mikroorganismen kommt es zur Erhöhung der Absorption im Photometer. Die Zellen sind in der REM sichtbar vergrößert, aber nicht mehr in der Lage sich zu teilen und CFUs zu bilden. Auf diese Weise ließe sich erklären, dass die OD im Vergleich zur Kontrolle annähernd unverändert war, obwohl einige Zellen bereits abgestorben und ein Großteil sich im Prozess der Zelllyse befand. Um die morphologischen Effekte von Myrtol stand. auf *S. aureus* noch ausführlicher zu visualisieren, wären REM Aufnahmen mit einer deutlich höheren Dosis oder höher auflösende Transmissionselektronenmikroskopie ein möglicher Ansatz. Zum Verständnis möglicher molekularer Effekte für die morphologischen Veränderungen und genaueren Beurteilung des antimikrobiellen Effektes wurden in dieser Arbeit Proteomanalysen durchgeführt.

### **8.3.3 Proteomanalysen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig Proteomanalysen mittels 2D-DIGE von *S. aureus* nach Behandlung mit Myrtol stand. durchgeführt. Parallel wurden die molekularen und biochemischen Prozesse, die zum vergrößerten Volumen der Zellen, sowie dem Absterben der Bakterien unter Behandlung mit Myrtol stand. führten, untersucht. Auf Proteinebene konnten die direkten Auswirkungen einer Behandlung von *S. aureus* analysiert werden. Untersuchungen von Jenkins et al. konnten dies bereits für Effekte von Manuka Honig [82] und Savijoki et al. für Penicillin G [130] auf *S. aureus* zeigen. Für eine differenzierte



## Diskussion

Betrachtung wurden extrazelluläre Proteine getrennt von den intrazellulären Proteinen zu allen Messpunkten entnommen und analog zu Ziebandt et al. [186] untersucht. Dies ermöglichte eine spezifischere Darstellung z.B. von Toxinen und extrazellulären cytosolischen Proteinen und deren Regulation. Die Reliabilität der Experimente konnte durch statistische Tests und PCA-Analysen der vier Replikate bestätigt werden. Die Auswahl der Spots wurde anhand einer minimalen mittleren Expressionsänderung im Vergleich zur Kontrolle ( $\text{ratio} \leq 0,667$ ,  $\text{ratio} \geq 1,5$ ,  $p < 0,05$ ), analog zu Savijoki et al. [130] durchgeführt.

Mittels Spot-Detektion konnten auf den 2D-Gelen der intrazellulären Proteine 1223 Spots und auf den Gelen der extrazellulären Proteine 610 Spots gefunden werden. Die IC-Gele zeigen ein Proteinverteilungsmuster, welches bereits in anderen 2D-Gelelektrophorese-Analysen von *S. aureus* COL [51, 87] und auch für Biofilme von *S. aureus* [130] gezeigt werden konnte. Die Anzahl der markierten Proteine liegt hierbei auch im Bereich der Literatur zu *S. aureus* [51].

Durch PCA konnte die Entwicklung der Kultur (Wachstumskurven) zwischen den verschiedenen Wachstumsphasen auf Proteinebene verdeutlicht werden. Weiterhin wurden durch die Abstände in der Hauptkomponente 2 die massiven Unterschiede nach Behandlung aufgezeigt.

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine wurden gezielt Spots quantifiziert und ausgewählt, ausgeschnitten, nach tryptischem Verdau mittels Massenspektrometrie untersucht und durch Datenbankabgleiche identifiziert. Dies entspricht einer etablierten Methode zur Proteomanalyse bei behandelten Mikroorganismen, wobei LC-MS [51, 87] und/oder MALDI –TOF [38, 51, 87, 130, 186] genutzt worden sind. Alle ausgewählten Spots sind in den Dual Channel Overlays von 0,25% Myrtol stand. und der jeweiligen unbehandelten Kontrolle zu den Zeitpunkten  $t[h] = \{4; 8; 24\}$  signifikant, mindestens 1,5-fach verändert. Die statistische Analyse erfolgte hier bei homogener Varianz und Normalverteilung mittels t-Test zum mittleren normalisierten Volumen der Spots im Vergleich. Es wurde mit Signifikanzniveau  $p < 0,05$  selektiert. Einige der ausgewählten Spots sind bereits nach 1 h signifikant reguliert. Des Weiteren wurden nur manuell deutlich differenzierbare Spots ausgeschnitten. Durch diese Kriterien konnte die Auswahl der Spots für die Identifikation stark eingeschränkt werden. In der Auswahl sind die am stärksten zu den einzelnen Zeitpunkten regulierten Proteine enthalten. Ein weiterer großer Vorteil der Auswahl ist die Vergleichbarkeit der Proteinregulation zur Kontrolle über einen Zeitraum von mindestens 4 h bis 24 h nach Behandlung für jedes der identifizierten Proteine. Das Verwenden eines internen Standards

sichert die Vergleichbarkeit der Spots auf allen Gelen und ermöglicht das Ausschneiden aus nur einem Gel.

Wie bereits beschrieben, konnten aufgrund der hohen Sensitivität der LC-MS für die einzelnen Spots mehrere Proteine identifiziert werden. In Tabelle 44 im Anhang sind diese durch Reihung anhand der Menge identifizierter Peptide gelistet. Für die Erstellung der Voronoi Treemaps wurden von den mehrfach identifizierten Proteinen alle im TIGRFam gelisteten Proteine dargestellt, die mindestens mit zwei Peptiden identifiziert werden konnten und deren Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt der Lokalisation auf dem Gel entsprach. Im Falle von Mehrfachidentifikationen des gleichen Proteins in verschiedenen Spots wurden die verschiedenen Intensitäten gemeinsam durch Anzeige mehrerer Farbkacheln innerhalb eines identifizierten Proteins visualisiert. Die Darstellung in den Treemaps ist, insbesondere bei großen komplexen Proteomdaten ein effektives Mittel zur Darstellung regulierter Stoffwechselprozesse [6, 17, 24]. Ursachen für die Mehrfachidentifikationen dieser Art können vor allem Modifikationen der Proteine sein. Durch Modifikationen wie bspw. Phosphorylierung, Glycosylierung oder Abspaltung von Gruppen kommt es zur Veränderung von MW und/oder IP, sodass die Position auf dem Gel ebenfalls variiert und das Protein an mehreren Positionen identifiziert werden kann. Im Rahmen der Recherche zu den identifizierten Proteinen wurden gezielt die Mehrfachidentifikationen durch Qualitätskontrolle im Direktverdau evaluiert. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass bspw. bei entgegengesetzten Ratios der Mehrfachidentifikationen die richtige Tendenz ermittelt werden konnte. Des Weiteren lieferte die Analyse nach dem Direktverdau, als zweite massenspektrometrische Methode, zusätzliche Identifikationen für die Betrachtung einzelner Stoffwechselwege.

Eine wesentliche Gemeinsamkeit der Proteinveränderung intrazellulär und extrazellulär ist die Abhängigkeit von den Wachstumsphasen in der Bakterienkultur. Der Grad der Regulation nimmt zu. Direkt nach Behandlung sind die Proteinveränderung noch vergleichsweise gering und nehmen in der exponentiellen Wachstumsphase nach 4 h deutlich zu. Die höchsten Werte der Veränderung werden nach 8 h und 24 h erreicht, wenn die Kultur sich bereits in der stationären Phase befindet. Anders als die Kontrollkultur, weisen die behandelten Zellen dann nicht die phasenspezifischen Proteinmengen auf.

### **8.3.3.1 Superantigen-Enterotoxine**

Zu den Superantigen-Enterotoxinen (SE) von *S. aureus* zählen über 20 verschiedene Toxine. Auswirkungen einer Infektion auf den Host können von Lebensmittelvergiftungen mit Diarrhoe und Emesis bis hin zu Schocksymptomatik aufgrund übermäßiger Immunreaktion oder Toxic Shock Syndrom führen. Die Proteine sind ca. 22-30 kDa groß und haben viele homologe Aminosäuresequenzen. Pathophysiologische Grundlage der Symptomatik ist eine übermäßige Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen. Eines der am besten untersuchten Toxine aus der Gruppe ist das Enterotoxin B (Seb) [19, 89, 90, 92].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine Reduktion der intrazellulären Proteinmengen von Seb und Sek zwischen 4 h und 24 h nach Behandlung mit Myrtol stand. nachgewiesen werden. Ausserdem ließ sich für Seb auch extrazellulär eine starke Verminderung der Proteinmenge zeigen.

Bisher liegen keine Untersuchungen zur Veränderung der SE-Produktion von *S. aureus* unter Behandlung mit Myrtol stand. vor. Aus diesem Grund erfolgt die Einordnung im Vergleich zu Studien zu anderen ätherischen Ölen mit gemeinsamen Bestandteilen.

Huang et al. konnten nach Behandlung von *S. aureus* mit ätherischem Öl aus Curcumarinde und Azizkhani et al. aus *Zataria multiflora* sowie herabgesetzte Transkriptionsmengen der SE (seb, sea, hly hla bzw. sea, sec, see ) messen [7, 76]. Zusätzlich weisen Ergebnisse von Lee et. al. für die Behandlung von *S. aureus* mit ätherischen Ölen aus schwarzem Pfeffer und Qiu et al. für Thymol, Eugenol und ätherischen Ölen aus Fenchel eine Reduktion der Toxinbildung auf Transkriptionsebene nach [93, 117–119].

Mit Hilfe von Immunoessayverfahren konnten Turchi et al. nach Behandlung von *S. aureus* mit subinhibitorischen Konzentrationen von verschiedenen ätherischen Ölen sowie Souza et al. eine Reduktion der Bildung von Enterotoxinen zusätzlich auf Proteinebene zeigen [140, 160]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen für Myrtol stand. eine analoge Reduktion der Proteinmengen der SE und somit der Virulenz über den Zeitraum von 4-24 h nach Behandlung. Aufgrund der Effekte auf Transkriptions- und Proteinebene ist von einer herabgesetzten Synthese der SE als Ursache auszugehen. Entsprechend ist ein Ansatz für mögliche Untersuchungen die prophylaktische Medikation mit Myrtol stand. bei Patienten mit hohem Toxic Shock Syndrom- Risiko wie z.B. Patienten mit liegenden Tamponaden denkbar [19].

Die Pathogenese der CRS ist ein multifaktorieller Prozess. Während für die CRSsNP bisher kein Zusammenhang zu vermehrtem Aufkommen von Immunglobulinen (v. A. IgE, IgG, IgA) in der Schleimhaut bzw. dem Serum gezeigt werden konnte [143], gibt es zahlreiche Studien die eine Korrelation zwischen Immunglobulinkonzentration und der Entstehung von CRSwNP beschreiben [31, 133, 143, 165]. Ein wesentlicher Grund dafür sind die von *S. aureus* gebildeten SE. Erhöhte Mengen der Enterotoxine im Gewebe, bei bspw. kommensaler Besiedelung mit *S. aureus* führen zur vermehrten Bildung von entsprechenden IgE, IgA und IgG, sowie Gewebshormonen wie Interleukin 5 (IL 5) [9, 133, 143, 165]. Dieser Zusammenhang besteht vor Allem für die eosinophile Form der CRSwNP mit Aktivierung der TH2-Lymphozyten und B-Zellproliferation. Bei der nicht eosinophilen (nicht allergischen) CRSwNP, welche vorwiegend durch neutrophile Granulozyten dominiert wird, konnte ebenfalls eine leichte Erhöhung der Ig gezeigt werden [31]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine massive Reduktion der SE von *S. aureus* unter Behandlung mit Myrtol stand. beschrieben. Die Behandlung mit dem Phytopharmakon kann dementsprechend über die symptomatische Therapie hinaus auch ein Ansatz zur Behandlung der Ursachen und Prävention der CRSwNP sein. Auch wenn die Funktion der IgE bei der Polypenbildung und Entwicklung einer CRS noch nicht abschließend geklärt und antagonistische Effekte von IgG Teil aktueller Untersuchungen sind [133].

### **8.3.3.2 Leukotoxine und Hämolsine**

Mit Hilfe der massenspektrometrischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden bakterielle Proteine mit zytolytischen bis hin zu zytotoxischen Effekten unter anderem auf humane Zielzellen identifiziert. Diese Exotoxine werden von *S. aureus* vor Allem im exponentiellen Wachstum gebildet und in den Extrazellularraum transportiert. Auf molekularer Ebene binden die Exotoxine an verschiedenen Rezeptoren wie bspw. Chemokinrezeptoren [122] und führen über Porenbildung in der Hostzellmembran zum Austritt von Ionen. Zu den untersuchten Leukotoxinen zählen die zwei-Komponenten Toxine Leukotoxin LukD-E, Gamma Hämolsine B und C, sowie die monomeren Toxine Alpha- und Beta Hämolsin. Während die Poren von Alpha- und Beta Hämolsin aus Monomeren zusammengesetzt sind, bestehen die anderen genannten Toxine aus zwei Komponenten (bi-component). Die Toxine zeigen zudem unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Hostzellen [36, 180]. Für das aus LukD und LukE bestehende Leukotoxin konnten bereits zytotoxische Effekte auf T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen gezeigt werden [59, 122]. Alpha Hämolsin zeigt beispielsweise starke

zytolytische Eigenschaften gegen Epithel- und Endothelzellen, sowie Thrombozyten und Leukozyten. Und für HlgB konnte eine Erhöhung der Konzentration von Antikörpern gegen das Toxin bei Infektionen mit *S. aureus* im Menschen nachgewiesen werden [3, 187]. Zusätzlich konnte für HlgB auch im Vergleich zu den anderen genannten Toxinen eine stark hämolysierende und gering leukotoxische Wirkung nachgewiesen werden. Die Exotoxine sind essentielle Virulenzfaktoren für die Pathogenität von *S. aureus* auf den Menschen [131].

In der vorliegenden Arbeit konnte für die Bestandteile des Leukotoxin D, sowie Alpha-Beta- und die Gamma Hämolysine eine deutliche Verminderung der Proteinmengen nach Behandlung mit Myrtol stand. gezeigt werden. Insbesondere die extrazellulär detektierten Proteinmengen sind nach Behandlung signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrolle.

Analog zu den SEs liegen bisher keine Untersuchungen zur Veränderung der entsprechenden Toxinmengen von *S. aureus* unter Behandlung mit Myrtol stand. vor. Wie bereits im Kapitel zu den SE beschrieben, konnten Huang et al. nach Behandlung mit ätherischem Öl aus Curcumarinde [76] sowie Qui et al. mit Bestandteilen aus Fenchelöl [119] und Federman et al. mit ätherischen Ölen aus Orangenöl [44] eine Reduktion der Transkription von hly und hlb zeigen. In einer weiteren Untersuchung konnten Hinweise auf eine Reduktion der Hämolysewirkung von MRSA unter Einfluss der ätherischen Öle aus *Pogostemon heyneanus* und *Cinnamomum tamala* ermittelt werden [127].

Die Behandlung mit Myrtol stand. führt zu einer deutlichen Reduktion von Virulenzfaktoren bei *S. aureus* und senkt damit die Pathogenität der Bakterienzellen bei Infektionen des Menschen. Während für einige Bestandteile aus pflanzlicher Herkunft bereits auf Transkriptionsebene Nachweise zur Reduktion erbracht werden konnten, beschreiben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nun umfangreiche Verminderung der Virulenz auf Proteinebene, sowohl intrazellulär als auch extrazellulär. Die Toxine stören nachweislich Wundheilung und Immunabwehr. Entsprechend wirken herabgesetzte Toxinmengen positiv auf die Heilungsraten bei Infektionen und verhindern die Signalwirkung der Toxine auf andere Bakterien in der Kultur, mit zusätzlichem heilungsfördernden Effekt [149].

### **8.3.3.3 Serin-Proteasen/ Extrazelluläre Proteine**

Eine weitere Gruppe der Exotoxine von *S. aureus* sind Proteasen. Darunter zählen unter anderem die Klassen der Metalloproteasen und Serin-Proteasen, deren Enzymaktivität die Immunabwehr der Hostzellen und die Dissemination der Bakterienzellen im Organismus

beeinflussen kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die serine-protease-like Proteins A-F (SplA-F) identifiziert werden. Sie bilden eine Klasse von strukturell und funktionell sehr ähnlichen Proteasen. Die Spls entsprechen Virulenzfaktoren und konnten in Untersuchungen bei mehreren Stämmen von *S. aureus* identifiziert werden. Alle Spls befinden sich gemeinsam auf dem Spl-Operon und werden durch den Gene Regulator Agr reguliert [142, 149, 181]. Die Analyse der Proteinmengen zeigte extrazellulär eine deutliche Verminderung der Proteinmengen nach Behandlung mit Myrtol stand. im Vergleich zur Kontrolle.

In verschiedenen Untersuchungen konnte bisher ein Einfluss der Spls auf nasale Besiedelung und die Modulation der Virulenzfaktoren von *S. aureus* gezeigt werden [149]. Die Reduktion der extrazellulären Proteinmengen der Spls ist ein weiteres Zeichen der Abschwächung der Virulenz des Bakteriums unter Behandlung mit *Myrtol stand*.

#### **8.3.3.4 Accessory gene regulator (Agr)**

*Staphylococcus aureus* reguliert die Bildung und Sekretion der verschiedenen Toxine und Proteasen, angepasst an die vorherrschenden Wachstumsbedingungen. Entsprechend des Nährstoffangebots, der Informationen anderer Zellen aus der Kultur und bei Infektionen auch der Hostzellen, werden Transkription und Translation der Virulenzfaktoren gesteuert (siehe Einleitung ab S. 20). Ein wesentlicher Faktor bei der Regulierung der Virulenzfaktoren von *S. aureus* ist das Agr (Accessory gene regulator) System. Agr ist ein selbstinduzierendes Peptid, dessen extrazelluläres Vorkommen bei Überschreiten einer bestimmten Menge die Proteinbiosynthese bestimmter Pathogenitätsfaktoren reguliert [83, 88, 154].

Im Rahmen dieser Arbeit konnten unter Behandlung mit Myrtol stand. deutlich verminderte Proteinmengen für Agr-regulierte Proteine gemessen werden. Darunter zählen Superantigen-Enterotoxin B, Alpha- und Beta Hämolyysin sowie Serin-Proteasen und Lipase [88]. Im Zusammenhang mit den bereits in den jeweiligen Kapiteln beschriebenen Studienergebnissen zeigt *Staphylococcus aureus* COL nach Behandlung mit Myrtol stand. eine deutlich verminderte Bildung der Virulenzfaktoren. Die Multiplex PCR Analysen zeigten das Allel agr1 und den CC8 für alle verwendeten Isolate und somit eine epidemiologisch häufige Kombination, die mit invasiven Infektionen assoziiert ist (siehe S. 50).

Untersuchungen zu den Effekten ätherischer Öle auf Bakterienzellen wurden überwiegend mit subinhibitorischen Konzentrationen der Wirkstoffe durchgeführt, um die Proteinmengen der behandelten Proben mit den Kontrollen vergleichen zu können. Für die in dieser Arbeit

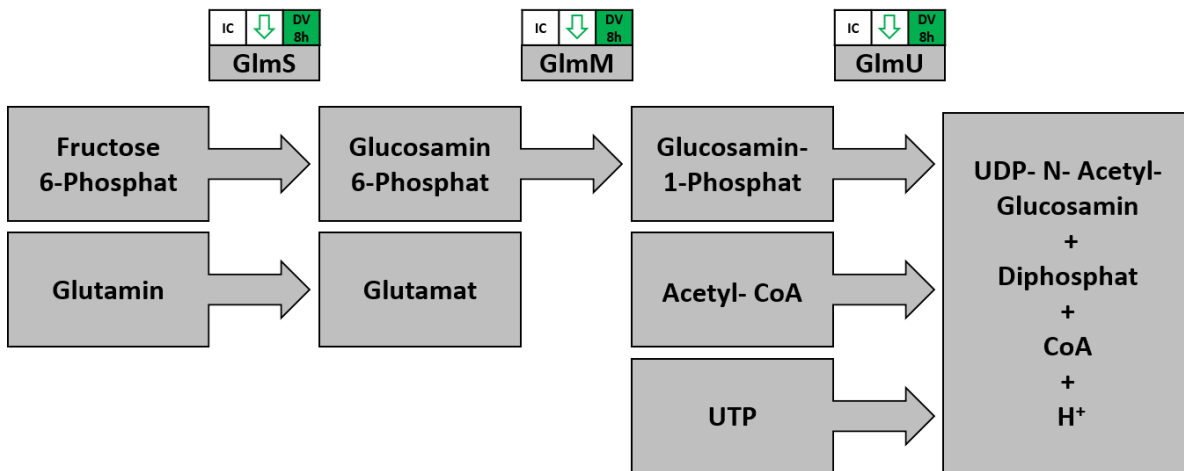
verwendete Konzentration von 0,25% Myrtol stand. konnte in den Wachstumskurven ein vergleichbares Wachstum der Kulturen mit entsprechenden Wachstumsstadien gezeigt werden, sodass die hier gezeigten Reduktionen der Virulenz nicht durch geringere Bakterienzellzahlen erklärbar sind, sondern ein direkter Effekt der Behandlung mit dem Phytopharmakon.

### **8.3.3.5 Zellwand-und Zellmembransynthese**

Mit Hilfe der REM konnte bereits ein deutlicher Einfluss von *Myrtol stand* auf die Zellmembran von *S. aureus* gezeigt werden. Die wirksamen Bestandteile des Myrtol stand. gehören zur Gruppe der Terpene. Für diese hydrophoben Moleküle wurden bereits antimikrobielle Effekte durch Störung der Membranintegrität und darauf folgende Permeabilitätsveränderungen mit konsekutivem Potentialverlust bis hin zur Zellyse beschrieben [12, 28]. Bei der Integration in die cytoplasmatische Membran verändern die Terpene die Durchlässigkeit der Membran für verschiedene Moleküle und Ionen, wie Xu et al. für Thymol und Carvacol bei *Escherichia coli* zeigen konnten [176]. Ein ähnlicher Effekt wurde auch für *S. aureus* unter Behandlung mit Oreganoöl mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie beschrieben [91].

Mehrere Proteine der Zellwand-und Membransynthese zeigten deutliche Veränderungen der Proteinmengen nach Myrtol stand. Behandlung. Die Proteine GlmU, GlmM und GlmS sind, als Enzyme des Aminosucker und Nukleotidstoffwechsels, an der Bildung von Peptidoglycanen und Lipopolysacchariden beteiligt. Diese sind wichtige Bestandteile der Zellwand-und membran. Die Behandlung mit Myrtol stand. führte zu verringerten Proteinmengen intrazellulär zwischen 4 h und 24 h (GlmU) bzw. 1 h und 24 h (GlmS) und 8 h (GlmM, nur Direktverdau) nach Behandlung. Der komplette Stoffwechselweg ist betroffen und damit die Bildung von N-Acetylglucosamin gestört, einem wesentlichen Peptidoglykan der Zellwand. Das Enzym GlmM wurde im Rahmen der ergänzenden Proteinidentifikationen aus dem Direktverdau analysiert. Es katalysiert die Konversion von Glucosamin-6-phosphat zu

Glucosamin-1-Phosphat, einem Teilschritt der Bildung von UDP-N-Acetylglucosamin, einem Teilschritt des Stoffwechselweges [13, 86, 156].



**Abbildung 38: Bildung von UDP- N- Acetylglucosamin**

IC, intrazellulär, DV, Direktverdau, UDP, Uridindiphosphat, UTP, Uridintriphosphat, CoA, Coenzym A. Schematische Darstellung der Bildung des Zellwandproteins UDP- N- Acetylglucosamin. Die katalysierenden Enzyme GlmS, GlmM und GlmU sind mit den Ergebnissen aus dem Direktverdau 8 h nach Behandlung dargestellt. Alle identifizierten Proteine zeigen nach Behandlung intrazellulär verminderte Proteinmengen im Vergleich zur Kontrolle. Der letzte Teilschritt der Reaktionskette erfolgt in zwei einzelnen Teilreaktionen, welche hier zusammengefasst wurden. Beide Teilreaktionen werden durch das Enzym GlmU katalysiert.

Die Abbildung 38 zeigt hier eine detaillierte Darstellung der katalysierten Teilschritte. Es kann davon ausgegangen werden, dass die niedrigen intrazellulären Proteinmengen dieser Synthesenzyme durch Effekte von Myrtol stand. auf die Proteinbiosynthese beeinflusst werden. Entsprechende Hinweise für eine Regulation auf Transkriptionsebene, wie von Xu J-G et al. [177] beschrieben, sind nachfolgend beschrieben. Ausserdem wird für GlmU eine Funktion in der Bildung von Biofilmen und Virulenzfaktoren beschrieben, wie bereits für *Streptococcus mutans* [86] und *S. aureus* [148] gezeigt werden konnte.

Zusätzlich wurden gezielt transmembranäre Proteine mit Veränderung der Proteinmengen nach Behandlung analysiert [14, 40]. Aus der Gruppe der Serin-Aspartat-repeat Proteine konnten die integralen Membranproteine SdrE und SdrH identifiziert werden. Sie zeigen nach Behandlung extrazellulär deutlich erhöhte Proteinmengen. Als Adhesine binden sie an Hostzellen und sind maßgeblich an der Pathogenität des Bakteriums beteiligt und bei MRSA häufiger vorhanden (SdrE) [5, 97]. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigen, wie die Behandlung mit Myrtol stand. ein Herauslösen der Proteine aus der Membran und konsekutive Anreicherung im Extrazellularraum mit Funktionsverlust zur Folge hat. Dieser Effekt der Verschiebung zum Extrazellularraum im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich ebenfalls für für das Plasmin-sensitive Protein, (PIs). Es konnte in einer Vielzahl von verschiedenen Spots identifiziert werden. Hier muss von diversen posttranslationalen Modifikationen bspw. zur



## Diskussion

Aktivierung ausgegangen werden. Das Protein ist das am häufigsten in dieser Arbeit identifizierte Protein. Die Lage an der Zelloberfläche und in Untersuchungen gezeigte Zusammenhänge mit Methicillinsensitivität und Biofilmbildung zeigen, dass es einen weiteren Virulenzfaktor darstellt, dessen Effekt nach Behandlung sinkt [22]. Pls liegt auf derselben Genkassette mec Typ I wie das Gen mecA, welches für das Penicillin-binding Protein 2 (PbP2) kodiert. Es ist eins von neun verschiedenen PbPs von *S. aureus* COL und mit PbP1 maßgeblich für die Peptidoglykanbildung verantwortlich [121]. Weil diese einen Großteil der Zellwand darstellen, ist der Mangel dieses Enzyms mit deutlicher Einschränkung der Überlebensfähigkeit verbunden. Die anderen sieben PbPs zeigen ihre Funktion vor Allem durch die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen. Die Steigerung der Proteinmengen von PbP2(Gen mecA) im Direktverdau nach 8 h intrazellulär kann ein Zeichen des erhöhten Bedarfs mit Steigerung der Proteinexpression sein. Diese Proteinidentifikationen bestätigen das Ergebnis aus der Multiplex PCR (S. 50), in der für das Laborisolat *S. aureus* COL das mecA Gen zur Typisierung genutzt wurde.

Aus dem Lipidstoffwechsel konnten bspw. die beiden Proteine Lipase (Lip1) und SACOL0212 identifiziert und analysiert werden. Lipase katalysiert die Hydrolyse von Esterbindungen bspw. zwischen Glycerol und Fettsäuren. In mehreren Untersuchungen konnte für das Enzym eine Funktion als Pathogenitätsfaktor nachgewiesen werden. Hostzellen wie Granulozyten werden in der Aggregation und Sekretfreisetzung durch die Spaltung der Esterbindungen geschädigt [75, 125]. Das Enzym Lip1 ist 1 h nach Behandlung zunächst vermindert extrazellulär und nach 4 h bis 24 h dann deutlich erhöht messbar. Vorstellbar ist eine geringere Sekretion des Enzyms nach Behandlung. Eine katabole Funktion steht zu diesem Zeitpunkt entgegen des Bedarfs an Lipiden zum Ausgleich der Membranverluste bzw. Wirkung der in Myrtol stand. enthaltenen Terpene. Vier Stunden nach Behandlung, in der exponentiellen Phase, sind die Proteinmengen höher als in der Kontrolle. Möglich ist hier die Verdrängung aus der Membran in den Extrazellularraum durch die Wirkstoffe oder als Versuch der Bakterien die Terpene und Terpenoide zu lysieren. SACOL0212, ein Enzym der  $\beta$ -Oxidation zeigt eine intrazelluläre Erhöhung der Proteinmengen nach Behandlung im Zeitraum 8 h bis 24 h nach Behandlung. Hierfür kommt bspw. der Versuch der Zellen die freigewordenen Lipide abzubauen oder eine zusätzliche Regulation im Energiestoffwechsel als Ursache in Frage.

### 8.3.3.6 Metabolismus

In den Voronoi Treemaps konnten für intrazelluläre Proteine mit Funktion im Metabolismus sowohl erhöhte, als auch verringerte Proteinmengen nach Behandlung gezeigt werden. Extrazelluläre Proteine der Kategorie sind mehrheitlich mit erhöhten Proteinmengen detektiert worden. Wie Untersuchungen von Xu J-G et al. mit *S. aureus* zeigen, haben bspw. die ätherischen Öle aus der Gewürznelke auch einen Einfluss auf die Transkription und DNA-Zusammensetzung der Bakterien [177].

Das Enzym Formiat Acetyltransferase (PflB) zeigte unter Behandlung im gesamten Zeitraum deutlich verringerte Proteinmengen. PflB ist in anaerober Umgebung für den Energiestoffwechsel der Zellen essentiell [94, 189]. Zusätzlich ermöglicht es die Biofilmbildung im sauerstoffarmen Milieu. Herabgesetzte Proteinmengen nach Behandlung führen dementsprechend zu herabgesetzten Überlebensraten und verhindern die Biofilmbildung unter anaeroben Bedingungen.

Für die beiden Malat-Chinonoxidoreduktasen Mqo1 und 2 konnten verschiedene Veränderungen der Proteinmengen gemessen werden. Mqo1 zeigte nach Behandlung intrazellulär verringerte, Mqo2 dagegen erhöhte Proteinmengen. Die Enzyme sind Teil des Citratzyklus und für Mqo2 konnte die Funktion der Umwandlung von Lactat in Pyruvat unter Bedingungen mit hoher NO Konzentration nachgewiesen werden [53]. Mqo2 ist notwendig für die Bakterienzellen, um der Stickstoffmonoxid Belastung durch das angeborene Immunsystem der Patienten entgegenzuwirken [141]. Savijoki et al. konnten bereits eine erhöhte Expression des Enzyms bei *S. aureus* unter Behandlung mit Penicillin G zeigen. Diskutiert wurde dies als letzter Versuch der Bakterienzellen, sich gegen die antibiotische Wirkung zu stellen [130].

Die Acetoin-bildende Diacetyl Reductase ButA ist ein weiteres cytosolisches Protein mit Regulation nach Behandlung. Unter anaeroben Bedingungen akkumulieren Endprodukte der Gärung wie bspw. Lactat und der pH-Wert in der Zellkultur sinkt. Viele Mikroorganismen bilden daraufhin vermehrt das neutrale Acetoin zur 2,3-Butandiol-Gärung, um diesem Prozess der Übersäuerung des Mediums entgegen zu wirken. Weiterhin ist Acetoin eine alternative Energiequelle für die Bakterienzelle nach Verbrauch anderer Kohlenhydratquellen und bei der Bildung von Biofilmen relevant [159, 175, 185, 189]. In den hier untersuchten Proben wurde das Acetoin-bildende Enzym nach Eintritt in die exponentielle Phase im Vergleich zur Kontrolle vermehrt im extrazellulären Raum gemessen. Diese Regulation der Bakterienzellen ist eine

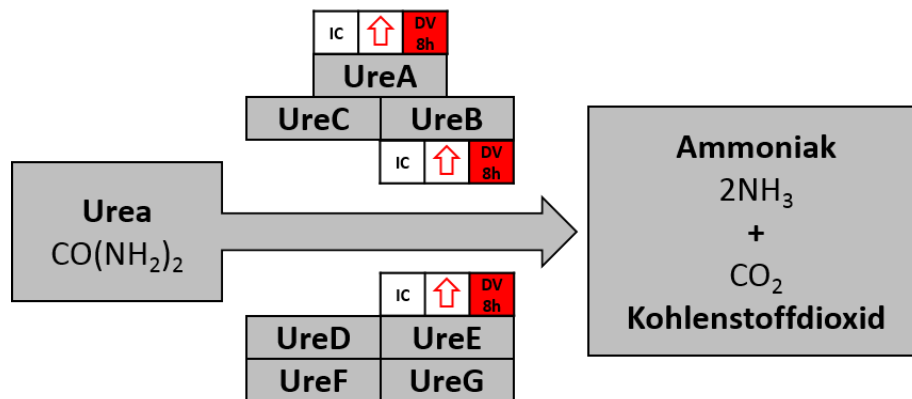
## Diskussion

Antwort auf die vermehrte Säurebelastung im extrazellulären Milieu. Parallel nehmen die Proteinmengen des Enzyms intrazellulär im Vergleich zur Kontrolle ab und könnten Hinweise auf einen vermehrten Transport in den Extrazellularraum geben.

Ebenfalls nach Behandlung vermehrt extrazellulär detektiert wurden die cytosolischen Proteine Triosephosphatisomerase (TpiA) und Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GapA1/ Gap). Neben der Funktion im Energiestoffwechsel werden beide Proteine als Virulenzfaktoren diskutiert. TpiA agiert auf der Zelloberfläche von *S. aureus* als Adhäsionsmolekül, das die Plasminogenaktivierung beeinflusst und an die Kapsel von *Cryptococcus neoformans*, dem Erreger der Kryptokokkose, binden kann [54]. Für GapA1/ Gap konnten bereits Zytotoxizität und Adhäsion zu Oberflächenproteinen von verschiedenen humanen Zelllinien nachgewiesen werden [42]. Weiterhin untersucht werden Transportprozesse für die gezielte Ausschüttung cytosolischer Proteine zu bestimmten Zeitpunkten im Wachstum der Bakterienkultur [43, 54, 170]. Ursachen für die extrazellulär vermehrten Proteinmengen können in diesem Fall ein aktiver Transport oder eine erhöhte Durchlässigkeit der Membran im Rahmen der Zelllyse sein.

Ein weiteres identifiziertes Protein aus dem Metabolismus ist UreA. Es wurde im Direktverdau bei den ergänzenden Identifikationen analysiert und ist ein Teil des Heterotrimer aus UreA, B und C, der zusammen mit dem Accessorischen Protein bestehend aus UreD-G das Enzym Urease bildet. Für UreE konnten ebenfalls reduzierte Proteinmengen im Direktverdau IC gezeigt werden. Durch Katalyse der Hydrolyse von Urea zu zwei Molekülen Ammoniak und Kohlenstoffdioxid, wirkt das Enzym bei saurem pH-Wert in der flüssigen Kultur neutralisierend. Dies verbessert die Überlebensraten des Bakteriums in planktonischer Form

und in Biofilmen [166]. Abbildung 39 zeigt die beteiligten Enzyme mit den gemessenen Tendenz der Proteinmengen nach Behandlung mit Myrtol stand.



**Abbildung 39: Hydrolyse von Urease zu Ammoniak und Kohlenstoffdioxid**

IC, intrazellulär, DV, Direktverdau. Schematische Darstellung der Reaktion von Urea zu Ammoniak und Kohlenstoffdioxid mit entsprechender Summenformel. Die katalysierenden Enzymkomplexe aus den Proteinen UreA- C und UreD- G (Accessory Proteine) sind mit den Ergebnissen aus dem Direktverdau 8 h nach Behandlung dargestellt. Alle identifizierten Proteine aus den Komplexen (UreA, UreB, UreE) zeigen nach Behandlung intrazellulär erhöhte Proteinmengen im Vergleich zur Kontrolle.

Die Analyse der zusätzlichen Proteinidentifikationen aus dem Direktverdau ermöglicht Aussagen über den Myrtol stand. spezifischen Einfluss auf ganze Stoffwechselwege. Für die Enzyme UreA und GlmM (s.o.) konnte dies bereits gezeigt werden. Ein möglicher Ansatzpunkt zukünftiger Untersuchungen können weitere Analysen dieser Identifikationen darstellen. Zusätzlich könnten auch entsprechende Genregulatoren in ihren Proteinmengen getestet werden.

Durch Beeinflussung der multiplen o.g. Faktoren zeigt Myrtol stand. eine signifikante Reduktion der Fähigkeiten des Bakteriums zur Biofilmbildung und somit vermutlich für die klinischen Verläufe von ARS und CRS geringere Persistenz bzw. Rezidivneigung.

#### **8.4 Einordnung dieser Arbeit und Ausblick**

Die erzielten Ergebnisse aus den in vitro Wachstumsexperimenten unter Behandlung mit Myrtol stand. ermöglichen nun detaillierte Angaben zur dosisabhängigen antimikrobiellen Wirkung über 24 h und auf epidemiologisch relevante Isolate von *S. aureus*.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem erstmals die morphologischen Veränderungen von *S. aureus* in vitro unter Behandlung mit Myrtol stand. mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht und signifikante Volumenänderungen festgestellt.

Die umfangreichen Proteinanalysen von *S. aureus* nach Behandlung mit Myrtol stand. mit Hilfe von 2D-DIGE, mit anschließender Massenspektrometrie veränderter Proteinspots und vergleichendem Direktverdau mit anschließender LC-MS, zeigen erstmals die Proteomveränderung des Bakteriums im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben über einen Zeitraum von 24 h. Während bislang nur für einzelne Wirkstoffbestandteile und wenige Proteine Informationen bekannt waren, ist dies die erste umfassende Analyse.

Myrtol stand. ist bereits ein klinisch erprobtes, seit vielen Jahren angewendetes Phytopharmakon, dessen Nebenwirkungen bekannt und überschaubar sind. Aktuell findet es als OTC vor allem in der Therapie der ARS und Bronchitis Anwendung. Aufgrund der hier in vitro gezeigten guten antimikrobiellen Wirksamkeit und damit der Veränderung des gesamten Proteoms wie die starke Herabsetzung der Virulenzfaktoren auf Translationsebene sollten klinische Untersuchungen zur Therapie von *S. aureus*-assoziierten Infektionen des menschlichen Körpers und speziell im Sinusnasalraum folgen.

Als mögliche Anwendungsformen stehen hier die verschiedenen etablierten Kapselformen zur Verfügung. Zusätzlich sollte die topische Anwendung des Phytopharmakons in klinischen DBPC Untersuchungen als Nasenöl, Nasenspülung oder Nasenspray auf Verträglichkeit und später Wirksamkeit geprüft werden. Aktuell im EPOS 2020 aufgeführte Studien zur lokalen Anwendung bei ätherischen Ölen aus Anis und Schwarzkümmel [48, 123, 167] zeigen mögliche positive Effekte, welche in gut konzipierten Studien belegt werden müssen. Möglich ist auch das Hinzufügen von Myrtol stand. zu bereits etablierten Nasenemulsionen oder Salben zur Schleimhautpflege. Zuvor ist eine Überprüfung des Effekts der lokalen Anwendung auf die Zilienkinetik der Schleimhaut sinnvoll.

Potentielle Zielgruppen einer solchen Therapie sind Patienten mit ARS sowie spezifische Endotypen/Phänotypen der CRS. Nach aktuellem EPOS 2020 sollte bei Verdacht auf ABRS (0,5-2% der ARS [48, 146]) die Verordnung einer Antibiotikatherapie nur nach strengen Kriterien erfolgen, um eine zusätzliche Resistenzentwicklung zu verhindern. Hier sollte die Therapie mit Myrtol stand. in oben genannten Applikationsformen als Alternative oder als Adjuvanz zur Dosisreduktion der Antibiotika geprüft werden. Zusätzlich sollten in DBPC-Studien die systemische und topische Anwendung bei CRS insbesondere der primären CRS vom Typ 2 mit nasalen Polypen (CRSwNP) bzw. einer erhöhten IgE-Konzentration untersucht werden. Patienten mit nachgewiesenem *S. aureus* Biofilm zeigen häufiger schwere komplikationsreiche Krankheitsverläufe. Bisherige Studien legen einen Zusammenhang zwischen der Biofilmformation selbst und der Induktion von IgE Bildung durch Sekretion der Superantigen-Enterotoxine nahe [98, 110, 155], ohne dass bisher entsprechende Metaanalysen vorliegen. EPOS 2020 fordert die Anwendung spezifischer nachgewiesener wirksamer Therapien bei den verschiedenen Phänotypen der CRS. In bestimmten Patientengruppen der Typ 2 CRS werden mittlerweile hochspezifische Interleukin Antikörper (z.B. IL 4,5,13) empfohlen und z. T. zugelassen [8, 47, 48]. Dementsprechend ist eine Prüfung der Effekte von Myrtol stand. auch auf diese Parameter sinnvoll. Zusätzlich zeigen sich unter nachgewiesener Kolonisation mit intrazellulärem *S. aureus* oder Biofilmen für Patienten mit CRS höhere Rezidivraten und Symptompersistenzen nach FESS, unabhängig davon ob eine Polyposis vorliegt oder nicht [137, 151, 184].

Generell gilt es, angesichts der wachsenden Resistenzen bei *S. aureus*, alternative Strategien für die Eradikation zu finden, auch weil für etablierte Anwendungen, wie z.B. Mupirozin, sich gehäuft Therapieversager zeigen [1]. Nach ausführlicher Verträglichkeitsprüfung sollte die topische Anwendung zur MRSA Dekolonisierung mit Myrtol stand., ähnlich wie z.B. bei Teebaumöl geprüft werden [41].

## 9 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die antimikrobiellen Effekte der Phytopharmaka BNO 101 und Myrtol stand. auf *Staphylococcus aureus* direkt miteinander verglichen. Für BNO 101 umfassten die Untersuchungen Wachstumsexperimente mit Messungen der Optischen Dichte und Experimente zur CFU-Bestimmung. In keinem dieser Experimente konnten antimikrobielle Effekte auf *S. aureus* unter Behandlung gezeigt werden. Für Myrtol stand. wurden Wachstumsexperimente analog durchgeführt. Hierbei konnte ein deutlicher bakteriostatischer Effekt auf *S. aureus* und verglichen mit BNO 101 eine höhere Wirksamkeit nachgewiesen werden.

Unter der Gesamtkonzentration von 0,25% Myrtol stand. liegen die Überlebensraten der Bakterien 4 h bis 24 h nach Behandlung bei unter 40% im Vergleich zu der Kontrolle. Um Ursachen für die antibakteriellen Effekte zu finden, wurden die Zellen mittels Rasterelektronenmikroskopie morphologisch zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung untersucht und eine Myrtol stand.-spezifische Volumenzunahme von bis zu 69% ermittelt. Zusätzlich wurden Proteinproben der Zellen mittels 2D-DIGE aufgetrennt. Hierbei wurden separat intrazellulär 1223 sowie extrazellulär 610 Proteinspots detektiert und miteinander verglichen. Durch Behandlung mit 0,25% Myrtol stand. wurde das *S. aureus* Proteom über den gesamten Messzeitraum von 24 h nach Behandlung massiv verändert. Mittels anschließendem tryptischen Verdau und Massenspektrometrie (LC-MS) signifikant veränderter Spots, konnte eine Vielzahl von Proteinen identifiziert und davon 54 verschiedene Proteine einzelnen Stoffwechselwegen durch Datenbankabgleich und Literaturrecherche zugeordnet werden. Bemerkenswert ist die deutliche Reduktion der Virulenzfaktoren des Bakteriums durch Myrtol stand. Behandlung. Unter anderem konnten für Superantigen-Enterotoxine, Leukotoxine, Hämolsine und Serine-Proteasen und den Genregulator Agr deutlich verminderte Proteinmengen nach Behandlung gemessen werden. Die veränderten Proteinmengen sind hierbei sowohl auf eine Umverteilung der Proteine zwischen den Zellkompartimenten, als auch auf deutliche Regulation in der Proteinbiosynthese zurückzuführen. Neben den Virulenzfaktoren ließen sich bspw. auch zahlreiche Enzyme der Zellwand- und Zellmembransynthese sowie des Energiemetabolismus mit deutlich veränderten Proteinmengen nachweisen, die für das Überleben der Bakterienzellen kritisch sind. Mittels Direktverdau und nachfolgender LC-MS der Proteinproben wurden die Ergebnisse bestätigt und weitere regulierte Proteine identifiziert.

Im Rahmen dieser Dissertation konnten antimikrobielle Effekte von Myrtol stand. auf *Staphylococcus aureus* nachgewiesen und deren Ursachen aufgezeigt werden. Die ausführlichen Proteinanalysen nach Behandlung mit Myrtol stand. lassen auf eine starke verminderte Virulenz des Bakteriums schließen. Angesichts des Bedarfs an zielgerichteten Therapieverfahren entsprechend der Phänotypen von CRS und ABRS, bietet die systemische Gabe von Myrtol stand. hier eine kausale Therapieoption. Die zusätzliche Möglichkeit einer topischen Anwendungsform kann angesichts der hier gezeigten Wirkungen eine vielversprechende Behandlungsmaßnahme sein und sollte Ziel klinischer Untersuchungen werden.



## 10 Literatur

1. Abad CL, Pulia MS, Safdar N Does the nose know? An update on MRSA decolonization strategies. *Curr Infect Dis Rep* (2013) 15(6):455–464
2. Al-Asousi F, Dadgostar A, Javer A Sinonasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Updates on treatment. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* (2017) 25(1):19–23
3. Alonzo F, Torres VJ The bicomponent pore-forming leucocidins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Mol Biol Rev* (2014) 78(2):199–230
4. App EM Stellenwert der Mukusclearance für das Bronchialsystem — Pathophysiologie und therapeutische Ansätze. In: Meister R (Hrsg) Entzündliche Erkrankungen des Bronchialsystems. Springer Berlin Heidelberg (2000), 27–53
5. Askarian F, Ajayi C, Hanssen A-M, van Sorge NM, Pettersen I, Diep DB, Sollid JUE, Johannessen M The interaction between *Staphylococcus aureus* SdrD and desmoglein 1 is important for adhesion to host cells. *Sci Rep* (2016) 6:22134
6. Aurass P, Gerlach T, Becher D, Voigt B, Karste S, Bernhardt J, Riedel K, Hecker M, Flieger A Life Stage-specific Proteomes of *Legionella pneumophila* Reveal a Highly Differential Abundance of Virulence-associated Dot/Icm effectors. *Mol Cell Proteomics* (2016) 15(1):177–200
7. Azizkhani M, Misaghi A, Basti AA, Gandomi H, Hosseini H Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A, C and E in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Int J Food Microbiol* (2013) 163(2-3):159–165
8. Bachert C, Zhang N Chronic rhinosinusitis and asthma: novel understanding of the role of IgE 'above atopy'. *J Intern Med* (2012) 272(2):133–143
9. Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Johansson SG, van Cauwenberge P Total and specific IgE in nasal polyps is related to local eosinophilic inflammation. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2001) 107(4):607–614
10. Bachert C, Hörmann K, Mösges R, Rasp G, Riechelmann H, Müller R, Luckhaupt H, Stuck BA, Rudack C An update on the diagnosis and treatment of sinusitis and nasal polyposis. *Allergy* (2003) 58(3):176–191
11. Bachert C, Claeys SEM, Tomassen P, van Zele T, Zhang N Rhinosinusitis and asthma: a link for asthma severity. *Curr Allergy Asthma Rep* (2010) 10(3):194–201
12. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol* (2008) 46(2):446–475

13. Bayer AS, Schneider T, Sahl H-G Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall. *Ann N Y Acad Sci* (2013) 1277:139–158
14. Becher D, Hempel K, Sievers S, Zühlke D, Pané-Farré J, Otto A, Fuchs S, Albrecht D, Bernhardt J, Engelmann S, Völker U, van Dijl JM, Hecker M A proteomic view of an important human pathogen--towards the quantification of the entire *Staphylococcus aureus* proteome. *PLoS ONE* (2009) 4(12):e8176
15. Begrow F, Böckenholt C, Ehmen M, Wittig T, Verspohl EJ Effect of myrtol standardized and other substances on the respiratory tract: ciliary beat frequency and mucociliary clearance as parameters. *Adv Ther* (2012) 29(4):350–358
16. Bendouah Z, Barbeau J, Abou Hamad W, Desrosiers M Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngology- Head Neck and Neck Surgery* (2006) 134(6):991–996
17. Bernhardt J, Funke S, Hecker M, Siebourg J Visualizing Gene Expression Data via Voronoi Treemaps. In: Anton F (Hrsg) Sixth International Symposium on Voronoi Diagrams 2009, ISVD '09. 23 - 26 June 2009, Copenhagen, Denmark ; proceedings. IEEE, Piscataway, NJ (2009), 233–241
18. Beule AG Epidemiologie der chronischen Rhinosinusitis, ausgewählter Risikofaktoren und Komorbiditäten, und ihre ökonomischen Folgen. *Laryngo- Rhino- Otologie* (2015) 94 Suppl 1:S1-S23
19. Beule AG, Weber RK, Kaftan H, Hosemann W Übersicht: Art und Wirkung geläufiger Nasentamponaden. *Laryngorhinootologie* (2004) 83(8):534-51; quiz 553-6
20. Bionorica Sinupret Tropfen. Gebrauchsinformationen: Informationen für den Anwender (2012)
21. Blackwell DL, Collins JG, Coles R Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 1997. *Vital Health Stat* 10 (2002) (205):1–109
22. Bleiziffer I, Eikmeier J, Pohlentz G, McAulay K, Xia G, Hussain M, Peschel A, Foster S, Peters G, Heilmann C The Plasmin-Sensitive Protein Pls in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Is a Glycoprotein. *PLoS Pathog* (2017) 13(1):e1006110
23. Bomblies L & Sonnenschein R Myrtol standardisiert: "Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration"(MHK) mit verschiedenen Testkeimen. Myrtol standardisiert Dokumentation 1996

24. Bonn F, Pané-Farré J, Schlüter R, Schaffer M, Fuchs S, Bernhardt J, Riedel K, Otto A, Völker U, van Dijk JM, Hecker M, Mäder U, Becher D Global analysis of the impact of linezolid onto virulence factor production in *S. aureus* USA300. *Int J Med Microbiol* (2016) 306(3):131–140
25. Bowers JR, Driebe EM, Albrecht V, McDougal LK, Granade M, Roe CC, Lemmer D, Rasheed JK, Engelthaler DM, Keim P, Limbago BM Improved Subtyping of *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 8 Strains Based on Whole-Genome Phylogenetic Analysis. *mSphere* (2018) 3(3):1–15
26. Brook I Microbiology of chronic rhinosinusitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2016) 35(7):1059–1068
27. Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller e. V. Der Arzneimittelmarkt in Deutschland. Zahlen und Fakten 2017 2017:1–48
28. Burt S Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int J Food Microbiol* (2004) 94(3):223–253
29. Carson CF, Mee BJ, Riley TV Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2002) 46(6):1914–1920
30. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D et al Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015. A population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases* (2019) 19(1):56–66
31. Cheng K-J, Wang S-Q, Xu Y-Y Different roles of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in different subtypes of nasal polyps. *Exp Ther Med* (2017) 13(1):321–326
32. Christoph F, Kaulfers PM, Stahl-Biskup E In vitro evaluation of the antibacterial activity of beta-triketones admixed to *Melaleuca* oils. *Planta Med.* (2001) 67(8):768–771
33. Corriveau M-N, Zhang N, Holtappels G, van Roy N, Bachert C Detection of *Staphylococcus aureus* in nasal tissue with peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization. *Am J Rhinol Allergy* (2009) 23(5):461–465
34. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* (1999) 284(5418):1318–1322
35. De Smet, Peter A G M Herbal medicine in Europe--relaxing regulatory standards. *N. Engl. J. Med.* (2005) 352(12):1176–1178

36. DeLeo FR, Diep BA, Otto M Host defense and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* infections. *Infect Dis Clin North Am* (2009) 23(1):17–34
37. Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin (DEGAM), Düsseldorf Rhinosinusitis DEGAM. Leitlinie Nr. 10. Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin (DEGAM) Geschäftsstelle Leitlinien 2008
38. Di Pasqua R, Mamone G, Ferranti P, Ercolini D, Mauriello G Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics* (2010) 10(5):1040–1049
39. Dlugaszewska J, Leszczynska M, Lenkowski M, Tatarska A, Pastusiak T, Szyfter W The pathophysiological role of bacterial biofilms in chronic sinusitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2016) 273(8):1989–1994
40. Dreisbach A, van Dijk JM, Buist G The cell surface proteome of *Staphylococcus aureus*. *Proteomics* (2011) 11(15):3154–3168
41. Dryden MS, Dailly S, Crouch M A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. *J Hosp Infect* (2004) 56(4):283–286
42. Ebner P, Rinker J, Nguyen MT, Popella P, Nega M, Luqman A, Schitteck B, Di Marco M, Stevanovic S, Gotz F Excreted Cytoplasmic Proteins Contribute to Pathogenicity in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* (2016) 84(6):1672–1681
43. Ebner P, Luqman A, Reichert S, Hauf K, Popella P, Forchhammer K, Otto M, Götz F Non-classical protein excretion is boosted by PSM $\alpha$ -induced cell leakage. *Cell Rep* (2017) 20(6):1278–1286
44. Federman C, Ma C, Biswas D Major components of orange oil inhibit *Staphylococcus aureus* growth and biofilm formation, and alter its virulence factors. *J Med Microbiol* (2016) 65(7):688–695
45. Federspil P, Wulkow R, Zimmermann T Wirkung von Myrtol standardisiert bei der Therapie der akuten Sinusitis--Ergebnisse einer doppelblinden, randomisierten Multicenterstudie gegen Plazebo. *Laryngorhinootologie* (1997) 76(1):23–27
46. Ferguson BJ, Stolz DB Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis. *American Journal of Rhinology* (2005) 19(5):452–457
47. Fokkens WJ, Lund V, Bachert C, Mullol J, Bjermer L, Bousquet J, Canonica GW, Deneyer L, Desrosiers M, Diamant Z, Han J, Heffler E, Hopkins C, Jankowski R, Joos G, Knill A, Lee J,

- Lee SE, Mariën G, Pugin B, Senior B, Seys SF, Hellings PW EUFOREA consensus on biologics for CRSwNP with or without asthma. *Allergy* (2019) 74(12):2312–2319
48. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C et al European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. *Rhinology* (2020) 58(Suppl S29):1–464
49. Foreman A, Psaltis AJ, Tan LW, Wormald P-J Characterization of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* (2009) 23(6):556–561
50. Foreman A, Holtappels G, Psaltis AJ, Jervis-Bardy J, Field J, Wormald PJ, Bachert C Adaptive immune responses in *Staphylococcus aureus* biofilm-associated chronic rhinosinusitis. *Allergy* (2011) 66(11):1449–1456
51. Frees D, Andersen JH, Hemmingsen L, Koskenniemi K, Baek KT, Muhammed MK, Gudeta DD, Nyman TA, Sukura A, Varmanen P, Savijoki K New insights into *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence regulation from an analysis of the role of the ClpP protease in the strains Newman, COL, and SA564. *J Proteome Res* (2012) 11(1):95–108
52. Fuchs G, Schlegel H-G, Eitinger T (Hrsg) *Allgemeine Mikrobiologie*, 9. Aufl. Thieme, Stuttgart (2014)
53. Fuller JR, Vitko NP, Perkowski EF, Scott E, Khatri D, Spontak JS, Thurlow LR, Richardson AR Identification of a lactate-quinone oxidoreductase in *Staphylococcus aureus* that is essential for virulence. *Front Cell Infect Microbiol* (2011) 1:19
54. Furuya H, Ikeda R Interaction of triosephosphate isomerase from *Staphylococcus aureus* with plasminogen. *Microbiol Immunol* (2011) 55(12):855–862
55. G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, 25551 Hohenlockstedt, DE MYRTOL, GeloMyrtol, Gelomyrtol, 1992
56. García-Salinas S, Elizondo-Castillo H, Arruebo M, Mendoza G, Irusta S Evaluation of the Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of Different Components of Natural Origin Present in Essential Oils. *Molecules* (2018) 23(6)
57. Gillissen A, Wittig T, Ehmen M, Krezdorn HG, Mey C de A multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial on the efficacy and tolerability of GeloMyrtol® forte in acute bronchitis. *Drug Res (Stuttg)* (2013) 63(1):19–27
58. Götz F, Bannerman T, Schleifer K-H The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. *Prokaryotes* (2006) 4:5–75
59. Gravet A, Colin DA, Keller D, Giradot R, Monteil H, Prévost G Characterization of a novel structural member, LukE-LukD, of the bi-component staphylococcal leucotoxins family. *FEBS Letters* (1998) 436(2):202–208

60. Griffin A. S., Cabot P., Wallwork B., Panizza B. Alternative Therapies for Chronic Rhinosinusitis: A Review (2018) 97(3):1–9
61. Gwaltney JM, Phillips CD, Miller RD, Riker DK Computed tomographic study of the common cold. *N. Engl. J. Med.* (1994) 330(1):25–30
62. Haft DH The TIGRFAMs database of protein families. *Nucleic Acids Res* (2003) 31(1):371–373
63. Haft DH, Loftus BJ, Richardson DL, Yang F, Eisen JA, Paulsen IT, White O TIGRFAMs. A protein family resource for the functional identification of proteins. *Nucleic Acids Res* (2001) 29(1):41–43
64. Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Muller E, Rohde M Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infection and Immunity* (2005) 73(8):4653–4667
65. Han D, Wang N, Zhang L The effect of myrtol standardized on human nasal ciliary beat frequency and mucociliary transport time. *Am J Rhinol Allergy* (2009) 23(6):610–614
66. Hastan D, Fokkens WJ, Bachert C, Newson RB, Bislimovska J, Bockelbrink A, Bousquet PJ, Brozek G, Bruno A, Dahlén SE, Forsberg B, Gunnbjörnsdóttir M, Kasper L, Krämer U, Kowalski ML, Lange B, Lundbäck B, Salagean E, Todo-Bom A, Tomassen P, Toskala E, van Drunen CM, Bousquet J, Zuberbier T, Jarvis D, Burney P Chronic rhinosinusitis in Europe--an underestimated disease. A GA<sup>2</sup>LEN study. *Allergy* (2011) 66(9):1216–1223
67. Hauer AJ, Luiten EL, van Erp NF, Blase PE, Aarts MCJ, Kaper NM, van der Heijden GJMG No evidence for distinguishing bacterial from viral acute rhinosinusitis using fever and facial/dental pain. A systematic review of the evidence base. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2014) 150(1):28–33
68. Hippeli S, Grassmann J, Dornisch K, Rohnert U, Elstner EF Freie Radikale in Pathogenese und Therapie von entzündlichen Erkrankungen des Bronchialsystems. In: Meister R (Hrsg) Entzündliche Erkrankungen des Bronchialsystems. Springer Berlin Heidelberg (2000), 1–26
69. Hof H, Dörries R Medizinische Mikrobiologie. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart (2009). S. 310-318
70. Holtfreter S, Grumann D, Schmutte M, Nguyen, H T T, Eichler P, Strommenger B, Kopron K, Kolata J, Giedrys-Kalemba S, Steinmetz I, Witte W, Bröker BM Clonal distribution of superantigen genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* (2007) 45(8):2669–2680

71. Holtfreter S, Nguyen TTH, Wertheim H, Steil L, Kusch H, Truong QP, Engelmann S, Hecker M, Volker U, van Belkum A, Broker BM Human immune proteome in experimental colonization with *Staphylococcus aureus*. *Clin Vaccine Immunol* (2009) 16(11):1607–1614
72. Holtfreter S, Radcliff FJ, Grumann D, Read H, Johnson S, Monecke S, Ritchie S, Clow F, Goerke C, Broker BM, Fraser JD, Wiles S Characterization of a mouse-adapted *Staphylococcus aureus* strain. *PLoS ONE* (2013) 8(9):1-10
73. Holtfreter S, Grumann D, Balau V, Barwich A, Kolata J, Goehler A, Weiss S, Holtfreter B, Bauerfeind SS, Doring P, Friebe E, Haasler N, Henselin K, Kuhn K, Nowotny S, Radke D, Schulz K, Schulz SR, Trube P, Hai Vu C, Walther B, Westphal S, Cuny C, Witte W, Volzke H, Grabe HJ, Kocher T, Steinmetz I, Broker BM Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in the general population in Northeast Germany - results of the Study of Health in Pomerania (SHIP-TREND-0). *J. Clin. Microbiol.* (2016)
74. Honório VG, Bezerra J, Souza GT, Carvalho RJ, Gomes-Neto NJ, Figueiredo, Regina C. B. Q., Melo JV, Souza EL, Magnani M Inhibition of *Staphylococcus aureus* cocktail using the synergies of oregano and rosemary essential oils or carvacrol and 1,8-cineole. *Front Microbiol* (2015) 6:1–10
75. Hu C, Xiong N, Zhang Y, Rayner S, Chen S Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun* (2012) 419(4):617–620
76. Huang Y, Xue C, He W, Zhao X Inhibition effect of Zedoary turmeric oil on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* growth and exotoxin proteins production. *J Med Microbiol* (2019):657–666
77. Ismail C, Wiesel A, März RW, Queisser-Luft A Surveillance study of Sinupret in comparison with data of the Mainz birth registry. *Arch Gynecol Obstet* (2003) 267(4):196–201
78. Jardak M, Elloumi-Mseddi J, Aifa S, Mnif S Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Tunisia. *Lipids Health Dis* (2017) 16(1):1–10
79. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, agr Groups (Alleles), and Human Disease. *Infect. Immun.* (2002) 70(2):631–641
80. Jefferson KK What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* (2004) 236(2):163–173

81. Jenkins A, Diep BA, Mai TT, Vo NH, Warren P, Suzich J, Stover CK, Sellman BR Differential Expression and Roles of *Staphylococcus aureus* Virulence Determinants during Colonization and Disease. *MBio* (2014) 6(1):1–10
82. Jenkins R, Burton N, Cooper R Proteomic and genomic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) exposed to manuka honey in vitro demonstrated down-regulation of virulence markers. *J Antimicrob Chemother* (2014) 69(3):603–615
83. Jenul C, Horswill AR Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiol Spectr* (2018) 6(1):1–34
84. Jones NS CT of the paranasal sinuses. A review of the correlation with clinical, surgical and histopathological findings. *Clin Otolaryngol Allied Sci* (2002) 27(1):11–17
85. Jund R, Mondigler M, Stammer H, Stierna P, Bachert C Herbal drug BNO 1016 is safe and effective in the treatment of acute viral rhinosinusitis. *Acta Oto-Laryngologica* (2015) 135(1):42–50
86. Kawada-Matsuo M, Oogai Y, Komatsuzawa H Sugar Allocation to Metabolic Pathways is Tightly Regulated and Affects the Virulence of *Streptococcus mutans*. *Genes (Basel)* (2016) 8(1):1–12
87. Kohler C, Wolff S, Albrecht D, Fuchs S, Becher D, Buttner K, Engelmann S, Hecker M Proteome analyses of *Staphylococcus aureus* in growing and non-growing cells: a physiological approach. *Int J Med Microbiol* (2005) 295(8):547–565
88. Kong C, Neoh H-m, Nathan S Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins (Basel)* (2016) 8(3):1–21
89. Krakauer T Staphylococcal Superantigens. Pyrogenic Toxins Induce Toxic Shock. *Toxins (Basel)* (2019) 11(3):1–19
90. Krakauer T, Stiles BG The staphylococcal enterotoxin (SE) family: SEB and siblings. *Virulence* (2013) 4(8):759–773
91. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas G-JE A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* (2001) 91(3):453–462
92. Lappin E, Ferguson AJ Gram-positive toxic shock syndromes. *The Lancet Infectious Diseases* (2009) 9(5):281–290
93. Lee K, Lee J-H, Kim S-I, Cho MH, Lee J Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol* (2014) 98(22):9447–9457



94. Leibig M, Liebeke M, Mader D, Lalk M, Peschel A, Gotz F Pyruvate formate lyase acts as a formate supplier for metabolic processes during anaerobiosis in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* (2011) 193(4):952–962
95. Lewis K Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2001) 45(4):999–1007
96. Lina G, Quaglia A, Reverdy M-E, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J Distribution of Genes Encoding Resistance to Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins among *Staphylococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1999) 43(5):1062–1066
97. Liu H, Lv J, Qi X, Ding Y, Li D, Hu L, Wang L, Yu F The carriage of the serine-aspartate repeat protein-encoding *sdr* genes among *Staphylococcus aureus* lineages. *Braz J Infect Dis* (2015) 19(5):498–502
98. Maina IW, Patel NN, Cohen NA Understanding the Role of Biofilms and Superantigens in Chronic Rhinosinusitis. *Curr Otorhinolaryngol Rep* (2018) 6(3):253–262
99. Matthys H, Mey C de, Carls C, Rys A, Geib A, Wittig T Efficacy and Tolerability of Myrtol Standardized in Acute Bronchitis - A multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled parallel group clinical trial vs. cefuroxime and ambroxol. *Arzneimittelforschung* (2000) 50(8):700–711
100. Maune S Anti-microbial potential of medical plant extracts (Sinupret®) regarding sinusitis. *European Journal of Integrative Medicine* (2008) 1:12–13
101. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol* (2015) 5:1–9
102. McCoul ED, Jourdy DN, Schaberg MR, Anand VK Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* sinusitis in nonhospitalized patients. A systematic review of prevalence and treatment outcomes. *Laryngoscope* (2012) 122(10):2125–2131
103. Mehraj J, Akmatov MK, Strömpl J, Gatzemeier A, Layer F, Werner G, Pieper DH, Medina E, Witte W, Pessler F, Krause G Methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal carriage in a random sample of non-hospitalized adult population in northern Germany. *PLoS ONE* (2014) 9(9):1-8
104. Meister R, Wittig T, Beuscher N, Mey C de Efficacy and tolerability of myrtol standardized in long-term treatment of chronic bronchitis. A double-blind, placebo-controlled study. Study Group Investigators. *Arzneimittelforschung* (1999) 49(4):351–358

105. Melzer J, Saller R, Schapowal A, Brignoli R Systematic review of clinical data with BNO-101 (Sinupret (R)) in the treatment of sinusitis. *Forschende Komplementärmedizin und klassische Naturheilkunde* (2006) 13(2):78–87
106. Menck K, Scharf C, Bleckmann A, Dyck L, Rost U, Wenzel D, Dhople VM, Siam L, Pukrop T, Binder C, Klemm F Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN. *J Mol Cell Biol* (2015) 7(2):143–153
107. Nazzaro F, Fratianni F, Martino L de, Coppola R, Feo V de Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)* (2013) 6(12):1451–1474
108. NH DyeAGNOSTICS GmbH Produktinformation Refraction-2D™ Labeling Kit. Produkt-Nr. PR08, PR08G, PR09, PR10, PR11, PR12, PR13 (Stand 2013)
109. Nielsen MW, Hansen EH, Rasmussen NK Use of natural medicines in the Danish population. A national cross-sectional survey. *Ann Pharmacother* (2005) 39(9):1534–1538
110. Ou J, Wang J, Xu Y, Tao Z-z, Kong Y-g, Chen S-m, Shi W-d Staphylococcus aureus superantigens are associated with chronic rhinosinusitis with nasal polyps: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2014) 271(10):2729–2736
111. Ou J, Drilling A, Singhal D, Tan NC-W, Wallis-Hill D, Vreugde S, Psaltis AJ, Wormald P-J Association of intracellular Staphylococcus aureus with prognosis in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol* (2016) 6(8):792–799
112. Palm D, Simm S, Darm K, Weis BL, Ruprecht M, Schleiff E, Scharf C Proteome distribution between nucleoplasm and nucleolus and its relation to ribosome biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *RNA Biol* (2016) 13(4):441–454
113. Palm J, Steiner I, Abramov-Sommariva D, Ammendola A, Mitzenheim S, Steindl H, Wonnemann M, Bachert C Assessment of efficacy and safety of the herbal medicinal product BNO 1016 in chronic rhinosinusitis. *Rhinology* (2017) 55(2):142–151
114. Paparoupa M, Gillissen A Is Myrtol(R) Standardized a New Alternative toward Antibiotics? *Pharmacogn Rev* (2016) 10(20):143–146
115. Piltcher OB, Kosugi EM, Sakano E, Mion O, Testa JRG, Romano FR, Santos MCJ, Di Francesco RC, Mitre EI, Bezerra TFP, Roithmann R, Padua FG, Valera FCP, Lubianca Neto JF, Sá LCB, Pignatari SSN, Avelino MAG, Caixeta JAdS, Anselmo-Lima WT, Tamashiro E How to avoid the inappropriate use of antibiotics in upper respiratory tract infections? A position statement from an expert panel. *Braz J Otorhinolaryngol* (2018) 84(3):265–279
116. Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, Homburger HA, Frigas E, Gaffey TA, Roberts GD The diagnosis and incidence of allergic fungal sinusitis. *Mayo Clin Proc* (1999) 74(9):877–884

117. Qiu J, Feng H, Lu J, Xiang H, Wang D, Dong J, Wang J, Wang X, Liu J, Deng X Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* (2010) 76(17):5846–5851
118. Qiu J, Wang D, Xiang H, Feng H, Jiang Y, Xia L, Dong J, Lu J, Yu L, Deng X Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and alpha-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS ONE* (2010) 5(3):e9736
119. Qiu J, Li H, Su H, Dong J, Luo M, Wang J, Leng B, Deng Y, Liu J, Deng X Chemical composition of fennel essential oil and its impact on *Staphylococcus aureus* exotoxin production. *World J Microbiol Biotechnol* (2012) 28(4):1399–1405
120. Ramadan, Hassan H. MD, Sanclement, Jose A. MD, Thomas JMD Chronic Rhinosinusitis and Biofilms. *Otolaryngology Head & Neck Surgery* (2004) 131(2):414–417
121. Reed P, Atilano ML, Alves R, Hoiczyc E, Sher X, Reichmann NT, Pereira PM, Roemer T, Filipe SR, Pereira-Leal JB, Ligoxygakis P, Pinho MG *Staphylococcus aureus* Survives with a Minimal Peptidoglycan Synthesis Machine but Sacrifices Virulence and Antibiotic Resistance. *PLoS Pathog* (2015) 11(5):1-19
122. Reyes-Robles T, Alonzo F3, Kozhaya L, Lacy DB, Unutmaz D, Torres VJ *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection. *Cell Host Microbe* (2013) 14(4):453–459
123. Rezaeian A, Amoushahi Khouzani S Effect of *Nigella sativa* Nasal Spray on the Treatment of Chronic Rhinosinusitis Without a Nasal Polyp. *Allergy Rhinol (Providence)* (2018) 9:1-5
124. Roca-Ferrer J, Garcia-Garcia FJ, Pereda J, Perez-Gonzalez M, Pujols L, Alobid I, Mullol J, Picado C Reduced expression of COXs and production of prostaglandin E(2) in patients with nasal polyps with or without aspirin-intolerant asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2011) 128(1):66-72
125. Rollof J, Vinge E, Nilsson-Ehle P, Braconier JH Aggregation of human granulocytes by *Staphylococcus aureus* lipase. *J Med Microbiol* (1992) 36(1):52–55
126. Rosenfeld RM, Piccirillo JF, Chandrasekhar SS, Brook I, Ashok Kumar K, Kramper M, Orlandi RR, Palmer JN, Patel ZM, Peters A, Walsh SA, Corrigan MD Clinical practice guideline (update). Adult sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2015) 152(2 Suppl):1-39
127. Rubini D, Banu SF, Nisha P, Murugan R, Thamocharan S, Percino MJ, Subramani P, Nithyanand P Essential oils from unexplored aromatic plants quench biofilm formation

- and virulence of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog* (2018) 122:162–173
128. Sachse F, Becker K, Eiff C von, Metze D, Rudack C *Staphylococcus aureus* invades the epithelium in nasal polyposis and induces IL-6 in nasal epithelial cells in vitro. *Allergy* (2010 Nov) 65(11):1430–1437
129. Sarkar P, Acharyya S, Banerjee A, Patra A, Thankamani K, Koley H, Bag PK Intracellular, biofilm-inhibitory and membrane-damaging activities of nimbolide isolated from *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* (2016) 65(10):1205–1214
130. Savijoki K, Skogman M, Fallarero A, Nyman TA, Sukura A, Vuorela P, Varmanen P Penicillin G increases the synthesis of a suicidal marker (CidC) and virulence (HlgBC) proteins in *Staphylococcus aureus* biofilm cells. *Int J Med Microbiol* (2016) 306(1):69–74
131. Seilie ES, Bubeck Wardenburg J *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. *Semin Cell Dev Biol* (2017) 72:101–116
132. Sertel S Phytomedizin in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde - evidenzbasierte Medizin mit Heilpflanzen. *HNO* (2011) 59(12):1198–1202
133. Shamji MH, Thomsen I, Layhadi JA, Kappen J, Holtappels G, Sahiner U, Switzer A, Durham SR, Pabst O, Bachert C Broad IgG repertoire in patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps regulates proinflammatory IgE responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2019) 143(6):2086-2094
134. Shashy RG, Moore EJ, Weaver A Prevalence of the chronic sinusitis diagnosis in Olmsted County, Minnesota. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* (2004) 130(3):320–323
135. Sikkema J, Bont JA de, Poolman B Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* (1994) 269(11):8022–8028
136. Sikkema J, Bont JA de, Poolman B Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* (1995) 59(2):201–222
137. Singhal D, Psaltis AJ, Foreman A, Wormald P-J The impact of biofilms on outcomes after endoscopic sinus surgery. *Am J Rhinol Allergy* (2010) 24(3):169–174
138. Singhal D, Foreman A, Jervis-Bardy J, Bardy J-J, Wormald P-J *Staphylococcus aureus* biofilms. Nemesis of endoscopic sinus surgery. *Laryngoscope* (2011) 121(7):1578–1583
139. Sousa JP de, Torres RdA, Azeredo GA de, Figueiredo RCBQ, Vasconcelos MAdS, Souza EL de Carvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations

- induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. *Int J Food Microbiol* (2012) 158(1):9–13
140. Souza EL de, Barros JC de, Oliveira CEV de, da Conceição ML Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. *Int J Food Microbiol* (2010) 137(2-3):308–311
141. Spahich NA, Vitko NP, Thurlow LR, Temple B, Richardson AR *Staphylococcus aureus* lactate- and malate-quinone oxidoreductases contribute to nitric oxide resistance and virulence. *Mol Microbiol* (2016) 100(5):759–773
142. Stec-Niemczyk J, Pustelny K, Kisielewska M, Bista M, Boulware KT, Stennicke HR, Thogersen IB, Daugherty PS, Enghild JJ, Baczynski K, Popowicz GM, Dubin A, Potempa J, Dubin G Structural and functional characterization of SplA, an exclusively specific protease of *Staphylococcus aureus*. *Biochem J* (2009) 419(3):555–564
143. Stevens WW, Lee RJ, Schleimer RP, Cohen NA Chronic rhinosinusitis pathogenesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2015) 136(6):1442–1453
144. Stjärne P, Odebäck P, Ställberg B, Lundberg J, Olsson P High costs and burden of illness in acute rhinosinusitis. Real-life treatment patterns and outcomes in Swedish primary care. *Prim Care Respir J* (2012) 21(2):174-179
145. Strommenger B, Kettlitz C, Weniger T, Harmsen D, Friedrich AW, Witte W Assignment of *Staphylococcus* isolates to groups by spa typing, Smal macrorestriction analysis, and multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* (2006) 44(7):2533–2540
146. Stuck BA, Beule A, Jobst D, Klimek L, Laudien M, Lell M, Vogl TJ, Popert U Leitlinie „Rhinosinusitis“ – Langfassung. S2k-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V. *HNO* (2018) 66(1):38–74
147. Suh JD, Ramakrishnan V, Palmer JN Biofilms. *Otolaryngol. Clin. North Am.* (2010) 43(3):521–530
148. Suman E, D'souza SJ, Jacob P, Sushruth MR, Kotian MS Anti-biofilm and anti-adherence activity of Gln-U inhibitors. *Indian J Med Sci* (2011) 65(9):387–392
149. Tam K, Torres VJ *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr* (2019) 7(2):1–34
150. Tan NC-W, Foreman A, Jardeleza C, Douglas R, Tran H, Wormald PJ The multiplicity of *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis: correlating surface biofilm and intracellular residence. *Laryngoscope* (2012) 122(8):1655–1660

151. Tan NC-W, Foreman A, Jardeleza C, Douglas R, Vreugde S, Wormald P-J Intracellular *Staphylococcus aureus*: the Trojan horse of recalcitrant chronic rhinosinusitis? *Int Forum Allergy Rhinol* (2013) 3(4):261–266
152. Teuscher E, Melzig MF, Lindequist U Biogene Arzneimittel. Ein Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie ; mit 19 Tabellen, 7. Aufl. Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart (2012). S. 24- 34
153. The UniProt Consortium UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* (2019) 47(D1):D506-D515
154. Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE, Horswill AR Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev* (2011) 111(1):117–151
155. Tomassen P, Vandeplass G, van Zele T, Cardell L-O, Arebro J, Olze H, Forster-Ruhrmann U, Kowalski ML, Olszewska-Ziaber A, Holtappels G, Ruyck N de, Wang X, van Drunen C, Mullol J, Hellings P, Hox V, Toskala E, Scadding G, Lund V, Zhang L, Fokkens W, Bachert C Inflammatory endotypes of chronic rhinosinusitis based on cluster analysis of biomarkers. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2016) 137(5):1449-1456.e4
156. Tosi T, Hoshiga F, Millership C, Singh R, Eldrid C, Patin D, Mengin-Lecreux D, Thalassinou K, Freemont P, Gründling A Inhibition of the *Staphylococcus aureus* c-di-AMP cyclase DacA by direct interaction with the phosphoglucosamine mutase GlmM. *PLoS Pathog* (2019) 15(1):1-28
157. Traber KE, Lee E, Benson S, Corrigan R, Cantera M, Shopsis B, Novick RP agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbiology* (2008) 154(Pt 8):2265–2274
158. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2005) 49(6):2474–2478
159. Tsang LH, Cassat JE, Shaw LN, Beenken KE, Smeltzer MS Factors contributing to the biofilm-deficient phenotype of *Staphylococcus aureus* sarA mutants. *PLoS ONE* (2008) 3(10):e3361
160. Turchi B, Mancini S, Pistelli L, Najar B, Cerri D, Fratini F Sub-inhibitory stress with essential oil affects enterotoxins production and essential oil susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Nat Prod Res* (2018) 32(6):682–688
161. Uwe Bornscheuer, Alfred Pühler, Bernd Dill, Fred Robert Heiker, Andreas Kirschning, Franz Faupel, Gerhard Eisenbrand, Peter Schreier, Burkhard Fugmann, Georg Pohnert , Thomas Gamse, Uwe Dingerdissen (Hrsg) *Römpp Online* (Information entnommen 2015)

162. van Bruaene N, Derycke L, Perez-Novo CA, Gevaert P, Holtappels G, Ruyck N de, Cuvelier C, van Cauwenberge P, Bachert C TGF-beta signaling and collagen deposition in chronic rhinosinusitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* (2009) 124(2):253-259
163. van Crombruggen K, Zhang N, Gevaert P, Tomassen P, Bachert C Pathogenesis of chronic rhinosinusitis: inflammation. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* (2011 Oct) 128(4):728–732
164. van den Broek MFM, Gudden C, Kluijfhout WP, Stam-Slob MC, Aarts MCJ, Kaper NM, van der Heijden GJMG No evidence for distinguishing bacterial from viral acute rhinosinusitis using symptom duration and purulent rhinorrhea. A systematic review of the evidence base. *Otolaryngol Head Neck Surg* (2014) 150(4):533–537
165. van Zele T, Gevaert P, Holtappels G, van Cauwenberge P, Bachert C Local immunoglobulin production in nasal polyposis is modulated by superantigens. *Clin Exp Allergy* (2007) 37(12):1840–1847
166. Vandecandelaere I, van Nieuwerburgh F, Deforce D, Coenye T Metabolic activity, urease production, antibiotic resistance and virulence in dual species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* (2017) 12(3):1-19
167. Vazifekah S, Shams-Ardekani MR, Kamalinejad M, Saderhossein SM, Hosseini H, Shams SM, Abbassi S, Eghtesad S, Saedi B Evaluation of a novel natural drop for treatment of chronic rhinosinusitis without nasal polyps: a single blind randomized trial. *Int Forum Allergy Rhinol* (2016) 6(9):943–949
168. Virgin F, Zhang S, Schuster D, Azbell C, Fortenberry J, Sorscher EJ, Woodworth BA The Bioflavonoid Compound, Sinupret, Stimulates Transepithelial Chloride Transport In Vitro and In Vivo. *Laryngoscope* (2010) 120(5):1051–1056
169. Vitanza L, Maccelli A, Marazzato M, Scazzocchio F, Comanducci A, Fornarini S, Crestoni ME, Filippi A, Frascetti C, Rinaldi F, Aleandri M, Goldoni P, Conte MP, Ammendolia MG, Longhi C *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microb Pathog* (2019) 126:323–331
170. Wang G, Chen H, Xia Y, Cui J, Gu Z, Song Y, Chen YQ, Zhang H, Chen W How are the non-classically secreted bacterial proteins released into the extracellular milieu? *Curr Microbiol* (2013) 67(6):688–695
171. Westermeier R, Schickle H The current state of the art in high-resolution two-dimensional electrophoresis. *Arch. Physiol. Biochem.* (2009) 115(5):279–285

172. Wittig T Myrtol standardisiert. Eine klinische Dokumentation, 5. Aufl. Ergebnisse-Verl., Hamburg (2010)
173. Wolcott R, Costerton JW, Raoult D, Cutler SJ The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clin Microbiol Infect* (2013) 19(2):107–112
174. Wytske J, Fokkens, , Valerie J. Lund European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012:1–298
175. Xiao Z, Xu P Acetoin metabolism in bacteria. *Crit Rev Microbiol* (2007) 33(2):127–140
176. Xu J, Zhou F, Ji B-P, Pei R-S, Xu N The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* (2008) 47(3):174–179
177. Xu J-G, Liu T, Hu Q-P, Cao X-M Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. *Molecules* (2016) 21(9)
178. Yang C, Hu D-H, Feng Y Essential oil of *Artemisia vestita* exhibits potent in vitro and in vivo antibacterial activity. Investigation of the effect of oil on biofilm formation, leakage of potassium ions and survival curve measurement. *Mol Med Rep* (2015) 12(4):5762–5770
179. Yasaki H, Shimada T, Yasui T, Yanagida T, Kaji N, Kanai M, Nagashima K, Kawai T, Baba Y Robust Ionic Current Sensor for Bacterial Cell Size Detection. *ACS Sens* (2018) 3(3):574–579
180. Yoong P, Torres VJ The effects of *Staphylococcus aureus* leukotoxins on the host: cell lysis and beyond. *Curr Opin Microbiol* (2013) 16(1):63–69
181. Zdzalik M, Kalinska M, Wysocka M, Stec-Niemczyk J, Cichon P, Stach N, Gruba N, Stennicke HR, Jabaiah A, Markiewicz M, Kedracka-Krok S, Wladyka B, Daugherty PS, Lesner A, Rolka K, Dubin A, Potempa J, Dubin G Biochemical and structural characterization of SplD protease from *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* (2013) 8(10):e76812
182. Zengin H, Baysal AH Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules* (2014) 19(11):17773–17798
183. Zhang S, Skinner D, Hicks SB, Bevenssee MO, Sorscher EJ, Lazrak A, Matalon S, McNicholas CM, Woodworth BA Sinupret activates CFTR and TMEM16A-dependent transepithelial chloride transport and improves indicators of mucociliary clearance. *PLoS ONE* (2014) 9(8):e104090



## Literatur

184. Zhang J, Li Y, Lu X, Wang X, Zang H, Wang T, Zhou B, Zhang L Distinguishing the dominant species of pathogen in maxillary sinusitis by sequencing DNA dataset analysis, *Bd* 561 (2015)
185. Zhu Y, Weiss EC, Otto M, Fey PD, Smeltzer MS, Somerville GA Staphylococcus aureus biofilm metabolism and the influence of arginine on polysaccharide intercellular adhesin synthesis, biofilm formation, and pathogenesis. *Infection and Immunity* (2007) 75(9):4219–4226
186. Ziebandt AK, Weber H, Rudolph J, Schmid R, Hoper D, Engelmann S, Hecker M Extracellular proteins of Staphylococcus aureus and the role of SarA and sigma B. *Proteomics* (2001) 1(4):480–493
187. Ziesemer S, Eiffler I, Schönberg A, Müller C, Hochgräfe F, Beule AG, Hildebrandt J-P Staphylococcus aureus  $\alpha$ -Toxin Induces Actin Filament Remodeling in Human Airway Epithelial Model Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2018) 58(4):482–491
188. Zimmermann T, Seiberling M, Thomann P, Karabelnik D Untersuchungen zur relativen Bioverfügbarkeit und zur Pharmakokinetik von Myrtol standardisiert. *Arzneimittelforschung* (1995) 45(11):1198–1201
189. Zühlke D, Dörries K, Bernhardt J, Maaß S, Muntel J, Liebscher V, Pané-Farré J, Riedel K, Lalk M, Völker U, Engelmann S, Becher D, Fuchs S, Hecker M Costs of life - Dynamics of the protein inventory of Staphylococcus aureus during anaerobiosis. *Sci Rep* (2016) 6:1–13

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Hauptbestandteile der ätherischen Öle in Myrtol stand. ....	17
Tabelle 2: Chemikalien .....	24
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien .....	25
Tabelle 4: Zusammensetzung UT-Puffer (1xUT) .....	25
Tabelle 5: UT Menge je Probe.....	25
Tabelle 6: Zusammensetzung Trenngellösung für 6 Gele (12,5% Polyacrylamid).....	26
Tabelle 7: Zusammensetzung Rehydratisierungspuffer (RH) je Probe.....	26
Tabelle 8: Zusammensetzung der Äquilibrierungsflüssigkeit A und B für je 2 Streifen.....	26
Tabelle 9: Zusammensetzung Lösung zur Entfärbung der Gelstücke.....	27
Tabelle 10: Zusammensetzung 10x Laufpuffer .....	27
Tabelle 11: Zusammensetzung IPG Überschichtung 0,5% Agarose.....	27
Tabelle 12: Zusammensetzung Trypsin Lösung (10µg/µl) .....	27
Tabelle 13: Zusammensetzung Coomassie 100 ml Färbelösung .....	27
Tabelle 14: Zusammensetzung Puffer A .....	28
Tabelle 15: Geräte.....	28
Tabelle 16: Software .....	29
Tabelle 17: Verwendete Phytopharmaka.....	30
Tabelle 18: Zusammensetzung LB-Flüssigmedium .....	30
Tabelle 19: Zusammensetzung LB-Agar Platten .....	30
Tabelle 20: Multiplex PCR Ansätze mit den jeweils untersuchten Genen.....	32
Tabelle 21: Dosierungen bei Erstellung der Wachstumskurven.....	36
Tabelle 22: Zusammensetzung der Proben für die Eichkurve .....	42
Tabelle 23: PCR-Analyse der Patientenisolate und des Referenzstammes COL.....	50
Tabelle 24: Veränderungen der Volumina unter Behandlung mit Myrtol stand. 0,25%.....	69
Tabelle 25: 2D-DIGE quantitative Spotanalyse .....	70
Tabelle 26: Differenziell exprimierte Proteinspots zum jeweiligen Zeitpunkt nach Gabe von 0,25% Myrtol stand.....	71
Tabelle 27: Proteinidentifikationen LC-MS EC.....	77
Tabelle 28: Proteinidentifikationen LC-MS IC.....	78
Tabelle 29: Superantigen-Enterotoxine, Myrtol stand. spezifische Veränderungen .....	85
Tabelle 30: Leukotoxine und Hämolsine, Myrtol stand. spezifische Veränderungen .....	86
Tabelle 31: Serin-Proteasen, Myrtol stand. spezifische Veränderungen .....	88

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 32: Zellwand/Zellmembransynthese, Myrtol stand. spezifische Veränderungen.....	90
Tabelle 33: Zytosolische Proteine, Myrtol stand. spezifische Veränderungen .....	93
Tabelle 34: Bestätigung der Proteinidentifikationen durch <sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O-Direktverdau .....	97
Tabelle 35: Zusammensetzung der PCR Reaktionsansätze .....	142
Tabelle 36: Multiplex PCR Ansätze mit jeweils untersuchten Genen .....	143
Tabelle 37: G-Dye Farbstoffe mit Anregungsmaxima .....	143
Tabelle 38: Versuchsaufbau Rehydratisierung.....	143
Tabelle 39: IEF-Programme, 1. Dimension .....	144
Tabelle 40: Verdünnungsreihe für die Ausplattierung unter BNO 101 Behandlung bei OD 0,5 595 nm.....	144
Tabelle 41: Verdünnungsreihe für die Ausplattierung nach Zeit t[h] .....	144
Tabelle 42: Ausplattierte Verdünnungen, nach Zeit [t].....	145
Tabelle 43: OD von Myrtol stand. und Myrtol stand. mit Tween 80 im Medium.....	146
Tabelle 44: Proteinidentifikation 2D-DIGE .....	151

## 12 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: 3-Ösenausstrich .....	31
Abbildung 2: Versuchsaufbau zur Kultivierung für Proteinextraktion.....	38
Abbildung 3: Arbeitsablauf zur Vorbereitung auf die Konzentrationsbestimmung.....	39
Abbildung 4: Arbeitsablauf der Proteomanalyse.....	41
Abbildung 5: Arbeitsablauf Inkubation mit Sauerstoffisotopen und Verdau .....	49
Abbildung 6: Dosisbestimmung BNO 101.....	51
Abbildung 7: Wachstumskurven COL mit BNO 101.....	52
Abbildung 8: Wachstumskurve B1a mit BNO 101 .....	53
Abbildung 9: CFU-Bestimmung bei OD=0,5 mit BNO 101 .....	54
Abbildung 10: CFU-Bestimmung nach Zeit mit BNO 101.....	55
Abbildung 11: Überlebensraten Dosisbestimmung Myrtol stand.....	56
Abbildung 12: Wachstumskurven COL mit Myrtol stand. ....	58
Abbildung 13: Wachstumskurven B1a mit Myrtol stand.....	59
Abbildung 14: CFU Auswertung Einzelexperiment B1a mit Myrtol stand.....	60
Abbildung 15: COL Überlebensraten mit Myrtol stand. ....	61
Abbildung 16: A1 Überlebensraten mit Myrtol stand. ....	62
Abbildung 17: B1a Überlebensrate mit Myrtol stand.....	63
Abbildung 18: B1b Überlebensraten mit Myrtol stand. ....	64
Abbildung 19: Staphylococcus aureus Überlebensraten mit Myrtol stand.....	65
Abbildung 20: REM-Bilder unter Behandlung mit Myrtol stand.....	68
Abbildung 21: REM 8 h nach Behandlung mit Myrtol stand. ....	69
Abbildung 22: Venn- Diagramme der Spots für IC und EC.....	71
Abbildung 23: Principle Component Analyse IC Hauptkomponenten 1.2.....	72
Abbildung 24: Principle Component Analyse IC 2.3 .....	73
Abbildung 25: 2D-DIGE Overlays Kontrolle vs. Myrtol stand. 0,25%.....	75
Abbildung 26: Dual Channel Overlay der extrazellulären Proteine 8 h nach Behandlung mit 0,25% Myrtol stand., gelabelt mit Identifikationsnummern .....	76
Abbildung 27: Dual Channel Overlay der intrazellulären Proteine 8 h nach Behandlung mit 0,25% Myrtol stand., gelabelt mit Identifikationsnummern.....	78
Abbildung 28: Voronoi Treemaps der intrazellulären Proteine IC, Seite 82 f. ....	84
Abbildung 29: Voronoi Treemaps der extrazellulären Proteine EC, Seite 80 f.....	84
Abbildung 30: Superantigen-Enterotoxine .....	85

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 31: Leukotoxine und Hämolytine in Treemaps.....	86
Abbildung 32: Superantigen-Enterotoxine.....	88
Abbildung 33: Zellwand- und Zellmembransynthese Treemaps.....	89
Abbildung 34: Zytosolische Proteine Treemaps.....	92
Abbildung 35: Proteinidentifikationen verschiedener Stoffwechselwege.....	95
Abbildung 36: Venn-Diagramm Direktverdau 8 h.....	96
Abbildung 37: Ideale Wachstumskurve einer Bakterienkultur in Flüssigmedium.....	100
Abbildung 38: Bildung von UDP- N- Acetylglucosamin.....	112
Abbildung 39: Hydrolyse von Urease zu Ammoniak und Kohlenstoffdioxid.....	116
Abbildung 40: Wachstumskurven A1 unter Myrtol stand.....	145
Abbildung 41: Wachstumskurven B1b unter Myrtol stand.....	145
Abbildung 42: Überlebensraten Dosisbestimmung Myrtol stand. vor Behandlung.....	146
Abbildung 44: Principle Component Analyse EC Hauptkomponenten 1.2.....	147
Abbildung 43: Principle Component Analyse zur Qualitätsprüfung EC.....	147
Abbildung 45: Principle Component Analyse EC Hauptkomponenten 2.3.....	148
Abbildung 46: Principle Component Analyse EC Hauptkomponenten 1.3.....	148
Abbildung 47: Principle Component Analyse IC Hauptkomponenten 1.2.....	149
Abbildung 48: Principle Component Analyse IC Hauptkomponenten 1.3.....	149

## 13 Anlagen

### 13.1 Ergänzendes Material

Für die Single -und Multiplex PCR Untersuchungen wurde das GoTaq Flexi DNA Polymerase-System verwendet. Zu Beginn wurden die Proben DNA 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend in 30 Zyklen amplifiziert (30s 95°C, 30s 55°C, 60s 72°C), gefolgt von 10 min bei 72°C. Die PCR Produkte wurden danach in 1,5 % Agarosegel mittels Elektrophorese mit 1x Trisborat EDTA Puffer gelöst, mit Ethidiumbromid gewaschen und unter UV-Licht visualisiert. Als positive Kontrollen wurden Sag-Gen positive *S. aureus* Stämme verwendet. Zusätzlich zu den Standardprotokollen diente der Sag-negative *S. aureus* Stamm 8325-4 als Kontaminationskontrolle. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 35 aufgelistet.

Tabelle 35: Zusammensetzung der PCR Reaktionsansätze

Komponente	Volumen
5x GoTaq Reaktionspuffer	5 µl
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	100 µM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Primer	150 -400 nM
GoTaq Flexi DNA Polymerase	1,0 U
Template DNA	10 -20 ng

## Anlagen

**Tabelle 36: Multiplex PCR Ansätze mit jeweils untersuchten Genen**

Modifiziert nach Holtfreter et al. [70]. Angaben zu Oligonukleotid Primern und Kontroll Stämmen für die Toxin-Gen Detektion im Referenzdokument: Suppl. Table 1 : Oligonucleotide primers and control strains used for toxin gene detection

multiplex I	sea seh sec tst	multiplex II	sed etd eta sek	multiplex III	see seb sem sel seo	multiplex IV	sen seg seq sej
multiplex V	sei ser seu sep	multiplex VI	agr 1 – 4 agr-1 agr-2 agr-3 agr-4	single PCR	16SrRNA gyrase mecA pvl	sequencing	sem spa

**Tabelle 37: G-Dye Farbstoffe mit Anregungsmaxima**

Die Darstellung zeigt genutzten G-Dye Farbstoffe mit ihren Anregungs- und Emissionsmaxima  $\lambda$ [nm].

Farbstoff	max. Anregung [nm]	max. Emission [nm]
G-Dye100	498	524
G-Dye200	554	575
G-Dye300	648	663

**Tabelle 38: Versuchsaufbau Rehydratisierung**

RHB, Rehydratisierungspuffer; UT, Urea(8M)/Thiourea(2M) Das Schema zeigt den Versuchsaufbau für die Rehydratisierung der Proben. In jedem Gel wurde eine Proteinprobe (2x25 $\mu$ g) G 200 markiert und eine Probe (2x25 $\mu$ g) G 300 markiert gemischt. Aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen/Dichte der Proben variieren die Volumina und wurden hier mit XXX angegeben. Anschließend wurde der Standard mit 50 $\mu$ g inklusive des Farbstoffes hinzugefügt. Zuletzt wurden 40 $\mu$ l 10x RHB hinzugegeben und auf 400 $\mu$ l mit UT aufgefüllt.

Komponente	G200	G300
Proben (4x25 $\mu$ g) inkl. Dyes + Stop	XXX $\mu$ l	XXX $\mu$ l
Standard (2x25 $\mu$ g), inkl. Dye + Stop (50 $\mu$ g)		XXX $\mu$ l
1xUT		XXX $\mu$ l
10xRHB		40 $\mu$ l
Gesamtmenge		400 $\mu$ l

**Tabelle 39: IEF-Programme, 1. Dimension**

IC, intrazellulär; EC, extrazellulär; IEF, isoelektrische Fokussierung, Die Tabelle zeigt die Schritte der IEF-Programme für die IC und EC Proben mit den jeweiligen Parametern. Unterschiede ergeben sich aus den verschiedenen ph-Wert-Spektren von IC und EC.

Probe	Step	U [V]	I [mA]	P[W]	Vh	t [h]
EC	1	300	2	5	1	4 h
	2	3500	2	5	2500	
	3	3500	2	5	9100	
IC	1	300	2	5	1	5h
	2	3500	2	5	2500	
	3	3500	2	5	12100	

**Tabelle 40: Verdünnungsreihe für die Ausplattierung unter BNO 101 Behandlung bei OD 0,5 595 nm**

PBS, phosphate buffered saline; Für die Experimente mit BNO 101 wurden die angegebenen Verdünnungen V1-V3 verwendet (100 µl je Platte) und von V2 jeweils drei Replikate erstellt. Vor1 und Vor2 entsprechen Vorverdünnungen. Bezugsvolumen entspricht 1ml.

Laufnummer	Verdünnung von 1ml Suspension	PBS Menge [µl]	Hinzugefügte Suspension bzw. Verdünnung [µl]
Vor1	1:100	990	10
Vor2	1:1.000	900	100
V1	1:10.000	180	20
V2	1:100.000	180 -360	20 -40
V3	1:1.000.000	180	20

**Tabelle 41: Verdünnungsreihe für die Ausplattierung nach Zeit t[h]**

PBS, phosphate buffered saline; Für CFU-Experimente unter Behandlung mit BNO 101 und Myrtol stand. nach Zeit wurden die Verdünnungen wie in der Tabelle nacheinander vorgenommen. Verdünnungsverhältnis bezogen auf Zellzahl in 1 ml.

Stufe	Verdünnung	PBS Menge [µl]	Hinzugefügte Suspension bzw. Verdünnung [µl]
1	1:100	900	100
2	1:1.000 (1K)	900	100
3	1:10.000 (10K)	900	100
4	1:100.000 (100K)	900	100
5	1:1.000.000 (1M)	900	100
6	1:10.000.000 (10M)	900	100
7	1:100.000.000 (100M)	900	100
8	1:1.000.000.000 (1G)	900	100

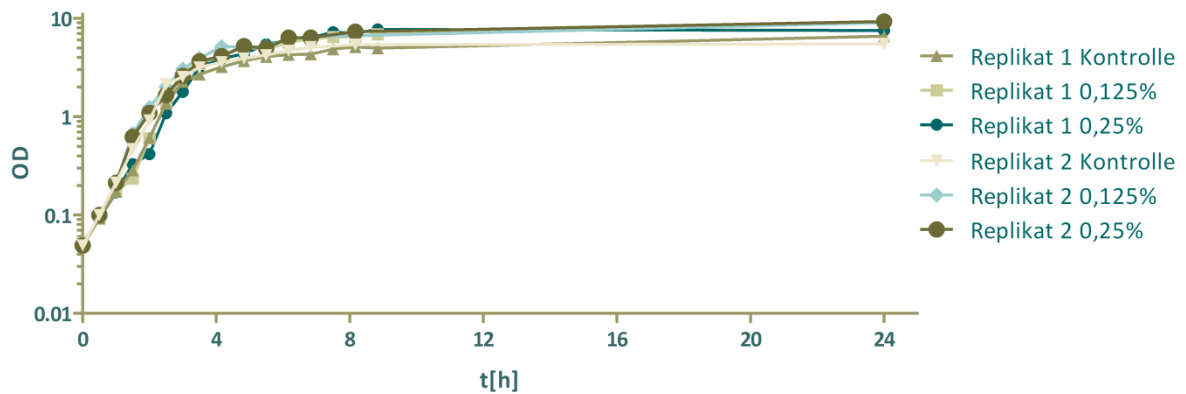


## Anlagen

**Tabelle 42: Ausplattierte Verdünnungen, nach Zeit [t]**

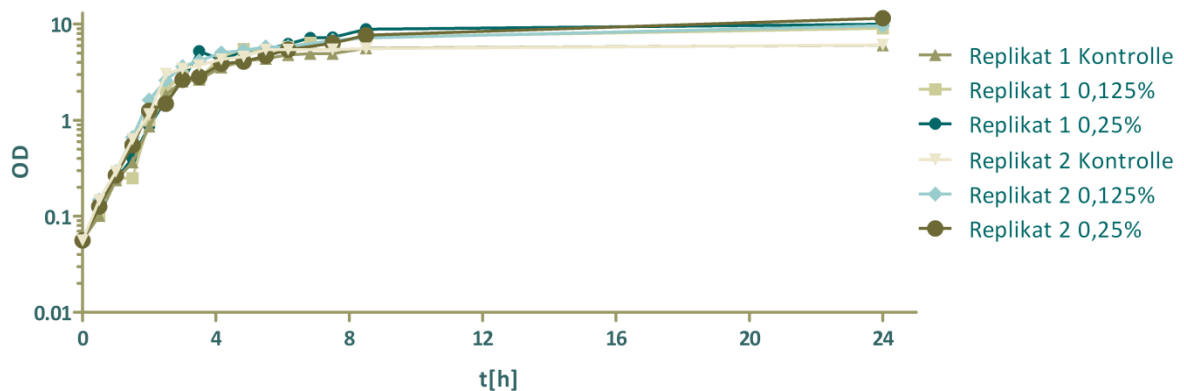
PBS, phosphate buffered saline; OD, optische Dichte ; Für die Ausplattierungen nach Zeit wurden je 100 µl der aufgelisteten Verdünnungen zu den jeweiligen Zeitpunkten in drei technischen Replikaten ausplattiert. Die Proben für OD 0,2 wurden direkt vor Gabe des Medikamentes entnommen und verdünnt.

Zeitpunkt/OD:	ausplattierte Verdünnung:
OD 0,2	1:100.000 (100K)
1 h	1:10.000.000 (10M)
4 h	1:100.000.000 (100M)
8 h	1:100.000.000 (100M)
24 h	1:100.000.000 (100M)



**Abbildung 40: Wachstumskurven A1 unter Myrtol stand.**

OD, Optische Dichte, Das Diagramm zeigt die OD mit logarithmischer Auftragung .von A1 in Abhängigkeit von der Zeit t[h]. In zwei Replikaten wurden unbehandelte Kontrollen mit 0,25 -und 0,125% Myrtol stand. verglichen. Das Medikament wurde bei OD 0,2 hinzugegeben. Im zweiten Durchgang (Replikat 2) wurde zusätzlich ein Tensid verwendet.



**Abbildung 41: Wachstumskurven B1b unter Myrtol stand.**

OD, Optische Dichte, Das Diagramm zeigt die OD mit logarithmischer Auftragung.von B1b in Abhängigkeit von der Zeit t[h]. In zwei Replikaten wurden unbehandelte Kontrollen mit 0,25 -und 0,125% Myrtol stand. verglichen. Das Medikament wurde bei OD 0,2 hinzugegeben. Im zweiten Durchgang (Replikat 2) wurde zusätzlich ein Tensid verwendet.

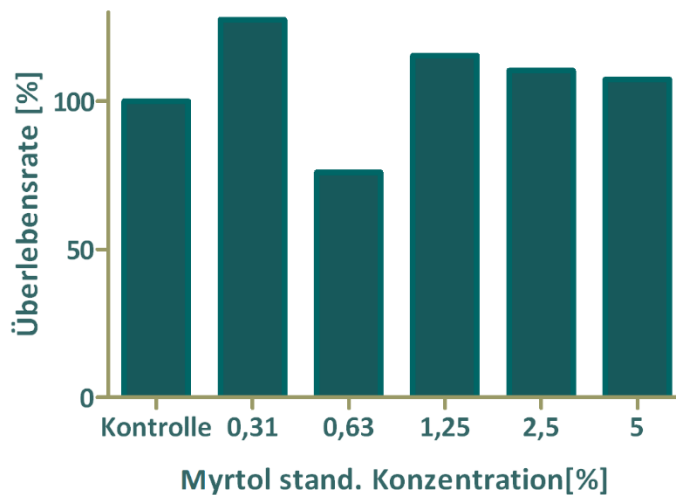
**Tabelle 43: OD von Myrtol stand. und Myrtol stand. mit Tween 80 im Medium**

OD, optische Dichte, Dargestellt ist die OD von 0,25% Myrtol stand. und 0,25% Myrtol stand. mit 0,125% Tween 80 in Abhängigkeit von der Zeit(t) in LB Medium. Die OD des Mediums verändert sich bei Hinzugabe von Myrtol stand. um 0,037 nach 24 h. Durch Hinzugabe von Tween 80 kommt es zu relativer Erhöhung der OD im Vergleich zur Kontrolle zwischen 0,89 zu Beginn und 0,539 nach 24 h. Die OD- Veränderungen in Bakterienkultur liegen im gleichen Zeitraum bei ca. 10, sodass ein wesentlicher Einfluss auf die OD-Entwicklung der Kultur hier nicht vorliegt.

OD Laufnummer	OD 1	OD 2	OD 3	OD 4	OD 5	OD 6	OD 7
<b>t in min</b>	0	30	60	90	120	160	200
<b>OD 0,25% Myrtol stand.</b>	0	0,04	0,01	0,007	0,008	0,012	0,029
<b>OD 0,25% Myrtol stand. + 0,125% Tween 80</b>	0,89	0,84	0,71	0,622	0,602	0,631	0,624

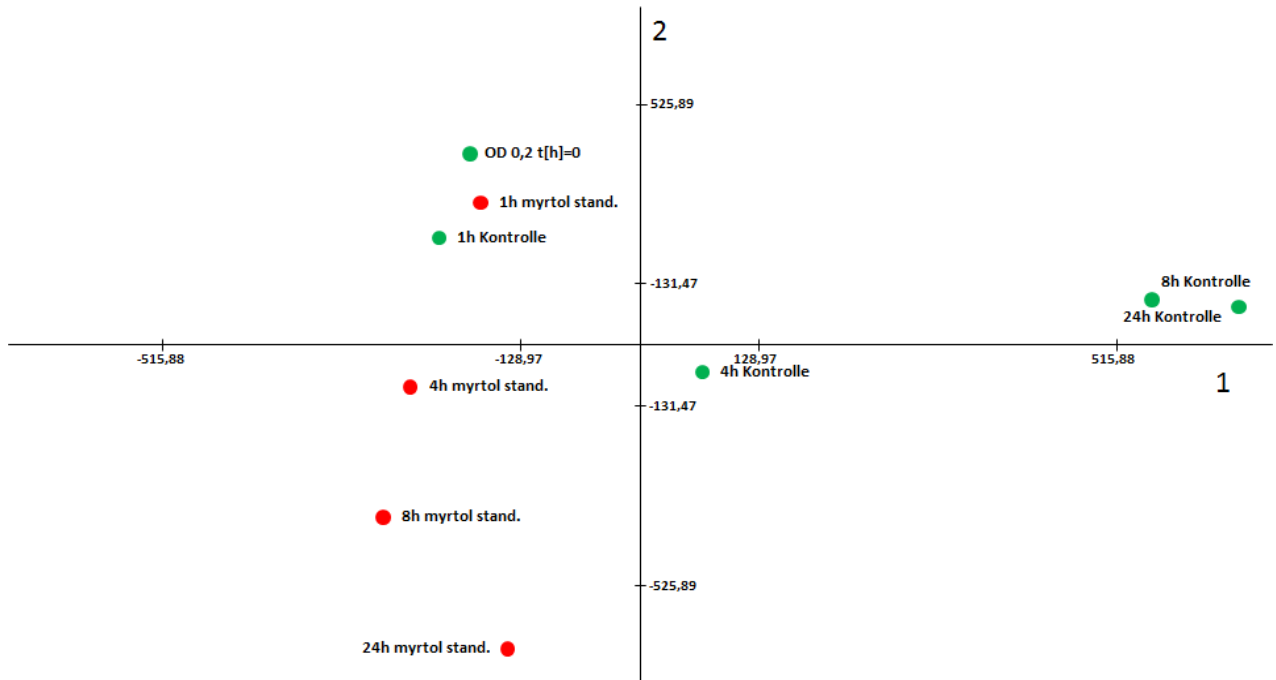
OD Laufnummer	OD 8	OD 9	OD 10	OD 11	OD 12	OD 13	OD 14
<b>t in min</b>	240	280	320	360	400	480	1440
<b>OD 0,25% Myrtol stand.</b>	0,01	0,014	0,01	0,016	0,017	0,019	0,037
<b>OD 0,25% Myrtol stand. + 0,125% Tween 80</b>	0,58	0,597	0,592	0,581	0,61	0,588	0,576



**Abbildung 42: Überlebensraten Dosisbestimmung Myrtol stand. vor Behandlung**

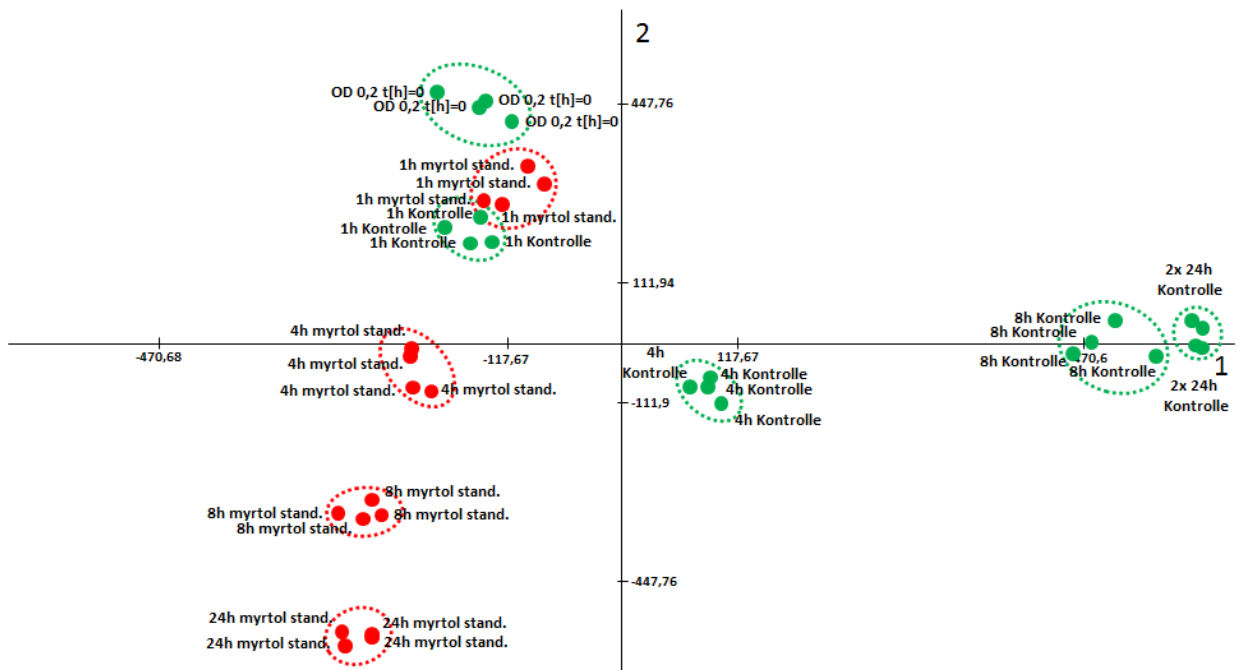
Die Abbildung zeigt die durchschnittlichen prozentualen Überlebensraten des Isolates B1a als Quotient aus CFU der jeweiligen Kultur und der unbehandelten Kontrolle zum Messzeitpunkt t[h]=0, vor der Medikamentengabe. Die angegebene Dosis *Myrtol stand.* wurde direkt nach der Messung hinzugefügt. Die Unterschiede der CFU Zahlen im Vergleich zur Kontrolle liegen bei max. 25% (spätere Dosierung 0,31% Myrtol stand.).

## Anlagen



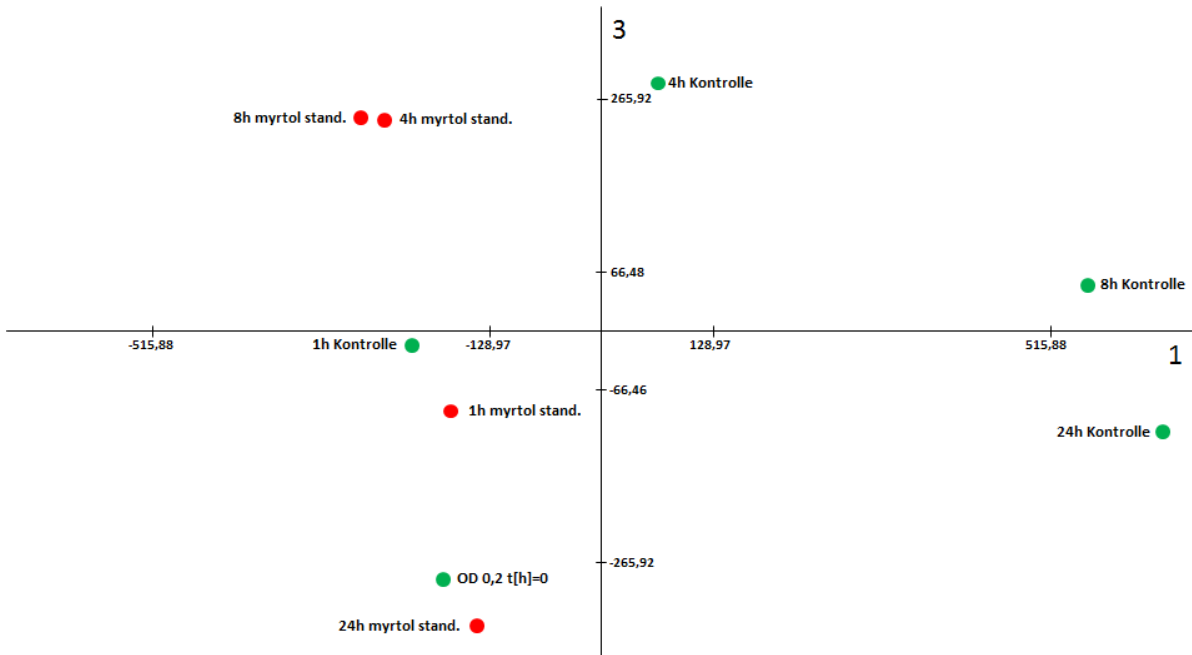
**Abbildung 43: Principle Component Analyse EC Hauptkomponenten 1.2**

EC, extrazellulär; Die Punkte kennzeichnen die Mittelwerte aller vier Replikate jeder einzelnen Probe zum entsprechenden Messzeitpunkt. Auf den Achsen sind die Hauptkomponenten der Veränderungen zwischen behandelter Gruppe und unbehandelter Kontrolle aufgetragen. x-Achse = Hauptkomponente 1, y- Achse = Hauptkomponente 2. Hauptkomponente 1 zeigt die Veränderungen der Proteinzusammensetzung der jeweiligen Kultur. Anhand der Hauptkomponente 2 lassen sich die Myrtol stand.- spezifischen Veränderungen erkennen. Die PCA-Analyse wurde mittels Delta 2D erstellt.



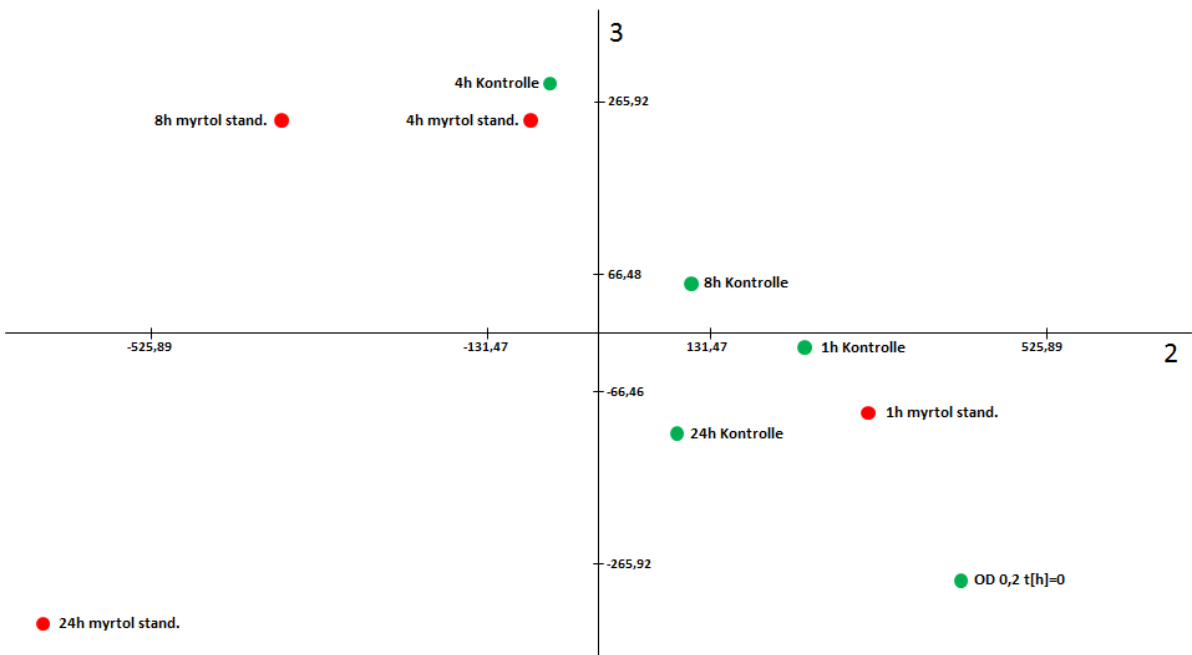
**Abbildung 44: Principle Component Analyse zur Qualitätsprüfung EC**

EC, extrazellulär; Schematische Darstellung der PCA aller EC- Proben in jeweils vier technischen Replikaten zu den Messzeitpunkten. Grün: unbehandelte Kontrollen, Rot: 0,25% Myrtol stand. x- Achse: Hauptkomponente 1, y- Achse Hauptkomponente 2. Alle vier Replikate jeder Probe liegen dicht beieinander (Kreise) und zeigen somit eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.



**Abbildung 46: Principle Component Analyse EC Hauptkomponenten 1.3**

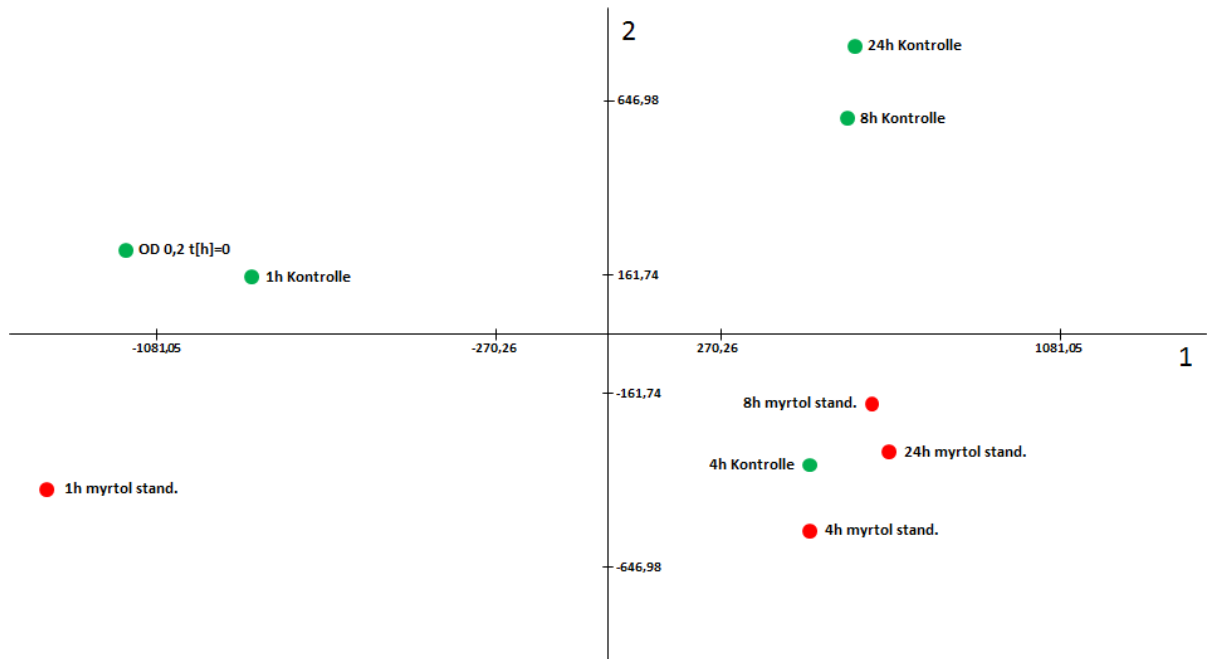
EC, extrazellulär; Die Punkte kennzeichnen die Mittelwerte aller 4 Replikate jeder einzelnen Probe zum entsprechenden Messzeitpunkt. Auf den Achsen sind die Hauptkomponenten der Veränderungen zwischen behandelter Gruppe und unbehandelter Kontrolle aufgetragen. x-Achse = 1. Hauptkomponente, y- Achse = 3. Hauptkomponente. Hauptkomponente 1 zeigt die Veränderungen der Proteinzusammensetzung der jeweiligen Kultur über den Wachstumsverlauf. Die PCA Analyse wurde mittels Delta 2D erstellt.



**Abbildung 45: Principle Component Analyse EC Hauptkomponenten 2.3**

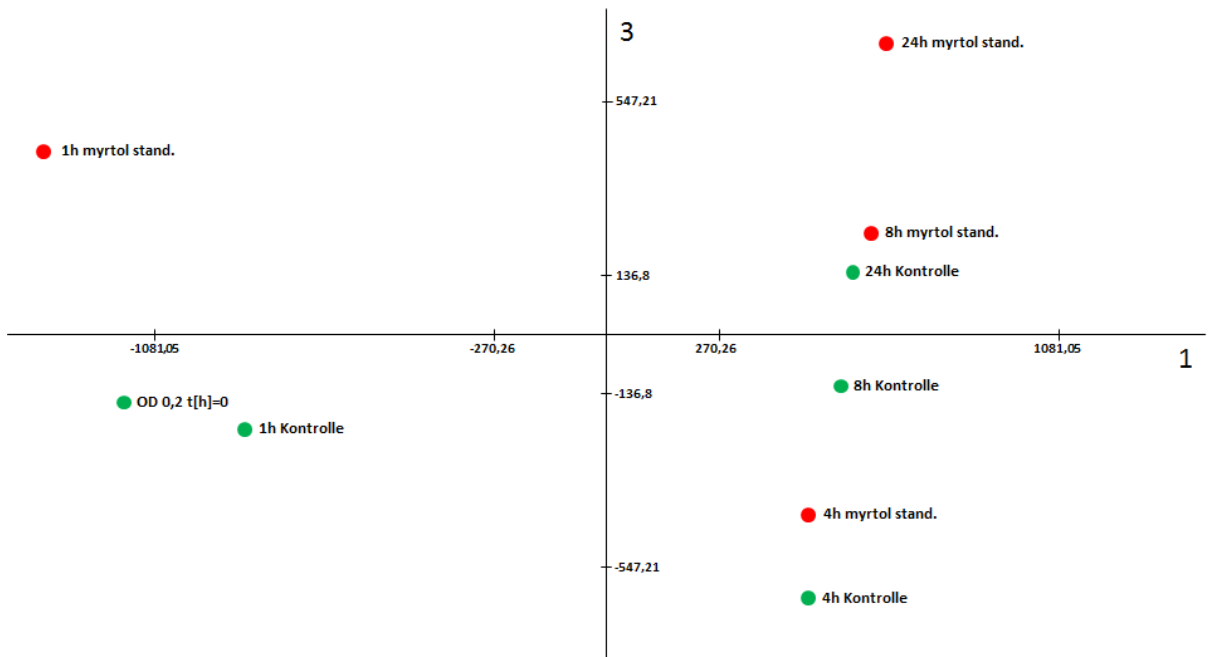
EC, extrazellulär; Die Punkte kennzeichnen die Mittelwerte aller 4 Replikate jeder einzelnen Probe zum entsprechenden Messzeitpunkt. Auf den Achsen sind die Hauptkomponenten der Veränderungen zwischen behandelter Gruppe und unbehandelter Kontrolle aufgetragen. x-Achse = 2. Hauptkomponente, y- Achse = 3. Hauptkomponente, Die PCA Analyse wurde mittels Delta 2D erstellt.

## Anlagen



**Abbildung 47: Principle Component Analyse IC Hauptkomponenten 1.2**

IC, intrazellulär Die Punkte kennzeichnen die Mittelwerte aller 4 Replikate jeder einzelnen Probe zum entsprechenden Messzeitpunkt. Auf den Achsen sind die Hauptkomponenten der Veränderungen zwischen behandelter Gruppe und unbehandelter Kontrolle aufgetragen. x-Achse = 1. Hauptkomponente, y- Achse = 2. Hauptkomponente. Hauptkomponente 1 zeigt die Veränderungen der Proteinzusammensetzung der jeweiligen Kultur über den Wachstumsverlauf. Anhand der Hauptkomponente 2 lassen sich die Myrtol stand.- spezifischen Veränderungen erkennen. Die PCA Analyse wurde mittels Delta 2D erstellt.



**Abbildung 48: Principle Component Analyse IC Hauptkomponenten 1.3**

IC, intrazellulär Die Punkte kennzeichnen die Mittelwerte aller 4 Replikate jeder einzelnen Probe zum entsprechenden Messzeitpunkt. Auf den Achsen sind die Hauptkomponenten der Veränderungen zwischen behandelter Gruppe und unbehandelter Kontrolle aufgetragen. x-Achse = 1. Hauptkomponente, y- Achse = 2. Hauptkomponente. Hauptkomponente 1 zeigt die Veränderungen der Proteinzusammensetzung der jeweiligen Kultur über den Wachstumsverlauf. Die PCA Analyse wurde mittels Delta 2D erstellt.



**Tabelle 44: Proteinidentifikation 2D-DIGE**

DV, Direktverdau; MW, Molekulargewicht, ID Spotidentifikation im Gel; n.f., nicht identifiziert. Die Tabelle zeigt die mittels LC-MS identifizierten Proteine der untersuchten Proteinspots aus den 2D-DIGE Gelen. Angegeben sind zusätzlich die Verhältnisse der Proteinmengen zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Behandlung im Vergleich zur Kontrollprobe zum gleichen Zeitpunkt (ratio). Farbkodierung: rot  $x > 3$ , rosa:  $x \geq 1,5$  grau:  $1,5 > x > 0,667$ , hellgrün:  $x \leq 0,667$ , grün:  $x \leq 0,333$ . Zusätzlich sind die Ratios der Massenspektrometrie nach Direktverdau zum Zeitpunkt  $t=8$  h der speziell untersuchten Proteine dargestellt. Angabe der Ratio nur für Proteine die nach KEGG-Pathwayanalyse gezielt untersucht wurden. Measure-Wert gibt Reihenfolge der Messung der Spots an.

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							EC 1	SACOL2152	35 kDa	9	51	ID1266	SACOL2152	x	3,48	10,2
EC 1	SACOL2666	69 kDa	6	51	ID1266	SACOL2666	x	3,48	10,2	22,6	-	1E-09	3E-08	6E-10		
EC 1	lytM	34 kDa	6	51	ID1266	SACOL0263	x	3,48	10,2	22,6	-	1E-09	3E-08	6E-10		
EC 1	hIb	37 kDa	3	51	ID1266	SACOL2003	x	3,48	10,2	22,6	-	1E-09	3E-08	6E-10	n.f.	0,39
EC 1	thrC	38 kDa	3	51	ID1266	SACOL1363	x	3,48	10,2	22,6	-	1E-09	3E-08	6E-10		
EC 2	SACOL2152	35 kDa	7	31	ID1297	SACOL2152	x	2,78	7,72	61,8	-	8E-10	4E-08	7E-08		
EC 2	SACOL2666	69 kDa	7	31	ID1297	SACOL2666	x	2,78	7,72	61,8	-	8E-10	4E-08	7E-08		
EC 2	lytM	34 kDa	6	31	ID1297	SACOL0263	x	2,78	7,72	61,8	-	8E-10	4E-08	7E-08		
EC 2	pfkA	35 kDa	4	31	ID1297	SACOL1746	x	2,78	7,72	61,8	-	8E-10	4E-08	7E-08		
EC 2	SACOL2367	37 kDa	2	31	ID1297	SACOL2367	x	2,78	7,72	61,8	-	8E-10	4E-08	7E-08		
EC 3	ftnA	20 kDa	7	38	ID148788	SACOL1952	x	0,59	4,85	11,7	-	0,022	1E-07	7E-09		
EC 3	rplJ	18 kDa	6	38	ID148788	SACOL0585	x	0,59	4,85	11,7	-	0,022	1E-07	7E-09		
EC 3	tpn.f.	18 kDa	5	38	ID148788	SACOL1762	x	0,59	4,85	11,7	-	0,022	1E-07	7E-09		
EC 3	gapA1	36 kDa	4	38	ID148788	SACOL0838	x	0,59	4,85	11,7	-	0,022	1E-07	7E-09	n.f.	n.f.
EC 3	SACOL2711	19 kDa	3	38	ID148788	SACOL2711	x	0,59	4,85	11,7	-	0,022	1E-07	7E-09		
EC 3	SACOL2295	17 kDa	3	38	ID148788	SACOL2295	x	0,59	4,85	11,7	-	0,022	1E-07	7E-09	3,98	28,9
EC 3	SACOL0376	16 kDa	3	38	ID148788	SACOL0376	x	0,59	4,85	11,7	-	0,022	1E-07	7E-09		

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							EC 3	isaA	24 kDa	2	38	ID148788	SACOL2584	x	0,59	4,85
EC 3	greA	18 kDa	2	38	ID148788	SACOL1665	x	0,59	4,85	11,7	-	0,022	1E-07	7E-09		
EC 4	SACOL0908	20 kDa	6	53	ID16168	SACOL0908	x	0,3	0,12	0,04	-	1E-08	3E-09	9E-11		
EC 4	mecA	76 kDa	2	53	ID16168	SACOL0033	x	0,3	0,12	0,04	-	1E-08	3E-09	9E-11		
EC 5	tpiA	27 kDa	13	76	ID167774	SACOL0840	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08	100	4,07
EC 5	tal	26 kDa	8	76	ID167774	SACOL1831	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08	n.f.	0,01
EC 5	tuf	43 kDa	6	76	ID167774	SACOL0594	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08		
EC 5	seb	31 kDa	6	76	ID167774	SACOL0907	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08	0,07	0,34
EC 5	adk	24 kDa	5	76	ID167774	SACOL2218	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08		
EC 5	isaA	24 kDa	4	76	ID167774	SACOL2584	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08		
EC 5	butA	27 kDa	4	76	ID167774	SACOL0111	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08	100	n.f.
EC 5	SACOL0633	29 kDa	4	76	ID167774	SACOL0633	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08		
EC 5	deoD2	26 kDa	4	76	ID167774	SACOL2130	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08		
EC 5	ureG	22 kDa	4	76	ID167774	SACOL2285	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08		
EC 5	sceD	24 kDa	3	76	ID167774	SACOL2088	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08		
EC 5	SACOL1835	31 kDa	3	76	ID167774	SACOL1835	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08		
EC 5	SACOL0914	28 kDa	3	76	ID167774	SACOL0914	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08		
EC 5	arlR	25 kDa	3	76	ID167774	SACOL1451	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08		
EC 5	SACOL0723	28 kDa	2	76	ID167774	SACOL0723	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08	3,98	28,9
EC 5	eno	47 kDa	2	76	ID167774	SACOL0842	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08		
EC 5	ldh2	34 kDa	2	76	ID167774	SACOL2618	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08		
EC 5	mtnN	25 kDa	2	76	ID167774	SACOL1655	x	2,45	5,5	6,86	-	0,0022	2E-07	8E-08		
EC 6	tpiA	27 kDa	15	60	ID168364	SACOL0840	x	2,29	4,28	5,55	-	8E-10	2E-06	1E-05	100	4,07
EC 6	adk	24 kDa	11	60	ID168364	SACOL2218	x	2,29	4,28	5,55	-	8E-10	2E-06	1E-05		



Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							EC 6	tal	26 kDa	8	60	ID168364	SACOL1831	x	2,29	4,28
EC 6	deoC2	23 kDa	5	60	ID168364	SACOL2129	x	2,29	4,28	5,55	-	8E-10	2E-06	1E-05		
EC 6	isaA	24 kDa	4	60	ID168364	SACOL2584	x	2,29	4,28	5,55	-	8E-10	2E-06	1E-05		
EC 6	deoD2	26 kDa	4	60	ID168364	SACOL2130	x	2,29	4,28	5,55	-	8E-10	2E-06	1E-05		
EC 6	ureG	22 kDa	4	60	ID168364	SACOL2285	x	2,29	4,28	5,55	-	8E-10	2E-06	1E-05		
EC 6	SACOL0914	28 kDa	3	60	ID168364	SACOL0914	x	2,29	4,28	5,55	-	8E-10	2E-06	1E-05		
EC 6	sceD	24 kDa	2	60	ID168364	SACOL2088	x	2,29	4,28	5,55	-	8E-10	2E-06	1E-05		
EC 6	SACOL0375	23 kDa	2	60	ID168364	SACOL0375	x	2,29	4,28	5,55	-	8E-10	2E-06	1E-05		
EC 8	SACOL0050	165 kDa	27	45	ID181502	SACOL0050	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06	4,54	23,9
EC 8	eno	47 kDa	14	45	ID181502	SACOL0842	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		
EC 8	atpA	55 kDa	13	45	ID181502	SACOL2097	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		
EC 8	glpK	56 kDa	12	45	ID181502	SACOL1320	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		
EC 8	tuf	43 kDa	11	45	ID181502	SACOL0594	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		
EC 8	rpsA	43 kDa	9	45	ID181502	SACOL1516	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		
EC 8	esaA	115 kDa	9	45	ID181502	SACOL0272	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		
EC 8	SACOL1801	53 kDa	9	45	ID181502	SACOL1801	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		
EC 8	pdhD	49 kDa	6	45	ID181502	SACOL1105	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		
EC 8	nusA	44 kDa	6	45	ID181502	SACOL1285	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		
EC 8	ftsZ	41 kDa	5	45	ID181502	SACOL1199	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06	1,12	0,01
EC 8	dltA	55 kDa	4	45	ID181502	SACOL0935	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		
EC 8	SACOL2019	47 kDa	4	45	ID181502	SACOL2019	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06	n.f.	81,4
EC 8	dnaN	42 kDa	3	45	ID181502	SACOL0002	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		
EC 8	ftsY	47 kDa	3	45	ID181502	SACOL1251	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		
EC 8	glnA	51 kDa	2	45	ID181502	SACOL1329	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							EC 8	sspB	45 kDa	2	45	ID181502	SACOL1056	x	2,16	3,64
EC 8	gnd	52 kDa	2	45	ID181502	SACOL1554	x	2,16	3,64	4,63	-	0,0006	2E-06	2E-06		
EC 9	serS	49 kDa	19	80	ID182097	SACOL0009	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05		
EC 9	glnA	51 kDa	18	80	ID182097	SACOL1329	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05		
EC 9	glyQS	54 kDa	17	80	ID182097	SACOL1622	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05		
EC 9	gatB	54 kDa	13	80	ID182097	SACOL1960	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05		
EC 9	atpA	55 kDa	10	80	ID182097	SACOL2097	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05		
EC 9	aldA	54 kDa	10	80	ID182097	SACOL0154	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05		
EC 9	SACOL0050	165 kDa	8	80	ID182097	SACOL0050	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05	4,54	23,9
EC 9	SACOL2114	52 kDa	8	80	ID182097	SACOL2114	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05		
EC 9	pdhD	49 kDa	7	80	ID182097	SACOL1105	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05		
EC 9	gcvPA	50 kDa	7	80	ID182097	SACOL1594	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05		
EC 9	glpK	56 kDa	6	80	ID182097	SACOL1320	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05		
EC 9	SACOL2019	47 kDa	5	80	ID182097	SACOL2019	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05	n.f.	81,4
EC 9	eno	47 kDa	4	80	ID182097	SACOL0842	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05		
EC 9	SACOL1801	53 kDa	3	80	ID182097	SACOL1801	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05		
EC 9	spa	56 kDa	3	80	ID182097	SACOL0095	x	2,41	3,17	3,64	-	0,0006	2E-05	2E-05		
EC 10	glnA	51 kDa	18	35	ID182099	SACOL1329	x	2,54	2,8	3,82	-	0,0008	2E-05	5E-05		
EC 10	cysS	54 kDa	14	35	ID182099	SACOL0576	x	2,54	2,8	3,82	-	0,0008	2E-05	5E-05		
EC 10	gcvPA	50 kDa	12	35	ID182099	SACOL1594	x	2,54	2,8	3,82	-	0,0008	2E-05	5E-05		
EC 10	SACOL0384	54 kDa	7	35	ID182099	SACOL0384	x	2,54	2,8	3,82	-	0,0008	2E-05	5E-05		
EC 10	spa	56 kDa	5	35	ID182099	SACOL0095	x	2,54	2,8	3,82	-	0,0008	2E-05	5E-05		
EC 10	SACOL2019	47 kDa	3	35	ID182099	SACOL2019	x	2,54	2,8	3,82	-	0,0008	2E-05	5E-05	n.f.	81,4
EC 10	SACOL0050	165 kDa	2	35	ID182099	SACOL0050	x	2,54	2,8	3,82	-	0,0008	2E-05	5E-05	4,54	23,9

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							EC 12	SACOL0050	165 kDa	39	2	ID187	SACOL0050	0,62	2,21	32,6
EC 13	SACOL0050	165 kDa	53	70	ID188	SACOL0050	x	2,12	57,8	85,4	-	3E-05	3E-08	6E-08	4,54	23,9
EC 14	SACOL0050	165 kDa	47	8	ID190	SACOL0050	0,46	2,32	43,7	29,6	3E-05	7E-05	4E-08	6E-06	4,54	23,9
EC 14	butA	27 kDa	3	8	ID190	SACOL0111	0,46	2,32	43,7	29,6	3E-05	7E-05	4E-08	6E-06	100	n.f.
EC 15	SACOL0908	20 kDa	6	6	ID20477	SACOL0908	0,5	0,27	0,1	0,03	0,0411	5E-09	2E-08	3E-09		
EC 15	glmS	66 kDa	5	6	ID20477	SACOL2145	0,5	0,27	0,1	0,03	0,0411	5E-09	2E-08	3E-09		
EC 15	isaA	24 kDa	2	6	ID20477	SACOL2584	0,5	0,27	0,1	0,03	0,0411	5E-09	2E-08	3E-09		
EC 18	sdrE	127 kDa	44	32	ID285	SACOL0610	x	1,98	10,2	14,9	-	0,0001	4E-09	1E-08	9,26	10,3
EC 18	SACOL0050	165 kDa	26	32	ID285	SACOL0050	x	1,98	10,2	14,9	-	0,0001	4E-09	1E-08	4,54	23,9
EC 22	sdrE	127 kDa	47	58	ID306	SACOL0610	x	0,55	14,3	17	-	0,0367	2E-06	2E-07	9,26	10,3
EC 22	SACOL0050	165 kDa	36	58	ID306	SACOL0050	x	0,55	14,3	17	-	0,0367	2E-06	2E-07	4,54	23,9
EC 26	lip1	77 kDa	23	21	ID336	SACOL2694	0,6	4,1	18,8	2,16	0,0195	6E-11	2E-10	0,0002	n.f.	2,62
EC 26	grpE	24 kDa	2	21	ID336	SACOL1638	0,6	4,1	18,8	2,16	0,0195	6E-11	2E-10	0,0002		
EC 27	SACOL2666	69 kDa	33	72	ID337	SACOL2666	x	3,73	28,5	15,3	-	4E-08	5E-10	1E-06		
EC 27	seb	31 kDa	5	72	ID337	SACOL0907	x	3,73	28,5	15,3	-	4E-08	5E-10	1E-06	0,07	0,34
EC 28	mecA	76 kDa	20	49	ID342	SACOL0033	x	6,14	26,6	5,53	-	7E-09	3E-11	2E-06		
EC 28	lip1	77 kDa	5	49	ID342	SACOL2694	x	6,14	26,6	5,53	-	7E-09	3E-11	2E-06	n.f.	2,62
EC 28	asp23	19 kDa	2	49	ID342	SACOL2173	x	6,14	26,6	5,53	-	7E-09	3E-11	2E-06		
EC 29	mecA	76 kDa	33	55	ID343	SACOL0033	x	8,95	33,6	7,1	-	2E-09	6E-11	5E-05		
EC 30	mecA	76 kDa	28	61	ID346	SACOL0033	x	10,7	26,9	4,68	-	4E-09	1E-10	0,0015		
EC 30	seb	31 kDa	3	61	ID346	SACOL0907	x	10,7	26,9	4,68	-	4E-09	1E-10	0,0015	0,07	0,34
EC 31	SACOL0050	165 kDa	34	42	ID353	SACOL0050	x	0,38	3,66	7,59	-	0,0001	3E-05	1E-05	4,54	23,9
EC 31	tig	49 kDa	3	42	ID353	SACOL1722	x	0,38	3,66	7,59	-	0,0001	3E-05	1E-05		
EC 32	SACOL0050	165 kDa	35	65	ID360	SACOL0050	x	0,54	3,19	8,44	-	1E-05	2E-07	5E-07	4,54	23,9

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							EC 32	tuf	43 kDa	2	65	ID360	SACOL0594	x	0,54	3,19
EC 34	ltaS	74 kDa	24	26	ID374	SACOL0778	x	2,04	3,12	1,51	-	6E-07	3E-06	2E-06		
EC 34	lip1	77 kDa	3	26	ID374	SACOL2694	x	2,04	3,12	1,51	-	6E-07	3E-06	2E-06	n.f.	2,62
EC 38	sspB	45 kDa	22	28	ID409	SACOL1056	x	2,28	5,06	2,2	-	1E-08	2E-07	5E-06		
EC 38	SACOL0426	42 kDa	10	28	ID409	SACOL0426	x	2,28	5,06	2,2	-	1E-08	2E-07	5E-06	n.f.	0,01
EC 38	pgk	43 kDa	8	28	ID409	SACOL0839	x	2,28	5,06	2,2	-	1E-08	2E-07	5E-06		
EC 38	pepA1	40 kDa	6	28	ID409	SACOL1795	x	2,28	5,06	2,2	-	1E-08	2E-07	5E-06		
EC 38	SACOL0959	42 kDa	6	28	ID409	SACOL0959	x	2,28	5,06	2,2	-	1E-08	2E-07	5E-06		
EC 38	rocD2	43 kDa	5	28	ID409	SACOL0960	x	2,28	5,06	2,2	-	1E-08	2E-07	5E-06		
EC 38	SACOL0368	48 kDa	4	28	ID409	SACOL0368	x	2,28	5,06	2,2	-	1E-08	2E-07	5E-06		
EC 38	SACOL0050	165 kDa	3	28	ID409	SACOL0050	x	2,28	5,06	2,2	-	1E-08	2E-07	5E-06	4,54	23,9
EC 38	sucC	42 kDa	2	28	ID409	SACOL1262	x	2,28	5,06	2,2	-	1E-08	2E-07	5E-06		
EC 38	camS	45 kDa	2	28	ID409	SACOL1964	x	2,28	5,06	2,2	-	1E-08	2E-07	5E-06		
EC 38	hemL1	46 kDa	2	28	ID409	SACOL1714	x	2,28	5,06	2,2	-	1E-08	2E-07	5E-06		
EC 38	nagA	43 kDa	2	28	ID409	SACOL0761	x	2,28	5,06	2,2	-	1E-08	2E-07	5E-06		
EC 39	sucC	42 kDa	18	37	ID414	SACOL1262	x	1,69	1,62	8,38	-	0,0046	0,004	5E-06		
EC 39	SACOL2561	43 kDa	18	37	ID414	SACOL2561	x	1,69	1,62	8,38	-	0,0046	0,004	5E-06		
EC 39	gapA1	36 kDa	14	37	ID414	SACOL0838	x	1,69	1,62	8,38	-	0,0046	0,004	5E-06	n.f.	n.f.
EC 39	ldh2	34 kDa	11	37	ID414	SACOL2618	x	1,69	1,62	8,38	-	0,0046	0,004	5E-06		
EC 39	rpoA	35 kDa	8	37	ID414	SACOL2213	x	1,69	1,62	8,38	-	0,0046	0,004	5E-06		
EC 39	gcvT	40 kDa	8	37	ID414	SACOL1595	x	1,69	1,62	8,38	-	0,0046	0,004	5E-06		
EC 39	esaA	115 kDa	6	37	ID414	SACOL0272	x	1,69	1,62	8,38	-	0,0046	0,004	5E-06		
EC 39	sspB	45 kDa	4	37	ID414	SACOL1056	x	1,69	1,62	8,38	-	0,0046	0,004	5E-06		
EC 39	SACOL0050	165 kDa	4	37	ID414	SACOL0050	x	1,69	1,62	8,38	-	0,0046	0,004	5E-06	4,54	23,9

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							EC 39	sdrE	127 kDa	3	37	ID414	SACOL0610	x	1,69	1,62
EC 39	SACOL1616	41 kDa	3	37	ID414	SACOL1616	x	1,69	1,62	8,38	-	0,0046	0,004	5E-06		
EC 39	ftsH	78 kDa	2	37	ID414	SACOL0555	x	1,69	1,62	8,38	-	0,0046	0,004	5E-06		
EC 40	hIb	37 kDa	17	64	ID423	SACOL2003	x	0,34	0,13	0,03	-	1E-06	8E-09	5E-08	n.f.	0,39
EC 40	tuf	43 kDa	3	64	ID423	SACOL0594	x	0,34	0,13	0,03	-	1E-06	8E-09	5E-08		
EC 41	SACOL2152	35 kDa	6	73	ID425	SACOL2152	x	3,74	9,98	12,3	-	1E-10	2E-09	4E-09		
EC 41	lytM	34 kDa	6	73	ID425	SACOL0263	x	3,74	9,98	12,3	-	1E-10	2E-09	4E-09		
EC 41	cbf1	36 kDa	4	73	ID425	SACOL1898	x	3,74	9,98	12,3	-	1E-10	2E-09	4E-09		
EC 41	seb	31 kDa	3	73	ID425	SACOL0907	x	3,74	9,98	12,3	-	1E-10	2E-09	4E-09	0,07	0,34
EC 41	thrC	38 kDa	3	73	ID425	SACOL1363	x	3,74	9,98	12,3	-	1E-10	2E-09	4E-09		
EC 41	plsn.f.	35 kDa	2	73	ID425	SACOL1243	x	3,74	9,98	12,3	-	1E-10	2E-09	4E-09		
EC 42	hIgB	37 kDa	15	13	ID438	SACOL2422	0,39	0,05	0,03	0,01	2E-07	3E-05	3E-06	5E-06	0,01	0,39
EC 42	SACOL2006	40 kDa	13	13	ID438	SACOL2006	0,39	0,05	0,03	0,01	2E-07	3E-05	3E-06	5E-06	n.f.	n.f.
EC 42	lukD	37 kDa	7	13	ID438	SACOL1880	0,39	0,05	0,03	0,01	2E-07	3E-05	3E-06	5E-06	0,03	1,08
EC 42	lip1	77 kDa	3	13	ID438	SACOL2694	0,39	0,05	0,03	0,01	2E-07	3E-05	3E-06	5E-06	n.f.	2,62
EC 42	truB	35 kDa	2	13	ID438	SACOL1290	0,39	0,05	0,03	0,01	2E-07	3E-05	3E-06	5E-06		
EC 43	hIb	37 kDa	19	84	ID440	SACOL2003	x	0,37	0,14	0,03	-	8E-07	2E-08	2E-07	n.f.	0,39
EC 43	SACOL2004	39 kDa	3	84	ID440	SACOL2004	x	0,37	0,14	0,03	-	8E-07	2E-08	2E-07	n.f.	n.f.
EC 44	hIb	37 kDa	17	22	ID442	SACOL2003	x	0,28	0,14	0,03	-	2E-06	6E-09	3E-09	n.f.	0,39
EC 44	guaC	36 kDa	3	22	ID442	SACOL1371	x	0,28	0,14	0,03	-	2E-06	6E-09	3E-09		
EC 45	SACOL2004	39 kDa	15	82	ID444	SACOL2004	x	0,04	0,08	0,61	-	5E-06	9E-09	0,0128	n.f.	n.f.
EC 45	lukD	37 kDa	7	82	ID444	SACOL1880	x	0,04	0,08	0,61	-	5E-06	9E-09	0,0128	0,03	1,08
EC 45	mecA	76 kDa	4	82	ID444	SACOL0033	x	0,04	0,08	0,61	-	5E-06	9E-09	0,0128		
EC 45	hIgB	37 kDa	3	82	ID444	SACOL2422	x	0,04	0,08	0,61	-	5E-06	9E-09	0,0128	0,01	0,39

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
EC 45	SACOL2006	40 kDa	2	82	ID444	SACOL2006	x	0,04	0,08	0,61	-	5E-06	9E-09	0,0128	n.f.	n.f.
EC 46	pta	35 kDa	12	66	ID445	SACOL0634	x	2,23	3,98	6,2	-	1E-05	1E-05	9E-07		
EC 46	pdhB	35 kDa	8	66	ID445	SACOL1103	x	2,23	3,98	6,2	-	1E-05	1E-05	9E-07		
EC 46	nrdF	38 kDa	7	66	ID445	SACOL0793	x	2,23	3,98	6,2	-	1E-05	1E-05	9E-07		
EC 46	sspA	36 kDa	6	66	ID445	SACOL1057	x	2,23	3,98	6,2	-	1E-05	1E-05	9E-07		
EC 46	SACOL0050	165 kDa	4	66	ID445	SACOL0050	x	2,23	3,98	6,2	-	1E-05	1E-05	9E-07	4,54	23,9
EC 46	ppaC	34 kDa	4	66	ID445	SACOL1982	x	2,23	3,98	6,2	-	1E-05	1E-05	9E-07		
EC 46	dnaK	66 kDa	3	66	ID445	SACOL1637	x	2,23	3,98	6,2	-	1E-05	1E-05	9E-07		
EC 46	fabH	34 kDa	3	66	ID445	SACOL0987	x	2,23	3,98	6,2	-	1E-05	1E-05	9E-07	n.f.	
EC 46	SACOL0198	37 kDa	2	66	ID445	SACOL0198	x	2,23	3,98	6,2	-	1E-05	1E-05	9E-07		
EC 47	SACOL2004	39 kDa	12	54	ID446	SACOL2004	x	0,24	0,11	0,44	-	3E-08	1E-05	0,001	n.f.	n.f.
EC 47	hIb	37 kDa	7	54	ID446	SACOL2003	x	0,24	0,11	0,44	-	3E-08	1E-05	0,001	n.f.	0,39
EC 47	trpS	37 kDa	5	54	ID446	SACOL1001	x	0,24	0,11	0,44	-	3E-08	1E-05	0,001		
EC 47	hIgB	37 kDa	2	54	ID446	SACOL2422	x	0,24	0,11	0,44	-	3E-08	1E-05	0,001	0,01	0,39
EC 48	SACOL2597	31 kDa	8	86	ID449	SACOL2597	x	2,1	12	15,8	-	0,004	8E-10	2E-10		
EC 48	sspA	36 kDa	6	86	ID449	SACOL1057	x	2,1	12	15,8	-	0,004	8E-10	2E-10		
EC 48	rpoA	35 kDa	2	86	ID449	SACOL2213	x	2,1	12	15,8	-	0,004	8E-10	2E-10		
EC 49	hIY	36 kDa	25	43	ID460	SACOL1173	x	0,17	0,17	0,16	-	0,0005	7E-08	4E-05	0,01	0,01
EC 49	SACOL0962	35 kDa	11	43	ID460	SACOL0962	x	0,17	0,17	0,16	-	0,0005	7E-08	4E-05		
EC 49	hIgC	36 kDa	2	43	ID460	SACOL2421	x	0,17	0,17	0,16	-	0,0005	7E-08	4E-05		0,01
EC 50	hIY	36 kDa	25	34	ID463	SACOL1173	x	0,11	0,11	0,23	-	0,001	2E-08	2E-06	0,01	0,01
EC 50	SACOL0962	35 kDa	9	34	ID463	SACOL0962	x	0,11	0,11	0,23	-	0,001	2E-08	2E-06		
EC 50	hIb	37 kDa	3	34	ID463	SACOL2003	x	0,11	0,11	0,23	-	0,001	2E-08	2E-06	n.f.	0,39
EC 51	plc	37 kDa	12	75	ID466	SACOL0078	x	0,15	0,13	0,15	-	5E-07	2E-08	1E-08		

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							EC 51	SACOL0962	35 kDa	8	75	ID466	SACOL0962	x	0,15	0,13
EC 51	seb	31 kDa	3	75	ID466	SACOL0907	x	0,15	0,13	0,15	-	5E-07	2E-08	1E-08	0,07	0,34
EC 51	ssaA2	29 kDa	2	75	ID466	SACOL2291	x	0,15	0,13	0,15	-	5E-07	2E-08	1E-08		
EC 52	plc	37 kDa	10	40	ID476	SACOL0078	x	0,07	0,06	0,08	-	4E-07	4E-07	8E-05		
EC 52	SACOL0962	35 kDa	5	40	ID476	SACOL0962	x	0,07	0,06	0,08	-	4E-07	4E-07	8E-05		
EC 52	seb	31 kDa	5	40	ID476	SACOL0907	x	0,07	0,06	0,08	-	4E-07	4E-07	8E-05	0,07	0,34
EC 52	hly	36 kDa	4	40	ID476	SACOL1173	x	0,07	0,06	0,08	-	4E-07	4E-07	8E-05	0,01	0,01
EC 52	SACOL0050	165 kDa	4	40	ID476	SACOL0050	x	0,07	0,06	0,08	-	4E-07	4E-07	8E-05	4,54	23,9
EC 52	ssaA2	29 kDa	2	40	ID476	SACOL2291	x	0,07	0,06	0,08	-	4E-07	4E-07	8E-05		
EC 52	SACOL0688	35 kDa	2	40	ID476	SACOL0688	x	0,07	0,06	0,08	-	4E-07	4E-07	8E-05		
EC 53	folE2	33 kDa	8	19	ID485	SACOL0613	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05		
EC 53	sceD	24 kDa	7	19	ID485	SACOL2088	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05		
EC 53	SACOL0370	44 kDa	6	19	ID485	SACOL0370	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05		
EC 53	SACOL0763	32 kDa	5	19	ID485	SACOL0763	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05		
EC 53	isaA	24 kDa	3	19	ID485	SACOL2584	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05		
EC 53	srrA	28 kDa	3	19	ID485	SACOL1535	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05		
EC 53	SACOL0303	33 kDa	3	19	ID485	SACOL0303	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05		
EC 53	map	28 kDa	3	19	ID485	SACOL1946	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05		
EC 53	lip1	77 kDa	2	19	ID485	SACOL2694	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05	n.f.	2,62
EC 53	fba	31 kDa	2	19	ID485	SACOL2117	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05		
EC 53	sasF	71 kDa	2	19	ID485	SACOL2668	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05		
EC 53	walR	27 kDa	2	19	ID485	SACOL0019	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05		
EC 53	SACOL0427	29 kDa	2	19	ID485	SACOL0427	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05		
EC 53	SACOL0534	29 kDa	2	19	ID485	SACOL0534	1,64	6,88	7,17	3,44	0,0015	3E-06	1E-05	4E-05		

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							EC 54	seb	31 kDa	23	69	ID492	SACOL0907	x	0,64	0,38
EC 55	seb	31 kDa	20	57	ID495	SACOL0907	x	0,62	0,18	0,06	-	6E-05	8E-09	3E-08	0,07	0,34
EC 56	seb	31 kDa	20	46	ID496	SACOL0907	x	0,53	0,21	0,08	-	5E-05	2E-08	4E-07	0,07	0,34
EC 56	h1b	37 kDa	2	46	ID496	SACOL2003	x	0,53	0,21	0,08	-	5E-05	2E-08	4E-07	n.f.	0,39
EC 56	atl	137 kDa	2	46	ID496	SACOL1062	x	0,53	0,21	0,08	-	5E-05	2E-08	4E-07	n.f.	11,7
EC 57	sspA	36 kDa	8	68	ID499	SACOL1057	x	3,47	87,5	35,9	-	4E-09	3E-07	6E-07		
EC 57	fda	33 kDa	6	68	ID499	SACOL2622	x	3,47	87,5	35,9	-	4E-09	3E-07	6E-07		
EC 57	SACOL2597	31 kDa	5	68	ID499	SACOL2597	x	3,47	87,5	35,9	-	4E-09	3E-07	6E-07		
EC 57	SACOL1561	36 kDa	4	68	ID499	SACOL1561	x	3,47	87,5	35,9	-	4E-09	3E-07	6E-07		
EC 57	SACOL0050	165 kDa	2	68	ID499	SACOL0050	x	3,47	87,5	35,9	-	4E-09	3E-07	6E-07	4,54	23,9
EC 57	asp23	19 kDa	2	68	ID499	SACOL2173	x	3,47	87,5	35,9	-	4E-09	3E-07	6E-07		
EC 58	tpiA	27 kDa	7	4	ID501	SACOL0840	0,56	3,24	16,8	8,38	0,0001	3E-08	1E-09	4E-06	100	4,07
EC 58	SACOL1835	31 kDa	7	4	ID501	SACOL1835	0,56	3,24	16,8	8,38	0,0001	3E-08	1E-09	4E-06		
EC 58	SACOL0633	29 kDa	6	4	ID501	SACOL0633	0,56	3,24	16,8	8,38	0,0001	3E-08	1E-09	4E-06		
EC 58	isaA	24 kDa	4	4	ID501	SACOL2584	0,56	3,24	16,8	8,38	0,0001	3E-08	1E-09	4E-06		
EC 58	asp23	19 kDa	2	4	ID501	SACOL2173	0,56	3,24	16,8	8,38	0,0001	3E-08	1E-09	4E-06		
EC 58	adk	24 kDa	2	4	ID501	SACOL2218	0,56	3,24	16,8	8,38	0,0001	3E-08	1E-09	4E-06		
EC 58	SACOL0723	28 kDa	2	4	ID501	SACOL0723	0,56	3,24	16,8	8,38	0,0001	3E-08	1E-09	4E-06	3,98	28,9
EC 59	seb	31 kDa	13	25	ID506	SACOL0907	x	1,73	3,31	1,57	-	3E-06	3E-07	0,0002	0,07	0,34
EC 59	sek	28 kDa	12	25	ID506	SACOL0886	x	1,73	3,31	1,57	-	3E-06	3E-07	0,0002	n.f.	n.f.
EC 59	sei	28 kDa	9	25	ID506	SACOL0887	x	1,73	3,31	1,57	-	3E-06	3E-07	0,0002	n.f.	n.f.
EC 59	mecA	76 kDa	4	25	ID506	SACOL0033	x	1,73	3,31	1,57	-	3E-06	3E-07	0,0002		
EC 59	isaA	24 kDa	3	25	ID506	SACOL2584	x	1,73	3,31	1,57	-	3E-06	3E-07	0,0002		
EC 59	cysS	54 kDa	3	25	ID506	SACOL0576	x	1,73	3,31	1,57	-	3E-06	3E-07	0,0002		



Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							EC 59	SACOL2302	35 kDa	3	25	ID506	SACOL2302	x	1,73	3,31
EC 59	SACOL0776	27 kDa	3	25	ID506	SACOL0776	x	1,73	3,31	1,57	-	3E-06	3E-07	0,0002		
EC 59	SACOL2666	69 kDa	2	25	ID506	SACOL2666	x	1,73	3,31	1,57	-	3E-06	3E-07	0,0002		
EC 59	SACOL0578	27 kDa	2	25	ID506	SACOL0578	x	1,73	3,31	1,57	-	3E-06	3E-07	0,0002		
EC 60	splB	26 kDa	12	79	ID507	SACOL1868	x	0,17	0,11	0,12	-	8E-10	2E-10	5E-10	0,08	0,01
EC 60	rplA	25 kDa	6	79	ID507	SACOL0584	x	0,17	0,11	0,12	-	8E-10	2E-10	5E-10		
EC 60	seb	31 kDa	5	79	ID507	SACOL0907	x	0,17	0,11	0,12	-	8E-10	2E-10	5E-10	0,07	0,34
EC 60	ssaA2	29 kDa	3	79	ID507	SACOL2291	x	0,17	0,11	0,12	-	8E-10	2E-10	5E-10		
EC 61	splC	26 kDa	8	81	ID514	SACOL1867	x	0,32	0,07	0,1	-	0,0005	3E-07	1E-08	n.f.	0,69
EC 61	mecA	76 kDa	4	81	ID514	SACOL0033	x	0,32	0,07	0,1	-	0,0005	3E-07	1E-08		
EC 61	SACOL0478	25 kDa	4	81	ID514	SACOL0478	x	0,32	0,07	0,1	-	0,0005	3E-07	1E-08		
EC 61	isaA	24 kDa	3	81	ID514	SACOL2584	x	0,32	0,07	0,1	-	0,0005	3E-07	1E-08		
EC 61	upp	23 kDa	2	81	ID514	SACOL2104	x	0,32	0,07	0,1	-	0,0005	3E-07	1E-08		
EC 62	splC	26 kDa	8	48	ID515	SACOL1867	x	0,26	0,16	0,17	-	5E-08	2E-09	7E-07	n.f.	0,69
EC 62	splF	26 kDa	4	48	ID515	SACOL1864	x	0,26	0,16	0,17	-	5E-08	2E-09	7E-07	33,7	0,28
EC 62	mecA	76 kDa	3	48	ID515	SACOL0033	x	0,26	0,16	0,17	-	5E-08	2E-09	7E-07		
EC 62	asp23	19 kDa	3	48	ID515	SACOL2173	x	0,26	0,16	0,17	-	5E-08	2E-09	7E-07		
EC 62	sek	28 kDa	2	48	ID515	SACOL0886	x	0,26	0,16	0,17	-	5E-08	2E-09	7E-07	n.f.	n.f.
EC 63	splF	26 kDa	10	15	ID517	SACOL1864		0,35	0,08	0,04	0,0238	8E-08	1E-07	6E-07	33,7	0,28
EC 63	seb	31 kDa	5	15	ID517	SACOL0907		0,35	0,08	0,04	0,0238	8E-08	1E-07	6E-07	0,07	0,34
EC 63	splD	26 kDa	3	15	ID517	SACOL1866		0,35	0,08	0,04	0,0238	8E-08	1E-07	6E-07	n.f.	n.f.
EC 63	pflB	85 kDa	2	15	ID517	SACOL0204		0,35	0,08	0,04	0,0238	8E-08	1E-07	6E-07	0,01	7,58
EC 63	splE	26 kDa	2	15	ID517	SACOL1865		0,35	0,08	0,04	0,0238	8E-08	1E-07	6E-07	n.f.	n.f.
EC 64	splF	26 kDa	16	74	ID518	SACOL1864	x	0,08	0,06	0,04	-	7E-10	5E-11	4E-08	33,7	0,28

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							EC 64	seb	31 kDa	9	74	ID518	SACOL0907	x	0,08	0,06
EC 64	splE	26 kDa	7	74	ID518	SACOL1865	x	0,08	0,06	0,04	-	7E-10	5E-11	4E-08	n.f.	n.f.
EC 64	splD	26 kDa	5	74	ID518	SACOL1866	x	0,08	0,06	0,04	-	7E-10	5E-11	4E-08	n.f.	n.f.
EC 66	splF	26 kDa	14	41	ID521	SACOL1864	x	0,13	0,1	0,06	-	3E-08	2E-09	6E-08	33,7	0,28
EC 66	splE	26 kDa	10	41	ID521	SACOL1865	x	0,13	0,1	0,06	-	3E-08	2E-09	6E-08	n.f.	n.f.
EC 66	seb	31 kDa	9	41	ID521	SACOL0907	x	0,13	0,1	0,06	-	3E-08	2E-09	6E-08	0,07	0,34
EC 66	splB	26 kDa	6	41	ID521	SACOL1868	x	0,13	0,1	0,06	-	3E-08	2E-09	6E-08	0,08	0,01
EC 66	splD	26 kDa	5	41	ID521	SACOL1866	x	0,13	0,1	0,06	-	3E-08	2E-09	6E-08	n.f.	n.f.
EC 66	aur	56 kDa	4	41	ID521	SACOL2659	x	0,13	0,1	0,06	-	3E-08	2E-09	6E-08		
EC 66	sasD	26 kDa	2	41	ID521	SACOL0119	x	0,13	0,1	0,06	-	3E-08	2E-09	6E-08	n.f.	n.f.
EC 67	ahpC	21 kDa	9	78	ID527	SACOL0452	x	1,87	1,74	3,52	-	0,0012	0,0062	3E-06		
EC 67	sodA	23 kDa	5	78	ID527	SACOL1610	x	1,87	1,74	3,52	-	0,0012	0,0062	3E-06		
EC 67	SACOL0050	165 kDa	4	78	ID527	SACOL0050	x	1,87	1,74	3,52	-	0,0012	0,0062	3E-06	4,54	23,9
EC 67	isaA	24 kDa	3	78	ID527	SACOL2584	x	1,87	1,74	3,52	-	0,0012	0,0062	3E-06		
EC 67	tuf	43 kDa	3	78	ID527	SACOL0594	x	1,87	1,74	3,52	-	0,0012	0,0062	3E-06		
EC 67	SACOL1885	21 kDa	3	78	ID527	SACOL1885	x	1,87	1,74	3,52	-	0,0012	0,0062	3E-06		
EC 67	tal	26 kDa	2	78	ID527	SACOL1831	x	1,87	1,74	3,52	-	0,0012	0,0062	3E-06	n.f.	0,01
EC 67	deoC2	23 kDa	2	78	ID527	SACOL2129	x	1,87	1,74	3,52	-	0,0012	0,0062	3E-06		
EC 67	clpP	22 kDa	2	78	ID527	SACOL0833	x	1,87	1,74	3,52	-	0,0012	0,0062	3E-06		
EC 67	SACOL1992	22 kDa	2	78	ID527	SACOL1992	x	1,87	1,74	3,52	-	0,0012	0,0062	3E-06		
EC 67	SACOL1933	19 kDa	2	78	ID527	SACOL1933	x	1,87	1,74	3,52	-	0,0012	0,0062	3E-06		
EC 68	nuc	25 kDa	18	23	ID543	SACOL0860	x	1,77	1,6	0,31	-	3E-06	1E-06	1E-05		
EC 68	h1b	37 kDa	3	23	ID543	SACOL2003	x	1,77	1,6	0,31	-	3E-06	1E-06	1E-05	n.f.	0,39
EC 68	SACOL2006	40 kDa	2	23	ID543	SACOL2006	x	1,77	1,6	0,31	-	3E-06	1E-06	1E-05	n.f.	n.f.

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							EC 68	SACOL0442	23 kDa	2	23	ID543	SACOL0442	x	1,77	1,6
EC 69	SACOL0908	20 kDa	8	50	ID545	SACOL0908	x	0,27	0,13	0,02	-	7E-09	2E-07	2E-10		
EC 69	seb	31 kDa	3	50	ID545	SACOL0907	x	0,27	0,13	0,02	-	7E-09	2E-07	2E-10	0,07	0,34
EC 69	isaA	24 kDa	2	50	ID545	SACOL2584	x	0,27	0,13	0,02	-	7E-09	2E-07	2E-10		
EC 70	SACOL0908	20 kDa	9	44	ID562	SACOL0908	x	0,45	0,28	0,07	-	1E-07	5E-09	5E-09		
EC 70	isaA	24 kDa	2	44	ID562	SACOL2584	x	0,45	0,28	0,07	-	1E-07	5E-09	5E-09		
EC 71	SACOL0908	20 kDa	9	59	ID565	SACOL0908	x	0,37	0,17	0,04	-	1E-08	3E-09	1E-09		
EC 71	mecA	76 kDa	4	59	ID565	SACOL0033	x	0,37	0,17	0,04	-	1E-08	3E-09	1E-09		
EC 71	seb	31 kDa	2	59	ID565	SACOL0907	x	0,37	0,17	0,04	-	1E-08	3E-09	1E-09	0,07	0,34
EC 71	ssb-p	16 kDa	2	59	ID565	SACOL0339	x	0,37	0,17	0,04	-	1E-08	3E-09	1E-09	n.f.	n.f.
EC 72	SACOL0908	20 kDa	5	62	ID566	SACOL0908	x	0,32	0,11	0,01	-	2E-08	4E-09	2E-09		
EC 72	SACOL1541	17 kDa	3	62	ID566	SACOL1541	x	0,32	0,11	0,01	-	2E-08	4E-09	2E-09		
EC 73	fda	33 kDa	11	85	ID62154	SACOL2622	x	2,46	12,4	14,8	-	6E-05	3E-09	5E-09		
EC 73	sspA	36 kDa	9	85	ID62154	SACOL1057	x	2,46	12,4	14,8	-	6E-05	3E-09	5E-09		
EC 73	pta	35 kDa	7	85	ID62154	SACOL0634	x	2,46	12,4	14,8	-	6E-05	3E-09	5E-09		
EC 73	hlb	37 kDa	6	85	ID62154	SACOL2003	x	2,46	12,4	14,8	-	6E-05	3E-09	5E-09	n.f.	0,39
EC 73	SACOL1561	36 kDa	6	85	ID62154	SACOL1561	x	2,46	12,4	14,8	-	6E-05	3E-09	5E-09		
EC 73	nrdF	38 kDa	6	85	ID62154	SACOL0793	x	2,46	12,4	14,8	-	6E-05	3E-09	5E-09		
EC 73	pdhB	35 kDa	5	85	ID62154	SACOL1103	x	2,46	12,4	14,8	-	6E-05	3E-09	5E-09		
EC 73	SACOL0198	37 kDa	4	85	ID62154	SACOL0198	x	2,46	12,4	14,8	-	6E-05	3E-09	5E-09		
EC 73	SACOL2596	38 kDa	4	85	ID62154	SACOL2596	x	2,46	12,4	14,8	-	6E-05	3E-09	5E-09		
EC 73	ezrA	66 kDa	3	85	ID62154	SACOL1767	x	2,46	12,4	14,8	-	6E-05	3E-09	5E-09		
EC 73	lip1	77 kDa	2	85	ID62154	SACOL2694	x	2,46	12,4	14,8	-	6E-05	3E-09	5E-09	n.f.	2,62
EC 74	hly	36 kDa	23	71	ID70144	SACOL1173	x	0,04	0,09	0,25	-	2E-08	5E-09	4E-05	0,01	0,01

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
EC 74	seb	31 kDa	9	71	ID70144	SACOL0907	x	0,04	0,09	0,25	-	2E-08	5E-09	4E-05	0,07	0,34
EC 74	plc	37 kDa	7	71	ID70144	SACOL0078	x	0,04	0,09	0,25	-	2E-08	5E-09	4E-05		
EC 74	SACOL1225	36 kDa	5	71	ID70144	SACOL1225	x	0,04	0,09	0,25	-	2E-08	5E-09	4E-05		
EC 74	SACOL0962	35 kDa	4	71	ID70144	SACOL0962	x	0,04	0,09	0,25	-	2E-08	5E-09	4E-05		
EC 74	mecA	76 kDa	3	71	ID70144	SACOL0033	x	0,04	0,09	0,25	-	2E-08	5E-09	4E-05		
EC 74	hIb	37 kDa	2	71	ID70144	SACOL2003	x	0,04	0,09	0,25	-	2E-08	5E-09	4E-05	n.f.	0,39
EC 74	SACOL0050	165 kDa	2	71	ID70144	SACOL0050	x	0,04	0,09	0,25	-	2E-08	5E-09	4E-05	4,54	23,9
EC 75	sodA	23 kDa	15	56	ID709	SACOL1610	x	2,01	2,21	4,1	-	0,0019	0,0007	1E-05		
EC 75	ahpC	21 kDa	8	56	ID709	SACOL0452	x	2,01	2,21	4,1	-	0,0019	0,0007	1E-05		
EC 75	dut	20 kDa	6	56	ID709	SACOL0357	x	2,01	2,21	4,1	-	0,0019	0,0007	1E-05		
EC 75	SACOL0444	21 kDa	5	56	ID709	SACOL0444	x	2,01	2,21	4,1	-	0,0019	0,0007	1E-05		
EC 75	clpP	22 kDa	5	56	ID709	SACOL0833	x	2,01	2,21	4,1	-	0,0019	0,0007	1E-05		
EC 75	SACOL1992	22 kDa	3	56	ID709	SACOL1992	x	2,01	2,21	4,1	-	0,0019	0,0007	1E-05		
EC 75	SACOL0270	33 kDa	3	56	ID709	SACOL0270	x	2,01	2,21	4,1	-	0,0019	0,0007	1E-05		
EC 75	rpe	24 kDa	3	56	ID709	SACOL1235	x	2,01	2,21	4,1	-	0,0019	0,0007	1E-05		
EC 75	isaA	24 kDa	2	56	ID709	SACOL2584	x	2,01	2,21	4,1	-	0,0019	0,0007	1E-05		
EC 75	SACOL1912	22 kDa	2	56	ID709	SACOL1912	x	2,01	2,21	4,1	-	0,0019	0,0007	1E-05		
EC 75	sodM	23 kDa	2	56	ID709	SACOL0118	x	2,01	2,21	4,1	-	0,0019	0,0007	1E-05		
EC 76	SACOL2006	40 kDa	19	16	ID845	SACOL2006	0,39	0,05	0,03	0,02	9E-06	0,0003	0,0001	1E-06	n.f.	n.f.
EC 76	hIlgB	37 kDa	11	16	ID845	SACOL2422	0,39	0,05	0,03	0,02	9E-06	0,0003	0,0001	1E-06	0,01	0,39
EC 76	lukD	37 kDa	3	16	ID845	SACOL1880	0,39	0,05	0,03	0,02	9E-06	0,0003	0,0001	1E-06	0,03	1,08
EC 77	lukD	37 kDa	22	10	ID863366	SACOL1880	0,55	0,06	0,05	0,03	0,0002	1E-05	9E-08	3E-08		
EC 77	SACOL2006	40 kDa	12	10	ID863366	SACOL2006	0,55	0,06	0,05	0,03	0,0002	1E-05	9E-08	3E-08	n.f.	n.f.
EC 77	hIlgB	37 kDa	7	10	ID863366	SACOL2422	0,55	0,06	0,05	0,03	0,0002	1E-05	9E-08	3E-08	0,01	0,39

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							EC 77	lip2	76 kDa	3	10	ID863366	SACOL0317/SACOL0390	0,55	0,06	0,05
EC 77	SACOL2004	39 kDa	3	10	ID863366	SACOL2004	0,55	0,06	0,05	0,03	0,0002	1E-05	9E-08	3E-08	n.f.	n.f.
EC 77	mecA	76 kDa	2	10	ID863366	SACOL0033	0,55	0,06	0,05	0,03	0,0002	1E-05	9E-08	3E-08		
EC 78	SACOL0050	165 kDa	50	29	ID95017	SACOL0050	x	1,72	1,91	7,47	-	0,0012	0,0007	7E-06	4,54	23,9
EC 78	SACOL0479	56 kDa	11	29	ID95017	SACOL0479	x	1,72	1,91	7,47	-	0,0012	0,0007	7E-06		
EC 78	odhB	47 kDa	9	29	ID95017	SACOL1448	x	1,72	1,91	7,47	-	0,0012	0,0007	7E-06		
EC 78	esaA	115 kDa	8	29	ID95017	SACOL0272	x	1,72	1,91	7,47	-	0,0012	0,0007	7E-06		
EC 78	atl	137 kDa	4	29	ID95017	SACOL1062	x	1,72	1,91	7,47	-	0,0012	0,0007	7E-06	n.f.	11,7
EC 78	SACOL0455	36 kDa	4	29	ID95017	SACOL0455	x	1,72	1,91	7,47	-	0,0012	0,0007	7E-06		
EC 78	ptsI	63 kDa	3	29	ID95017	SACOL1092	x	1,72	1,91	7,47	-	0,0012	0,0007	7E-06		
EC 78	gpmI	56 kDa	2	29	ID95017	SACOL0841	x	1,72	1,91	7,47	-	0,0012	0,0007	7E-06		
EC 79	rocA	57 kDa	21	52	ID97338	SACOL2569	x	2,04	2,79	6,29	-	0,0005	8E-05	2E-06		
EC 79	argS	62 kDa	14	52	ID97338	SACOL0663	x	2,04	2,79	6,29	-	0,0005	8E-05	2E-06		
EC 79	SACOL0050	165 kDa	12	52	ID97338	SACOL0050	x	2,04	2,79	6,29	-	0,0005	8E-05	2E-06	4,54	23,9
EC 79	lysS	57 kDa	11	52	ID97338	SACOL0562	x	2,04	2,79	6,29	-	0,0005	8E-05	2E-06		
EC 79	pdhD	49 kDa	10	52	ID97338	SACOL1105	x	2,04	2,79	6,29	-	0,0005	8E-05	2E-06		
EC 79	gatA	53 kDa	8	52	ID97338	SACOL1961	x	2,04	2,79	6,29	-	0,0005	8E-05	2E-06		
EC 79	ipdC	61 kDa	8	52	ID97338	SACOL0173	x	2,04	2,79	6,29	-	0,0005	8E-05	2E-06		
EC 79	SACOL0918	53 kDa	7	52	ID97338	SACOL0918	x	2,04	2,79	6,29	-	0,0005	8E-05	2E-06		
EC 79	katA	58 kDa	6	52	ID97338	SACOL1368	x	2,04	2,79	6,29	-	0,0005	8E-05	2E-06	0,44	2,83
EC 79	guaA	58 kDa	6	52	ID97338	SACOL0461	x	2,04	2,79	6,29	-	0,0005	8E-05	2E-06		
EC 79	glnA	51 kDa	4	52	ID97338	SACOL1329	x	2,04	2,79	6,29	-	0,0005	8E-05	2E-06		
IC 5	alaS	99 kDa	27	17	ID2254	SACOL1673	0,12	0,55	0,49	0,53	8E-06	2E-05	5E-05	9E-05		
IC 5	polA	99 kDa	26	17	ID2254	SACOL1737	0,12	0,55	0,49	0,53	8E-06	2E-05	5E-05	9E-05	100	

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							IC 5	leuS	92 kDa	22	17	ID2254	SACOL1808	0,12	0,55	0,49
IC 5	valS	102 kDa	6	17	ID2254	SACOL1710	0,12	0,55	0,49	0,53	8E-06	2E-05	5E-05	9E-05		
IC 5	pyc	129 kDa	2	17	ID2254	SACOL1123	0,12	0,55	0,49	0,53	8E-06	2E-05	5E-05	9E-05		
IC 6	SACOL0973	33 kDa	17	36	ID226254	SACOL0973	x	1,8	2,23	0,54	-	4E-05	2E-06	5E-05		
IC 6	fda	33 kDa	15	36	ID226254	SACOL2622	x	1,8	2,23	0,54	-	4E-05	2E-06	5E-05		
IC 6	tuf	43 kDa	14	36	ID226254	SACOL0594	x	1,8	2,23	0,54	-	4E-05	2E-06	5E-05		
IC 6	fabD	34 kDa	8	36	ID226254	SACOL1244	x	1,8	2,23	0,54	-	4E-05	2E-06	5E-05		
IC 6	efp	21 kDa	7	36	ID226254	SACOL1587	x	1,8	2,23	0,54	-	4E-05	2E-06	5E-05		
IC 6	SACOL2121	33 kDa	7	36	ID226254	SACOL2121	x	1,8	2,23	0,54	-	4E-05	2E-06	5E-05		
IC 6	tkt	72 kDa	6	36	ID226254	SACOL1377	x	1,8	2,23	0,54	-	4E-05	2E-06	5E-05		
IC 6	ispA	33 kDa	4	36	ID226254	SACOL1566	x	1,8	2,23	0,54	-	4E-05	2E-06	5E-05		
IC 6	dat	32 kDa	4	36	ID226254	SACOL1800	x	1,8	2,23	0,54	-	4E-05	2E-06	5E-05		
IC 6	SACOL0727	26 kDa	3	36	ID226254	SACOL0727	x	1,8	2,23	0,54	-	4E-05	2E-06	5E-05		
IC 6	tal	26 kDa	2	36	ID226254	SACOL1831	x	1,8	2,23	0,54	-	4E-05	2E-06	5E-05	0,37	0,75
IC 6	SACOL2321	32 kDa	2	36	ID226254	SACOL2321	x	1,8	2,23	0,54	-	4E-05	2E-06	5E-05		
IC 7	SACOL0212	85 kDa	36	39	ID2278	SACOL0212	x	28,3	31,3	6,84	-	4E-07	4E-08	2E-07	1,75	n.f.
IC 7	pflB	85 kDa	37	39	ID2278	SACOL0204	x	28,3	31,3	6,84	-	4E-07	4E-08	2E-07	0,01	0,08
IC 8	hlgB	37 kDa		14	ID2287	SACOL2422	0,08	0,08	0,01	0	5E-07	1E-08	4E-09	9E-05	n.f.	n.f.
IC 10	SACOL0212	85 kDa	30	63	ID2289	SACOL0212	x	22,5	28	7,21	-	2E-06	2E-10	4E-09	1,75	n.f.
IC 11	pflB	85 kDa	37	11	ID2291	SACOL0204	0,08	0,09	0	0	8E-06	8E-08	1E-05	5E-08	0,01	0,08
IC 11	lukD	37 kDa		11	ID2291	SACOL1880	0,08	0,09	0	0	8E-06	8E-08	1E-05	5E-08	n.f.	n.f.
IC 11	katA	58 kDa		11	ID2291	SACOL1368	0,08	0,09	0	0	8E-06	8E-08	1E-05	5E-08	100	0,01
IC 14	glmS	66 kDa	26	5	ID2349	SACOL2145	0,18	1,69	0,57	0,38	0,0003	2E-06	2E-05	5E-07	0,28	0,57
IC 14	acnA	99 kDa	10	5	ID2349	SACOL1385	0,18	1,69	0,57	0,38	0,0003	2E-06	2E-05	5E-07		

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							IC 14	ptsl	63 kDa	9	5	ID2349	SACOL1092	0,18	1,69	0,57
IC 14	tkl	72 kDa	6	5	ID2349	SACOL1377	0,18	1,69	0,57	0,38	0,0003	2E-06	2E-05	5E-07		
IC 14	pdhC	46 kDa	6	5	ID2349	SACOL1104	0,18	1,69	0,57	0,38	0,0003	2E-06	2E-05	5E-07		
IC 14	clpL	78 kDa	5	5	ID2349	SACOL2563	0,18	1,69	0,57	0,38	0,0003	2E-06	2E-05	5E-07		
IC 14	gpml	56 kDa	4	5	ID2349	SACOL0841	0,18	1,69	0,57	0,38	0,0003	2E-06	2E-05	5E-07		
IC 14	fusA	77 kDa	3	5	ID2349	SACOL0593	0,18	1,69	0,57	0,38	0,0003	2E-06	2E-05	5E-07		
IC 14	ftsZ	41 kDa	3	5	ID2349	SACOL1199	0,18	1,69	0,57	0,38	0,0003	2E-06	2E-05	5E-07	1,26	2,37
IC 14	pyrG	60 kDa	3	5	ID2349	SACOL2119	0,18	1,69	0,57	0,38	0,0003	2E-06	2E-05	5E-07		
IC 14	isaA	24 kDa	2	5	ID2349	SACOL2584	0,18	1,69	0,57	0,38	0,0003	2E-06	2E-05	5E-07		
IC 14	asp23	19 kDa	2	5	ID2349	SACOL2173	0,18	1,69	0,57	0,38	0,0003	2E-06	2E-05	5E-07		
IC 18	mgo2	56 kDa	16	30	ID2402	SACOL2623	x	1,81	2,6	1,86	-	1E-07	6E-08	4E-05	n.f.	n.f.
IC 18	mgo1	55 kDa		30	ID2402	SACOL2362	x	1,81	2,6	1,86	-	1E-07	6E-08	4E-05	1,63	4,08
IC 21	cysS	54 kDa	26	24	ID2421	SACOL0576	x	0,47	0,63	0,5	-	0,0024	0,0242	0,001		
IC 21	glnA	51 kDa	14	24	ID2421	SACOL1329	x	0,47	0,63	0,5	-	0,0024	0,0242	0,001		
IC 21	gcvPA	50 kDa	8	24	ID2421	SACOL1594	x	0,47	0,63	0,5	-	0,0024	0,0242	0,001		
IC 21	tkl	72 kDa	6	24	ID2421	SACOL1377	x	0,47	0,63	0,5	-	0,0024	0,0242	0,001		
IC 21	dnaA	52 kDa	6	24	ID2421	SACOL0001	x	0,47	0,63	0,5	-	0,0024	0,0242	0,001		
IC 21	aldA	54 kDa	5	24	ID2421	SACOL0154	x	0,47	0,63	0,5	-	0,0024	0,0242	0,001		
IC 21	crtN	57 kDa	5	24	ID2421	SACOL2576	x	0,47	0,63	0,5	-	0,0024	0,0242	0,001		
IC 21	glmU	49 kDa	5	24	ID2421	SACOL0543	x	0,47	0,63	0,5	-	0,0024	0,0242	0,001		0,01
IC 21	nuc	25 kDa	4	24	ID2421	SACOL0860	x	0,47	0,63	0,5	-	0,0024	0,0242	0,001		
IC 21	bglA	55 kDa	3	24	ID2421	SACOL0251	x	0,47	0,63	0,5	-	0,0024	0,0242	0,001		
IC 21	hll	37 kDa	2	24	ID2421	SACOL2003	x	0,47	0,63	0,5	-	0,0024	0,0242	0,001	n.f.	n.f.
IC 21	ilvB	64 kDa	2	24	ID2421	SACOL2043	x	0,47	0,63	0,5	-	0,0024	0,0242	0,001		

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							IC 22	cdr	49 kDa	23	1	ID2451	SACOL0975	0,55	0,66	0,29
IC 22	gluD	46 kDa	9	1	ID2451	SACOL0961	0,55	0,66	0,29	0,22	0,0001	0,0018	9E-06	3E-07		
IC 22	accC	50 kDa	9	1	ID2451	SACOL1571	0,55	0,66	0,29	0,22	0,0001	0,0018	9E-06	3E-07	n.f.	n.f.
IC 22	SACOL0596	43 kDa	7	1	ID2451	SACOL0596	0,55	0,66	0,29	0,22	0,0001	0,0018	9E-06	3E-07		
IC 22	mnmA	42 kDa	6	1	ID2451	SACOL1676	0,55	0,66	0,29	0,22	0,0001	0,0018	9E-06	3E-07		
IC 22	recA	38 kDa	5	1	ID2451	SACOL1304	0,55	0,66	0,29	0,22	0,0001	0,0018	9E-06	3E-07	0,99	2,05
IC 22	cap5F	42 kDa	4	1	ID2451	SACOL0141	0,55	0,66	0,29	0,22	0,0001	0,0018	9E-06	3E-07		
IC 22	purD	46 kDa	2	1	ID2451	SACOL1083	0,55	0,66	0,29	0,22	0,0001	0,0018	9E-06	3E-07		
IC 23	hutI	45 kDa	15	67	ID2482	SACOL2323	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		
IC 23	SACOL1749	44 kDa	12	67	ID2482	SACOL1749	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		
IC 23	hemL2	47 kDa	12	67	ID2482	SACOL1922	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		
IC 23	SACOL1483	43 kDa	11	67	ID2482	SACOL1483	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		
IC 23	SACOL0211	42 kDa	10	67	ID2482	SACOL0211	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004	100	0,82
IC 23	ald1	40 kDa	10	67	ID2482	SACOL1478	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		
IC 23	pgk	43 kDa	8	67	ID2482	SACOL0839	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		
IC 23	pdhA	41 kDa	8	67	ID2482	SACOL1102	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		
IC 23	tkt	72 kDa	5	67	ID2482	SACOL1377	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		
IC 23	SACOL0426	42 kDa	4	67	ID2482	SACOL0426	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004	n.f.	1,26
IC 23	pyk	63 kDa	3	67	ID2482	SACOL1745	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		
IC 23	SACOL0805	42 kDa	3	67	ID2482	SACOL0805	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		
IC 23	icd	46 kDa	3	67	ID2482	SACOL1741	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		
IC 23	SACOL0213	45 kDa	3	67	ID2482	SACOL0213	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		
IC 23	SACOL0596	43 kDa	2	67	ID2482	SACOL0596	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		
IC 23	atpA	55 kDa	2	67	ID2482	SACOL2097	x	3,76	2,29	4,43	-	3E-07	0,0003	0,0004		



Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							IC 23	SACOL2114	52 kDa	2	67	ID2482	SACOL2114	x	3,76	2,29
IC 33	grpE	24 kDa	13	20	ID2597	SACOL1638	1,6	1,88	2,44	2,73	0,0038	4E-06	8E-09	2E-06		
IC 33	tuf	43 kDa	11	20	ID2597	SACOL0594	1,6	1,88	2,44	2,73	0,0038	4E-06	8E-09	2E-06		
IC 33	dnaK	66 kDa	10	20	ID2597	SACOL1637	1,6	1,88	2,44	2,73	0,0038	4E-06	8E-09	2E-06		
IC 33	rpsA	43 kDa	7	20	ID2597	SACOL1516	1,6	1,88	2,44	2,73	0,0038	4E-06	8E-09	2E-06		
IC 33	rplY	24 kDa	3	20	ID2597	SACOL0545	1,6	1,88	2,44	2,73	0,0038	4E-06	8E-09	2E-06		
IC 37	SACOL1835	31 kDa	12	7	ID2650	SACOL1835	2	0,25	0,22	0,22	0,0003	7E-06	0,0008	0,0002		
IC 37	butA	27 kDa	8	7	ID2650	SACOL0111	2	0,25	0,22	0,22	0,0003	7E-06	0,0008	0,0002	n.f.	n.f.
IC 37	ftsZ	41 kDa	6	7	ID2650	SACOL1199	2	0,25	0,22	0,22	0,0003	7E-06	0,0008	0,0002	1,26	2,37
IC 37	SACOL0815	22 kDa	4	7	ID2650	SACOL0815	2	0,25	0,22	0,22	0,0003	7E-06	0,0008	0,0002		
IC 37	isaA	24 kDa	3	7	ID2650	SACOL2584	2	0,25	0,22	0,22	0,0003	7E-06	0,0008	0,0002		
IC 37	glmS	66 kDa	2	7	ID2650	SACOL2145	2	0,25	0,22	0,22	0,0003	7E-06	0,0008	0,0002	0,28	0,57
IC 37	SACOL0633	29 kDa	2	7	ID2650	SACOL0633	2	0,25	0,22	0,22	0,0003	7E-06	0,0008	0,0002		
IC 40	fabG	26 kDa	10	12	ID2706	SACOL1245	1,52	1,6	3,94	1,76	0,0039	0,0001	1E-07	8E-07	1,45	
IC 40	def	21 kDa	9	12	ID2706	SACOL1100	1,52	1,6	3,94	1,76	0,0039	0,0001	1E-07	8E-07		
IC 40	leuD	22 kDa	8	12	ID2706	SACOL2049	1,52	1,6	3,94	1,76	0,0039	0,0001	1E-07	8E-07		
IC 40	SACOL1905	24 kDa	3	12	ID2706	SACOL1905	1,52	1,6	3,94	1,76	0,0039	0,0001	1E-07	8E-07		
IC 40	ilvE	40 kDa	3	12	ID2706	SACOL0600	1,52	1,6	3,94	1,76	0,0039	0,0001	1E-07	8E-07		
IC 40	upp	23 kDa	2	12	ID2706	SACOL2104	1,52	1,6	3,94	1,76	0,0039	0,0001	1E-07	8E-07		
IC 40	pdn.f.T	21 kDa	2	12	ID2706	SACOL0565	1,52	1,6	3,94	1,76	0,0039	0,0001	1E-07	8E-07		
IC 40	udk	24 kDa	2	12	ID2706	SACOL1666	1,52	1,6	3,94	1,76	0,0039	0,0001	1E-07	8E-07		
IC 42	def	21 kDa	11	83	ID2717	SACOL1100	x	1,67	1,96	2,09	-	0,0004	2E-06	2E-05		
IC 42	pdn.f.T	21 kDa	5	83	ID2717	SACOL0565	x	1,67	1,96	2,09	-	0,0004	2E-06	2E-05		
IC 42	upp	23 kDa	2	83	ID2717	SACOL2104	x	1,67	1,96	2,09	-	0,0004	2E-06	2E-05		

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							IC 46	SACOL1759	18 kDa	10	33	ID2756	SACOL1759	x	0,46	0,34
IC 46	hslV	20 kDa	5	33	ID2756	SACOL1270	x	0,46	0,34	0,31	-	3E-05	1E-06	2E-06		
IC 46	moaB	19 kDa	3	33	ID2756	SACOL2268	x	0,46	0,34	0,31	-	3E-05	1E-06	2E-06		
IC 47	asp23	19 kDa	9	3	ID2759	SACOL2173	1,53	0,24	0,14	0,16	0,0002	2E-08	1E-10	1E-08		
IC 47	ssb	19 kDa	4	3	ID2759	SACOL0438	1,53	0,24	0,14	0,16	0,0002	2E-08	1E-10	1E-08	1,56	2,33
IC 47	pyk	63 kDa	3	3	ID2759	SACOL1745	1,53	0,24	0,14	0,16	0,0002	2E-08	1E-10	1E-08		
IC 49	SACOL1759	18 kDa	9	27	ID2764	SACOL1759	x	0,44	0,27	0,2	-	1E-05	3E-09	1E-07		
IC 49	hslV	20 kDa	7	27	ID2764	SACOL1270	x	0,44	0,27	0,2	-	1E-05	3E-09	1E-07		
IC 49	SACOL0413	21 kDa	4	27	ID2764	SACOL0413	x	0,44	0,27	0,2	-	1E-05	3E-09	1E-07		
IC 49	ltaS	74 kDa	2	27	ID2764	SACOL0778	x	0,44	0,27	0,2	-	1E-05	3E-09	1E-07		
IC 49	bcp	17 kDa	2	27	ID2764	SACOL1921	x	0,44	0,27	0,2	-	1E-05	3E-09	1E-07	0,38	n.f.
IC 51	asp23	19 kDa	8	47	ID2766	SACOL2173	x	0,24	0,29	0,46	-	8E-10	4E-08	5E-06		
IC 51	ssb	19 kDa	5	47	ID2766	SACOL0438	x	0,24	0,29	0,46	-	8E-10	4E-08	5E-06	1,56	2,33
IC 51	seb	31 kDa	3	47	ID2766	SACOL0907	x	0,24	0,29	0,46	-	8E-10	4E-08	5E-06	0,01	0,01
IC 51	tuf	43 kDa	2	47	ID2766	SACOL0594	x	0,24	0,29	0,46	-	8E-10	4E-08	5E-06		
IC 51	ftnA	20 kDa	2	47	ID2766	SACOL1952	x	0,24	0,29	0,46	-	8E-10	4E-08	5E-06		
IC 51	SACOL2711	19 kDa	2	47	ID2766	SACOL2711	x	0,24	0,29	0,46	-	8E-10	4E-08	5E-06		
IC 52	ureB	15 kDa	6	18	ID2772	SACOL2281	9,09	9,14	54,5	103	0,0025	1E-06	2E-05	4E-07	28	15
IC 52	ureE	17 kDa	5	18	ID2772	SACOL2283	9,09	9,14	54,5	103	0,0025	1E-06	2E-05	4E-07	15,4	44,9
IC 52	queF	20 kDa	3	18	ID2772	SACOL0789	9,09	9,14	54,5	103	0,0025	1E-06	2E-05	4E-07		
IC 52	asp23	19 kDa	2	18	ID2772	SACOL2173	9,09	9,14	54,5	103	0,0025	1E-06	2E-05	4E-07		
IC 52	katA	58 kDa	2	18	ID2772	SACOL1368	9,09	9,14	54,5	103	0,0025	1E-06	2E-05	4E-07	100	0,01
IC 52	alaS	99 kDa	2	18	ID2772	SACOL1673	9,09	9,14	54,5	103	0,0025	1E-06	2E-05	4E-07		
IC 55	ureB	15 kDa	5	9	ID2781	SACOL2281	2,4	5,22	20,2	43	0,0034	6E-06	1E-05	8E-08	28	15

Spot Nr.	Identified Protein, Gene Label	MW	Peptides	Measure	ID	Accession Nr.	ratio Myrtol. stand vs. Kontrolle				t-Test, p-Wert				<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O DV 8 h ratio	
							1 h	4 h	8 h	24 h	1 h	4 h	8 h	24 h	1.	2.
							IC 55	ureE	17 kDa	4	9	ID2781	SACOL2283	2,4	5,22	20,2
IC 55	tuf	43 kDa	4	9	ID2781	SACOL0594	2,4	5,22	20,2	43	0,0034	6E-06	1E-05	8E-08		
IC 55	bcp	17 kDa	3	9	ID2781	SACOL1921	2,4	5,22	20,2	43	0,0034	6E-06	1E-05	8E-08	0,38	n.f.
IC 55	lun.f.S	18 kDa	2	9	ID2781	SACOL2126	2,4	5,22	20,2	43	0,0034	6E-06	1E-05	8E-08		
IC 55	isaA	24 kDa	2	9	ID2781	SACOL2584	2,4	5,22	20,2	43	0,0034	6E-06	1E-05	8E-08		
IC 55	SACOL1163	19 kDa	2	9	ID2781	SACOL1163	2,4	5,22	20,2	43	0,0034	6E-06	1E-05	8E-08		
IC 56	ftnA	20 kDa	8	77	ID2783	SACOL1952	x	0,14	0,52	0,55	-	6E-08	6E-07	5E-05		
IC 56	SACOL2711	19 kDa	7	77	ID2783	SACOL2711	x	0,14	0,52	0,55	-	6E-08	6E-07	5E-05		
IC 56	SACOL1558	16 kDa	5	77	ID2783	SACOL1558	x	0,14	0,52	0,55	-	6E-08	6E-07	5E-05		
IC 56	isaA	24 kDa	3	77	ID2783	SACOL2584	x	0,14	0,52	0,55	-	6E-08	6E-07	5E-05		
IC 56	rplJ	18 kDa	3	77	ID2783	SACOL0585	x	0,14	0,52	0,55	-	6E-08	6E-07	5E-05		
IC 56	SACOL1630	35 kDa	3	77	ID2783	SACOL1630	x	0,14	0,52	0,55	-	6E-08	6E-07	5E-05		
IC 56	ptpA	17 kDa	3	77	ID2783	SACOL1939	x	0,14	0,52	0,55	-	6E-08	6E-07	5E-05		
IC 56	greA	18 kDa	2	77	ID2783	SACOL1665	x	0,14	0,52	0,55	-	6E-08	6E-07	5E-05		



### **13.2 Wissenschaftliche Publikation**

Mai 2015	Poster Veröffentlichung, Jahreskongress der DGHNO, Thema: „Antimikrobielle Effekte von standardisiertem Myrtol auf Staphylococcus aureus“ Constantin L. M. Schütz, Achim G. Beule, Katrin Darm, Julia Kolata, Werner G. Hosemann, Rabea Schlüter, Christian Scharf
----------	---

### **13.3 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

### **13.4 Danksagung**

Hiermit möchte ich allen danken, die an der Entstehung dieser Arbeit im Labor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen-, Ohrenkrankheiten, Kopf- und Halschirurgie der Universitätsmedizin Greifswald unter Leitung von Prof. Dr. Werner Hosemann mitgewirkt haben.

Mein außerordentlicher Dank geht hierbei an Dr. Christian Scharf für die umfangreiche Hauptbetreuung, richtungsweisende Erfahrungswerte, und das Ermöglichen der interdisziplinären Zusammenarbeit mit anderen Instituten der Universität Greifswald

Ebenfalls großen Dank möchte ich an PD Dr. Achim Beule für die Möglichkeit der Durchführung, das Thema und wegweisende kritische Betreuung von klinischer Seite richten.

Weiterhin danke ich Dipl. Biologin Katrin Darm insbesondere für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Vorbereitung und Erstellung der 2D-DIGE Gele, sowie der Durchführung der Experimente zur Proteinidentifikation.

Für die Erstellung der REM-Aufnahmen der Mikroorganismen im Imaging-Zentrum des Institutes für Mikrobiologie der Universität Greifswald danke ich Dr. Rabea Schlüter. Sowie für Durchführung der LC-MS mit Hilfe des Proxeon Easy nano-LC-System und dem Orbitrap Velos mit kombinierter ESI am interfakultären Institut für Genetik und funktionelle Genomforschung der Universität Greifswald von Dr. Vishnu M. Dhople. Vielen Dank gilt auch Dr. Jörg Bernhardt für die Mithilfe zur Erstellung der Voronoi Treemaps vom Institut für Mikrobielle Physiologie und Molekularbiologie der Universität Greifswald.

Besonderer Dank gebührt meiner Familie für ihren herzlichen Einsatz und die liebevolle Unterstützung in den vergangenen Jahren.