

ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN  
DEPARTEMENT LIFE SCIENCES UND FACILITY MANAGEMENT  
INSTITUT FÜR CHEMIE UND BIOTECHNOLOGIE

**Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von *Artemisia annua* auf  
Borrelien-Zellen**

Bachelorarbeit

von  
**Julia Nafzger**

Bachelorstudiengang 2020

Studienrichtung Biotechnologie

Abgabedatum: 6. Juli 2023

**Fachkorrektoren:**

Prof. Dr. Martin Sievers

Wiss. Mitarb. Tobias Wermelinger

ZHAW Life Sciences und Facility Management  
Fachstelle Mikrobiologie und Molekularbiologie  
Einsiedlerstrasse 31  
8820 Wädenswil

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene Extrakte ausgehend von einem Bio-Kräuter Pulver von *Artemisia annua* von Amarys hergestellt und auf ihre antibakterielle Wirkung gegen *B. burgdorferi* mittels einer SYBR Green I/ PI Färbung untersucht. Mögliche inhibierende Fraktionen werden weiter mittels MALDI-TOF auf das Molekulargewicht bestimmt und in Datenbanken gesucht. Im Ganzen sind sechs verschiedene Extraktionen hergestellt und mittels Normalphasenchromatographie fraktioniert worden. Darunter eine Extraktion mit 60% Ethanol, eine mit 99.7% Ethylacetat und eine Extraktion die auf dem Isolierungsprinzip von Artemisinin basierte und aus dem ein wässriger Extrakt sowie ein Etherphase-Extrakt resultierte. Zusätzlich wurde eine Extraktion mit Ethylacetat, welche mit einer Soxhlet-Apparatur realisiert wurde, sowie eine weitere Extraktion mit Ethylacetat in der Mikrowelle und eine letzte Extraktion mit Dichlormethan durchgeführt. Da bereits in verschiedenen Publikationen antibakterielle Wirkungen von diversen *A. annua* Extrakten gegen *E. coli* und *S. aureus* gezeigt wurden, sind die hergestellten Extrakte zur Überprüfung ihrer Wirkung zuerst auf *E. coli* WDCM 0013 und *S. aureus* DMSZ 766 getestet worden, bevor ein Inhibierungs- Assay mit *B. burgdorferi* durchgeführt wurde. Die Resultate des Inhibierungs- Assay mit Omnilog und Well Diffusion mit *E. coli* WDCM 0013 zeigten, dass die drei Extrakte Etherphase F8-13, Soxhlet EtoAC und EtoAC F11-17 bei einer Konzentration von 100 mg/mL das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 inhibierten, wobei die Wirkung des EtoAC F11-17 Extraktes stärker war als die Wirkungen der beiden Extrakte Etherphase F8-13 und Soxhlet EtoAC. Daraus resultierte die Feststellung, dass der Extrakt EtoAC F11-17, welcher ohne Hitze hergestellt wurde im Vergleich zu den beiden Extrakten Etherphase F8-13 und Soxhlet EtoAC, die unter dem Einfluss von Hitze hergestellt worden sind, eine stärkere Wirkung aufweist, da durch die Hitze wertvolle Wirkstoffe in den *A. annua* Extrakten verloren gehen können. Weiter wurde gezeigt, dass einzelne Fraktionen von EtoAC F11-17 und Etherphase F8-13 keine antibakterielle Wirkungen gegen *E. coli* WDCM 0013 aufweisen und nur die Gesamtfraktion EtoAC F11-17 im Well Diffusion Assay das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 inhibierte. Der Inhibierungs- Assay mit *B. burgdorferi* und EtoAC F11-17 [ 5 mg/mL] in den 1.5 mL Reaktionsgefäßen, nach einer Inkubation von 24 h zeigte, dass in beiden Ansätzen mit EtoAC F11-17 verglichen mit den positiv Kontrollen Artemisinin und Minocycline und der negativ Kontrolle DMSO mehr tote als lebende Borrelien nach der Färbung mit SYBR Green I/ PI vorhanden waren. Die Analyse von EtoAC F11-17 mit MALDI-TOF ergab vier Moleküle mit 870.6 g/mol, 886.6 g/mol, 902.6 g/mol und 918.5 g/mol, die in den Datenbanken von natürlichen Produkten ohne weitere Eingrenzungen keine Treffer bezüglich *A. annua* zeigten. Weitere Inhibierungs- Assay mit *B. burgdorferi* und EtoAC F11-17 mit Hilfe von einem HTS 7000 Plus Bio Assay Reader sind nötig, um quantitative Auswertungen machen zu können. Zusätzlich sollte für die EtoAC Fraktion 11-17 eine Analyse mit der NMR-Spektroskopie gemacht werden, um die Suche in den Datenbanken einzugrenzen.

## Abstract

In the present work, different extracts are prepared from an organic herbal powder of *Artemisia annua* from Amarys and investigated for their antibacterial activity against *B. burgdorferi* using SYBR Green I/PI staining. Possible inhibitory fractions are further determined for molecular weight by MALDI-TOF and searched in data banks. In total, six different extractions were prepared and fractionated by normal phase chromatography. These included an extraction with 60% ethanol, one with 99.7% ethyl acetate and an extraction based on the isolation principle of artemisinin, which resulted in an aqueous extract and an ether phase extract. In addition, an extraction with ethyl acetate was carried out using a Soxhlet apparatus, as well as another extraction with ethyl acetate in the microwave and a final extraction with dichloromethane. Since antibacterial effects of divergent *A. annua* extracts against *E. coli* and *S. aureus* have already been shown in various publications, the extracts produced were first tested for their effect on *E. coli* WDCM 0013 and *S. aureus* DMSZ 766 before an inhibition assay was carried out with *B. burgdorferi*. The results of the inhibition assay with Omnilog and Well diffusion with *E. coli* WDCM 0013 showed that the three extracts Etherphase F8-13, Soxhlet EtoAC and EtoAC F11-17 inhibited the growth of *E. coli* WDCM 0013 at a concentration of 100 mg/mL, with the effect of the EtoAC F11-17 extract being stronger than the effects of the two extracts Etherphase F8-13 and Soxhlet EtoAC. This led to the conclusion that the extract EtoAC F11-17, which was produced without heat, had a stronger effect than the two extracts Etherphase F8-13 and Soxhlet EtoAC, which were produced under the influence of heat, because valuable active substances in the *A. annua* extracts can be lost through heat. It was further shown that individual fractions of EtoAC F11-17 and ether phase F8-13 had no antibacterial effects against *E. coli* WDCM 0013 and only the total fraction EtoAC F11-17 inhibited the growth of *E. coli* WDCM 0013 in the Well diffusion assay. The inhibition assay with *B. burgdorferi* and EtoAC F11-17 [5 mg/mL] in the 1.5 mL reaction vessels, after an incubation of 24 h, showed that in both preparations with EtoAC F11-17 compared to the positive controls Artemisinin and Mincycline and the negative control DMSO more dead than live Borrelia were present after staining with SYBR Green I/PI. Analysis of EtoAC F11-17 with MALDI-TOF yielded four molecules with molecular masses of 870.6 g/mol, 886.6 g/mol, 902.6 g/mol and 918.5 g/mol which did not show any hits related to *A. annua* in the databases of natural products without any further restrictions. Further inhibition assays with *B. burgdorferi* and EtoAC F11-17 using a HTS 7000 Plus Bio Assay Reader are necessary, to make quantitative evaluations. In addition, an analysis with NMR spectroscopy should be carried out for EtoAC fraction 11-17 in order to narrow down the search in the databases.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung der Bachelorarbeit unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin Sievers bedanken, dass ich die Bachelorarbeit in seiner Forschungsgruppe schreiben durfte. Seine Unterstützung während der Arbeit und das Engagement bei der Lösung von aufkommenden Problemen, haben mich stets weitergebracht. Ausserdem möchte ich mich für die Korrekturlesung bedanken.

Mein Dank gebührt auch Herrn Tobias Wermelinger. Er hat mich während der praktischen Durchführung der Arbeit unterstützt und hat mir bei Unklarheiten jederzeit weiter geholfen. Herr Tobias Wermelinger hat mir ausserdem beim Mikroskopieren am Fluoreszenzmikroskop geholfen. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Herrn Gottfried Dasen für seine Hilfe am Fluoreszenzmikroskop bedanken.

Ein grosses Dankeschön geht auch an Alexandra Brandenberger. Sie hat mich bei den chemischen Arbeitsschritten unterstützt und durch ihr grosses Wissen und ihr Engagement hat sie mir während der Arbeit sehr weiter geholfen.

Ich möchte mich bei Frau Dr. Lydia Reutter für die Bereitstellung der Extrakte und bei Herrn Herbert Heller für die Initiierung des Projekts bedanken.

## Inhalt

1	Einleitung .....	7
2	Theorie.....	8
2.1	Pflanzenextrakte zur Behandlung der Lyme- Krankheit .....	8
2.2	<i>Artemisia annua</i> L.....	20
2.3	Lyme- Borreliose und <i>B. burgdorferi sensu lato</i> .....	23
3	Material und Methode.....	25
3.1	Materialliste .....	25
3.2	Extraktionen <i>A. annua</i> Pflanzenpulver .....	29
3.2.1	Extraktionen mit 60% Ethanol und Ethylacetat.....	30
3.2.2	Extraktion mit 99% Ethanol und Diethylether nach (Eckhardt et al., 2016). .....	31
3.2.3	Soxhlet Extraktion mit Ethylacetat.....	35
3.2.4	Mikrowellen Extraktion mit Ethylacetat.....	37
3.2.5	Extraktion mit Dichlormethan .....	38
3.3	Vorversuch Borrelien- Zellen SYBR Green I/Propidium-Iodid Färbung .....	39
3.4	Assays mit <i>E. coli</i> WDCM 00013/ <i>S. aureus</i> DMSZ 766 und den Extrakten aus 3.2.1 und 3.2.2 (4 Extrakte).....	40
3.4.1	Hemm-Assay mit Omnilog (4 Extrakte).....	40
3.4.2	Disk Diffusion (4 Extrakte) .....	43
3.4.3	Well Diffusion mit zusätzlich <i>S. aureus</i> DMSZ 766 (4 Extrakte) .....	44
3.5	Assays mit mit <i>E. coli</i> WDCM 00013 und den Extrakten aus 3.2.1 bis und mit 3.2.4 (21 Extrakte) .....	45
3.5.1	Well Diffusion (21 Extrakte) .....	46
3.5.2	Omnilog Assay (21 Extrakte) .....	46
3.6	Well Diffusion mit <i>E. coli</i> WDCM 00013 und den Fraktionen von Ethylacetat F11-17 und Etherphase F8-13 .....	48
3.7	MALDI-TOF von den vier Fraktionen von Ethylacetat F11-17 .....	49
3.8	Inhibierungs- Assay mit Omnilog mit <i>Borrelia</i> sp. und Extrakte .....	50

3.9	Borrelien Wachstumsversuche .....	52
3.10	Inhibierungs- Assay <i>B. burgdorferi</i> mit EtoAC F11-17 in Reaktionsgefäße. .....	53
4	Resultate .....	54
4.1	Chromatogramme der Extrakte mit Einteilung der Fraktionen .....	54
4.2	Vorversuch Borrelien Färbung mit SYBR Green I/Propidium-Iodid .....	58
4.3	Assays mit <i>E. coli</i> WDCM 00013/ <i>S. aureus</i> DMSZ 766 und den Extrakten aus 3.2.1 und 3.2.2 (4 Extrakte).....	61
4.3.1	Inhibierungs- Assay mit Omnilog(4 Extrakte) .....	63
4.3.2	Disk Diffusion Assay (4 Extrakte).....	64
4.3.3	Well Diffusion Assay (4 Extrakte).....	65
4.4	Assays mit <i>E. coli</i> WDCM 00013 und den Extrakten aus 3.2.1 bis und mit 3.2.4 (21 Extrakte) .....	67
4.4.1	Well Diffusion (21 Extrakte) .....	70
4.4.2	Inhibierungs- Assaymit Omnilog (17 Extrakte) .....	73
4.5	Fraktionen von Ethylacetat F11-17 und Etherphase F8-13 und Well Diffusion mit <i>E. coli</i> WDCM 00013.....	79
4.6	MALDI-TOF von den vier Fraktionen von Ethylacetat F11-17 .....	83
4.7	Omnilog mit <i>Borrelia sp.</i> .....	86
4.8	Borrelien Wachstumsversuche .....	88
4.9	Inhibierungs- Assay <i>B. burgdorferi</i> mit EtoAC F11-17 in Reaktionsgefäße .95	
5	Diskussion und Ausblick.....	102
6	Literaturverzeichnis .....	110
7	Abbildungsverzeichnis.....	114
8	Tabellenverzeichnis.....	119
9	Anhang.....	120

## Abkürzungsverzeichnis

<i>Borrelia</i> sp.	engl.: <i>Borrelia</i> species
<i>B.burgdorferi</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>B. garinii</i>	<i>Borrelia garinii</i>
<i>B. afzelii</i>	<i>Borrelia afzelii</i>
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>
ISOF	Isoforskolin
Culla	Cucurbitacin IIa
BmpA	engl.: Basic Membranprotein A
TLR	engl.: Toll-like-Rezeptor
IL-1R	Interleukin -1-Rezeptor
TIR-Domäne	Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
SIGIRR	engl.:Single-Immunoglobulin-Interleukin-1-Rezeptor
AN	Artemisia naphta
EM	Erythema migrans
BSK	Barbour- Stoenner-Kelly Medium
PTLDS	engl.: Post Treatment Lyme Disease Syndrom
SYBR Green I/PI	engl.: SYBR Green I / Propidium iodide Assay
LC-MS	engl.: Liquid chromatography - mass spectrometry
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionization

# 1 Einleitung

Der Einsatz von Naturprodukten zur Heilung von Krankheiten geht in der Geschichte der menschlichen Zivilisation weit zurück, als vor 5000 Jahren der Beginn der Anwendung der botanischen Heilkunde entstand und sich traditionelle Medizinsysteme, wie die chinesische Medizin (TCM) und Ayurveda entwickelt haben (Feng et al., 2020; Feng, Shi, et al., 2018; Mohammed et al., 2022). Heute verwenden rund 80% der Bevölkerung Naturheilmittel zur Heilung von verschiedenen Krankheiten und laut Angaben der WHO sind Heilpflanzen die beste Quelle zur Gewinnung einer Vielzahl von Medikamenten die einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung von Medikamenten gegen Krebs und Infektionskrankheiten dazu leisten (Gupta et al., 2009; Zhang et al., 2018). Eine von vielen Infektionskrankheiten ist die Lyme-Borreliose, die durch die Erreger der Genospezies *B. burgdorferi sensu lato* verursacht wird, welche über Zecken auf den Menschen übertragen werden. Patienten\*innen welche von der Lyme-Borreliose betroffen sind werden in der Regel mit Antibiotika behandelt. Problematisch ist, dass trotz einer Behandlung von 6 Monaten oder länger, etwa 10 bis 20% der Patienten\*innen weiterhin unter anhaltenden Symptomen dem sogenannten Post Treatment Lyme Disease Syndrom (PTLDS) leiden. Eine mögliche Ursache dafür ist die Bildung von Persistier-Formen von *B. burgdorferi*, welche mit einer Antibiotikabehandlung nicht getötet werden können (Feng, Yee, et al., 2018; Goc & Rath, 2016). Die *in-vitro* Wirkung von einzelnen Pflanzenspezies zur Bekämpfung der Lyme- Borreliose wurde in einzelnen Studien publiziert. Darunter der Einjährige Beifuss (*Artemisia annua*), welcher auch in Form von Tabletten als Ergänzung zur Behandlung der Lyme- Borreliose den Patienten\*innen empfohlen wird (Dr. med. Lydia Reutter, 2023). Der Hintergrund dieser Arbeit ist, in Zusammenarbeit mit der Fachgruppe Organische Chemie und Medizinalchemie und Herrn Herbert Heller und Frau Dr. Lydia Reutter, verschiedene Extrakte ausgehend von einem Bio-Kräuter Pulver von *Artemisia annua* von Amarys herzustellen und auf ihre antibakterielle Wirkung gegen verschiedene Borrelienarten zu untersuchen (siehe Anhang 1 Aufgabenstellung). Insgesamt werden sechs verschiedene Extraktionen hergestellt und mittels Normalphasenchromatographie fraktioniert. Darunter eine Extraktion mit 60% Ethanol, eine mit 99.7% Ethylacetat und eine Extraktion die auf dem Isolierungsprinzip von Artemisinin von Eckhardt et al. (2016) basiert und aus dem ein wässriger Extrakt sowie ein Etherphase-Extrakt resultiert. Zusätzlich wird eine Extraktion mit Ethylacetat, welche mit einer Soxhlet- Apparatur realisiert wird, sowie eine weitere Extraktion mit Ethylacetat in der Mikrowelle und eine letzte Extraktion mit Dichlormethan durchgeführt. Ziel ist es, die Wirkung verschiedener Fraktionen der Extrakte sowie Kombinationen der Extrakte auf Borrelien mit einer SYBR Green I und Propidium-Iodid Färbung nachzuweisen. Mögliche inhibierende Fraktionen werden weiter mittels MALDI-TOF auf das Molekulargewicht bestimmt und in Datenbanken gesucht.

## 2 Theorie

### 2.1 Pflanzenextrakte zur Behandlung der Lyme-Krankheit

Die Praxis der Nutzung von Naturprodukten, der Flora und Fauna, zur Linderung von Schmerzen und zur Heilung von Krankheiten bei Menschen und Tieren wird seit Jahrtausenden in der Geschichte der Menschheit eingesetzt (Mohammed et al., 2022). Vor ungefähr 5000 Jahren war der Beginn der Anwendung der botanischen Medizin in Mesopotamien und wurde über 3000 Jahre in China praktiziert und dokumentiert. Verschiedene traditionelle Medizinsysteme wie die traditionelle chinesische Medizin (TCM) und Ayurveda, haben sich über Jahrtausende hinweg entwickelt und zeigten einen positiven Einfluss auf den Fortschritt der menschlichen Zivilisation (Feng et al., 2020; Zhang et al., 2018). Heute verwenden rund 80% der Bevölkerung in Entwicklungsländern traditionelle Arzneimittel, die bioaktive Verbindungen aus Heilpflanzen enthalten, für ihre primäre Gesundheitsversorgung. Nebst dem Interesse an Naturheilmitteln in Entwicklungsländern, steigt auch wegen zunehmenden Gesundheitskosten und allgemeinen Sparmassnahmen die Aufmerksamkeit an Heilpflanzen in Industrieländern (Gupta et al., 2009; Zhang et al., 2018). Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind Heilpflanzen die beste Quelle zur Gewinnung einer Vielzahl von Medikamenten und in den letzten Jahrzehnten haben mehrere Studien gezeigt, dass Nutrazeutika einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung von Medikamenten gegen Krebs und Infektionskrankheiten dazu leisten (Allemailem, 2022; Gupta et al., 2009). Das Interesse an antimikrobiellen Wirkstoffen aus natürlichen Quellen wie Pflanzen, Kräutern, Gewürze, Früchte und ätherische Öle ist gross und haben sich als wirksam gegen eine Vielzahl von Bakterienarten gezeigt (Goc & Rath, 2016). Weitere antibakterielle Eigenschaften dieser natürlichen Substanzen zu erforschen hat grosses Potential, da die meisten Naturstoffe gut verträglich sind und als wirksam anerkannt werden. Im Hinblick auf die antibakterielle Wirkung von Naturstoffen gegen die Erreger der Lyme-Krankheit die *Borrelia* sp. ist nur wenig bekannt. Ein grösseres Wissen über die Wirksamkeit von pflanzlichen Stoffen zur Bekämpfung der Lyme-Borreliose ist besonders wichtig, da einerseits die Nebenwirkungen der herkömmlichen Antibiotikabehandlungen, sowie auch die bakterielle Persistenz bekannt sind und zu einem Hauptproblem bei Gesundheitsproblemen von Lyme-Borreliose Patienten geworden sind (Feng et al., 2017, 2020; Feng, Shi, et al., 2018; Goc & Rath, 2016; J. Weathers, 2023). Die bakterielle Persistenz beschreibt die Fähigkeit von *Borrelia burgdorferi* in der stationären Phase seine Morphologie von einer spirochetaalen Form in atypische Formen wie runde Körper, Mikrokolonien und Biofilm zu verändern. Solche sogenannten atypischen Persisterformen zeigen gegenüber den derzeitigen Antibiotika die zur Behandlung der Lyme-Borreliose eingesetzt werden eine Toleranz. Demzufolge steigt das Interesse an der Identifizierung neuer Arzneimittelkandidaten, die vorallem natürlichen Ursprungs sind, solche Persister abzutöten (Feng et al., 2020; Feng, Shi, et al., 2018).

Die Wirksamkeit von natürlichen Stoffen zu bestimmen geht mit einer Identifizierung von aktiven Molekülen aus Naturextrakten einher, welches eine schwierige Aufgabe darstellt, da Pflanzenprodukte eine komplexe Gruppe von primären und sekundären Metaboliten darstellen und hunderte oder sogar tausende von Bestandteile in diversen Konzentrationen enthalten (Allemaille, 2022). Hinzu kommt, wie in mehreren Studien gezeigt worden ist, dass die biologischen und pharmakologischen Funktionen von Pflanzenextrakten auf Synergien zwischen verschiedenen Komponenten zurückzuführen sind. Nur in wenigen Studien wurde gezeigt, dass eine Komponente allein für die Gesamtwirkung eines Extraktes verantwortlich ist (Allemaille, 2022; Golbarg & Mehdipour Moghaddam, 2021). Im Allgemeinen ist bekannt, dass verschiedene pflanzliche Sekundärmetaboliten wie Flavonoide, Terpene, Phenolsäuren, Alkaloide, Carotinoide, Gerbstoffe, Cumarine sowie einige Primärmetaboliten wie Peptide, Aminosäuren, organische Aminosäuren sowie organische Säuren eine antimikrobielle Aktivität aufweisen. Insbesondere Flavonoide, welche zu den Sekundärmetaboliten gehören, haben die umfassendste Wirkung, da sie nebst einer antimikrobiellen Wirkung, antioxidative, immunmodulatorische, entzündungshemmende, krebshemmende, neuroprotektive als auch antidiabetische Wirkungen mit sich bringen. Weiter gehören zu den meist untersuchten Heilpflanzen solche, welche Polyphenole enthalten, da sie bekannt sind für ihre antimikrobielle und antioxidative Wirkung (Golbarg & Mehdipour Moghaddam, 2021).

Einzelne Studien welche eine *in-vitro* Wirksamkeit von verschiedenen Pflanzenspezies zur Bekämpfung der Lyme-Borreliose zeigen, sind in der Tabelle 1 zu sehen. Insgesamt sind 22 verschiedene Pflanzenspezies aufgelistet, welche pro Studie Informationen über den getesteten Extrakt, beziehungsweise die Komponente und die biologische Aktivität zeigen. Zur Auswertung der Wirksamkeit der verschiedenen Pflanzenspezies wurde in den meisten Studien die minimale Hemmkonzentration (engl. MIC für Minimal Inhibitory Concentration) der Extrakte oder phytochemischen Stoffen bestimmt und verschiedene Aktivitäten gegen Persistierformen, als antipersister Aktivität bezeichnet, sind in der Tabelle 1 beschrieben worden. Die Autoren Feng, Shi, et al.,(2018) konnten in ihrer Studie zehn verschiedenen ätherischen Ölen von *Allium sativum L.*, *Pimenta officinalis*, *Cuminum cyminum L.*, *Cymbopogon martini var. Motia*, *Commiphora myrrha*, *Hedychium spicatum* und *Eucalyptus citriodora Hook* bereits bei einer Konzentration von 0.1% eine starke Aktivität gegen die stationäre Phase von *B. burgdorferi* zuweisen. Darunter zählten *Allium sativum L.*, *Pimenta officinalis*, *Commiphora myrrha* und *Hedychium spicatum* zu den wirksamsten Pflanzen. Zwei Jahre später wurden weitere Pflanzenspezies auf ihre Wirkung gegen *B. burgdorferi* untersucht (Feng et al., 2020). Ethanol-Extrakte von *Cryptolepis sanguinolenta*, *Juglans nigra*, *Polygonum cuspidatum*, *Artemisia annua*, *Uncaria tomentosa*, *Cistus incanus*, und *Scutellaria baicalensis* zeigten bei einer Konzentration von 1% eine gute Aktivität gegen stationäre Phase *B. burgdorferi* (Tabelle 1).

Extrakte in 60% und 90% Ethanol von *Artemisia annua* zeigten für den 60% und 90% Ethanol-Extrakt eine MIC von 0.5-1% (Tabelle 1) und die Zellviabilität in der stationären Phase betrug bei Konzentrationen von 0.5% und 1% des 60% Ethanolextrakts 44% und die Zellviabilität von 0.5% des 90% Ethanol-Extraktes lag bei 50% und 1% des 90% Ethanol-Extraktes bei 43% Zellviabilität. Bei beiden Extrakten und beiden Konzentrationen (0.5% und 1%) sind nach einer Subkultivierung der behandelten Zellen, Restzellen gewachsen. *Cryptolepis sanguinolenta* und *Polygonum cuspidatum* erwiesen sich als die beiden wirksamsten Pflanzen bezüglich ihrer starken Aktivität gegen wachsende *B. burgdorferi* und nicht wachsende, stationäre Phase *B. burgdorferi* (Feng et al., 2020). So zeigten Ethanol Extrakte von 60% - und 90% Ethanol eine MIC von 0.03-0.06% für *Cryptolepis sanguinolenta* und 30-,60- und 90% EtOH-Extrakte von *Polygonum cuspidatum* ergaben eine MIC von 0.25-0.5% (Tabelle 1). In der Studie von Feng et al., (2017) sind ätherische Öle auf ihre Aktivität gegen stationäre *B. burgdorferi* Kulturen getestet worden. Fünf ätherische Öle von *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon winterianus*, *Gaultheria procumbens*, *Origanum vulgare L.* und *Syzygium aromaticum* erwiesen sich bei einer niedrigen Konzentration von bereits 0.25% als wirksam. Darunter zählten *Origanum vulgare L.*, *Cinnamomum zeylanicum* und *Syzygium aromaticum* zu den wirksamsten Pflanzen, da sie alle lebensfähigen Zellen vollständig abtöteten und in Subkulturen kein Nachwuchs festgestellt wurde.

Bei einzelnen Pflanzenspezies wie *Artemisia annua*, *Cinnamomus camphora*, *Cistus creticus*, *Scutellaria baicalensis*, *Coleus forskohlii* und *Hemsleya macrosperma* wurden phytochemische Stoffe beschrieben welche eine Wirkung gegen *Borrelia* sp. zeigen. So ist in den Studien von Feng et al., (2015) und Feng, Weitner, et al., (2016) sowie Alvarez-Manzo et al., (2020) eine antipersister Aktivität von *B. burgdorferi* durch Artemisinin, ein Sesquiterpenlacton, von *Artemisia annua* beschrieben worden (Ekiert et al., 2021). In einem Screening von FDA zugelassenen Arzneimitteln gegen stationäre Phase von *B. burgdorferi* Kulturen konnten Feng et al., (2015) zeigen, dass Artemisinin eine etwa 50% höhere Wirksamkeit als die Antibiotika Doxycyclin (Dox) und Amoxicillin aufweist, jedoch weniger wirksam war als Daptomycin (DAP). Darauf wurden in einer Folgestudie Amoxicillin-induzierte Persister sowie stationäre Phase Kulturen von *B. burgdorferi* mit Artemisinin und in Kombinationen mit den Antibiotika Dox, DAP und Cephoperazon (CefP) behandelt und getestet. Ihre Ergebnisse zeigten, dass zwei 3-Wirkstoff-Kombinationen, Artemisinin + Dox + CefP und Artemisinin + Dox + DAP bei einer Konzentration von 10 mg/mL, die stärksten Wirkungen sowohl gegen die Persisterzellen als auch gegen stationäre Phase-Zellen aufwies (Feng, Shi, et al., 2016). Andere Forscher stellten ebenfalls eine Wirkung von Artemisinin gegen die stationäre Phase von *B. burgdorferi* fest und bestimmten bei einer Konzentration von 50 µM Artemisinin eine MIC von 5 µg/mL und bei einer Überlebensrate von kleiner 30% (Alvarez-Manzo et al., 2020). Cinnamaldehyde von

*Cinnamomus camphora* zeigte in der Studie von Feng, Shi, et al., (2018) bei einer Konzentration von 0.1% eine starke Aktivität gegen stationäre *B. burgdorferi* Kulturen. Rauwald et al., (2019) stellten in ihrer Studie fest, dass Manoyloxide und Carvacrol, zwei Terpene aus dem Oleoresins Labdanum, welches von der Blattoberfläche von *Cistus creticus* abgesondert wurde, eine starke wachstumshemmende Wirkung gegen *B. burgdorferi sensu stricto* zeigten (Tabelle 1). Die Studie von Goc et al., (2015) beschrieb die Wirksamkeit von 15 phytochemischen Stoffen und Mikronährstoffen gegen die drei morphologischen Formen: Spirochäten, latente runde Formen und Biofilm von *B. burgdorferi* B31 und *B. garinii* CIP103362. Zu den 15 phytochemischen Stoffen gehören die Verbindungen Baicalein, Hydroxytyrosol, Fisetin, Kaffeeferol, Oenin, cis-2-Decensäure, Rosmarinsäure, Luteolin, Monolaurin, Morin, Piceatannol, Rottlerin, Vitamin D3, Vitamin C, Seetang Jod und Doxycycline. Darunter zeigten sich Baicalein, cis-2-Decensäure, Monolaurin und Seetang Jod als äusserst wirksam gegen die runde Form von *B. burgdorferi* und *Borrelia garinii* (*B. garinii*). Ihre Ergebnisse zeigten zudem, dass nur Baicalein und Monolaurin eine signifikante Aktivität gegen den Biofilm aufweisen. Baicalein ist hauptsächlich in den Wurzeln von *Oroxylum indicum* (L.) und *Scutellaria baicalensis* zu finden und Monolaurin ist unter anderem im Kokosnuss-Öl zu finden (Hu et al., 2022; Nitbani et al., 2022). Eine weitere interessante Studie von Peng et al., (2020) schildert die entzündungshemmende Wirkung der Lyme Arthritis von den Naturstoffen Isoforskolin (ISOF) aus der in China beheimateten Pflanze *Coleus forskohlii* und Cucurbitacin IIa (Culla) aus der Knolle von *Hemsleya macrosperma*. *Coleus forskohlii* und *Hemsleya macrosperma* haben wegen ihren wichtigsten Hauptbestandteilen ISOF und Culla mit ihren entzündungshemmenden Eigenschaften viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen und werden zur Behandlung von zahlreichen Krankheiten eingesetzt. Wie in der Studie von Peng et al., (2020) gezeigt wurde, auch deren Einsatz als potentielle Heilpflanzen zur Behandlung der Lyme Arthritis.

Die Lyme Arthritis ist ein charakteristisches Merkmal der spätesten Phase der Lyme-Borreliose und frühere Studien haben gezeigt, dass *B. burgdorferi* Spirochäten, genauer gesagt, das *B. burgdorferi* basic Membranprotein A (BmpA) den Toll-like-Rezeptor (TLR)-Signalweg in Makrophagen und dendritischen Zellen von Mäusen und Menschen induziert und dieser für die Entstehung der Lyme Arthritis verantwortlich ist (Peng et al., 2020). TLRs und Interleukin (IL)-1-Rezeptor (IL-1R), beides wichtige Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, verfügen über eine konservierte intrazelluläre Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne und gehören zur TIR-Superfamilie. Im Allgemeinen kann eine Aktivierung der TLR/IL-1R Signalübertragung positive als auch negative Einflüsse haben, da es zum einen bei der systematischen Entzündungsreaktion und der natürlichen Abwehrimmunität mitspielt und zum anderen kann bei einer übermässigen TLR-Reaktivität eine ganze Kaskade von Entzündungsreaktionen entstehen.

Solche Kaskaden von Entzündungsreaktionen führen im schlimmsten Falle zu schweren Gewebe- und Organschäden.

Nebst den TLR und IL-1R Rezeptoren, die zur TIR Superfamilie gehören, ist der Single-Immunglobulin-Interleukin-1-Rezeptor (SIGIRR) ein neueres Mitglied der TIR-Familie. SIGIRR ist bekannt für dessen Vermittlung von angeborenen immuninhibitorischen-regulatorischen Effekten im TLR/IL-1R-Signalweg. Nun hat die Studie von Peng et al., (2020) gezeigt, dass ISOF und Culla eine entzündungshemmende Wirkung ausüben, indem sie SIGIRR modulieren, wodurch der BmpA induzierte TLR-Signalweg in menschlichen Makrophagen inhibiert wird und einen positiven Effekt auf den Ausbruch und die Entwicklung der chronischen Entzündung, der Lyme-Arthritis haben.

Bei den meisten Pflanzenspezies jedoch, sind die wirksamen phytochemischen Stoffe der Extrakte oder ätherischen Ölen unbekannt. Weitere Studien sind deshalb notwendig, um einerseits die wirksamen Komponenten der Pflanzenstoffe und ihre potentiellen synergistischen Wirkungen zu identifizieren und andererseits soll ihre potenzielle Toxizität und pharmakokinetische Eigenschaften für die Aktivität gegen *Borrelia* sp. *in vivo* in Tiermodellen vor der Anwendung beim Menschen bewertet werden (Bobe et al., 2021).

Tabelle 1: Studien welche die *in-vitro* Wirksamkeit von 26 verschiedenen Pflanzenspezies zur Bekämpfung der Lyme-Borreliose aufzeigen. Die Tabelle ist gegliedert in die Spalten Pflanzenspezies, Extrakte/Komponente, Biologische Aktivität und Referenz. **Quelle:** Einzelne Informationen über Pflanzenspezies sowie das Design der Tabelle wurde von der Supplementary Tabelle von (Feng et al., 2020) übernommen und mit weiteren Literaturen ergänzt.

Pflanzenspezies	Extrakt/Komponente	Biologische Aktivität	Referenz
<i>Allium sativum</i> L.	Ätherisches Öl, 0.1%	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31 5A19)	(Feng, Shi, et al., 2018)
<i>Amyris balsamifera</i> L.	Ätherisches Öl, 0.1%	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31 5A19)	(Feng, Shi, et al., 2018)
<i>Artemisia annua</i> L.	Artemisinin	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Amoxicillin-induzierte runde Körper <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31)	(Feng, Weitner, et al., 2016)
	Artemisinin	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31)	(Feng et al., 2015)
	Extrakte in 60% und 90% EtOH von Heron Botanicals	Antipersister Aktivität der Borrelien: 60% und 90%-EtOH Extrakte gegen stationäre Phase <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31) MIC 60% EtOH: 0.5-1% MIC 90% EtOH: 0.5-1%	(Feng et al., 2020, S. 20)

Pflanzenspezies	Extrakt/Komponente	Biologische Aktivität	Referenz
<i>Artemisia annua</i> L.	Artemisinin	Antipersister Aktivität Borrelien: 50uM Artemisinin gegen stationäre Phase <i>B. burgdorferi</i> (Stamm N40) MIC: 5 µg/mL Überlebensrate: <30%	(Alvarez-Manzo et al., 2020)
<i>Cinnamomum camphora</i> (L.)	0.1 % Cinnamaldehyde (CA)	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31 5A19)	(Feng, Shi, et al., 2018)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Ätherisches Öl, 0.25%	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31 5A19)	(Feng et al., 2017)
<i>Cistus creticus</i>	Ätherisches Öl und Terpene	Borreliozid: <i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	(Hutschenreuther et al., 2010)
	Terpene aus Oleoresins Labdanum: 0.1 % Manoyloxide und 0.1 % Carvacrol	Antispirochätische Wirkung von <i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	(Rauwald et al., 2019)
<i>Cistus incanus</i>	Extrakt in 45% EtOH von BioPure Healing Products	Antipersister Aktivität der Borrelien: 45%-EtOH Extrakte gegen stationäre Phase <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31) MIC 45% EtOH: 0.25-0.5%	(Feng et al., 2020)

Pflanzenspezies	Extrakt/Komponente	Biologische Aktivität	Referenz
<i>Citrus x paradisi</i>	Samenextrakt Konzentrationen von 0.165% bis 0.00032%	Antipersister Aktivität der Borrelien: <i>B.afzelii</i> (ACA-1) Spirochäten und Zysten	(Goc & Rath, 2016)
<i>Coleus forskohlii</i>	Isoforskolin	Fördert die Expression des entzündungshemmenden regulatorischen Faktors SIGIRR in menschlichen Makrophagen, welcher mit dem basischen Membranprotein A von <i>B. burgdorferi</i> stimuliert wird.	(Peng et al., 2020)
<i>Commiphora myrrha</i>	Ätherisches Öl, 0.1 %	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31 5A19)	(Feng, Shi, et al., 2018)
<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>	Extrakte in 60% und 90% EtOH von Heron Botanicals	Antipersister Aktivität der Borrelien: 60% und 90%-EtOH Extrakte gegen stationäre Phase <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31) MIC 60% EtOH: 0.03-0.06% MIC 90% EtOH: 0.03-0.06%	(Feng et al., 2020)
<i>Cuminum cyminum</i> L.	Ätherisches Öl, 0.1 %	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31 5A19)	(Feng, Shi, et al., 2018)

Pflanzenspezies	Extrakt/Komponente	Biologische Aktivität	Referenz
<i>Cymbopogon martinii var. motia</i>	Ätherisches Öl, 0.1 %	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31 5A19)	(Feng, Shi, et al., 2018)
<i>Cymbopogon winterianus</i>	Ätherisches Öl, 0.25 %	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31 5A19)	(Feng et al., 2017)
<i>Dispacus sylvestris</i>	70% Ethylacetat-Extrakt 70% Dichlormethan-Extrakt	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Wachstumshemmung der Spirochäten <i>B.afzelii</i> (ACA-1). Stärkste Inhibition mit Ethylacetat-Extrakt	(Goc & Rath, 2016)
	Ethylacetat-Extrakt Dichlormethan-Extrakt	Signifikante Wachstumshemmung gegen <i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	(Liebold et al., 2011)
<i>Eucalyptus citriodora Hook.</i>	Ätherisches Öl, 0.1 %	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31 5A19)	(Feng, Shi, et al., 2018)
<i>Gaultheria procumbens</i>	Ätherisches Öl, 0.25 %	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31 5A19)	(Feng et al., 2017)

Pflanzenspezies	Extrakt/Komponente	Biologische Aktivität	Referenz
<i>Hemsleya macrosperma</i>	Cucurbitacin	Fördert die Expression des entzündungshemmenden regulatorischen Faktors SIGIRR in menschlichen Makrophagen, welcher mit dem basischen Membranprotein A von <i>B. burgdorferi</i> stimuliert wird.	(Peng et al., 2020)
<i>Juglans nigra</i>	Grünschalenextrakt	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase der persistier Formen von <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (Stamm MIC90 bei 100 µg/ml, MBC80 bei 125 µg/ml) Runde Körper (MBC50 bei 250 µg/ml) Biofilm (EC40 at 500 µg/ml)	(Goc & Rath, 2016)
	Extrakte in 30%, 60% und 90% EtOH von Heron Botanicals	Antipersister Aktivität der Borrelien: 30%, 60% und 90%-EtOH Extrakte gegen stationäre Phase <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31) MIC 30% EtOH: 1-2% MIC 60% EtOH: 0.5-1% MIC 90% EtOH: 0.5-1%	(Feng et al., 2020)

<b>Pflanzenspezies</b>	<b>Extrakt/Komponente</b>	<b>Biologische Aktivität</b>	<b>Referenz</b>
<i>Litsea cubeba</i>	Ätherisches Öl, 0.1 %	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31 5A19)	(Feng, Shi, et al., 2018)
<i>Origanum vulgare</i> L.	Ätherisches Öl, 0.25 %	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31 5A19)	(Feng et al., 2017)
<i>Otoba parvifolia</i>	Extrakt 1:400 Verdünnung (Lösungsmittel wird nicht erwähnt)	Antipersister-Aktivität der Borrelien: <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> Spirochäten und Runde Körper Bakterizide Wirkung: >90%	(Goc & Rath, 2016)
<i>Pimenta officinalis</i>	Ätherisches Öl, 0.1 %	Antipersister-Aktivität der Borrelien: Stationäre Phase Persister <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31 5A19)	(Feng, Shi, et al., 2018)
<i>Polygonum cuspidatum</i>	Extrakte in 30%, 60% und 90% EtOH von Heron Botanicals	Antipersister Aktivität der Borrelien: 30%, 60% und 90%-EtOH Extrakte gegen stationäre Phase <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31) MIC 30% EtOH: 0.25-0.5% MIC 60% EtOH: 0.25-0.5% MIC 90% EtOH: 0.25-0.5%	(Feng et al., 2020)

<b>Pflanzenspezies</b>	<b>Extrakt/Komponente</b>	<b>Biologische Aktivität</b>	<b>Referenz</b>
<i>Scutellaria baicalensis</i>	Baicalein	Antipersister Aktivität gegen <i>B. burgdorferi</i> und <i>B. garinii</i> Spirochäten, latente runde Formen und Biofilm	(Goc et al., 2015)
<i>Uncaria tomentosa</i>	Extrakt in 50% EtOH von KW Botanicals	Antipersister Aktivität der Borrelien: 50%-EtOH Extrakte gegen stationäre Phase <i>B. burgdorferi</i> (Stamm B31) MIC 50% EtOH: >2%	(Feng et al., 2020)
	Extrakt 1:300 Verdünnung (Lösungsmittel wird nicht erwähnt)	Antipersister Aktivität der Borrelien: <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> Biofilm	(Goc & Rath, 2016)

## 2.2 *Artemisia annua* L.

*Artemisia annua* L. (*A. annua*) auf Deutsch Einjähriger Beifuss, ist eine Pflanze der Gattung *Artemisia* L. und gehört zur Familie der *Asteraceae* welche über 500 Arten beinhaltet und in den geografischen Regionen Nordamerika, Europa und Asien beheimatet sind. Zu der Gattung *Artemisia* L. gehören weitere Arten wie *Artemisia absinthium*, *Artemisia biennis*, *Artemisia campestris*, *Artemisia douglasiana*, *Artemisia dracunculus*, *Artemisia tridentata* und *Artemisia vulgaris* dazu. Ein wesentlicher Vorteil dieser Gattung ist ihre Fähigkeit in nahezu allen Lebensraumtypen zu gedeihen und zu überleben. Die Pflanze bevorzugt jedoch ein halbtrockenes bis trockenes Klima und gedeiht am Besten in feuchten Böden (Anibogwu et al., 2021). In der Abbildung 1 ist *A. annua* dargestellt. *A. annua* kann 20 bis 200 cm hoch werden, ist stark verzweigt, ihre Blätter sind drei bis vierfach regelmässig kammartig gefiedert und ihre Blütezeit in der Schweiz dauert von August bis Oktober mit grünlich-gelben Röhrenblüten (Flora Helvetica, 2018).



Abbildung 1: *Artemisia annua* L. (*A. annua*) Quelle: Flora Helvetica 2018, Art Info (Bornand-Christophe 2001). Abgerufen am 18.05.23 unter <https://www.inflora.ch/de/flora/artemisia-annua.html>.

*A. annua* wird in der traditionellen chinesischen Medizin schon seit der Antike zur Behandlung von verschiedenen Krankheiten wie intermittierendes Fieber wegen Malaria, Tuberkulose, zur Behandlung von Läusen, Wunden und Krätze verwendet. In China entstand 1967 ein nationales Forschungsprojekt gegen Malaria, bei dem mehr als 380 Kräuterextrakte von der chinesischen Spezialistin für pharmazeutische Chemie, Prof. Youyou Tu, auf Malariamittel untersucht wurden. Dabei erwies sich *A. annua* als die aktivste Pflanze und 1971 wurde das Endoperoxid-Sesquiterpenlacton Artemisinin isoliert und als aktive chemische Komponente von *A. annua* gegen Malaria charakterisiert (Feng et al., 2020). Prof. Youyou Tu erhielt für die Entdeckung von Artemisinin und auf Grund des Nachweises der Wirksamkeit für die Behandlung von Malaria, im Jahr 2015 den Nobelpreis für Medizin. Bis heute wird noch an dem Wirkmechanismus für die Anti-Malaria-Aktivität von Artemisinin aus *A. annua* geforscht (Feng et al., 2020). Artemisinin gehört zu der Gruppe der Sesquiterpenlactone, welche für das Aktivitätsprofil von *A. annua* von Bedeutung sind. *A. annua* enthält nebst den Sesquiterpenlactonen viele weitere verschiedene Klasse von Verbindungen. Dazu gehören ätherische Öle mit Mono- und Sesquiterpene, Flavonoide, Cumarine, Phenolsäuren, Gerbstoffe, Saponine, Polyalkene, Phytosterole, Fettsäuren und Proteine einschliesslich Enzymproteine. Die chemische Zusammensetzung und damit verbunden der medizinische Wert der Pflanze wird vom Lebensraum in dem sie wächst, beeinflusst (Ekiert et al., 2021). In der Studie von Wu et al., (2020) wird der Einsatz von Artemisinin als Malariamittel und auch als potenzieller antibakterieller Wirkstoff thematisiert und es wird erwähnt, dass bei der Extraktion von Artemisinin aus *A. annua* eine geringe Menge an Artemisinin von 0.1 bis 0.7% gewonnen werden kann und die restlichen Bestandteile zurückgelassen werden, welches eine Verschwendung von Ressourcen ist. Forscher haben herausgefunden, dass ein *A. annua* Pulver in flüchtige Bestandteile sogenanntes Artemisia naphtha (AN) und nicht flüchtige Bestandteile inklusive Artemisinin und andere Komponenten eingeteilt werden kann (Abbildung 2). Wie in der Abbildung 2 dargestellt wird, besteht der flüchtige Bestandteil AN, aus hauptsächlich Terpenoiden und phenolischen Hydroxylgruppen wie Eucalyptol, Terpinen-4-ol, Eugenol, Artemisia Keton und Beta-Pinene. Nebst dem Artemisinin ist auch von den Bestandteilen des AN bekannt, dass Terpene und phenolische Hydroxylgruppen eine antibakterielle Aktivität aufweisen (Wu et al., 2020).

Die Wirkung von *A. annua* auf verschiedene Krankheiten wurde über Jahre hinweg untersucht und hemmende Wirkungen gegen unterschiedliche Parasiten, Viren, Pilze und Bakterien konnten festgestellt werden. Studien, welche die antibakterielle Wirkung von *A. annua* auf *B. burgdorferi* zeigten, sind in der Tabelle 1 zu finden. Auch ihre entzündungshemmende und krebshemmende Wirkung von *A. annua* ist bekannt und wird zur Behandlung von Osteoarthritis, Leukämie, Dickdarmkrebs, Nierenzellkarzinom, Brustkrebs, nicht-kleinzelligem Lungenkrebs, Prostatakrebs und Hepatom verwendet. Weiter sind immunregulierende, antiadipogenen,

antiulzerogenen, antiasthmatischen, antinozizeptiven und anti-osteoporotische Aktivitäten von *A. annua* ebenfalls bewertet worden (Feng et al., 2020).

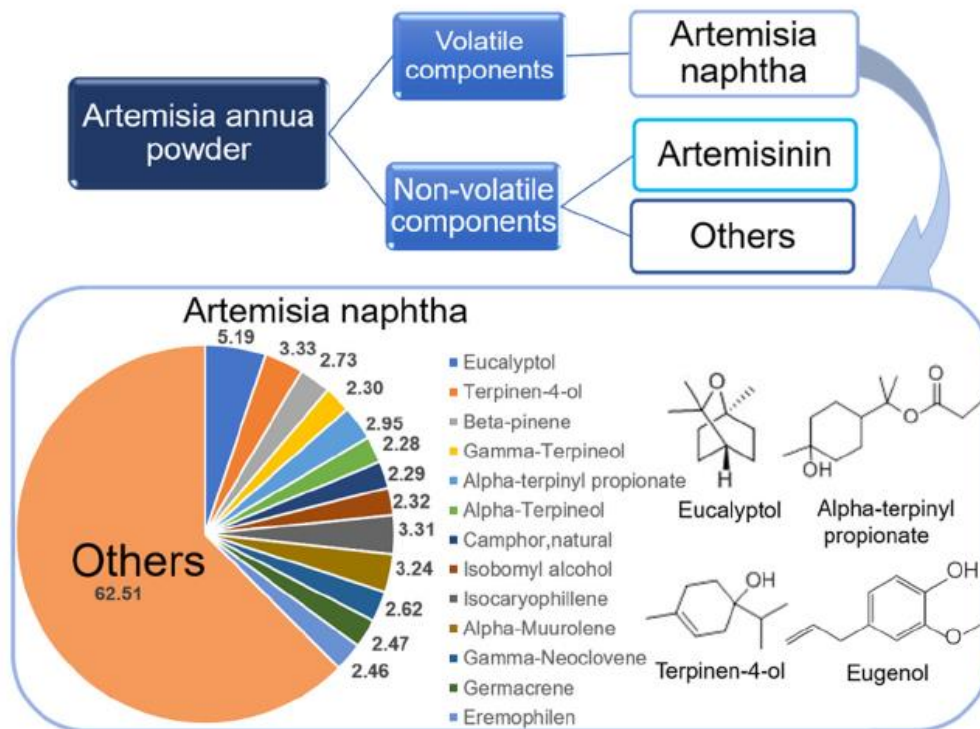


Abbildung 2: Hauptkomponenten des *A. annua* Pulvers und einzelne chemische Strukturen von Komponenten von *Artemisia naphtha* (AN). Zu sehen ist eine grobe Unterteilung des *A. annua* Pulvers in die flüchtigen Komponenten, sogenanntes *Artemisia naphtha* (AN) und die nicht flüchtigen Komponenten einschliesslich Artemisinin und andere Bestandteile. Quelle: Abbildung aus Paper von (Wu et al., 2020).

### 2.3 Lyme- Borreliose und *B. burgdorferi sensu lato*

Die Lyme- Borreliose ist eine durch Zecken übertragbare Krankheit und führt beim Menschen an der Stelle des Zeckenbisses zu einem lokalen Erythema migrans (EM)-Ausschlag und einer grippeähnlichen Erkrankung (Feng, Wang, Shi, et al., 2014; Feng, Yee, et al., 2018). Späte Folgeerscheinungen der Krankheit können sogar zu einer Karditis, Neuroborreliose und Arthritis führen (Feng, Wang, Shi, et al., 2014). Die Erreger der Lyme- Borreliose gehören zu den *Borrelia* sp., welche über Zecken beispielsweise auf den Menschen übertragen werden. *Borrelia* sp., welche die Lyme-Borreliose verursachen, können in mehrere Genospezies von *B. burgdorferi sensu lato* unterteilt werden. Dazu gehören *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* und *B. afzelii*. Während in den USA hauptsächlich *B. burgdorferi sensu stricto* beim Menschen nachgewiesen worden ist, dominieren in Europa *B. afzelii* und *B. garinii* (Huppertz & Krause, 2003). *Borrelia* sp. sind alle gramnegative, wirtsabhängige und langsam wachsende Organismen und lassen sich in Flüssigkulturen wie dem Barbour- Stoenner-Kelly (BSK) II Medium bei 30-34°C in einer mikroaerophilen Atmosphäre kultivieren wobei sie sich während der Logphase alle 8-12 Stunden teilen (Goc & Rath, 2016; Huppertz & Krause, 2003). Von *B. burgdorferi* sind verschiedene morphologische Formen wie Spirochäten, Sphäroplasten (oder L-Formen), zystische oder runde Formen und biofilmartige Kolonien bekannt (Feng, Wang, Shi, et al., 2014). Spirochäten, welche beweglich und in zähflüssigen Bedingungen überleben, haben die Fähigkeit sich bei einer Bedrohung in latente Formen wie den zystischen oder runden Formen und biofilmartige Kolonien zu verwandeln und können somit über Jahrzehnte überleben. Latente Formen weisen eine niedrige Stoffwechselrate auf und sind im Gegensatz zu den Spirochäten nicht beweglich können aber weiterhin eine Infektion auslösen.

Patienten\*innen die Symptome der Lyme Borreliose aufweisen, werden in der Regel mit Mincycline behandelt, welches in den meisten Fällen wirkt und die Heilung beschleunigt (Dr. med. Lydia Reutter, 2023). Allerdings kommt es vor, dass trotz einer Behandlung von 6 Monaten oder länger, etwa 10 bis 20% der Patienten\*innen weiterhin unter anhaltenden Symptomen wie Müdigkeit, Gelenk- und Muskelschmerzen und unter neurokognitiven Symptomen leiden. Solche Symptome werden auch als das sogenannte Post Treatment Lyme Disease Syndrom (PTLDS) gekennzeichnet. Obwohl die Ursache des PTLDS komplex ist, kann eine mögliche Erklärung dafür die persistierende *B. burgdorferi* Infektion sein die aufgrund der Anwesenheit von Persisterformen dafür sorgt, dass eine Antibiotikabehandlung nicht effektiv ist, da diese Formen der Borrelien nicht abgetötet werden (Feng, Yee, et al., 2018, 2018; Goc & Rath, 2016).

Aussagen über das Wachstum von *Borrelia* sp. machen zu können, ist nicht ganz so einfach wie bei den meisten Bakterien wie beispielsweise *E. coli* oder *S. aureus*. Im Falle von *E. coli* und *S. aureus* die deutlich sichtbare Kolonien auf Agarplatten bilden, wächst *B. burgdorferi* sehr schlecht und sehr langsam als Kolonie auf Agarplatten. Zudem kann keine ausreichende

Lichtabsorption von *B. burgdorfi* in einer Flüssigkultur mittels direkter Messung der optischen Dichte gewährleistet werden (Feng, Wang, Shi, et al., 2014). Um die Lebensfähigkeit der *Borrelia* sp. bestimmen zu können hat sich der SYBR Green I / Propidium-Iodid Assay (SYBR Green I/PI), welcher das Verhältnis von grüner zu roter Fluoreszenz wiedergibt, als optimal dafür erwiesen in Bezug auf Empfindlichkeit, Genauigkeit, Zuverlässigkeit und Geschwindigkeit (Feng, Wang, Zhang, et al., 2014). SYBR Green I, ein grüner, durchlässiger Farbstoff färbt alle Zellen ein, wobei Propidium-Iodid, ein orange-roter undurchlässiger Farbstoff nur tote oder geschädigte Zellen färbt. Dies bedeutet der SYBR Green I/PI Assay basiert auf dem Prinzip, lebende oder lebensfähige Zellen mit intakter Membran mit SYBR Green I einzufärben und geschädigte oder tote Zellen mit lädierter Zellmembran mit Propidium-Iodid zu färben, sodass eine Differenzierung zwischen Lebend und Tot gemacht werden kann und die Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie bestimmt und ausgezählt werden können (Feng, Wang, Zhang, et al., 2014; Feng, Yee, et al., 2018).

### 3 Material und Methode

In diesem Abschnitt werden die Methoden chronologisch erläutert, welche für diese Arbeit gebraucht wurden. Alle genauen Informationen zu dem verwendeten *Artemisia annua* Blätter Pulver sowie Informationen zu den Organismen, Substanzen/ Reagenzien, Materialien und Geräte sind im Kapitel 3.1 der Materialliste zu finden.

#### 3.1 Materialliste

Pflanzenmaterial/Organismen	Hersteller	Lot Nummer	Bemerkungen
Einjähriger Beifuss ( <i>Artemisia annua</i> )-Blätter-Pulver	Amarys aus biologisch-ökologischem Anbau (AMARYS GmbH, D-89081 Ulm)	Lot: 20028 best before: 12/24	
<i>Borrelia afzelii</i> actively growing culture Strain: ATCC 51567, CIP 103469, VS 461	DSMZ	DSM 10508	17.01.23 ZHAW Kultivierung: 33°C, mikroaerophil, in BSK-H Medium + 6% Rabbit Serum
<i>Borrelia garinii subsp. garinii</i> actively growing culture Strain: 20047	DSMZ	DSM 10534	17.01.23 ZHAW Kultivierung: 33°C, mikroaerophil, in BSK-H Medium + 6% Rabbit Serum
<i>Borrelia burgdorferi</i> actively growing culture Strain: B31	DSMZ	DSM 4680	17.01.23 ZHAW Kultivierung: 33°C, mikroaerophil, in BSK-H Medium + 6% Rabbit Serum
<i>E.coli</i> WDCM 0013	Kryokultur 01.12.2022 ZHAW		
<i>S.aureus</i> DMSZ 766	Kultur von ZHAW		

Substanzen/Reagenzien	Hersteller	Lot Nummer/ Pat. No	Bemerkungen
Ethanol absolute 99%	VWR	Lot: 23B224007	
Ethylacetat 99.7%	Honeywell	Lot: L2430	
Isolute HM-N	Biotage	Pat.No: 9800-1000 Lot No: 200111902MS	
SYBR Green I nucleic acid gel stain	Invitrogen	Lot: 2533897	
Propidium iodide	Sigma Aldrich	CAS-No: 25535-16-4	250 mg in 10 mL PBS gelöst
Aktivkohle Norit, Pulver	Fluka	Lot: 13417CE 50707B15	
Diethylether 99%	Acros organics	Lot: A0424412	
Natriumsulfat >99%, wasserfrei	ROTH	Art.Nr 8631.1	
NaCl-Lösung gesättigt	Labor Riedl		(360g NaCl in 1L deion.H2O)
Agar			steht an der ZHAW bereits zur Verfügung
Müller Hinton Broth 2	Milipore	PCode: 102526945	
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	Sigma Aldrich	Lot#SHBM9343	
Artemisinin 98%	Merck	361593-100MG	
Minocycline Hydrochloride	Apollo Scientific	Lot: AS471794	
Biolog Redox Dye Mix A	Biolog	Lot No: D1210195	
BSK-H Medium with L-Glutamine (+ 6% Rabbit Serum, 29.3.23 wert)	Lot No: RG11746P	BioConcept	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium- low glucose (+ 10% FCS)	SIGMA- ALDRICH	Lot: RNBK5264	
Dichlormethan	VWR Chemicals	Lot: 23A114017	
Methanol	VWR Chemicals	Lot: 22L274037	
Argon	PanGas	EG-Nr. 231-147-0	
DABCO Antifade 0.21 M	ZHAW 6.8.2010		

Material	Hersteller	Lot Nummer/ Pat. No	Bemerkungen
Kartusche	RediSep Rf Teledyne Isco		
Silica 40 gram Flash Column	RediSep Rf Teledyne Isco- U.S	Pat No: 7008541 Lot: 302121305X	CV 48 mL – 40 mL/min max.pressure 300 psi (20.7 bar)
Genbox Microaer Generator	BioMerieux SA	REF: 96125	
Anaerober Kulturgefäss	Oxoid		Zur Kultivierung der Borrelia sp. Mit Genbox Microaer Generator
Filterpapier (Western Blotting Filter Papiere)	Thermo Scientific	Lot # QK2088581	
Sterile Pinzetten	steriGLIN	LOT: 3013262 201308	an der ZHAW zur Verfügung , zur Rücksterilisation
96-well Platte Nunclon Delat Surface	Thermo Scientific	CAT No: 167006 Lot: 160128	
Stanzer			Durchmesser 8mm
Neubauer Improved DHC-N01 C-Chip	NanoEnTek	Nr: 2N1845	
Zählkammer C-Chip	NanoEnTek	DHC-N04 Lot: 7N18822	
Müller Hinton Base Agar Platten			1L: 22g Müller Hinton Broth + 15g Agar
Müller Hinton Soft Agar Medium			0.5L: 11g Müller Hinton Broth + 2.5g Agar
6 well Platte sterile	Nunc A/S	Lot: 08744	
Abdeckfolie gasdurchlässig und steril	Greiner bio-one	Lot: E191238R REF: 676051	
Deepwell Plate 96/2000 µL, white Border	Eppendorf	Lot: H175745G	
Rundkolben Braunglas, 250 mL	ROTH		
HPLC Gewindflssche 136 13x40 mm klar	Müller + Krempel	Art. Nr: 14.020.02	
Ballon			um mit Edelgas Argon zu füllen

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Lot Nummer</b>	<b>Bemerkungen</b>
Analysenwaage	Mettler Toledo	Model: MS403TS	
Präzisionswaage	Mettler Toledo		PB1502-S/FACT
Rotationsverdampfer Heating Bath	Büchi		Rotavapor R-120 Heating Bath B-491
CombiFlash Rf+	CombiFlash Rf	ZHAW LSFM	
Chromatographiesysteme	Teledyne ISCO-U.S	2000000537	
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf	ZHAW IBT-05441	
Umkehrlichtmikroskop mit UV Laser mit gekoppelter Kamera	Leica		8T-1694 PH 2 für Blaulicht PH 3 für Grünlicht
Ultraschallbad	Technikum Winterthur	C13-12	
Omnilog (BioLOG)	BioLOG Torcon Instruments	Model Nummer: 7100DS Serial Number: 645	
Photometer	Eppendorf Neither Hinz GmbH	No. 6131 00604	
Thermometer	IKA	Model: ETS-D5	
Mikrowelle	CEM Discover		
Heizkörper	Huber Lab & Co. AG		
37°C Inkubator	Heraeus	Fabrik Nr: 20003292	
33°C Inkubator	Heraeus	Klasse 3.1, Fabrik Nr: 20003292	
33°C Inkubator mit 5% CO2	HERA cell 150	BT-PM-0526	
Floureszenzmikroskop Axio Imager.Z2 mit AxioCam MR R3	Zeiss	C20-132	
Massenspektrometer (LC-MS)	UltiMate 3000		
MALDI TOF	Autoflex speed		

## 3.2 Extraktionen *A. annua* Pflanzenpulver

Insgesamt sind sechs verschiedene Extraktionen des *A. annua* Blätter-Pulvers im Labor gemacht worden, von denen die jeweiligen Extrakte sowie deren Fraktionen auf ihre antibakterielle Wirkung gegen *E. coli* WDCM 0013 und auf *Borrelia* sp. getestet wurden. Zu den sechs Extraktionen gehörten, eine Extraktion mit 60% Ethanol, eine mit 99.7% Ethylacetat (3.2.1), eine Extraktion die auf dem Isolierungsprinzip von Artemisinin von Eckhardt et al., (2016) basierte und einen wässrigen Extrakt sowie einen Etherphase-Extrakt resultierte (Kapitel 3.2.2), eine Extraktion mit Ethylacetat welche mit einer Soxhlet-Apparatur realisiert wurde (Kapitel 3.2.3), eine weitere Extraktion wurde mit Ethylacetat in der Mikrowelle gemacht (Kapitel 3.2.4) und eine letzte Extraktion wurde mit Dichlormethan durchgeführt (Kapitel 3.2.5). Die Methoden mit 60% Ethanol und Ethylacetat wurden ausgewählt, da eine Extraktion mit 60% Ethanol bereits im Paper von Feng et al., (2020) beschrieben worden ist und im Aufarbeitungsprozess wurden die Extrakte nicht stark erhitzt, damit wichtige temperaturempfindliche Wirkstoffe in der Pflanze nicht zerstört werden (Dr. med. Lydia Reutter, 2023). Die beiden Methoden wie Soxhlet und Mikrowelle gehören zu den klassischen Verfahren zur Isolation von Pflanzenstoffen und wurden aus diesem Grund ebenfalls miteinbezogen (Allemailem, 2022; Chuo et al., 2022). Dichlormethan als ein flüchtiges Extraktionsmittel mit einem niedrigen Siedepunkt wurde verwendet, um mögliche chemisch wirkstoffzerstörende Verarbeitungsprozesse zu verringern (Dr. med. Lydia Reutter, 2023). Dieses Unterkapitel beschreibt diese sechs verschiedenen Extraktionen, welche in separate Kapitel eingeteilt sind. Jede Extraktion wurde mit dem Einjährigen Beifuss (*Artemisia annua*), bestehend aus dem Pulver von Blättern von Amarys aus biologischem und ökologischem Anbau (AMARYS GmbH, D-89081 Ulm, Lot: 20028, best before: 12/24) durchgeführt.

### 3.2.1 Extraktionen mit 60% Ethanol und Ethylacetat

Zwei Extraktionen mit dem *A. annua* Blätter-Pulver von Amarys wurden im Labor durchgeführt. Die eine Extraktion ist mit 60% Ethanol und eine andere ist mit 99.7% Ethylacetat gemacht worden. 21.6 g *A. annua* Blätter-Pulver wurde in einem 250 mL Erlenmeyerkolben auf der Präzisionswaage abgewogen und in 100 mL 60% Ethanol bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten mit einem Magnetfisch gelöst. Für den Ethylacetat-Extrakt sind 41.29 g *A. annua* Blätter-Pulver auf der Präzisionswaage abgewogen worden und in 100 mL 99.7% Ethylacetat wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für mindestens 30 min mit einem Magnetfisch gelöst. Beide Extrakte wurden über eine Nutsche bei Raumtemperatur mit Vakuum filtriert und das Filtrat wurde in 250 mL Rundkolben aufgefangen. Der 60% Ethanol-Extrakt und der 99.7% Ethylacetat-Extrakt wurden am Rotationsverdampfer im Wasserbad bei 35°C einrotiert, um die beiden Lösungsmittel zu verdampfen. Die Ausbeute des 60% Ethanol-Extraktes und des 99.7% Ethylacetat-Extraktes wurde gewogen und die beiden Extrakte sind im Kühlraum bei 4°C gelagert worden. Für beide Extrakte, 60% Ethanol-Extrakt und für den Ethylacetat-Extrakt wurde eine Ausbeute von 3 g Rohextrakt gewogen.

1 g vom Ethylacetat-Extrakt wurde mittels Normalphasenchromatografie über eine Silica 40 g Säule aufgetrennt. Dafür sind 1 g Ethylacetat-Extrakt in einen frischen 250 mL Rundkolben an der Analysenwaage abgewogen worden und wurde in 50 mL Ethylacetat gelöst. Eine zur Hälfte gefüllte Kartusche von RediSep Rf wurde mit Isolute HM-N gefüllt und dem gelösten Ethylacetat-Extrakt im 250 mL Rundkolben dazugegeben und anschliessend am Rotationsverdampfer im Wasserbad bei 35°C einrotiert. Nach der Verdampfung des Lösungsmittels Ethylacetat wurde der Inhalt des 250 mL Rundkolben zurück in die Kartusche über einen Trichter gegeben und kompakt zusammengedrückt, sodass der Ethylacetat-Extrakt über die Silica 40 g Säule mittels Normalphasenchromatographie mit dem apolaren Lösungsmittel Cyclohexan und einem Gradienten von 0% auf 100% polarem Ethylacetat aufgetrennt wird. Nach der Normalphasenchromatographie des Ethylacetat-Extraktes sind total sechs verschiedene Fraktionen ausgewählt worden und deren Inhalt wurde jeweils in Fraktionsgläser am Rotationsverdampfer einrotiert und die Ausbeute gewogen. Im Kapitel 4.1 ist das Resultat der Normalphasenchromatografie von 1 g Ethylacetat-Extrakt zu sehen mit der Einteilung der sechs verschiedenen Fraktionen sowie deren gewogenen Ausbeuten.

### 3.2.2 Extraktion mit 99% Ethanol und Diethylether nach (Eckhardt et al., 2016)

Eine Extraktion des *A. annua* Blätter-Pulvers von Amarys wurde nach dem Protokoll von Eckhardt et al., (2016) im Labor durchgeführt. Das Paper von Eckhardt et al., (2016) beschreibt die Isolierung von Artemisinin aus getrockneten, zerkleinerten Blätter von *A. annua*, wobei für diesen Bericht die Isolierung bis zu der Gewinnung einer wässrigen Phase (wässriger Extrakt) und einer Etherphase (Etherphase-Extrakt) befolgt wurde. Die genaue Vorgehensweise bis zu den Endprodukten wässriger Extrakt und Etherphase-Extrakt, wird im folgenden Abschnitt beschrieben. 65.2 g *A. annua* Blätter-Pulver von Amarys wurde an der Präzisionswaage abgewogen und in einen 1 L Rundkolben überführt. Dem Pulver wurde 455 mL 99% Ethanol dazugegeben und das Pulver/Ethanol Gemisch ist im Ölbad bei 100°C für 15 min unter Rückfluss erhitzt worden, mit konstanter Durchmischung mit einem Magnetfisch (Abbildung 3). Danach wurde der grüne Extrakt vom Ölbad entnommen und auf Raumtemperatur abgekühlt, sodass anschliessend der Extrakt über eine Nutsche filtriert wurde und der Rückfluss ist in einem neuen 1 L Rundkolben aufgefangen worden. Der Filterrückstand wurde mit 99% Ethanol (100 mL) gewaschen und dann ein weiteres Mal in Ethanol im Ölbad bei 100°C für 15 min unter Rückfluss und konstanter Durchmischung erhitzt. Ein weiteres Mal wurde der Extrakt über eine Nutsche filtriert und der Rückfluss wurde dem 1 L Rundkolben dazugegeben. Dem vereinigten grünen Rohextrakte im 1 L Rundkolben ist zum Binden der Blattfarbstoffe 26 g Aktivkohle dazugegeben worden und das Ganze wurde im Ölbad bei 50°C für 10min mit einem Magnetrührer erwärmt. Nach diesen 10 min ist der Rundkolben bis zum Erreichen der Raumtemperatur abgekühlt worden. Danach wurde die Aktivkohle über eine Nutsche mit einer feinen Schicht Kieselgur abgesaugt und das Filtrat wurde in einem frischen 1 LRundkolben aufgefangen. Das Filtrat sah gelb aus (Abbildung 4). Mit Ethanol wurde die Nutsche erneut gespült, bis kein gelbes Filtrat mehr durch die Nutsche filtriert wurde. Das klare gelbe Filtrat ist am Rotationsverdampfer im Wasserbad auf 200 mL eingeeengt worden. Anschliessend wurde 150 mL Diethylether dem 1 L Rundkolben dazugegeben und in einen 1 L Scheidetrichter überführt. Rückstände im 1 L Rundkolben, welche sich nicht lösten, wurden mit 15 mL gesättigter Natriumchlorid-Lösung (NaCl-Lösung) versetzt und für 2 min in das Ultraschallbad zur schnelleren und verbesserten Löslichkeit gehalten. Die gelösten Rückstände wurden dem 1 L Scheidetrichter dazugegeben. Der Scheidetrichter mit dem gelben Filtrat und dem zugegebenen Diethylether wurde drei Mal gut geschüttelt und der Druck wurde jeweils durch das Ventli abgelassen. Im Scheidetrichter haben sich zwei Phasen gebildet, eine untere wässrige Phase, mit einer höheren Dichte als die obere gelb-bräunlich gefärbte Etherphase (Abbildung 5). Die wässrige Phase wurde sorgfältig abgelassen und in einem 1 L Erlenmeyerkolben aufgefangen. Dem 1 L Scheidetrichter wurde erneut Diethylether dazugegeben, geschüttelt und nach der Bildung der beiden Phasen wurde erneut die wässrige Phase in den 1 L Erlenmeyerkolben abgelassen. Nun wurde die verbleibende Phase im Scheidetrichter, die Etherphase, in einen neuen 1 L

Rundkolben vorsichtig abgelassen. Zum Binden der restlichen wässrigen Substanzen in der Etherphase, wurden 2 Polylöffel Natriumsulfat dazugegeben und weisse Klumpen haben sich gebildet. Die Etherphase mit Natriumsulfat wurde über eine Nutsche filtriert und der Rückfluss wurde in einem 1 L Rundkolben gesammelt. Mit Diethylether wurde die Nutsche gespült. Die filtrierte Etherphase wurde am Rotationsverdampfer im Wasserbad bei 43°C einrotiert und schlussendlich in einem 100 mL Rundkolben aufbewahrt und über 2 Tage hinweg mit Vakuum getrocknet. Auch die wässrige Phase im 1 L Erlenmeyerkolben wurde in einen 1 L Rundkolben überführt und am Rotationsverdampfer im Wasserbad bei 43°C einrotiert. Nach der Verdampfung des wässrigen Extraktes, befanden sich die unlöslichen Rückstände, unter anderem Salze im Rundkolben (Abbildung 6) welche durch die Zugabe von Ethanol im Ultraschallbad versucht wurden zu lösen. Etwas löste sich von den Klumpen, da sich das Ethanol leicht gelblich verfärbte und dies wurde wieder am Rotationsverdampfer einrotiert und schlussendlich in einen 100 mL Rundkolben überführt. Auch der wässrige Extrakt wurde über 2 Tage hinweg mit Vakuum getrocknet. Für beide Extrakte, der Etherphase-Extrakt und der wässrige Extrakt wurde nach der Vakuum-Trocknung die Ausbeute an der Präzisionswaage gewogen. Die Ausbeute des Etherphase-Extraktes betrug 3.21 g und die des wässrigen Extraktes 3.44 g.

1 g vom Etherphase-Extrakt wurde mittels Normalphasenchromatografie über eine Silica 40 g Säule aufgetrennt. Das Vorgehen dazu kann dem Kapitel 3.2.1 entnommen werden. Nach der Normalphasenchromatografie des Etherphase-Extraktes sind total vier verschiedene Fraktionen ausgewählt worden und deren Inhalt wurde jeweils in Fraktionsgläser am Rotationsverdampfer einrotiert und die Ausbeute gewogen. Im Kapitel 4.1 ist das Resultat der Normalphasenchromatografie von 1 g Etherphase-Extrakt zu sehen mit der Einteilung der vier verschiedenen Fraktionen sowie deren gewogene Ausbeute.



Abbildung 3: *A. annua* Blätter Pulver (65.2 g) wurde in einem 1 L Rundkolben mit 99% Ethanol (455 mL) versetzt und im Ölbad für 15 min unter Rückfluss und konstanter Durchmischung erhitzt. Quelle: Foto wurde selbst während der Extraktion am 30.03.2023 aufgenommen.



Abbildung 4: Der Rohextrakt mit Aktivkohle (26 g) ist über eine Nutsche mit Kieselgur filtriert worden. Der Rückfluss, das Filtrat sah gelb aus. Quelle: Foto wurde selbst während der Extraktion am 30.03.2023 aufgenommen.



Abbildung 5: 1 L Scheidetrichter gefüllt mit gelbem Filtrat und Diethylether (150 mL). Es haben sich zwei Phasen gebildet, eine untere wässrige Phase mit einer höheren Dichte als die obere gelb-bräunlich gefärbte Etherphase. Quelle: Foto wurde selbst während der Extraktion am 31.03.2023 aufgenommen.



Abbildung 6: Schlecht löslicher Rückstand (Salze) des wässrigen Extraktes nach der Einrotierung am Rotationsverdampfer. Quelle: Foto wurde selbst während der Extraktion am 04.04.2023 aufgenommen.

### 3.2.3 Soxhlet Extraktion mit Ethylacetat

Eine weitere Extraktion des *A. annua* Blätter-Pulvers von Amarys wurde mittels eines Soxhlet-Aufsatzes durchgeführt. Eine passende Extraktionshülse, welche den Überlauf des Dampfrohres überragt wurde für die Extraktion verwendet. In der Abbildung 7 ist der Aufbau der Soxhlet-Extraktion mit Beschriftung zu sehen und die Abbildung 8 zeigt eine Nahaufnahme des Soxhlet- Aufsatzes mit Beschriftung. In die Extraktionshülse wurden 12 g *A. annua* Blätter-Pulver abgewogen, mit Glaswolle gut abgedeckt und in den Soxhlet- Aufsatz gegeben. Die Soxhlet-Extraktion wurde gemäss der Abbildung 7 zusammengebaut mit einem Kühler inklusive Zulaufschlauch und Ablaufschlauch, welcher oberhalb des Soxhlet- Aufsatzes montiert wurde und einem 500 mL Dreihalsrundkolben mit Magnetrührer, der unterhalb des Soxhlet- Aufsatzes befestigt wurde und in ein Ölbad eingetaucht worden ist. Das Ölbad wurde mit einem Heizkörper erwärmt. In die eine Öffnung des Dreihalsrundkolben wurde 300 mL des Extraktionsmittel Ethylacetat mit Hilfe eines Trichters in den Kolben geleert und die beiden Öffnungen wurden mit Stopfen abgedeckt und mit Klemmen zum sicheren Zusammenhalten befestigt. Zur Überprüfung der Temperatur im Ölbad, wurde ein Thermometer in das Ölbad eingetaucht und auf eine Temperatur von 100°C eingestellt. Das Ölbad wurde mit dem Heizkörper erwärmt und kontinuierlich durchmischt. Beim Erreichen von 90°C, wurde der Soxhlet- Aufsatz mit Alufolie gut abgedeckt und isoliert zur schnelleren oder besseren Verdampfung des Extraktionsmittels. Ein Zyklus, welcher die Füllung der Extraktionshülse mit dem Extraktionsmittel Ethylacetat und der Ablauf des Extraktes im Dampfrohr beschreibt, dauerte 12 min. Die Extraktion dauerte 6 h und 40 min, sodass im Totalen sicher mit 33 Zyklen gerechnet werden konnte. Nach Beendigung der Soxhlet- Extraktion wurde der Dreihalsrundkolben von der Apparatur entnommen und am Rotationsverdampfer im Wasserbad bei 42 °C einrotiert und anschliessend wurde die Ausbeute an der Präzisionswaage gewogen. 1.24 g des Soxhlet- Ethylacetat-Extraktes wurde gewogen.

1.07 g des Soxhlet-Ethylacetat-Extraktes wurde mittels Normalphasenchromatografie über eine Silica 40 g Säule aufgetrennt. Das Vorgehen dazu kann dem Kapitel 3.2.1 entnommen werden. Nach der Normalphasenchromatographie des Soxhlet-Ethylacetat-Extraktes sind total drei verschiedene Fraktionen ausgewählt worden und deren Inhalt wurde jeweils in Fraktionsgläser am Rotationsverdampfer einrotiert und die Ausbeute gewogen. Im Kapitel 4.1 ist das Resultat der Normalphasenchromatografie von 1.07 g des Soxhlet-Ethylacetat-Extraktes zu sehen mit der Einteilung der drei verschiedenen Fraktionen sowie deren gewogene Ausbeute.



Abbildung 7: Aufbau der Soxhlet-Extraktion mit Soxhlet-Aufsatz, Kühler, Zweihalskolben, Ölbad und Heizkörper und Thermometer. Quelle: Foto wurde selbst während der Extraktion am 03.05.2023 aufgenommen und beschriftet.

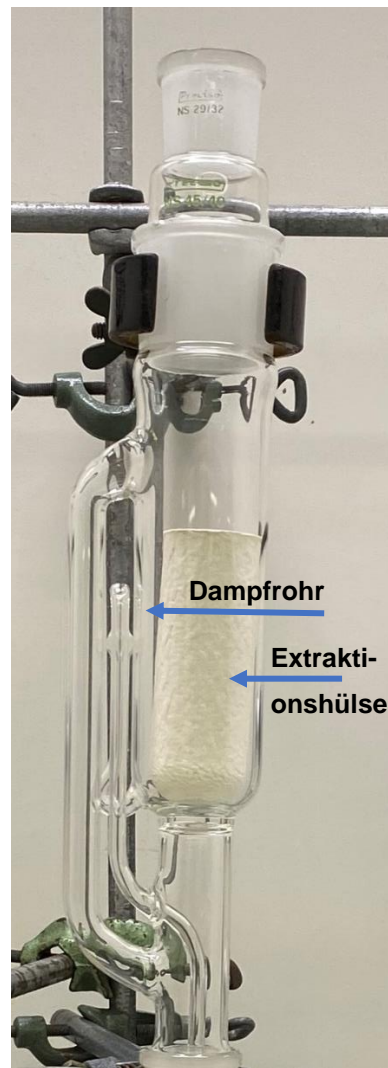


Abbildung 8: Abbildung einer Nahaufnahme des Soxhlet-Aufsatzes mit Extraktionshülse. Die Höhe der Extraktionshülse überragt den Überlauf des Dampfrohres.

### 3.2.4 Mikrowellen Extraktion mit Ethylacetat

Für die Extraktion des *A. annua* Blätter-Pulvers von Amarys in der Mikrowelle, wurde 1g des Pulvers abgewogen und in ein passendes 30 mL Mikrowellenröhrchen für die Mikrowelle von CEM Discover überführt. 5 mL Ethylacetat wurden dazugegeben und das Röhrchen mit Pulver und Ethylacetat wurde in die Mikrowelle gestellt. Die Extraktion erfolgte bei 200 W bei einer Temperatur von 100 °C für 12 min. In der Abbildung 9 ist eine Aufnahme der Mikrowelle zu sehen. Danach wurde der Extrakt mit einem Faltenfilter und Trichter in ein Fraktionsgefäß filtriert und anschliessend am Rotationsverdampfer einrotiert. Eine Ausbeute des Mikrowellen Ethylacetat- Extraktes von 58 mg wurde gewogen.



Abbildung 9: Mikrowelle von CEM. 1 g *A. annua* Blätter-Pulver von Amarys wurde in 5 mL Ethylacetat gelöst und in der Mikrowelle bei 200 W und 100 °C für 12 min extrahiert.

### 3.2.5 Extraktion mit Dichlormethan

Für die Extraktion des *A. annua* Blätter-Pulvers von Amarys mit Dichlormethan, wurde 41.29 g des Pulvers abgewogen und mit 100 mL Dichlormethan in einem 250 mL Braunglas-Rundkolben versetzt und bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten mit einem Magnetfisch gelöst und inkubiert. Durch die Zugabe von einem mit Argon befüllten Ballon, wurde eine inerte Umgebung im Rundkolben gewährleistet. Der Extrakt wurde nach der Inkubation über eine Nutsche bei Raumtemperatur mit Vakuum filtriert und das Filtrat wurde in einem 250 mL Braunglas-Rundkolben aufgefangen. Der Dichlormethan- Extrakt wurde am Rotationsverdampfer im Wasserbad bei 30°C einrotiert. Die Ausbeute des Dichlormethan-Extraktes wurde gewogen und ist im Kühlraum bei 4°C gelagert worden. Eine Ausbeute von 3.14 g Rohextrakt wurde gewogen. 1 g vom Ethylacetat-Extrakt wurde mittels Normalphasenchromatografie über eine Silica 40 g Säule aufgetrennt. Das Vorgehen dazu kann dem Kapitel 3.2.1 entnommen werden mit dem Unterschied das Dichlormethan anstatt Ethylacetat als Lösungsmittel gebraucht worden ist. Nach der Normalphasenchromatographie des Dichlormethan- Extraktes sind total drei verschiedene Fraktionen ausgewählt worden und deren Inhalt wurde jeweils in Fraktionsgläser am Rotationsverdampfer einrotiert und die Ausbeute gewogen. Im Kapitel 4.1 ist das Resultat der Normalphasenchromatografie von 1 g des Dichlormethan-Extraktes zu sehen mit der Einteilung der drei verschiedenen Fraktionen sowie deren gewogene Ausbeute.

### 3.3 Borrelien Färbung mit SYBR Green I/ Propidium-Iodid

In diesem Unterkapitel wird die Färbung der Borrelien Zellen mit SYBR Green I und Propidium Iodid (SYBR Green I/PI Färbung) beschrieben. Sie wurde im Labor als Vorversuch durchgeführt, um zu schauen ob die Borrelien Färbung funktioniert. Die Färbung wurde mit *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. burgdorferi* gemacht. Die Zelllinien werden seit dem 17.01.2023 in 15 mL Falkontubes mit BSK-H Medium mit L-Glutamin und 6% Hasen-Serum bei 33°C, mikroaerophil kultiviert. Für eine mikroaerophile Kultivierung werden die Zelllinien in einem Kulturgefäß mit einem Beutel von Genbox microaer Generator gehalten. Für eine Färbung von toten Zellen, wurden für jede Zelllinie jeweils Zellen bei 37°C für 15 min erwärmt. Dafür sind 1.5 mL von jeder Zelllinie in frische Reaktionsgefäße pipettiert und zentrifugiert worden. Der Überstand wurde entfernt bis auf ein kleines Restvolumen, welches mit dem Zellpellet suspendiert wurde. 500 µL jeder Zelllinie wurde jeweils in neue Reaktionsgefäße überführt und bei 37 °C für 15 min im Heizblock für die tot-Bestimmung erwärmt. Eine SYBR Green I/PI Mischung von 30 µL einer 25 mg/mL Propidium-Iodid- PBS Lösung wurde mit 10 µL SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain gemischt und mit 960 µL sterilem Wasser auf 1 mL aufgefüllt. Jeder Zelllinie lebend und tot, total sechs Reaktionsgefäße, wurde 10 µL der SYBR Green I/PI Mischung dazugegeben, davon wurde jeweils ein Tropfen auf ein Objektglas überführt und mit einem Deckglas bedeckt. Die Zellen sind am Umkehrlichtmikroskop mit UV Laser von Leica betrachtet worden. SYBR Green I wurde mit Blaulicht angeregt ( $\lambda_{\max} = 498 \text{ nm}$ ) und emittiert grünes Licht bei  $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$ . Propidium-Iodid wurde mit Grünlicht angeregt ( $\lambda_{\max} = 535 \text{ nm}$ ) und emittierte rotes Licht bei  $\lambda_{\max} = 617 \text{ nm}$ .

### 3.4 Assays mit *E. coli* WDCM 00013, *S. aureus* DMSZ 766 und den Extrakten aus 3.2.1 und 3.2.2 (4 Extrakte)

Dieses Unterkapitel beschreibt verschiedene Assays, ein Inhibierungs- Assay mit Omnilog (Kapitel 3.4.1), Disk Diffusion (Kapitel 3.4.2) und Well Diffusion (Kapitel 3.4.3) die verwendet wurden um die antibakterielle Wirkung der *A. annua* Extrakte, 60% Ethanol-Extrakt und Ethylacetat-Extrakt aus Kapitel 3.2.1 und der Etherphase-Extrakt sowie wässriger Extrakt aus Kapitel 3.2.2 zu testen (Tabelle 2). Diese drei verschiedenen Assays mit den vier Extrakten wurden hauptsächlich mit *E. coli* WDCM 0013 durchgeführt, wobei beim Well Diffusion auch *S. aureus* DMS Z766 als Testorganismus integriert wurde.

Tabelle 2: Vier *A. annua* Blätter Pulver Extrakte mit einem Verweis zu den beschriebenen Methoden.

Name Extrakt	Verweis auf Methode
60% Ethanol-Extrakt	Kapitel 3.2.1
Ethylacetat-Extrakt (EtoAC)	
Etherphase-Extrakt	Kapitel 3.2.2
Wässriger Extrakt	

#### 3.4.1 Inhibierungs- Assay mit Omnilog (4 Extrakte)

Ein Inhibierungs- Assay mit Omnilog wurde mit *E. coli* WDCM 00013 und den vier Extrakten, 60% Ethanol-Extrakt und Ethylacetat-Extrakt aus Kapitel 3.2.1 und dem Etherphase-Extrakt sowie wässrigem Extrakt aus Kapitel 3.2.2 durchgeführt. Jeder Extrakt wurde bei Konzentrationen von 5 mg/mL, 0.5 mg/mL und 0.05 mg/mL auf *E. coli* WDCM 00013 getestet. Drei verschiedene Kontrollen wurden verwendet, dazu zählten Artemisinin und Minocycline Hydrochloride als positive Kontrollen und Dimethylsulfoxid (DMSO) als negative Kontrolle. Zusätzlich wurden *B. burgdorferi* Zellen im Assay verwendet, welche nicht mit den Extrakten behandelt wurden und als Nachweis der Omnilog Färbung dienten. Die verwendete *B. burgdorferi* Kultur, wurde in 15 mL Falkontubes mit BSK-H Medium mit L-Glutamin und 6% Kaninchen-Serum bei 33°C, mikroaerophil kultiviert. Von jedem *A. annua* Extrakt wurde eine 100 mg/mL, 10 mg/mL und eine 1 mg/mL Lösung mit DMSO hergestellt und in 1.5 mL Reaktionsgefäße zubereitet. Für Artemisinin wurde eine 2 mg/mL Lösung in DMSO und für Minocycline Hydrochloride eine 0.1 mg/mL in DMSO hergestellt. Alle Extrakte und Substanzen, die mit DMSO in Lösung gebracht werden mussten, wurden an der Analysenwaage abgewogen. Für den Inhibierungs-Assay mit Omnilog wurde ein frischer *E. coli* WDCM 0013 Verdünnungsausstrich und eine Flüssigkultur für 24 h Inkubation bei 37°C und 100 rpm in 5 mL Todd Hewitt Broth (THB)-Medium vorbereitet. Die Zellsuspension wurde 1:10 mit THB-Medium verdünnt, der OD600nm wurde gemessen und auf einen OD von 0.25 mit Endvolumen 10 mL mit THB-Medium verdünnt. Ein OD- Wert von 0.25 entspricht dabei einer Zellkonzentration von  $5 \cdot 10^7$  Zellen/mL.

Danach wurden die Zellen 1:100 verdünnt mit THB-Medium auf ein Endvolumen von 10 mL, sodass eine Zellkonzentration von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/mL erreicht wurde. In diesem Assay, wurde für *E. coli* WDCM 00013 und *B. burgdorferi*, beides Gram-negative Bakterien der Dye Mix A verwendet. Der Dye Mix A wurde 1:100 mit THB-Medium zu einem Endvolumen von 20 mL verdünnt. In einem weiteren Schritt wurde die Zellsuspension von  $5 \cdot 10^5$  Zellen/mL, 1:5 mit der Farbstofflösung verdünnt auf ein Endvolumen von 25 mL. Die finale Zellkonzentration die im Hemm-Assay mit Omnilog verwendet wurde, entspricht einer Konzentration von  $1 \cdot 10^5$  Zellen/mL. Davon wurden 190  $\mu$ L in die wells einer 96-well Platte pipettiert und jeweils 10  $\mu$ L der Extraktlösungen von 100 mg/mL, 10 mg/mL und 1 mg/mL sowie die Kontrollen dazugegeben. Die Endkonzentrationen der hergestellten Extrakte im Inhibierungs-Assay betragen von 5 mg/mL, 0.5 mg/mL und 0.05 mg/mL. Minocycline Hydrochloride als Kontrolle wurde mit 5  $\mu$ g/mL und Artemisinin 100  $\mu$ g/mL verwendet. Für jeden Extrakt und für jede Kontrolle wurde ein Replikat gemacht. Für die *B. burgdorferi* Kultur wurde die genaue Zellkonzentration nicht bestimmt, sondern die Zellen wurden direkt mit der Farbstofflösung wie bereits beschrieben verdünnt und 200  $\mu$ L davon wurde in ein well pipettiert. Die 96-well Platte wurde für 72 h bei 37°C mit einer Probemessung von 15 min Interferenz im Omnilog gemessen. In der Abbildung 10 ist das Schema der 96-well Platte abgebildet.

Konzentration [mg/mL]	ID	EtOAc Ex- trakt	EtOAc Ex- trakt	Etherphase Extrakt	Etherphase Extrakt	Wässri- ger Ex- trakt	Wässri- ger Ex- trakt	EtOH 60% Extrakt	EtOH 60% Extrakt				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	A	EtOAc	EtOAc	Etherphase	Etherphase	wässrig	wässrig	EtOH 60%	EtOH 60%	Borrelien	Borrelien		
0.5	B	EtOAc 1:10	EtOAc 1:10	Etherphase 1:10	Etherphase 1:10	wässrig 1:10	wässrig 1:10	EtOH 60 % 1:10	EtOH 60 % 1:10				
0.05	C	EtOAc 1:100	EtOAc 1:100	Etherphase 1:100	Etherphase 1:100	wässrig 1:100	wässrig 1:100	EtOH 60 % 1:100	EtOH 60 % 1:100				
	D												
	E												
	F												
	G												
	H	Minocyclin	Minocyclin	Artemisinin	Artemisinin	DMSO	DMSO						

Abbildung 10: Schema der 96-well Platte des Inhibierungs- Assays mit Omnilog. Getestet wurden die vier Extrakte Ethylacetat (EtOAc), Etherphase-Extrakt, wässriger Extrakt (wässrig) und 60% Ethanol-Extrakt (EtOH 60%) auf *E. coli* WDCM 0013. Von allen vier Extrakten wurden Konzentrationen von 5 mg/mL, 0.5 mg/mL und 0.05 mg/mL getestet. Drei verschiedene Kontrollen, 5 µg/mL Minocycline Hydrochloride und 100 µg/mL Artemisinin und DMSO wurden ebenfalls auf *E. coli* WDCM 0013 getestet. Eine *B. burdorferi* Zellkultur (Borrelien) wurde als Nachweis für die Omnilog Färbung mitgetestet, ohne Behandlung mit den Extrakten.

### 3.4.2 Disk Diffusion (4 Extrakte)

Ein Agardiffusionstest mit sterilem gelochtem Filterpapier wurde mit den vier Extrakten 60% Ethanol-Extrakt und Ethylacetat-Extrakt aus Kapitel 3.2.1 und dem Etherphase-Extrakt sowie wässrigem Extrakt aus Kapitel 3.2.2 und der *E. coli* WDCM 0013 Kultur durchgeführt. Dafür wurde ein frischer *E. coli* WDCM 0013 Verdünnungsausstrich und eine Flüssigkultur für 24h Inkubation bei 37°C und 100 rpm in 5 mL Todd Hewitt Broth (THB)-Medium vorbereitet. Zusätzlich wurden 100 mg/mL der vier Extrakte gelöst in DMSO und 2 mg/mL Artemisinin in DMSO sowie 0.1 mg/mL Minocycline Hydrochloride in DMSO hergestellt (Kapitel 3.4.1). In der Abbildung 11 ist das Vorgehen des Disk Diffusion Tests zu sehen. Zuerst wurde von der *E. coli* WDCM 0013 Flüssigkultur der  $OD_{600nm}$  bestimmt und auf einen OD-Wert von 0.2 mit einem Endvolumen von 10 mL mit TSA-Medium verdünnt. 100  $\mu$ L der Kultur wurde auf zwei TSA-Platten pipettiert. Die eine Platte wurde mit dem Drigalskispatel ausplattiert und die andere mit einem sterilen Wattestäbchen. In eine 96-well Platte wurden jeweils 50  $\mu$ L der Extrakte und Kontrollen in wells pipettiert. Steriles, gelochtes Filterpapier wurde in den zu testenden Extrakt oder in die zu testende Kontrolle für 5 min eingelegt und vollgesaugt. Danach wurde das gelochte Filterpapier mit einer sterilen Pinzette auf die *E. coli* WDCM 0013 Platte gegeben. Total befanden sich vier gelochte Filterpapiere, welche mit den Extrakten inkubiert wurden und drei gelochte Filterpapiere welche mit den Kontrollen inkubiert wurden, auf einer Platte. Die beiden Platten wurden bei 37°C für 24 h inkubiert.

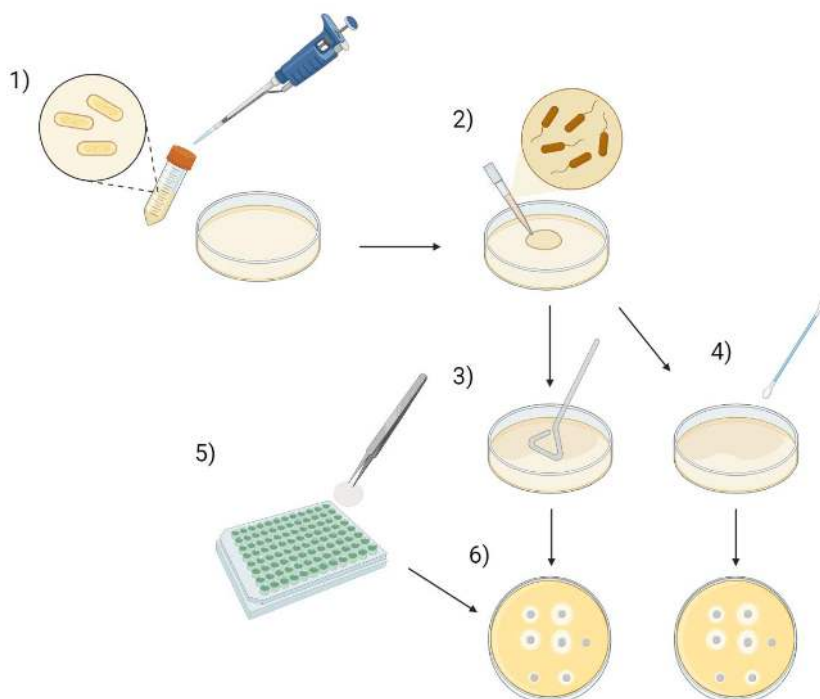


Abbildung 11: Ablauf des Disk Diffusion Tests für die vier Extrakte [100 mg/mL] und drei Kontrollen Artemisinin [2 mg/mL], Minocycline Hydrochloride [0.1 mg/mL] und DMSO. **1) und 2)** 100  $\mu$ L der *E. coli* WDCM 0013 Flüssigkultur OD 0.2 wird auf die TSA-Platte pipettiert. **3) und 4)** Die Kultur wird auf der einen Platte mit einem Drigalskispatel und auf der anderen Platte mit einem Wattestäbchen verteilt. **5) und 6)** steriles gelochtes Filterpapier wird in 50  $\mu$ L Pflanzenextrakt oder Kontrolle für 5 min eingetaucht und auf die Platte transferiert. Total sieben Filterpapiere pro Platte. **Quelle:** Erstellt mit BioRender Julia Nafzger.

### 3.4.3 Well Diffusion mit zusätzlich *S. aureus* DMSZ 766 (4 Extrakte)

Ein Well Diffusion Test mit den vier Extrakten 60% Ethanol-Extrakt und Ethylacetat-Extrakt aus Kapitel 3.2.1 und dem Etherphase- Extrakt sowie wässrigem Extrakt aus Kapitel 3.2.2 und einer *E. coli* WDCM 0013 Kultur durchgeführt. Zusätzlich wurden die vier Extrakte auch noch auf ihre antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* DMSZ 766 getestet. Dafür wurden frische *E. coli* WDCM 0013 und *S. aureus* DMSZ 766 Verdünnungsausstriche sowie Flüssigkulturen vorbereitet, die bei 37°C und 100 rpm in 5 mL Todd Hewitt Broth (THB)- Medium für 24 h inkubiert wurden. Zusätzlich wurden 100 mg/mL und 10 mg/mL der vier Extrakte gelöst in DMSO und 2 mg/mL Artemisinin in DMSO sowie 0.1 mg/mL Minocycline Hydrochloride in DMSO hergestellt (Kapitel 3.4.1). Insgesamt sind pro Organismus (*E. coli* WDCM 0013 oder *S. aureus* DMSZ 766) fünf Well- Diffusion Agarplatten mit zwei Platten für 100 mg/mL Extrakte, weiter zwei Platten für 10 mg/mL Extrakte und eine weitere Platte mit den Kontrollen hergestellt worden. Pro Well- Diffusion Platte befanden sich drei wells. Das genaue Vorgehen wird in der Abbildung 12 gezeigt. In Müller-Hinton Base Agar Platten wurden mit einem abgeflammt Stanser, Durchmesser 8 mm, Löcher in den Agar gestanzt und mit einer sterilen Pipettenspitze entfernt. Pro Platte wurden 3 Löcher (wells) gestanzt. In die wells wurde 100 µL Pflanzenextrakt oder eine Kontrollsubstanz pipettiert. Minocycline Hydrochloride wurde separat in einem well auf einer Platte getestet. Während die Extrakte und Kontrollsubstanzen inkubierten, wurden die beiden Flüssigkulturen von *E. coli* WDCM 0013 und *S. aureus* DMSZ 766 auf einen OD<sub>600nm</sub> von 0.6 mit einem Endvolumen von 5 mL mit TSA- Medium verdünnt. 5 mL jeder Kultur wurde mit 20 mL Müller Hinton Softagar (2.5 g/L Agar) gemischt und vorsichtig über eine Platte mit gefüllten wells geleert. Die total 10 Platten wurden bei 37°C für 24 h inkubiert.

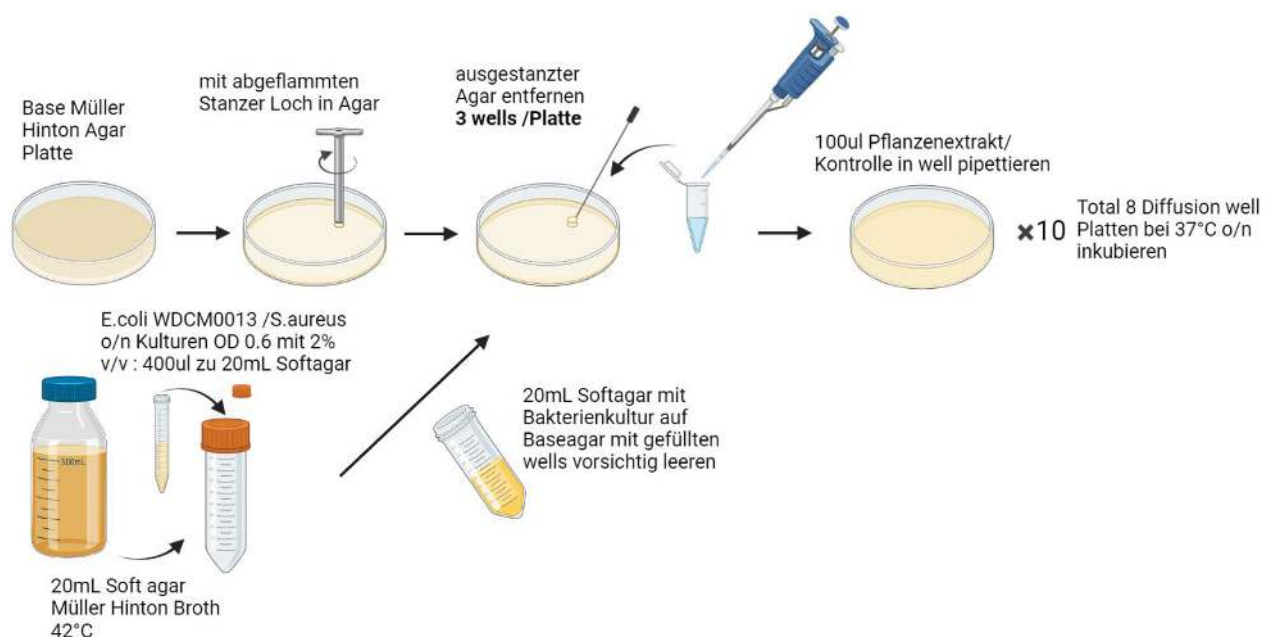


Abbildung 12: Schema des Well Diffusion Assays für die vier Extrakte [100 mg/mL] und drei Kontrollen Artemisinin [2 mg/mL], Minocycline Hydrochloride [0.1 mg/mL] und DMSO. **Quelle:** Erstellt mit BioRender, Julia Nafzger.

### 3.5 Assays mit *E. coli* WDCM 00013 und den Extrakten aus 3.2.1 bis und mit 3.2.4 (21 Extrakte)

Die Ergebnisse des Kapitels 3.4 zeigten, dass der EtoAC- Extrakt und der Etherphase- Extrakt das Wachstums von *E. coli* WDCM 0013 hemmten. Diesbezüglich wurden die beiden Extrakte fraktioniert und wieder auf *E. coli* WDCM 0013 getestet. Zusätzlich wurde der Soxhlet- Extrakt, der Mikrowelle- Extrakt und der Dichlormethan- Extrakt getestet. Dieses Unterkapitel beschreibt die beiden Assays, Inhibierungs- Assay mit Omnilog und Well Diffusion die verwendet wurden um die antibakterielle Wirkung des Ethylacetat-Extrakts und deren Fraktionen aus dem Kapitel 3.2.1, des Etherphase-Extrakts mit Fraktionen aus Kapitel 3.2.2, des Soxhlet Ethylacetat-Extrakts mit Fraktionen aus Kapitel 3.2.3, des Mikrowellen Ethylacetat-Extrakts aus Kapitel 3.2.4 sowie des Dichlormethan- Extraktes mit Fraktionen aus Kapitel 3.2.5 zu bestimmen. Im Ganzen wurden 21 Extrakte auf *E. coli* WDCM 0013 getestet (Tabelle 3).

Tabelle 3: 21 *A. annua* Blätter Pulver Extrakte mit einem Verweis zu den beschriebenen Methoden.

<b>Name Extrakt</b>	<b>Verweis auf Methode</b>
Ethylacetat- Extrakt (EtoAC)	Kapitel 3.2.1
Ethylacetat Fraktion 1-4	
Ethylacetat Fraktion 5-8	
Ethylacetat Fraktion 9-10	
Ethylacetat Fraktion 11-17	
Ethylacetat Fraktion 18-22	
Ethylacetat Fraktion 23-28	
Etherphase- Extrakt	Kapitel 3.2.2
Etherphase Fraktion 1-7	
Etherphase Fraktion 8-13	
Etherphase Fraktion 14-22	
Etherphase Fraktion 23-30	
Soxhlet Ethylacetat- Extrakt	Kapitel 3.2.3
Soxhlet Ethylacetat- Extrakt Fraktion 2-16	
Soxhlet Ethylacetat- Extrakt Fraktion 17-25	
Soxhlet Ethylacetat- Extrakt Fraktion 26-37	
Mikrowellen Ethylacetat- Extrakt	Kapitel 3.2.4
Dichlormethan- Extrakt	Kapitel 3.2.5
Dichlormethan F10-13	
Dichlormethan F14-19	
Dichlormethan F20-25	

### 3.5.1 Well Diffusion (21 Extrakte)

Ein weiterer Well Diffusion Assay auf *E. coli* WDCM 0013 wurde durchgeführt, jedoch mit den 21 Extrakten die der Tabelle 3 zu sehen sind (Kapitel 3.5). Das Vorgehen für den Ansatz des Well Diffusion Tests kann vom Kapitel 3.4.3 übernommen werden mit den folgenden Änderungen. Bei diesem Well Diffusion Test wurden nur Müller Hinton Base Agar (15 g/L Agar)- Platten verwendet und kein Soft Agar wurde gebraucht. Die *E. coli* WDCM 0013 Flüssigkultur wurde mit einem Volumen von 100  $\mu$ L mit dem Drigalskispatel auf jeder Platte verteilt. Für die 21 Extrakte mit den drei Kontrollen wurden total 16 Platten benötigt. Die wells wurden mit dem Stanzer, 8 mm Durchmesser in den bereits mit *E. coli* WDCM 0013 ausgestrichenen Agar gestanzt (3 wells/ Platte) und der Agar wurde entfernt. Danach konnten 100  $\mu$ L der Extrakte oder Kontrollen in die Wells pipettiert werden und bei 37°C für 24 h inkubiert werden.

### 3.5.2 Inhibierungs- Assay mit Omnilog (21 Extrakte)

Ein weiterer Inhibierungs- Assay mit Omnilog wurde mit *E. coli* WDCM 0013 durchgeführt, jedoch mit den 17 Extrakten die der Tabelle 3 zu entnehmen sind (Kapitel 3.5), davon ausgeschlossen der Dichlormethan Extrakt mit Fraktionen. Das Vorgehen für den Ansatz des Omnilog Tests kann vom Kapitel 3.4.1 übernommen werden mit den folgenden Änderungen. Es wurden keine Borrelien Zellen getestet und der Assay wurde nur mit Konzentrationen von 5 mg/mL und 0.5 mg/mL der jeweiligen Extrakte durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 24.25 h. In der Abbildung 13 wird das Schema der 96-well Platte abgebildet.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	A	Ether F1-7	Ether F8-13	Ether F14-22	Ether F23-30		EtoAC F1-4	EtoAC F5-8	EtoAC F9-10	EtoAC F11-17	EtoAC F18-22	EtoAC F23-28	
	B	Ether F1-7	Ether F8-13	Ether F14-22	Ether F23-30		EtoAC F1-4	EtoAC F5-8	EtoAC F9-10	EtoAC F11-17	EtoAC F18-22	EtoAC F23-28	
5	C	Soxhlet EtoAC	Soxhlet EtoAC F2-16	Soxhlet EtoAC F17-25	Soxhlet EtoAC F26-37		Ether	EtoAC	Microwave EtoAC	Minocycline	Artemisinin	DMSO	
0.5	D	Soxhlet EtoAC	Soxhlet EtoAC F2-16	Soxhlet EtoAC F17-25	Soxhlet EtoAC F26-37		Ether	EtoAC	Microwave EtoAC				
	E												
	F												
	G												
	H												

Abbildung 13: Schema der 96-well Platte des Hemm- Assays mit Omnilog mit den 17 Extrakten und Kontrollen. Von allen 17 Extrakten wurden Konzentrationen von 5 mg/mL und 0.5 mg/mL getestet. Drei verschiedene Kontrollen, 5 µg/mL Minocycline Hydrochloride und 100 µg/mL Artemisinin und DMSO wurden ebenfalls auf *E. coli* WDCM 0013 getestet.

### 3.6 Well Diffusion mit *E. coli* WDCM 00013 und den Fraktionen von EtoAC F11-17 und Etherphase F8-13

Die Ergebnisse des Kapitels 3.5 zeigten, dass die EtoAC Fraktion 11-17 und die Etherphase-Fraktion 8-13 das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 hemmten. EtoAC F11-17 und Etherphase F8-13 wurden weiter mittels Normalphasenchromatografie über eine Silica 25 g Säule aufgetrennt und deren Fraktionen auf *E. coli* WDCM 0013 getestet. Dies wurde gemacht, um nachweisen zu können, ob eine inhibitorische Wirkung auf einzelne Komponenten in den Extrakten zurückzuführen ist. Dafür wurde die restliche Menge an EtoAC F11-17 von 231 mg und 242 mg für die Etherphase F8-13 wurden in Ethylacetat gelöst und über eine 25 g Säule aufgetrennt, die genaue Durchführung der Normalphasenchromatographie kann dem Kapitel 3.2.1 entnommen werden. Nach der Normalphasenchromatographie des EtoAC F11-17 Extraktes sind total vier verschiedene Fraktionen ausgewählt worden und für den Etherphase F8-13 Extrakt drei Fraktionen, deren Inhalt jeweils in Fraktionsgläser am Rotationsverdampfer einrotiert und die Ausbeute gewogen wurde. Im Kapitel 4.5 sind die Resultate der beiden Normalphasenchromatografien zu sehen mit jeweils den verschiedenen Fraktionen sowie deren gewogene Ausbeute. Die beiden Fraktionen Etherphase F8-13 und EtoAC F11-17 und deren Fraktionen 1-5, 6-9 und 10-16 für Etherphase (F8-13) und 5-9, 10-13 und 14-19 Fraktionen für die EtoAC (F11-17) Fraktion sowie ein Pool der Fraktionen von EtoAC F11-17 und ein weiterer Pool der Fraktionen von Etherphase F8-13 wurden mittels Well Diffusion Assay auf *E. coli* WDCM 0013 getestet, dabei wurde wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben vorgegangen. Die Konzentration des Pools EtoAC F11-17 und Etherphase F8-13 betrug im Well Diffusion Assay 30 mg/mL und für beide Pools wurde ein Replikat gemacht. Die Konzentrationen von EtoAC 11-17 sowie deren einzelne Fraktionen und Etherphase F8-13 plus deren einzelne Fraktionen wurden bei einer Konzentration von 100 mg/mL gelöst in DMSO getestet. Das wiederholte Testen der Fraktionen Etherphase F8-13 und EtoAC F11-17 diente als technisches Replikat, da die beiden Fraktionen wie im Kapitel 3.5 beschrieben, bereits auf *E. coli* WDCM 0013 getestet worden sind.

### 3.7 MALDI-TOF von den drei Fraktionen von EtoAC F11-17

Die Ergebnisse des Kapitels 3.5 zeigten, dass die EtoAC Fraktion 11-17 eine Hemmung des *E. coli* WDCM 0013 Wachstums aufweist und in Kapitel 3.6 wurde bestätigt, dass eine weitere Fraktionierung von EtoAC F11-17 zu keiner Hemmung führte, sondern nur das Zusammenführen der EtoAC F11-17 Fraktionen wieder eine Wirkung aufwies. Um der Bestimmung der chemischen Zusammensetzung von EtoAC F11-17 näher zu kommen, wurde eine Bestimmung mit einer Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI-TOF, Matrix-assisted laser desorption/ionization) durchgeführt. Mit dieser Methode konnten die Extrakte nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) aufgetrennt werden und das Molekulargewicht konnte bestimmt werden und mit der Literatur verglichen werden. Für die Bestimmung mit MALDI-TOF wurde von den drei Fraktionen 5-9, 10-13 und 14-19 von EtoAC F11-17 jeweils 33  $\mu\text{L}$  von den 100 mg/mL Extrakten gelöst in DMSO (Kapitel 3.5) entnommen und in einem Rundkolben bei 30°C einrotiert. Die Ausbeute für EtoAC F11-17 Fraktion 5-9 betrug 3.08 mg, für Fraktion 10-13, 2.25 mg und für die Fraktion 14-19, 3.93 mg. Die Durchführung des MALDI-TOFs wurde von einer wissenschaftlichen Mitarbeiterin gemacht. Das Resultat der MALDI-TOF Analyse wurde als Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) angegeben, welches einfach protoniert wurde. Für die Umrechnung auf die Molekularmasse musste demnach minus 1 (-1 H-Atom) gerechnet werden.

### 3.8 Inhibierungs- Assay mit Omnilog mit *Borrelia* sp. und Extrakte

Ein Inhibierungs- Assay mit Omnilog mit *B. afzelii*, *B. burgdorferi* und *B. garinii* wurde mit den Extrakten Soxhlet Ethylacetat- Extrakt und Etherphase Fraktion 8-13 aus Kapitel 3.2.3 und der Ethylacetat Fraktion 11-17 aus Kapitel 3.2.1 durchgeführt, da diese drei Extrakte eine Hemmung gegen das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 zeigten (Kapitel 3.5). Informationen über die verwendeten *Borrelien* sp. können aus dem Kapitel 3.3 entnommen werden. Für diesen Versuch wurden *Borrelien* gebraucht, die am 29.3.23 von der Ausgangskultur vom 17.1.23 subkultiviert wurden. Das Vorgehen zur Durchführung des Omnilog Assays kann vom Kapitel 3.4.1 übernommen werden mit den folgenden Änderungen. Die verwendete Zellkonzentration von *B. afzelii* betrug  $2.75 \cdot 10^6$  Zellen/mL, die von *B. burgdorferi*  $3.5 \cdot 10^6$  Zellen/mL und die von *B. garinii* betrug  $3.25 \cdot 10^6$  Zellen/mL. Diese wurden mit dem BSK-H Medium/ Dye A Mix 1:5 verdünnt, sodass die Zellkonzentration im Assay  $5.5 \cdot 10^5$  Zellen/mL für *B. afzelii* betrug,  $7 \cdot 10^5$  Zellen/mL für *B. burgdorferi* und  $6.5 \cdot 10^5$  Zellen/mL für *B. garinii*. Die 96-well Platte wurde mit einer PCR Folie abgedeckt für mikroaerophile Bedingungen und wurde im Omnilog für 4 d bei 33°C kultiviert. In der Abbildung 14 ist das Schema der 96-well Platte zu sehen. Parallel dazu, wurden in einer weiteren 96-well Platte nur *B. afzelii*, *B. burgdorferi* und *B. garinii* mit dem Omnilog Dye A Mix angesetzt und die Platte diente als Wachstumskontrolle. Dafür wurden jeweils 190 µL Zellen mit 10 µL Dye A Mix zusammengegeben und für jede Zelllinie wurden 1:5, 1:25 und 1:125 Verdünnungen durchgeführt.

Nach der Inkubation im Omnilog wurde zusätzlich eine Lebend/Tot Färbung mit SYBR Green I/PI wie sie in Kapitel 3.3 beschrieben wird, von den unbehandelten Zellen gemacht.

Konzentration  
[mg/mL]

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
5	A	Ether F8-13	Blank	EtoAC F11-17	Mino	DMSO	Ether F8-13	Blank	EtoAC F11-17	Mino	DMSO		
	B	Ether F8-13	Blank	EtoAC F11-17	Mino	DMSO	Ether F8-13	Blank	EtoAC F11-17	Mino	DMSO		
0.5	C	Ether F8-13	Soxhlet EtoAC	EtoAC F11-17	Arte		Ether F8-13	Soxhlet EtoAC	EtoAC F11-17	Arte			
	D	Ether F8-13	Soxhlet EtoAC	EtoAC F11-17	Arte		Ether F8-13	Soxhlet EtoAC	EtoAC F11-17	Arte			
5	E	Ether F8-13	Blank	EtoAC F11-17	Mino	DMSO							
	F	Ether F8-13	Blank	EtoAC F11-17	Mino	DMSO							
0.5	G	Ether F8-13	Soxhlet EtoAC	EtoAC F11-17	Arte								
	H	Ether F8-13	Soxhlet EtoAC	EtoAC F11-17	Arte								

- B. afzelii
- B. burgdorferi
- B. garinii

Abbildung 14: Schema der 96-well Platte des Inhibierungs -Assays mit Omnilog mit *B. afzelii*, *B. burgdorferi* und *B. garinii* wurde mit den Extrakten Soxhlet Ethylacetat- Extrakt, Etherphase Fraktion 8-13 und Ethylacetat Fraktion 11-17. Die Extrakte wurden jeweils bei 5 mg/mL und 0.5 mg/mL getestet mit Replikate. Drei verschiedene Kontrollen, 5 µg/mL Minocycline Hydrochloride und 100 µg/mL Artemsinin und DMSO wurden ebenfalls auf die *Borrelia* sp. getestet.

### 3.9 Borrelien Wachstumsversuche

Borrelien Wachstumsversuche wurden gemacht wegen den negativen Resultaten aus Kapitel 3.8, bei welchem im Omnilog kein Wachstum von Borrelien im BSK-H Medium nachgewiesen werden konnte. Informationen über die verwendeten *Borrelien* sp. können aus dem Kapitel 3.3 entnommen werden. Für diesen Versuch wurden Borrelien gebraucht, die am 29.3.23 von der Ausgangskultur vom 17.1.23 in BSK-H Medium subkultiviert wurden.

In einem ersten Ansatz wurden *B. burgdorferi*, *B. afzelii* und *B. garinii* in BSK-H Medium unter mikroaerophilen Bedingungen in einem Kulturgefäß mit einem Beutel von Genbox microaer Generator kultiviert. Dazu wurde für jede Zelllinie eine 1:5, 1:25 und eine 1:125 Verdünnung mit BSK-H Medium gemacht und in einer 96-well Platte angesetzt. Die verwendete Zellkonzentration von *B. afzelii* betrug  $2.75 \cdot 10^6$  Zellen/mL, die von *B. burgdorferi*  $3.5 \cdot 10^6$  Zellen/mL und die von *B. garinii* betrug  $3.25 \cdot 10^6$  Zellen/mL. Von diesen Zellkonzentrationen wurden jeweils 200 µL entnommen in ein Well pipettiert und ausgehend davon wurden die Verdünnungen gemacht. Nach 4 h und 24 h Inkubation wurden die Borrelien mit SYBR Green I/PI wie sie in Kapitel 3.3 beschrieben wird, gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In einem zweiten Ansatz wurden die drei Zelllinien in einer 6-well Platte und zwei verschiedenen Medien, BSK-H Medium und dem Dulbecco's Modified Eagles's – low glucose with 10% FCS Medium angesetzt. Dafür wurde jeweils die gleiche Zellkonzentration verwendet wie oben erwähnt, von der 200 µL entnommen wurde und auf 1 mL mit Medium aufgefüllt wurde. Zwei 6 Well Platten sind angesetzt worden, wobei die eine im CO<sub>2</sub> Inkubator bei 33°C für 24 h inkubiert wurde und die andere wurde unter mikroaerophilen Bedingungen in einem Kulturgefäß mit einem Beutel von Genbox microaer Generator kultiviert. Nach der Inkubation sind beide Platten mit SYBR Green I/PI wie sie in Kapitel 3.3 beschrieben wird, gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet worden. In einem dritten Ansatz wurden *B. garinii* bei einer Zellkonzentration von  $3.25 \cdot 10^6$  Zellen/mL in 1.5 mL Reaktionsgefäße und 15 mL Falcontubes mit 200 µL Zellen unter mikroaerophilen Bedingungen kultiviert. Der vierte Ansatz untersuchte, *B. garinii* bei gleicher Zellkonzentration mit 1.5 mL in Deepwell Platten und einer gasdurchlässigen Folie, wobei ebenfalls mikroaerophil kultiviert wurde. Alle Ansätze wurden nach 24h wieder wie bereits beschrieben mit SYBR Green I/PI gefärbt und unter den Fluoreszenzmikroskop von Zeiss betrachtet. Vom Ansatz drei wurde auch ein Mix aus Zellen aus dem Reaktionsgefäß und Falcontube mit je 5 µL der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In einem letzten Ansatz wurde wie im Paper von (Feng et al., 2020) beschrieben, 1 mL von *B. burgdorferi* bei einer Zellkonzentration von  $3.5 \cdot 10^6$  Zellen/mL in 1.5 mL Reaktionsgefäße für 7d kultiviert.

### 3.10 Inhibierungs- Assay *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 in 1.5 mL Reaktionsgefäße

Die Wachstumsversuche mit den Borrelien (Kapitel 3.9) zeigten, dass 1 mL der *B. burgdorferi* Kultur vom 29.03.2023 bei einer Konzentration von  $3.5 \cdot 10^6$  Zellen/mL im 1.5 mL Reaktionsgefäß verglichen mit den restlichen getesteten Ansätzen die geeignetste Methode ist um *B. burgdorferi* mikroaerophil zu kultivieren (Kapitel 4.8). Aus diesem Grund wurde die Wirkung von der EtoAC Fraktion 11-17, die gegen *E. coli* WDCM 0013 wirkte (Kapitel 3.5 und 3.6) auf *B. burgdorferi* in einer 1.5 mL Reaktionsgefäß Kultivierung getestet. Dazu sind 950  $\mu$ L von der *B. burgdorferi* Kultur vom 29.3.23 (Kapitel 3.9) bei einer Konzentration von  $2.8 \cdot 10^6$  Zellen/mL in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 50  $\mu$ L Testsubstanz bei 33°C unter mikroaerophilen Bedingungen in einem Kulturgefäß mit einem Beutel von Genbox microaer Generator für 24 h kultiviert worden. Zu den Testsubstanzen gehörten EtoAC Fraktion 11-17 bei einer Testkonzentration von 5 mg/mL, DMSO bei einer Testkonzentration von 5%, Artemisinin bei einer Testkonzentration von 100  $\mu$ g/mL und Minocycline bei einer Testkonzentration von 5  $\mu$ g/mL. Allgemeine Informationen über die Testsubstanzen, welche in DMSO gelöst wurden können unter anderem aus dem Kapitel 3.4 entnommen werden. Von der EtoAC Fraktion 11-17 wurde ein Replikat gemacht und zusätzlich wurde ein Blank mit nur *B. burgdorferi* Kultur angesetzt. Die Borrelien, welche mit EtoAC behandelt wurden, sind vor der Färbung zentrifugiert und mit PBS gewaschen und das Zellpellet anschliessend wieder in 100  $\mu$ L PBS gelöst worden. Der Waschschrift mit PBS wurde gemacht, um Rückstände des Extraktes loszuwerden. Jeweils 2.5  $\mu$ L Probe und 2.5  $\mu$ L Antifade wurden auf den Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.Z2 von Zeiss mit gekoppeltem Imaging- Gerät AxioCam MR R3 wurden gemacht. Für jede Probe wurde zur Übersicht ein XY-Tile gemacht mit vier festgelegten Standpunkten auf dem Objektträger und dem Objektiv EC Plan-Neofluar 20x/ 0.50 Ph 2 M27. Dazu sind zwei Channels ausgewählt worden, AF488 und AF568. AF488 mit einer Filter Anregungswellenlänge von 450 bis 490 nm und einer Emissionswellenlänge von 500 bis 550 nm und der Lichtquelle HXP-120. Die Anregungswellenlänge von AF488 betrug 493 nm und die Emissionswellenlänge 517 nm. AF568 mit einer Filter Anregungswellenlänge von 540 bis 552 nm und einer Emissionswellenlänge von 575 bis 640 nm und der Lichtquelle HXP- 120. Die Anregungswellenlänge von AF568 betrug 577 nm und die Emissionswellenlänge 603 nm. Die Einstellung der vier Standpunkte wurde für jede Probe übernommen und pro Standpunkt wurde vom XY-Tile eine Aufnahme gemacht.

## 4 Resultate

In diesem Abschnitt werden die Resultate chronologisch nach dem Ablauf der Methoden erläutert. Alle Ergebnisse der Normalphasenchromatographien der *A. annua* Extrakte sind zusammengenommen worden und werden im Kapitel 4.1 beschrieben. Die Resultate der verschiedenen Inhibierungs- Assays mit *E. coli* WDCM 0013 und den verschiedenen *A. annua* Extrakten, werden den Vergleich der Extraktionsmethoden, welche ohne die Zufuhr von Hitze realisiert wurden, wie die Extraktionen mit 60% Ethanol und Ethylacetat zu den Extraktionsmethoden mit Hitze, wie die Extraktionen mit Soxhlet und in der Mikrowelle zeigen. Weiter werden die Resultate des Well Diffusion Assays von drei einzelnen Fraktionen von EtoAC F11-17 mit dem Resultat der Gesamtfraktion EtoAC F11-17 verglichen. Die Ergebnisse der MALDI-TOF Analyse von EtoAC F11-17 werden gezeigt und in einem letzten Abschnitt sind die Resultate des Inhibierungs-Assay mit *B. burgdorferi* und EtoAC F11-17 in den 1.5 mL Reaktionsgefäße dargestellt.

### 4.1 Chromatogramme der Extrakte mit Einteilung der Fraktionen

In diesem Unterkapitel werden alle Resultate der Normalphasenchromatographien des Ethylacetat- Extraktes, Etherphase- Extraktes, Soxhlet Ethylacetat- Extraktes und des Dichlormethan Extraktes dargestellt. Alle Abbildungen zeigen ein Chromatogramm mit UV- aktiven Stoffen, welches die Auftrennung des jeweiligen Extraktes, von apolar gelösten Stoffen in Cyclohexan bis hin zu polar gelösten Stoffen in Ethylacetat aufzeigt. Auf der X- Achse ist die Zeitspanne von 18 min dargestellt und die Y-Achse zeigt das Detektorsignal. Das Chromatogramm ist von links nach rechts mit zunehmender Polarität der Stoffe zu lesen. Apolare Substanzen eluieren in der mobilen Phase, welche zu Beginn apolar ist (Cyclohexan) schneller und befinden sich im Chromatogramm zu Beginn der Laufzeit, also links im Chromatogramm. Mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels sprich der Gradient von Ethylacetat (polar) nimmt zu, welcher in den Abbildungen als blaue Linie von 0% bis 100% Ethylacetat dargestellt ist, eluieren polare Stoffe schneller. Die Auswahl der Fraktionen wurde einerseits nach ähnlicher Peakform und Höhe entschieden und andererseits mussten ähnliche Peaks zusammengenommen werden, damit eine gewisse Menge an Ausbeute für das Testen der Fraktionen ausreichte.

Die Normalphasenchromatographie des Ethylacetat-Extraktes ist in total sechs verschiedene Fraktionen eingeteilt worden, die im Chromatogramm in der Abbildung 15 zu sehen sind und in der Tabelle 4 ist die jeweilige Ausbeute der Fraktionen aufgelistet. Die Fraktion 9-10 zeigt einen hohen und schmalen Peak mit einem geringen Gehalt der aufgetrennten Komponenten, wobei die später eluierten Komponenten der Fraktionen 11-17 und 18-22 breitere und kleinere Peaks mit einem höheren Gehalt der aufgetrennten Komponenten zeigen. Die

Normalphasenchromatographie des Etherphase-Extraktes ist in total vier verschiedene Fraktionen eingeteilt worden, die im Chromatogramm in der Abbildung 16 zu sehen sind und in der Tabelle 5 ist die jeweilige Ausbeute der Fraktionen aufgelistet. In diesem Chromatogramm enthält die Fraktion 8-13 ein früh eluierter schmaler Peak mit einem geringen Gehalt der aufgetrennten Komponenten, die Fraktion 14-22 zeigt beinahe keine schön aufgelösten Peaks und die Fraktion 23-30 enthält einen spät eluierten hohen sowie breiten Peak mit einem höheren Gehalt der aufgetrennten Komponenten. Die Normalphasenchromatographie des Soxhlet Ethylacetat- Extraktes ist in total drei verschiedene Fraktionen eingeteilt worden, die im Chromatogramm in der Abbildung 17 zu sehen sind und in der Tabelle 6 ist die jeweilige Ausbeute der Fraktionen aufgelistet. Die Fraktion 2-16 enthält weniger schön aufgelöste Peaks mit ähnlicher Peakform und Höhe und die Fraktion 17-25 umfasst schmale und höhere Peaks als in Fraktion 2-16. In der Fraktion 26-37 sind breite und hohe Peaks mit einem hohen Gehalt der aufgetrennten Komponenten zu sehen. Die Normalphasenchromatographie des Dichlormethan-Extraktes ist in total drei verschiedene Fraktionen eingeteilt worden, die im Chromatogramm in der Abbildung 18 zu sehen sind und in der Tabelle 7 ist die jeweilige Ausbeute der Fraktionen aufgelistet. In diesem Chromatogramm enthält die Fraktion 10-13 früh eluierte schmale Peaks, Fraktion 14-19 kleinere und breitere Peaks und die Fraktion 20-25 spät eluierte breite Peaks.

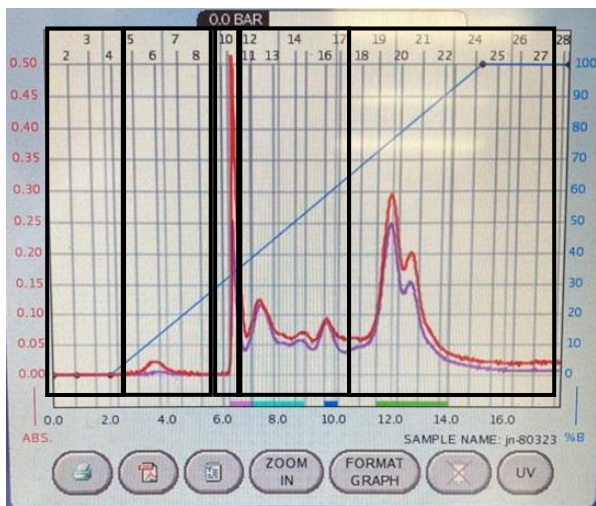


Abbildung 15: Chromatogramm des EtoAC- Extraktes eingeteilt in die sechs Fraktionen. Detektion von UV- aktiven Substanzen.

Tabelle 4: Fraktionen mit Ausbeute [mg] des EtoAC- Extraktes.

EtoAC-Fraktion Nummer	Tara Fraktionsglas [mg]	Tara Fraktionsglas plus Ausbeute [mg]	Ausbeute [mg]
Fraktion 1-4	15790.7	15830	39.3
Fraktion 5-8	15774.5	15791	16.5
Fraktion 9-10	16793.4	17104	310.6
Fraktion 11-17	15592.3	15915	322.7
Fraktion 18-22	15689.8	15806	116.2
Fraktion 23-28	15740.4	15782	41.6

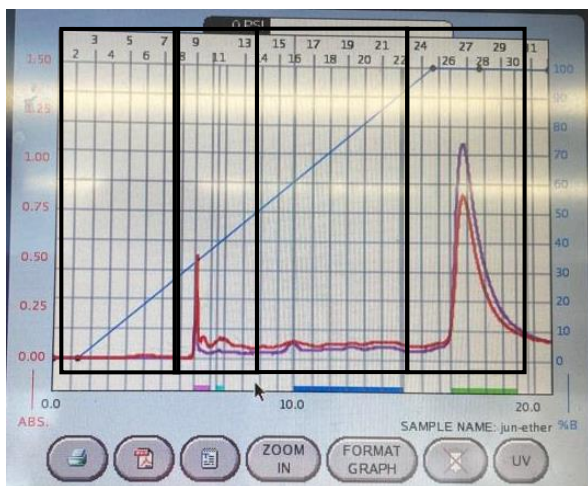


Abbildung 16: Chromatogramm des Etherphase- Extraktes eingeteilt in die vier Fraktionen. Detektion von UV- aktiven Substanzen.

Tabelle 5: Fraktionen mit Ausbeute [mg] des Etherphase- Extraktes.

Etherphase Fraktion Nummer	Tara Fraktionsglas [mg]	Tara Fraktionsglas plus Ausbeute [mg]	Ausbeute [mg]
Fraktion 1-7	12680	12943	263
Fraktion 8-13	12673	13022	349
Fraktion 14-22	12680	12943	263
Fraktion 23-30	12654	12811	157

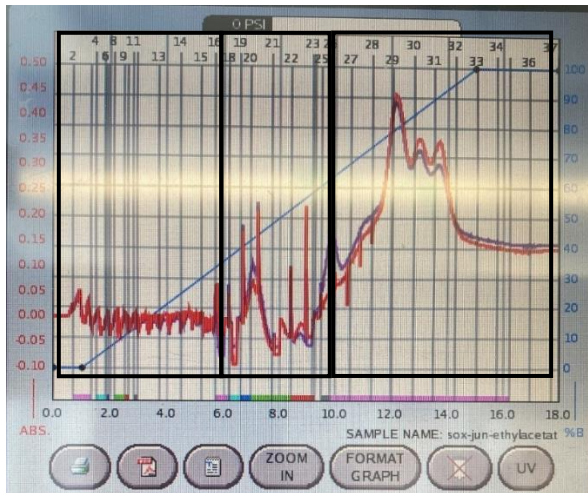


Abbildung 17: Chromatogramm des Soxhlet EtOAc- Extraktes eingeteilt in die drei Fraktionen. Detektion von UV- aktiven Substanzen.

Tabelle 6: Fraktionen mit Ausbeute [mg] des Soxhlet EtOAc- Extraktes.

Soxhlet EtOAc Fraktion Nummer	Tara Fraktionsglas [mg]	Tara Fraktionsglas plus Ausbeute [mg]	Ausbeute [mg]
Fraktion 2-16	12763	12941	178
Fraktion 17-25	12742	13114	372
Fraktion 26-37	12591	12772	181

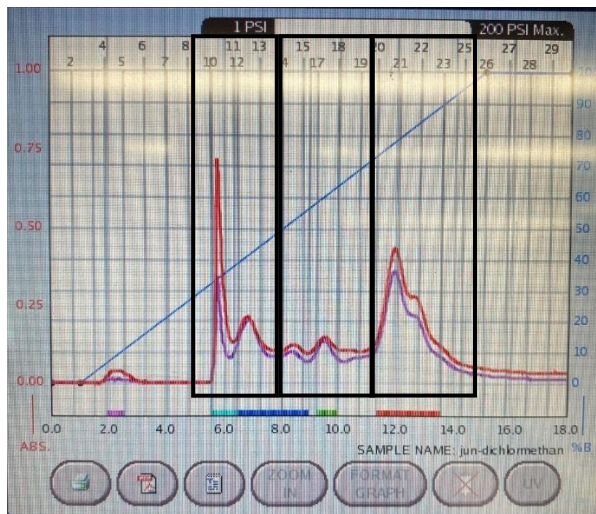


Abbildung 18: Chromatogramm des Dichlormethan- Extraktes eingeteilt in die drei Fraktionen. Detektion von UV- aktiven Substanzen.

Tabelle 7: Fraktionen mit Ausbeute [mg] des Dichlormethan- Extraktes.

Dichlormethan Fraktion Nummer	Tara Fraktionsglas [mg]	Tara Fraktionsglas plus Ausbeute [mg]	Ausbeute [mg]
Fraktion 10-13	13207	13960	753
Fraktion 14-19	12319	12490	171
Fraktion 20-25	13253	13384	131

## 4.2 Vorversuch Borrelien Färbung mit SYBR Green I/Propidium-Iodid

Die folgenden Abbildungen zeigen die Resultat des Vorversuchs zur Färbung von Borrelien Zellen mit SYBR Green I/PI. In den Abbildung 19 und Abbildung 20 ist die Färbung von *B. afzelii*, in den Abbildung 21 und Abbildung 22 die Färbung von *B. garinii* und in den Abbildung 23 und Abbildung 24 die Färbung von *B. burgdorferi* dargestellt. Die Abbildung 19 zeigt die Lebendprobe von *B. afzelii*, bei der die Zellen mit der SYBR Green I/PI Färbung und Detektion beider Farbstoffe nur in grün erscheinen und somit lebende Spirochäten bestätigt werden können. Die Abbildung 20 stellt eine Probe von *B. afzelii* dar mit Borrelien, welche mit Hitze inaktiviert wurden, eine Totprobe. Die Totprobe erscheint, nach der Färbung und Detektion beider Farbstoffe stark in rot, weshalb lebensunfähige und tote Borrelien bestätigt werden können. Die Abbildung 21 zeigt die Lebendprobe von *B. garinii*, bei der die Zellen mit der SYBR Green I/PI Färbung und Detektion beider Farbstoffe nur in grün erscheinen und somit lebende Spirochäten bestätigt werden können. Die Totprobe von *B. garinii* in Abbildung 22 zeigt, dass nicht alle Spirochäten lebensunfähig oder tot sind, da nur eine Spirochäte mit Propidiumiodid rot eingefärbt wurde. Die Lebendprobe von *B. burgdorferi* (Abbildung 23) bei der die Zellen mit der SYBR Green I/PI Färbung und Detektion beider Farbstoffe nur in grün erscheinen, können somit lebende Spirochäten bestätigt werden. Die Totprobe von *B. burgdorferi* in Abbildung 24 zeigt, dass die Ansammlung von den Spirochäten stark rot gefärbt ist und lebensunfähige und tote *B. burgdorferi* Spirochäten bestätigt werden können.

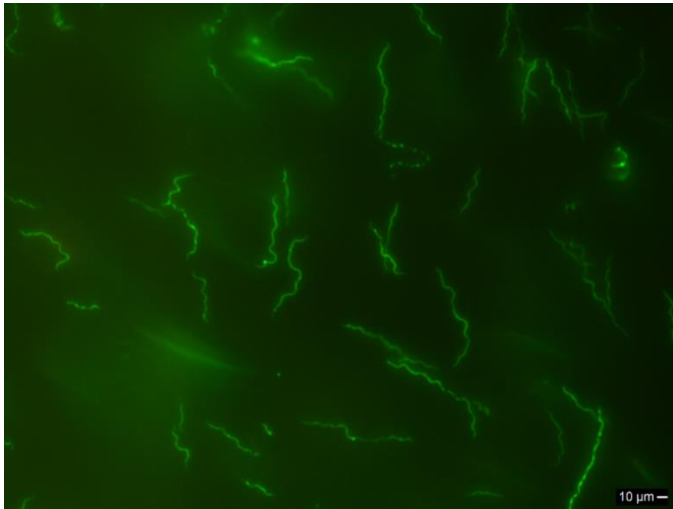


Abbildung 19: Lebendprobe von *B. afzelii* gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen SYBR Green I grün gefärbt

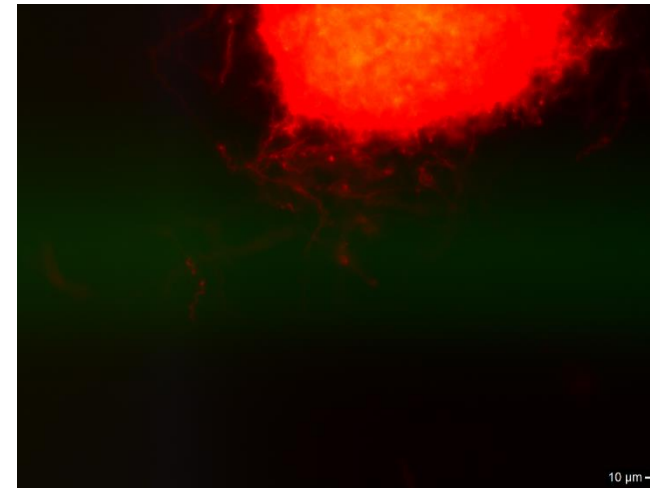


Abbildung 20: Totprobe von *B. afzelii* gefärbt mit SYBR Green I/PI angeregt mit Grünlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen Propidium-Iodid rot gefärbt.

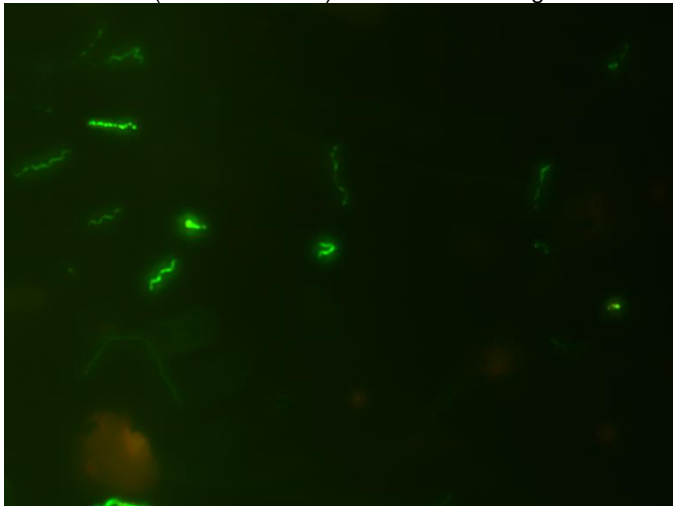


Abbildung 21: Lebendprobe von *B. garinii* gefärbt gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen SYBR Green I grün gefärbt

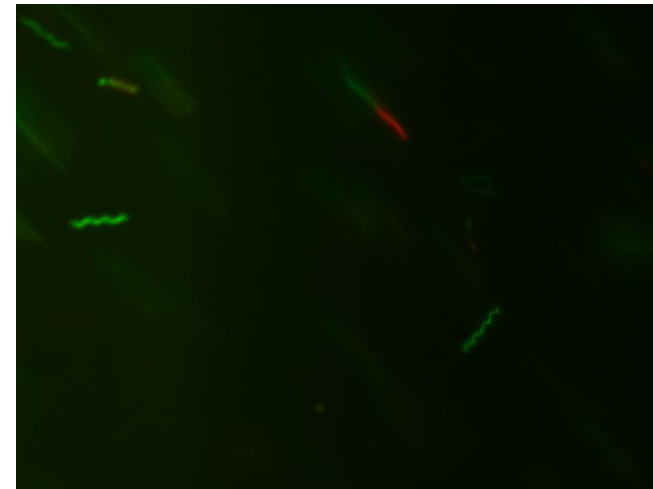


Abbildung 22: Totprobe von *B. garinii* gefärbt mit SYBR Green I/PI angeregt mit Grünlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen Propidium-Iodid rot gefärbt und tot.

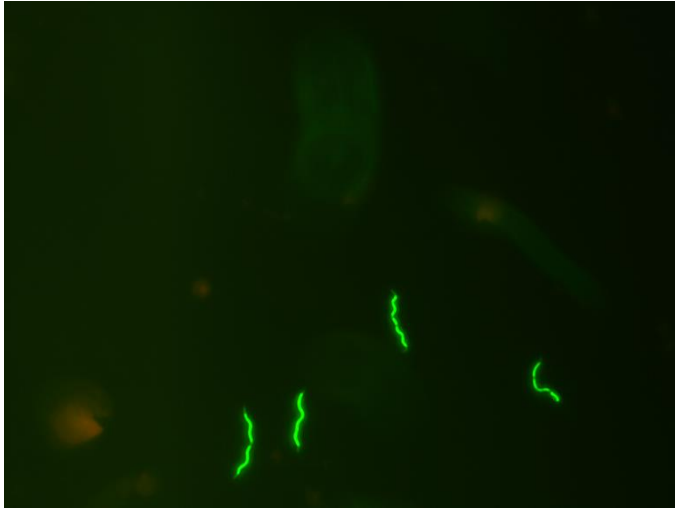


Abbildung 23: Lebendprobe *B. burgdorferi* gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen SYBR Green I grün gefärbt.

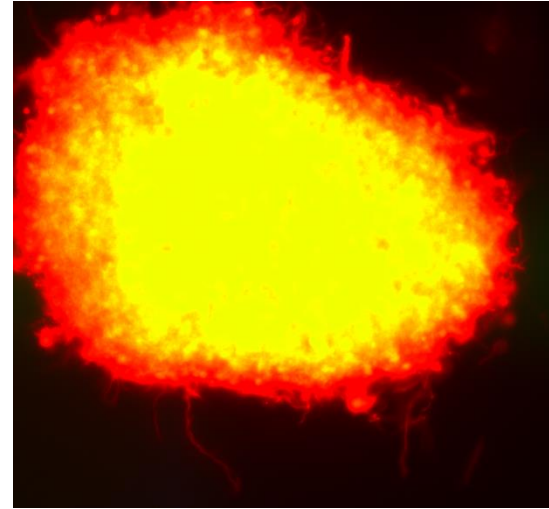


Abbildung 24: Totprobe *B. burgdorferi* gefärbt gefärbt mit SYBR Green I/ PI angeregt mit Grünlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$  ). Borrelien sind wegen Propidium-Iodid rot gefärbt und tot.

### 4.3 Assays mit *E. coli* WDCM 00013/ *S. aureus* DMSZ 766 und den Extrakten aus 3.2.1 und 3.2.2 (4 Extrakte)

In diesem Kapitel werden die Resultate der Assays Hemm Assay mit Omnilog, Disk Diffusion und Well Diffusion mit den vier Extrakten dargestellt. Die Tabelle 8 zeigt eine Zusammenfassung der Resultate von den drei Assays. Die beiden Extrakte Etherphase und Ethylacetat zeigen beim Well Diffusion Assay bei einer Konzentration von 100 mg/mL eine Hemmung des *E. coli* WDCM 0013 Wachstums. Es werden in den folgenden Unterkapiteln nur die Resultate abgebildet, welche eine Hemmung zeigten.

Tabelle 8: Übersicht über die Resultate der drei verschiedenen Assays, Hemm Assay mit Omnilog, Disk Diffusion und Well Diffusion mit den vier *A. annua* Extrakten. Stärker markiert sind die *A. annua* Extrakte welche eine Hemmung des *E. coli* WDCM 0013 Wachstums zeigten.

Substanz	Omnilog	Disk Diffusion	Well Diffusion
Etherphase-Extrakt	5 mg/mL: keine Hemmung 0.5 mg/mL: keine Hemmung 0.05 mg/mL: keine Hemmung	100 mg/mL: keine Hemmung	10 mg/mL: <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> keine Hemmung <b>100 mg/mL: <i>E. coli</i> Hemmung</b> <i>S. aureus</i> keine Hemmung
Wässriger-Extrakt	5 mg/mL: keine Hemmung 0.5 mg/mL: keine Hemmung 0.05 mg/mL: keine Hemmung	100 mg/mL: keine Hemmung	10 mg/mL: <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> keine Hemmung 100 mg/mL <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> keine Hemmung
Ethylacetat-Extrakt	5 mg/mL: keine Hemmung 0.5 mg/mL: keine Hemmung 0.05 mg/mL: keine Hemmung	100 mg/mL: keine Hemmung	10 mg/mL: <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> keine Hemmung <b>100 mg/mL: <i>E. coli</i> Hemmung</b> <i>S. aureus</i> keine Hemmung

<b>Substanz</b>	<b>Omnilog</b>	<b>Disk Diffusion</b>	<b>Well Diffusion</b>
60% Ethanol-Extrakt	5 mg/mL: keine Hemmung 0.5 mg/mL: keine Hemmung 0.05 mg/mL: keine Hemmung	100 mg/mL: keine Hemmung	10 mg/mL: <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> keine Hemmung 100 mg/mL <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> keine Hemmung
Artemisinin	0.1 mg/mL: keine Hemmung	2 mg/mL: keine Hemmung	2 mg/ mL: <i>E. coli</i> Hemmung und <i>S. aureus</i> keine Hemmung
Minocycline	5 µg/mL: Hemmung	0.1 mg/mL: Hemmung	0.1 mg/mL: <i>E. coli</i> und <i>S. aureus</i> Hemmung
DMSO	5%: keine Hemmung	100%: keine Hemmung	100%: <i>E. coli</i> Hemmung und <i>S. aureus</i> keine Hemmung

### 4.3.1 Inhibierungs- Assay mit Omnilog (4 Extrakte)

Die Abbildung 25 zeigt die Resultate der Messung im Omnilog von den drei Kontrollen Minocycline [5 µg/mL], Artemisinin [0.1 mg/mL] und DMSO bei einer Konzentration von 50%. Nur Minocycline zeigt eine Hemmung des Wachstums von *E. coli* WDCM 0013. Abbildung 26 und Abbildung 27 sind Aufnahmen der 96- well Platte, welche für den Inhibierungs- Assay im Omnilog gebraucht wurden. Dabei stellt die Abbildung 26 die Platte zu Beginn der Messung, Zeitpunkt 0 h dar und die Abbildung 27 zeigt die Platte am Ende der Omnilog Messung nach 72 h. Ein Farbumschlag von hell zu violett der wells von der Platte bei Zeitpunkt 0 h zu Zeitpunkt 72 h ist deutlich ersichtlich. Informationen über die Belegung der Platte kann vom Schema der Platte im Kapitel 3.4.1 entnommen werden. Einzig die beiden wells, welche mit Minocycline behandelt wurden, sind in der Abbildung 26 und Abbildung 27 blau umkreist, zeigen keinen Farbwechsel und eine Inhibierung des Wachstums von *E. coli* WDCM 0013 kann bestätigt werden.

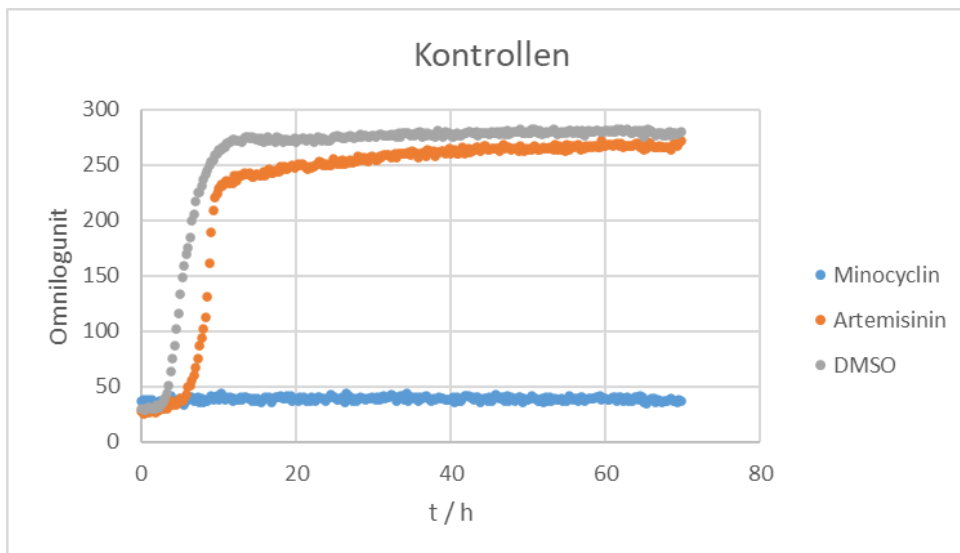


Abbildung 25: Inhibierungs- Assay mit Omnilog der drei Kontrollen Minocycline, Artemisinin und DMSO. In blau ist der Verlauf der Omnilogunits (OU) über eine Zeitspanne von 72h von Minocycline [5µg/mL] dargestellt. In orange ist der Verlauf der OU über eine Zeitspanne von 72h von Artemisinin [0.1 mg/mL] dargestellt und in in grau wird der Verlauf der OU über 72h von DMSO bei einer Konzentration von 50% gezeigt.



Abbildung 26: Aufnahme der Platte des Hemm- Assays mit Omnilog der vier Extrakte zum Zeitpunkt 0h.



Abbildung 27: Aufnahme der Platte des Hemm- Assays mit Omnilog der vier Extrakte zum Zeitpunkt nach 72h.

### 4.3.2 Disk Diffusion Assay (4 Extrakte)

Die Abbildung 28 und Abbildung 29 zeigen das Resultat des Disk Diffusion Assay mit den vier Extrakten auf *E. coli* WDCM 0013. Abbildung 28, stellt das Resultat des Disk Diffusion mit dem Wattestabchen und Abbildung 29 das Resultat mit dem Spatel dar. Keine Hemmungen der Extrakte sind zu sehen, nur Minocycline [0.1 mg/mL] als positiv Kontrolle zeigte auf beiden Platten eine inhibitorische Wirkung. DMSO als negativ Kontrolle bei einer Konzentration von 100% zeigte wie erwartet keine Hemmung und Artemisinin [2 mg/mL] als positiv Kontrolle zeigte auf beiden Platten keine Hemmung.

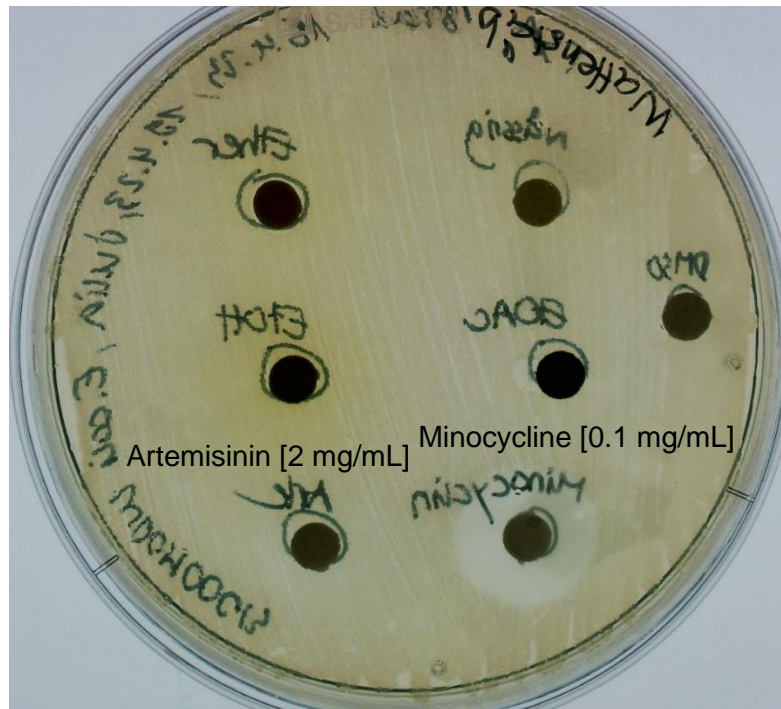


Abbildung 28: Disk Diffusion Platte mit *E. coli* WDCM 0013 und den vier Extrakten. *E. coli* WDCM 0013 wurde mit einem Wattestabchen auf der Platte verteilt. Aufnahme der Platte nach 24 h.

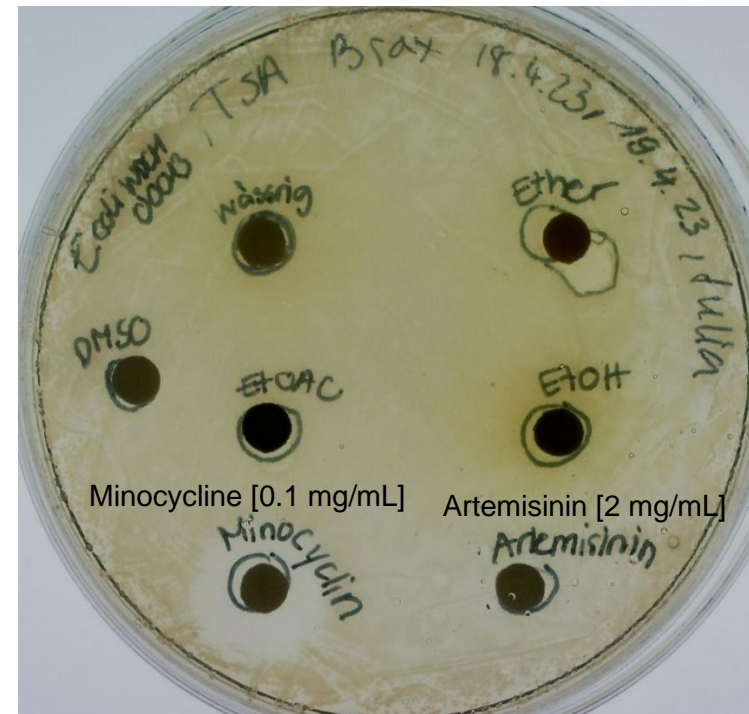


Abbildung 29: Disk Diffusion Platte mit *E. coli* WDCM 0013 und den vier Extrakten. *E. coli* WDCM 0013 wurde mit einem Spatel auf der Platte verteilt. Aufnahme der Platte nach 24 h.

### 4.3.3 Well Diffusion Assay (4 Extrakte)

Die vier Abbildungen zeigen, dass die beiden Extrakte, der Etherphase- Extrakt und der Ethylacetat- Extrakt einen Hemmhof von *E. coli* WDCM 0013 (Abbildung 30) bildeten. Die beiden positiv Kontrollen Artemisinin [2 mg/mL] (Abbildung 31) und Minocycline [0.1 mg/mL] (Abbildung 32) weisen beide einen Hemmhof auf und DMSO 100%, als negativ Kontrolle keinen.



Abbildung 30: *E. coli* WDCM 0013 mit 100 mg/mL Pflanzenextrakte nach 24 h. **Oben links:** Etherphase- Extrakt, **oben rechts:** wässriger Extrakt, **unten:** Ethylacetat- Extrakt

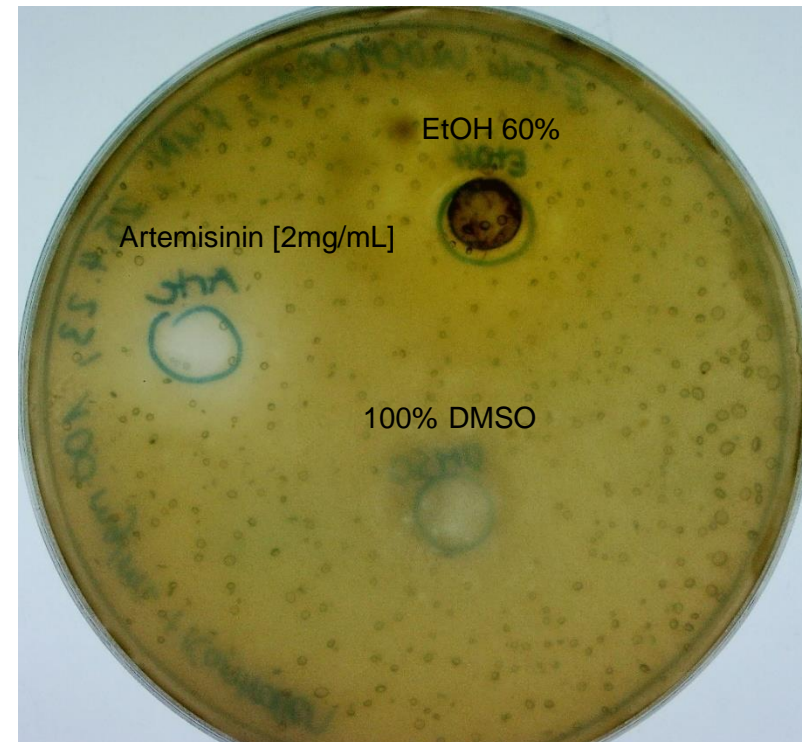


Abbildung 31: *E. coli* WDCM 0013 mit 100 mg/mL Pflanzenextrakte und Kontrollen nach 24 h. **Oben links:** Kontrolle Artemisinin 2 mg/mL, **oben rechts:** 60% Ethanol - Extrakt [100 mg/mL], **unten:** Kontrolle DMSO 100%.

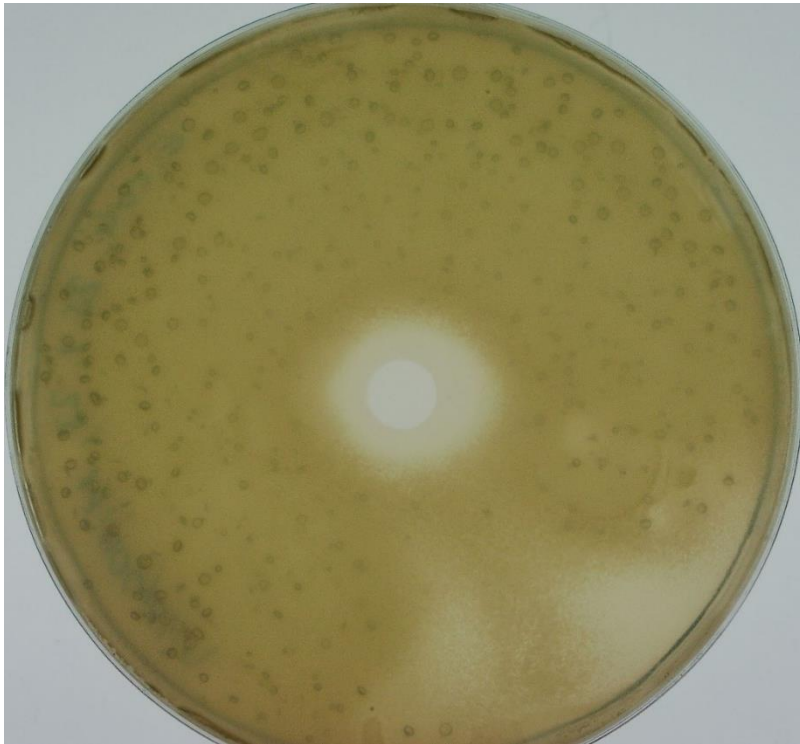


Abbildung 32: *E. coli* WDCM 0013 mit Minocycline [0.1 mg/mL] nach 24 h.

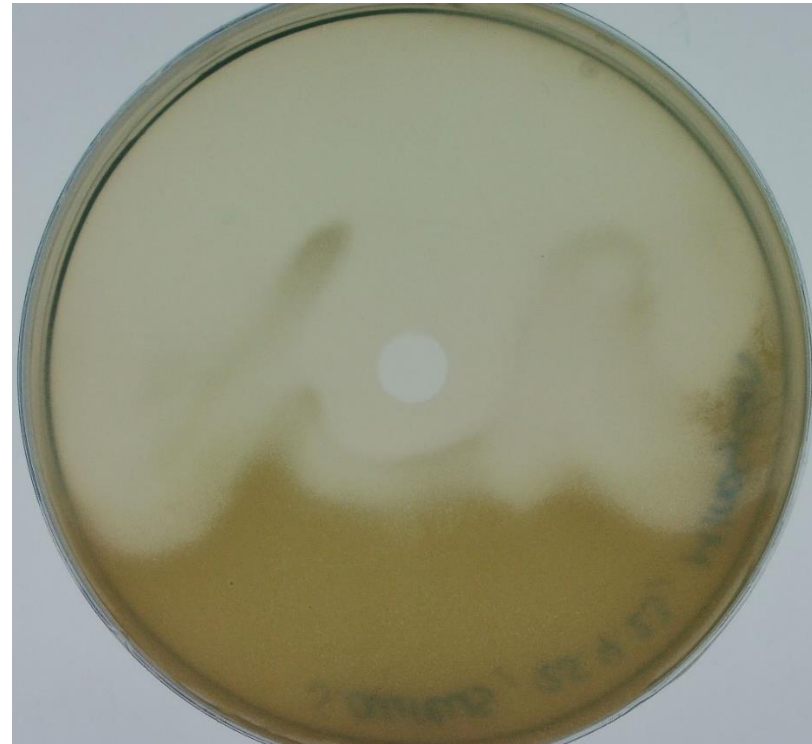


Abbildung 33: *S. aureus* DMSZ 766 mit Minocycline [0.1 mg/mL] nach 24 h.

#### 4.4 Assays mit *E. coli* WDCM 00013 und den Extrakten aus 3.2.1 bis und mit 3.2.4 (21 Extrakte)

In diesem Kapitel werden die Resultate der beiden Assays Well Diffusion und Hemm Assay mit Omnilog mit den 21 Extrakten dargestellt. Die Tabelle 9 zeigt eine Zusammenfassung der Resultate von den beiden Assays. Eine mit einem Fragezeichen gekennzeichnete Hemmung weist darauf hin, dass bei Extrakten mit starker Eigenfärbung keine eindeutige Bestimmung gemacht werden konnte. Die Etherphase Fraktion 8-13, der Soxhlet EtoAC- Extrakt und die EtoAC Fraktion 11-17 zeigen beim Omnilog und Well Diffusion Assay eine Hemmung des *E. coli* WDCM 00013 Wachstums. Abgebildet sind nur die Resultate, welche beim Omnilog oder beim Well Diffusion Assay eine eindeutige Hemmung zeigten.

Tabelle 9: Übersicht über die Resultate der zwei Assays, Hemm Assay mit Omnilog und Disk Diffusion mit den 21 *A. annua* Extrakten. Stärker markiert sind die *A. annua* Extrakte welche eine eindeutige Hemmung des *E. coli* WDCM 00013 Wachstums zeigten. Hemmung ? bedeutet, dass keine eindeutige Hemmung bestätigt werden kann, wegen der starken Eigenfärbung der Extrakte.

Substanz	Omnilog	Well Diffusion
Etherphase Extrakt	<b>5 mg/mL: Hemmung</b>	100 mg/mL: Keine Hemmung
	0.5 mg/mL: Keine Hemmung	10 mg/mL: Keine Hemmung
Etherphase F1-7	5 mg/mL: Keine Hemmung	100 mg/mL: Keine Hemmung
	0.5 mg/mL: Keine Hemmung	10 mg/mL: Keine Hemmung
<b>Etherphase F8-13</b>	<b>5 mg/mL: Hemmung</b>	<b>100 mg/mL: Hemmung</b>
	0.5 mg/mL: Keine Hemmung	10 mg/mL: Keine Hemmung
Etherphase F14-22	<b>5 mg/mL: Hemmung</b>	100 mg/mL: Keine Hemmung
	0.5 mg/mL: Keine Hemmung	10 mg/mL: Keine Hemmung
Etherphase F23-30	5 mg/mL: Keine Hemmung	100 mg/mL: Keine Hemmung
	0.5 mg/mL: Keine Hemmung	10 mg/mL: Keine Hemmung

<b>Substanz</b>	<b>Omnilog</b>	<b>Well Diffusion</b>
<b>Soxhlet EtoAC (starke Eigenfärbung)</b>	<b>5 mg/mL: Hemmung ?</b> 0.5 mg/mL: Keine Hemmung	<b>100 mg/mL: Schwache Hemmung</b> 10 mg/mL: Keine Hemmung
Soxhlet EtoAC F2-16	5 mg/mL: Keine Hemmung 0.5 mg/mL: Keine Hemmung	100 mg/mL: Keine Hemmung 10 mg/mL: Keine Hemmung
Soxhlet EtoAC F17-25 (starke Eigenfärbung )	5 mg/mL: Hemmung ? 0.5 mg/mL: Keine Hemmung	100 mg/mL: Keine Hemmung 10 mg/mL: Keine Hemmung
Soxhlet EtoAC F26-37 (starke Eigenfärbung )	5 mg/mL: Hemmung ? 0.5 mg/mL: Keine Hemmung	100 mg/mL: Keine Hemmung 10 mg/mL: Keine Hemmung
EtoAC Extrakt (starke Eigenfärbung )	5 mg/mL: Hemmung ? 0.5 mg/mL: Keine Hemmung	100 mg/mL: <b>Hemmung</b> 10 mg/mL: Keine Hemmung
EtoAC F1-4	5 mg/mL: Keine Hemmung 0.5 mg/mL: Keine Hemmung	100 mg/mL: Keine Hemmung 10 mg/mL: Keine Hemmung
EtoAC F5-8	5 mg/mL: Keine Hemmung 0.5 mg/mL: Keine Hemmung	100 mg/mL: Keine Hemmung 10 mg/mL: Keine Hemmung
EtoAC F9-10	5 mg/mL: Keine Hemmung 0.5 mg/mL: Keine Hemmung	100 mg/mL: Keine Hemmung 10 mg/mL: Keine Hemmung
<b>EtoAC F11-17 (starke Eigenfärbung)</b>	<b>5 mg/mL: Hemmung ?</b> 0.5 mg/mL: Keine Hemmung	<b>100 mg/mL: Hemmung</b> <b>10 mg/mL: Hemmung sehr stark</b>
EtoAC F18-22 (starke Eigenfärbung)	5 mg/mL: Hemmung ? 0.5 mg/mL: Keine Hemmung	100 mg/mL: Keine Hemmung 10 mg/mL: Keine Hemmung

Substanz	Omnilog	Well Diffusion
EtoAC F23-28 (starke Eigenfärbung)	5 mg/mL: Hemmung ? 0.5 mg/mL: Keine Hemmung	100 mg/mL: Keine Hemmung 10 mg/mL: Keine Hemmung
Microwave EtoAC (starke Eigenfärbung)	5 mg/mL: Hemmung ? 0.5 mg/mL: Keine Hemmung	100 mg/mL: Keine Hemmung 10 mg/mL: Keine Hemmung
Dichlormethan- Extrakt	wurde nicht gemacht	100 mg/mL: Keine Hemmung 10 mg/mL: Keine Hemmung
Dichlormethan F10-13	wurde nicht gemacht	100 mg/mL: Keine Hemmung 10 mg/mL: Keine Hemmung
Dichlormethan F14-19	wurde nicht gemacht	100 mg/mL: Keine Hemmung 10 mg/mL: Keine Hemmung
Dichlormethan F20-25	wurde nicht gemacht	100 mg/mL: Keine Hemmung 10 mg/mL: Keine Hemmung
Artemisinin	0.1 mg/mL: Keine Hemmung	2 mg/ mL: 1x Hemmung und 1x keine Hemmung
Minocycline	5 µg/mL: Hemmung	mg/mL: 1x Hemmung und 1x keine Hemmung
DMSO	5%: Keine Hemmung	100%: Keine Hemmung

#### 4.4.1 Well Diffusion (21 Extrakte)

Die sechs Abbildungen zeigen, dass im Well Diffusion Assay mit *E. coli* WDCM 0013 die Etherphase Fraktion 8-13 (Abbildung 34), der Soxhlet EtoAC- Extrakt (Abbildung 35) und die EtoAC Fraktion 11-17 (Abbildung 36 und Abbildung 37) eine Hemmhof bei Konzentrationen von 100 mg/mL aufweisen. Die EtoAC Fraktion 11-17 zeigt auch bei einer Konzentration von 10 mg/mL einen Hemmhof (Abbildung 36). Die beiden positiv Kontrollen Artemisinin [2 mg/mL] (Abbildung 38) und Minocycline [0.1 mg/mL] (Abbildung 39) weisen beide einen Hemmhof auf und DMSO 100% keinen.



Abbildung 34: *E. coli* mit 100 mg/mL Etherphase-Extrakt Fraktionen nach 24 h. **Oben links:** Etherextrakt F8-13, **oben rechts:** Etherextrakt F1-7, **unten:** Etherextrakt F14-22.



Abbildung 35: *E. coli* mit 100 mg/mL Etherphase-Extrakt Fraktionen und Soxhlet EtoAC-Fraktion nach 24 h. **Oben links:** Soxhlet EtoAC, **oben rechts:** Etherextrakt F23-30, **unten:** Soxhlet EtoAC F2-16.

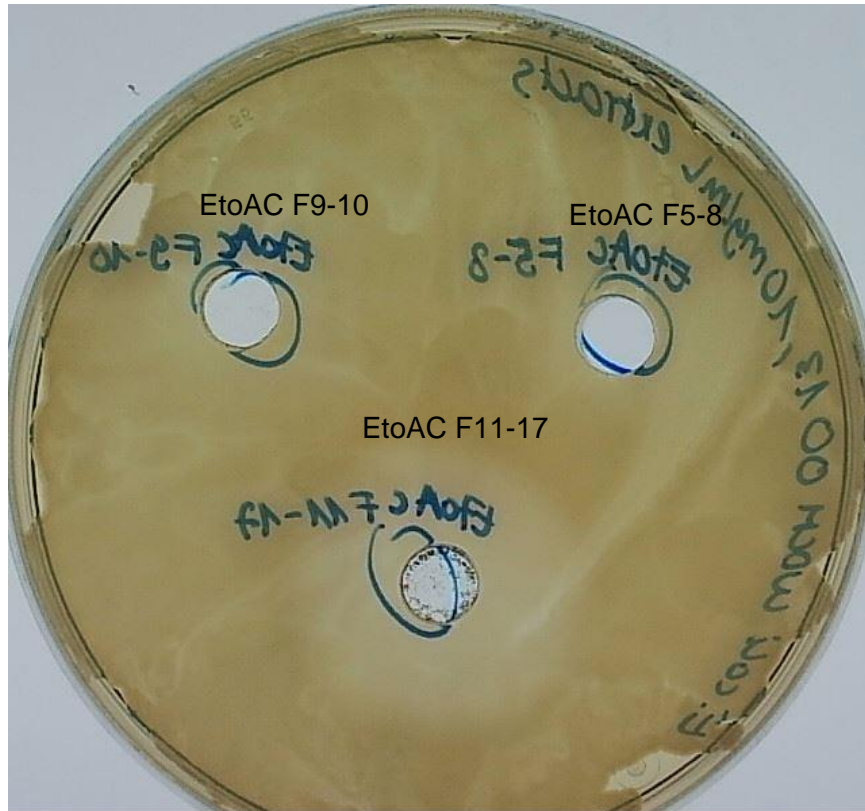


Abbildung 36: *E.coli* mit 10 mg/mL EtoAC-Fractionen nach 24 h. **Oben links:** EtoAC F9-19, **oben rechts:** EtoAC F5-8, **unten:** EtoAC F11-17

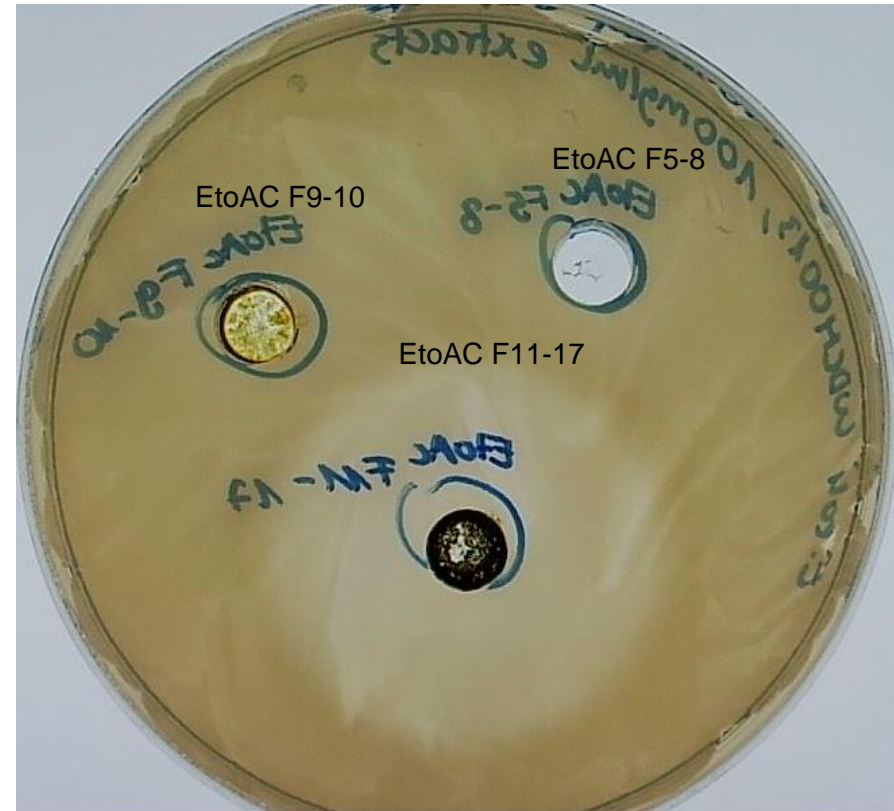


Abbildung 37: *E.coli* mit 100 mg/mL EtoAC-Fractionen nach 24 h. **Oben links:** EtoAC F9-19, **oben rechts:** EtoAC F5-8, **unten:** EtoAC F11-17.

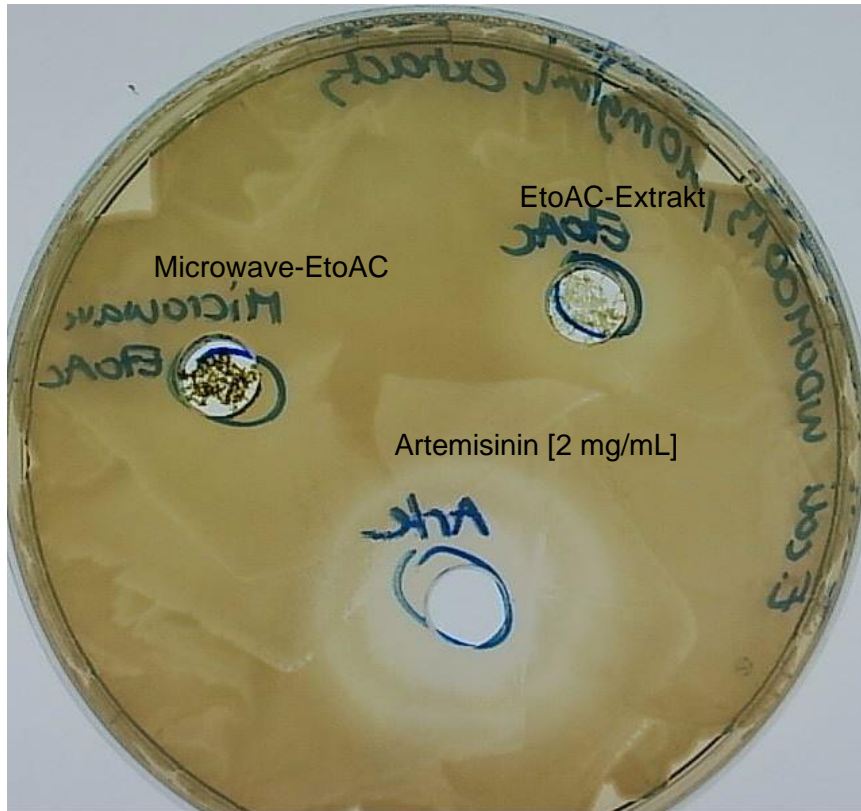


Abbildung 38: *E.coli* mit 10 mg/mL EtoAC-Extrakt, Microwave-EtoAC und Artemisinin nach 24 h. **Oben links:** Microwave-EtoAC, **oben rechts:** EtoAC-Extrakt, **unten:** Artemisinin [2 mg/mL]

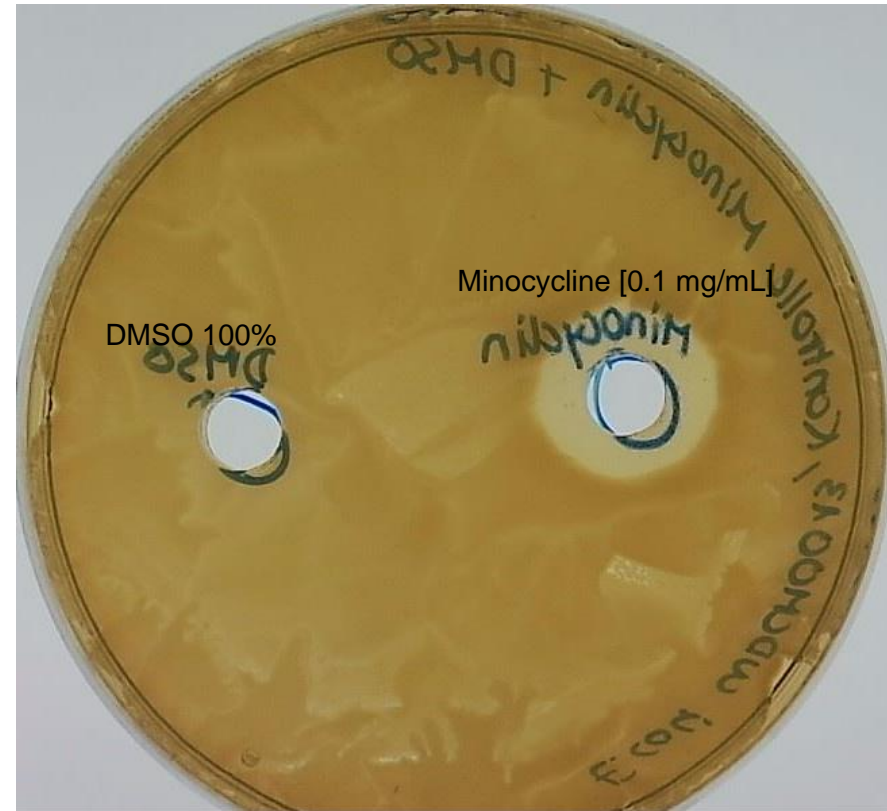


Abbildung 39: *E.coli* mit Kontrollen Minocycline und DMSO (Repilkat) nach 24 h. **Oben links:** DMSO 100%, **oben rechts:** Minocycline [0.1 mg/mL]

#### 4.4.2 Inhibierungs- Assay mit Omnilog (17 Extrakte)

##### Etherphase-Extrakt

Der Etherphase-Extrakt zeigt in der Abbildung 40 den Verlauf der Omnilogunits für 5 mg/mL und 0.5 mg/mL. Die Ausprägung der Farbbildung wird in Omnilogunits (OU-Einheiten) erfasst und eine Farbänderung zu violett lässt sich auf den zellulären Stoffwechsel zurückführen, wobei Aussagen über das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 gemacht werden können. Der Verlauf von 5 mg/mL Etherphasextrakt beginnt bereits bei hohem Omnilogunit, wegen der starken Eigenfärbung und zeigt kein Anstieg des *E. coli* WDCM 0013 Wachstums. Im Gegensatz dazu zeigt eine Konzentration von 0.5 mg/mL ein starkes Wachstum von *E. coli* WDCM 0013. Die Abbildung 41, zeigt eine Aufnahme der Platte beim Startpunkt der Omnilog Messung, nach 0h (A) und eine Aufnahme der Platte am Ende der Omnilog Messung, nach 24.25 h (B). Ein Vergleich der Platte A zu B zeigt die Farbänderungen für 5 mg/mL, blau markiert und für 0.5 mg/mL, orange markiert. 5 mg/mL Etherphase-Extrakt weist keine Farbänderung zu violett auf und in Bezug auf die Abbildung 1 ist eine Hemmung des Wachstums von *E. coli* WDCM 0013 zu sehen. 0.5 mg/mL Etherphase-Extrakt hingegen, zeigt eine starke Farbveränderung von weiss (0 h) zu violett (24.25 h) was bedeutet, dass ein Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 somit keine Inhibierung anzeigt.

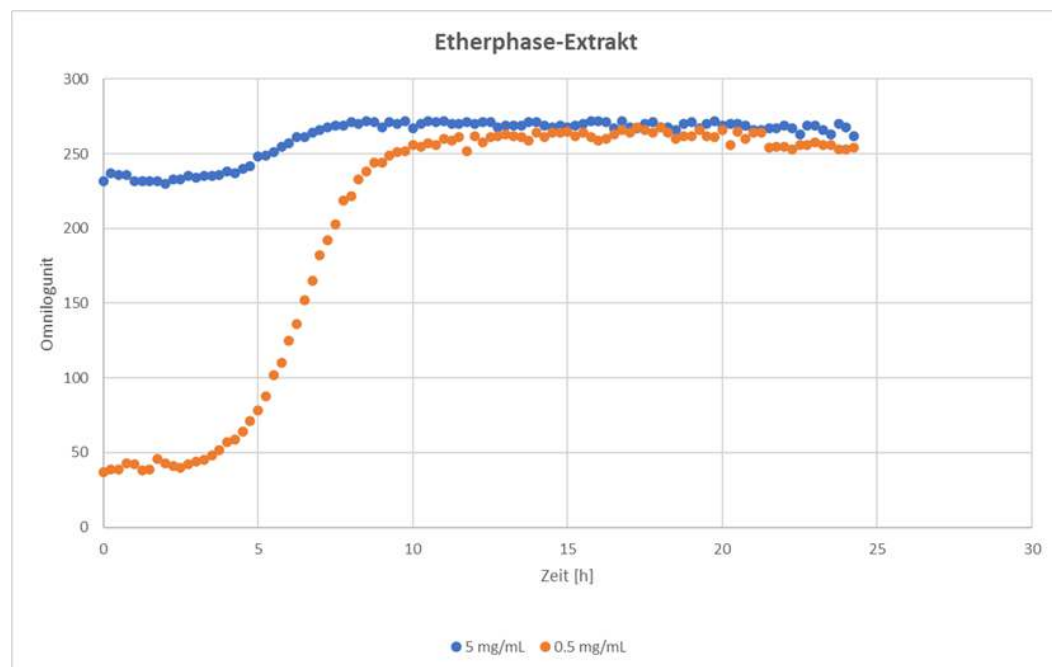


Abbildung 40: Hemm-Assay mit Omnilog des Etherphase-Extraktes mit *E. coli* WDCM0013. In blau ist der Verlauf der Omnilogunits (OU) bei einer Konzentration von 5 mg/mL Etherphase-Extrakt und in orange bei einer Konzentration von 0.5 mg/mL dargestellt.

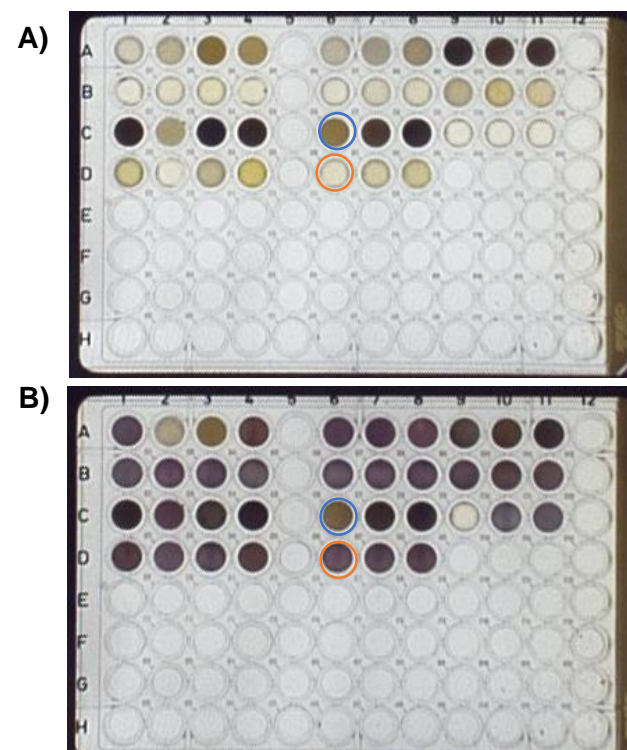


Abbildung 41: Etherphase-Extrakt A) Platte bei 0h B) Platte nach 24.25 h

### Etherphase Fraktion 8-13

Der Etherphase-Extrakt der Fraktionen 8-13 zeigt in der Abbildung 42 den Verlauf der Omnilogunits für 5 mg/mL und 0.5 mg/mL. Die Ausprägung der Farbbildung wird in Omnilogunits (OU-Einheiten) erfasst und eine Farbänderung zu violett lässt sich auf den zellulären Stoffwechsel zurückführen, wobei Aussagen über das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 gemacht werden können. Der Verlauf von 5 mg/mL zeigt eine Abnahme des Wachstums von *E. coli* WDCM 0013 und 0.5 mg/mL zeigt ein starkes Wachstum von *E. coli* WDCM 0013. Die Abbildung 43 zeigt eine Aufnahme der Platte beim Startpunkt der Omnilog Messung, nach 0h (A) und eine Aufnahme der Platte am Ende der Omnilog Messung, nach 24.25h (B). Ein Vergleich von A mit B zeigt die Farbänderungen für 5mg/mL, blau markiert und für 0.5 mg/mL, orange markiert. 5 mg/mL Etherphase-Extrakt der Fraktionen 8-13 zeigt keine Farbveränderung, nach 0h sowie nach 24.25 h ist eine helle Farbe zu sehen und eine Hemmung kann im Vergleich zur Abbildung 7 bestätigt werden. 0.5 mg/mL Etherphase-Extrakt der Fraktionen 8-13 weist einen Farbumschlag von hell (0h) zu violett (24.25h) auf, was bedeutet, dass ein Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 somit keine Inhibierung anzeigt.

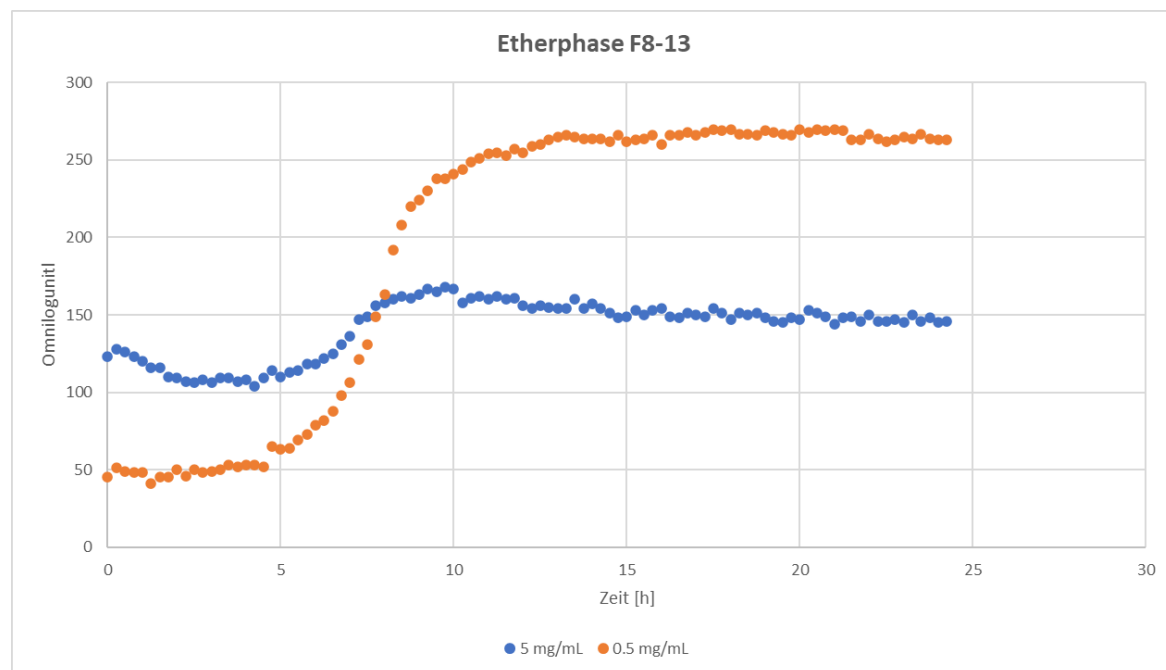


Abbildung 42: Hemm- Assay mit Omnilog der Etherphase Fraktion 8-13 mit *E. coli* WDCM0013. In blau ist der Verlauf der Omnlogunits (OU) bei einer Konzentration von 5 mg/mL Etherphase Fraktion 8-13 und in orange bei einer Konzentration von 0.5 mg/mL dargestellt.

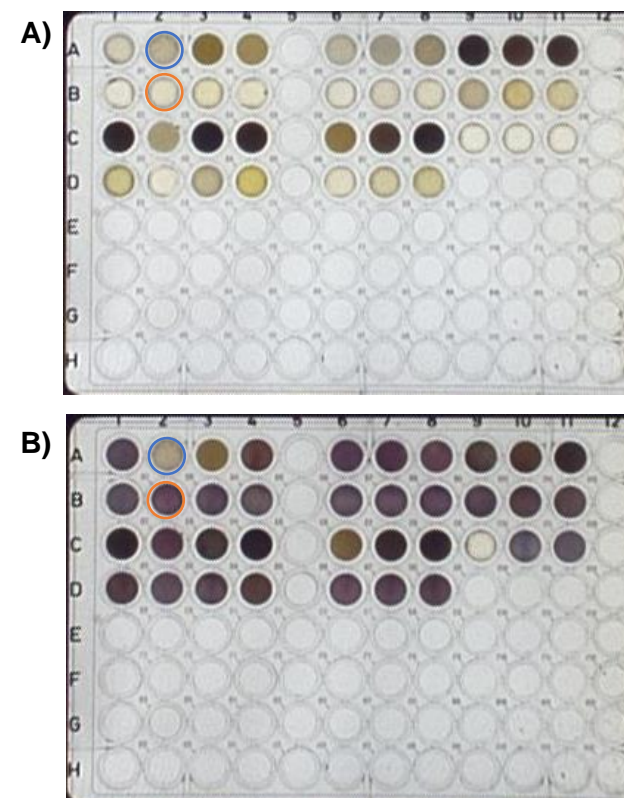


Abbildung 43: Etherphase Fraktion 8-13 **A)** Platte bei 0h **B)** Platte nach 24.25 h.

### Etherphase-Fraktion 14-22

Der Etherphase-Extrakt der Fraktionen 14-22 zeigt in der Abbildung 44 den Verlauf der Omnilogunits für 5 mg/mL und 0.5 mg/mL. Die Ausprägung der Farbbildung wird in Omnilogunits (OU-Einheiten) erfasst und eine Farbänderung zu violett lässt sich auf den zellulären Stoffwechsel zurückführen, wobei Aussagen über das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 gemacht werden können. Der Verlauf von 5 mg/mL zeigt keine Veränderung des Wachstums von *E. coli* WDCM 0013 und 0.5 mg/mL zeigt ein starkes Wachstum von *E. coli* WDCM 0013. Die Abbildung 45 zeigt eine Aufnahme der Platte beim Startpunkt der Omnilog Messung, nach 0h (A) und eine Aufnahme der Platte am Ende der Omnilog Messung, nach 24.25 h (B). Ein Vergleich von A zu B zeigt die Farbänderungen für 5 mg/mL, blau markiert und für 0.5 mg/mL, orange markiert. 5 mg/mL Etherphase-Extrakt der Fraktionen 14-22 zeigt keine Farbveränderung, nach 0h sowie nach 24.25h ist eine helle Farbe zu sehen und eine Hemmung kann im Vergleich zur Abbildung 10 bestätigt werden. 0.5 mg/mL Etherphase-Extrakt der Fraktionen 14-22 weist einen Farbumschlag von hell (0 h) zu violett (24.25 h) auf, was bedeutet, dass ein Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 somit keine Inhibierung anzeigt.

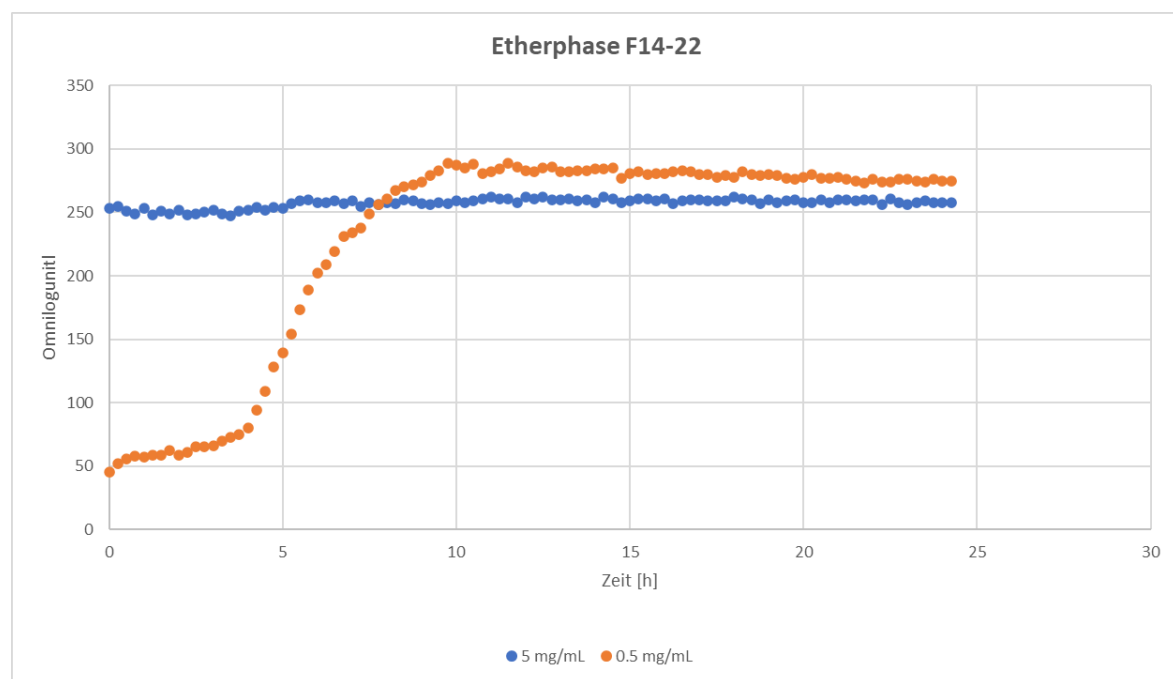


Abbildung 44: Hemm- Assay mit Omnilog der Etherphase Fraktion 14-22 mit *E. coli* WDCM0013. In blau ist der Verlauf der Omnilogunits (OU) bei einer Konzentration von 5 mg/mL Etherphase Fraktion 14-22 und in orange bei einer Konzentration von 0.5 mg/mL dargestellt.

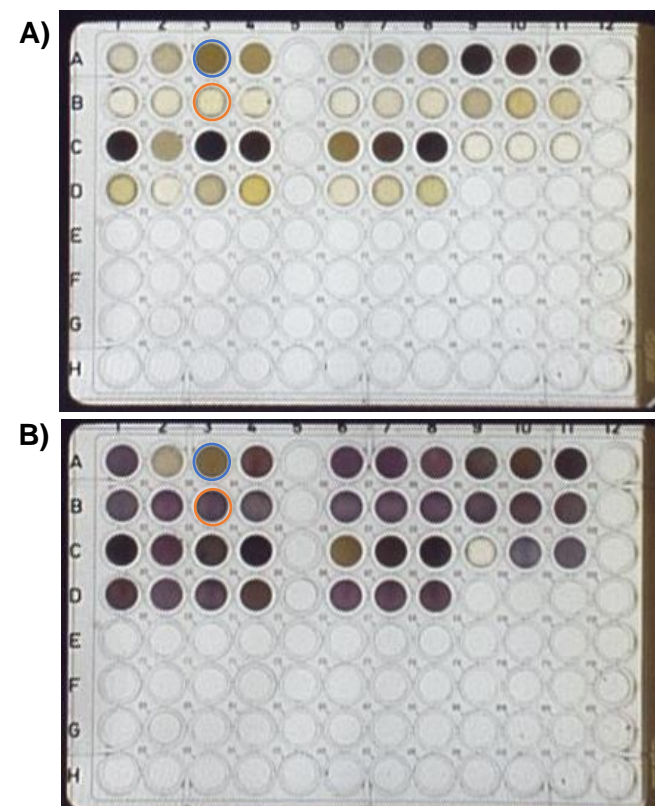


Abbildung 45: Etherphase Fraktion 14-22 **A)** Platte bei 0h **B)** Platte nach 24.25 h.

### Soxhlet EtoAC

Der Soxhlet EtoAC Extrakt zeigt in der Abbildung 46 den Verlauf der Omnilogunits für 5 mg/mL und 0.5 mg/mL. Die Ausprägung der Farbbildung wird in Omnilogunits (OU-Einheiten) erfasst und eine Farbänderung zu violett lässt sich auf den zellulären Stoffwechsel zurückführen, wobei Aussagen über das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 gemacht werden können. Der Verlauf von 5 mg/mL zeigt keine Veränderung des Wachstums von *E. coli* WDCM 0013 und 0.5 mg/mL zeigt ein starkes Wachstum von *E. coli* WDCM 0013. Die Abbildung 47 zeigt eine Aufnahme der Platte beim Startpunkt der Omnilog Messung, nach 0h (A) und eine Aufnahme der Platte am Ende der Omnilog Messung, nach 24.25 h (B). Ein Vergleich von A zu B zeigt die Farbänderungen für 5 mg/mL, blau markiert und für 0.5 mg/mL, orange markiert. 5 mg/mL Soxhlet EtoAC Extrakt zeigt keine Farbveränderung, bereits zu Beginn ist wegen einer starken Eigenfärbung die Probe dunkel gefärbt. Eine Aussage über das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 machen zu können ist somit schwierig. Die Probe wurde unter dem Umkehrlichtmikroskop betrachtet und keine *E. coli* Stäbchen konnten beobachtet werden und im Vergleich zur Abbildung 16 kann von einer Hemmung ausgegangen werden. 0.5 mg/mL Soxhlet EtoAC- Extrakt weist einen Farbumschlag von hell (0 h) zu violett (24.25 h) auf, auf was bedeutet, dass ein Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 somit keine Inhibierung anzeigt.

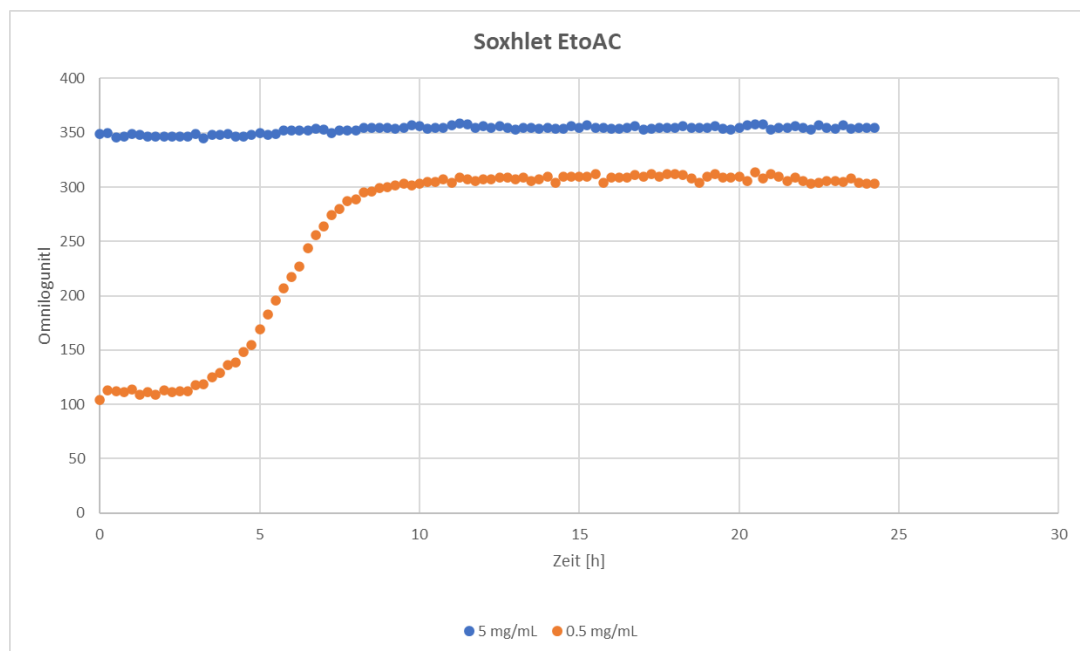


Abbildung 46: Hemm- Assay mit Omnilog des Soxhlet EtoAC Extraktes mit *E. coli* WDCM0013. In blau ist der Verlauf der Omnilogunits (OU) bei einer Konzentration von 5 mg/mL Soxhlet EtoAC Extrakt und in orange bei einer Konzentration von 0.5 mg/mL dargestellt.

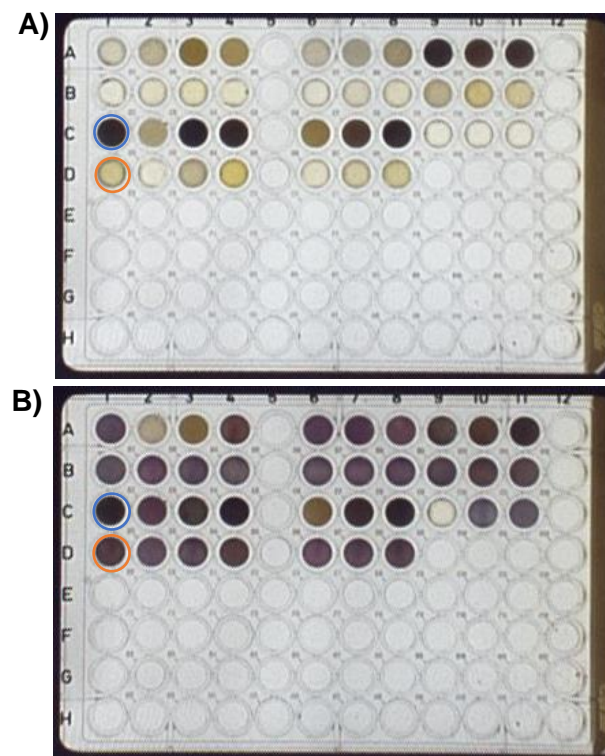


Abbildung 47: Soxhlet EtoAC- Extrakt **A)** Platte bei 0h **B)** Platte nach 24.25 h.

### EtoAC Fraktionen 11-17

Der EtoAC Extrakt der Fraktionen 11-17 zeigt in der Abbildung 48 den Verlauf der Omnilogunits für 5 mg/mL und 0.5 mg/mL. Die Ausprägung der Farbbildung wird in Omnilogunits (OU-Einheiten) erfasst und eine Farbänderung zu violett lässt sich auf den zellulären Stoffwechsel zurückführen, wobei Aussagen über das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 gemacht werden können. Der Verlauf von 5 mg/mL zeigt eine Abnahme des Wachstums von *E. coli* WDCM 0013 und 0.5 mg/mL zeigt ein starkes Wachstum von *E. coli* WDCM 0013. Die Abbildung 49 zeigt eine Aufnahme der Platte beim Startpunkt der Omnilog Messung, nach 0h (A) und eine Aufnahme der Platte am Ende der Omnilog Messung, nach 24.25 h (B). Ein Vergleich von A zu B zeigt die Farbänderungen für 5 mg/mL, blau markiert und für 0.5 mg/mL, orange markiert. 5 mg/mL EtoAC Extrakt der Fraktionen 11-17 zeigt keine Farbveränderung, bereits zu Beginn ist wegen einer starken Eigenfärbung die Probe dunkel gefärbt. Eine Aussage über das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 machen zu können ist somit schwierig. Die Probe wurde unter dem Umkehrlichtmikroskop betrachtet und *E. coli* Stäbchen konnten beobachtet werden, eine Hemmung lässt sich jedoch optisch nicht ausschließen und im Vergleich zur Abbildung 40 kann von einer Hemmung ausgegangen werden. 0.5 mg/mL EtoAC der Fraktionen 11-17 weist einen Farbumschlag von hell (0 h) zu violett (24.25 h) auf, das heisst, ein starkes Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 kann bestätigt werden.

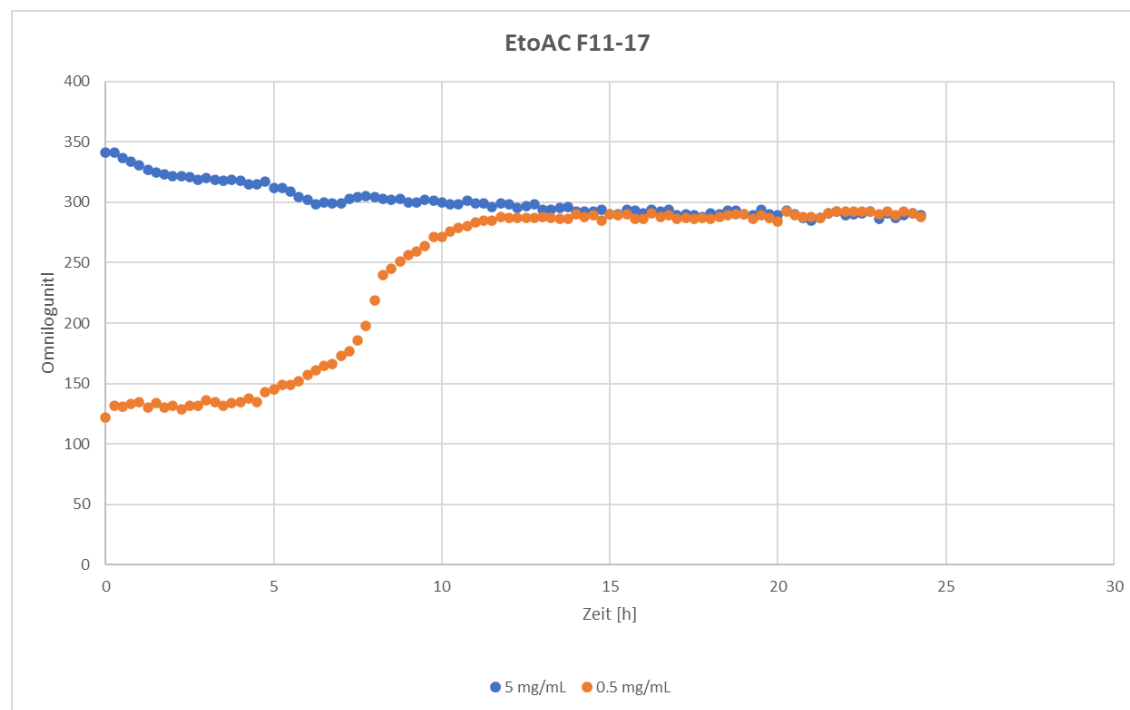


Abbildung 48: Hemm- Assay mit Omnilog der EtoAC Fraktion 11-17 mit *E. coli* WDCM0013. In blau ist der Verlauf der Omnlogunits (OU) bei einer Konzentration von 5 mg/mL EtoAC Fraktion 11-17 und in orange bei einer Konzentration von 0.5 mg/mL dargestellt.

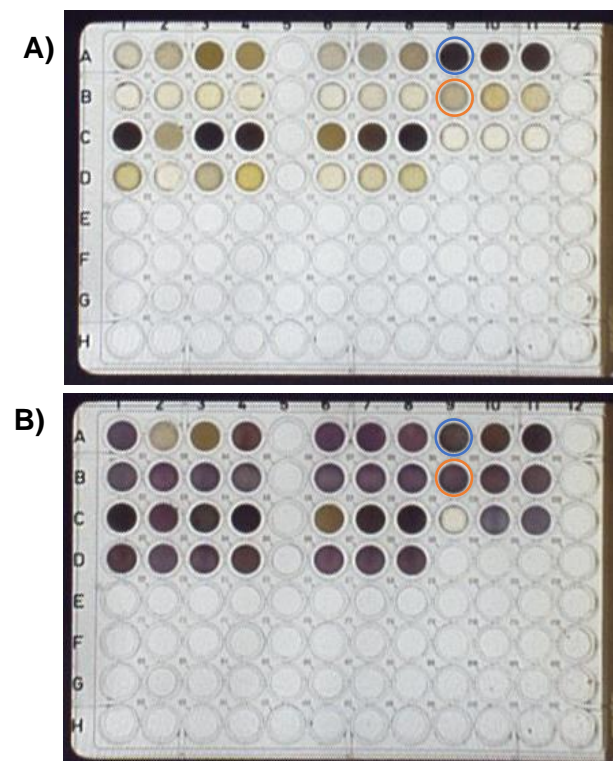


Abbildung 49: Soxhlet EtoAC- Extrakt **A)** Platte bei 0h **B)** Platte nach 24.25 h

## Kontrollen

Der Verlauf der Omnilogunits (OU) für die drei verschiedenen Kontrollen Minocycline [5 µg/mL], Artemisinin [0.1 mg/mL] und DMSO sind in der Abbildung 50 über eine Zeitspanne von 24.25 h aufgetragen. Minocycline zeigt wie erwartet eine starke Hemmung des *E. coli* WDCM 0013 Wachstums. Artemisinin zeigt in diesem Versuch keine Hemmung (Abbildung 51).

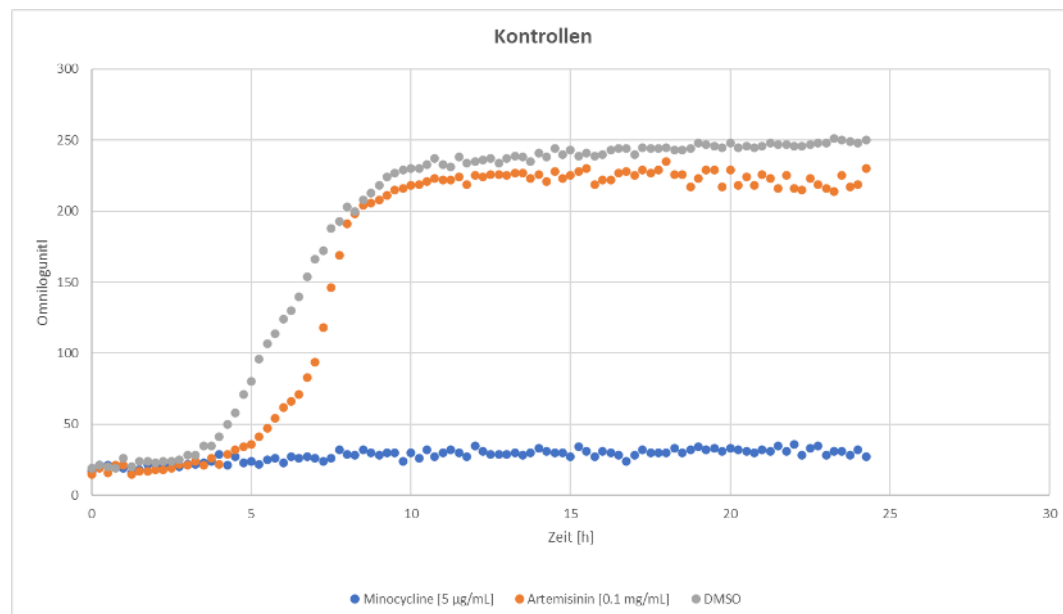


Abbildung 50: Hemm-Assay mit Omnilog der drei Kontrollen Minocycline [5 µg/mL] (blau), Artemisinin [0.1 mg/mL] (orange) und DMSO 5% (grau).

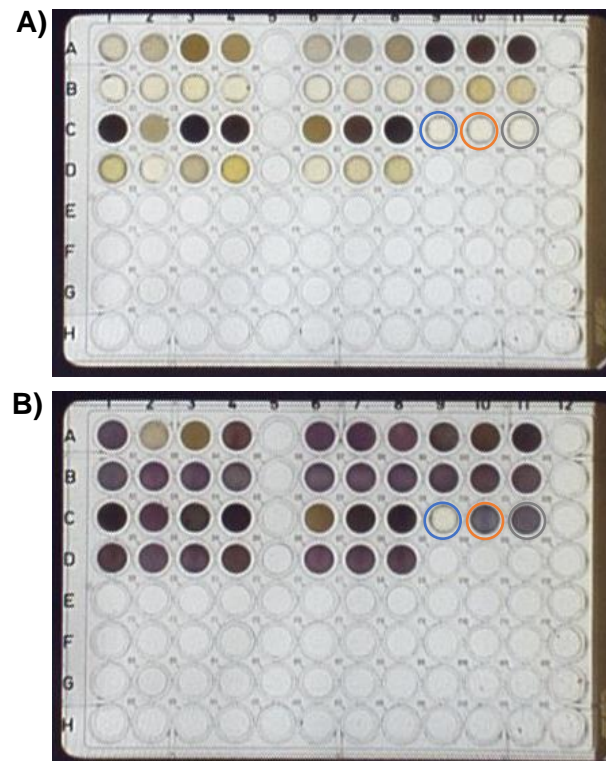


Abbildung 51: Kontrollen Minocycline [5 µg/mL] (blau), Artemisinin [0.1 mg/mL] (orange) und DMSO 50% (grau). A) Platte bei 0h B) Platte nach 24.25 h

## 4.5 Fraktionen von EtoAC F11-17 und Etherphase F8-13 und Well Diffusion mit *E. coli* WDCM 00013

Die Normalphasenchromatographie der Ethylacetat Fraktion 11-17 ist in total vier verschiedene Fraktionen eingeteilt worden, die im Chromatogramm in der Abbildung 52 zu sehen sind und der Tabelle 10 ist die jeweilige Ausbeute der Fraktionen dargestellt. Abbildung 53 zeigt das Chromatogramm der Etherphase F8-13 Fraktion und die Tabelle 11 listet die jeweiligen Fraktionen mit deren Ausbeute auf. Allgemeine Informationen zum Lesen, dieses Chromatogramms können aus dem Kapitel 4.1 entnommen werden. Auch bei diesen Fraktionen wurde die Auswahl der Fraktionen einerseits nach ähnlicher Peakform und Höhe entschieden und andererseits mussten ähnliche Peaks zusammengekommen werden, damit eine gewisse Menge an Ausbeute für das Testen der Fraktionen ausreichte.

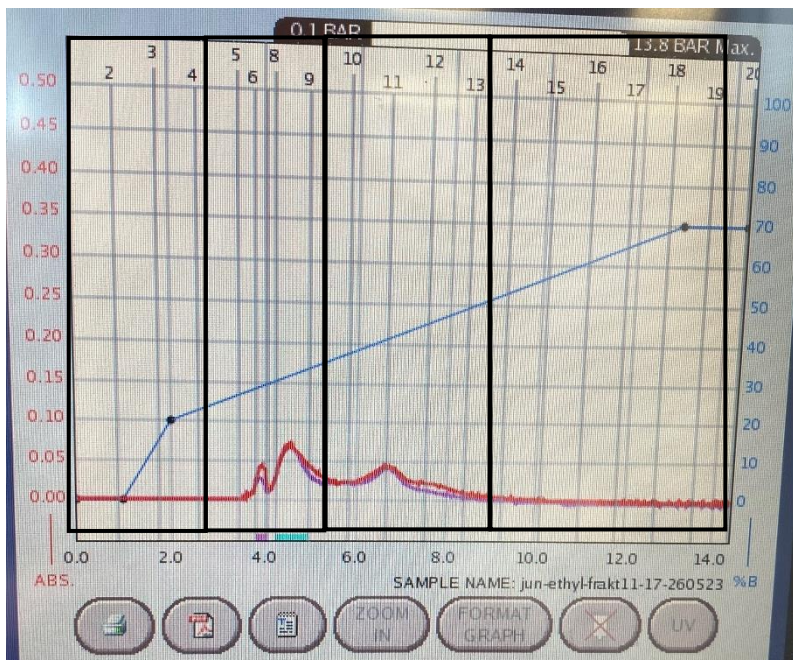


Abbildung 52: Chromatogramm der EtoAC Fraktion 11-17 eingeteilt in die vier Fraktionen.

Tabelle 10: Fraktionen mit Ausbeute [mg] der EtoAC Fraktion 11-17.

Fraktion Nummer	Tara	Fraktionsglas	Tara	Fraktionsglas	Ausbeute [mg]
	[mg]		[mg]	plus Ausbeute [mg]	
Fraktion 1-4	13321		13324		3
Fraktion 5-9	12535		12669		134
Fraktion 10-13	13179		13211		31
Fraktion 14-19	13175		13211		36

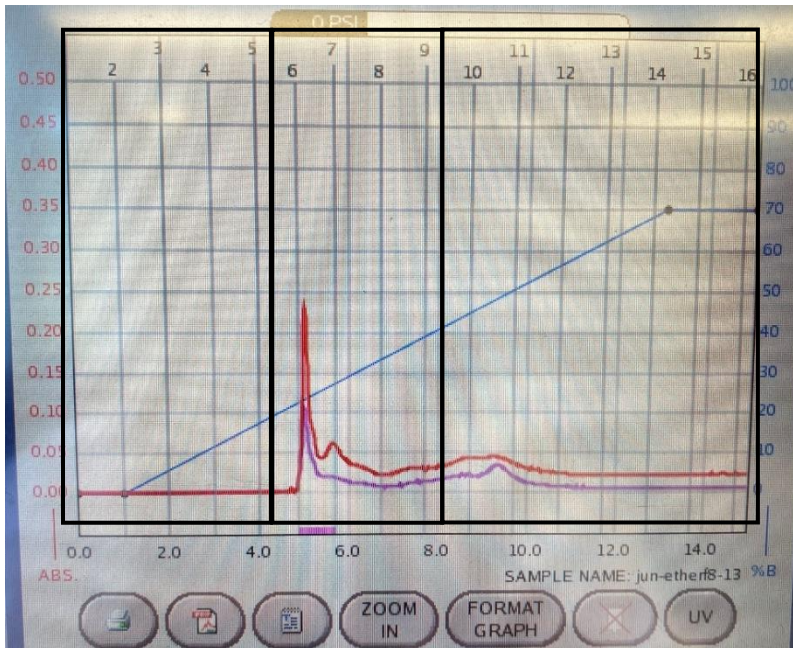


Abbildung 53: Chromatogramm der Etherphase Fraktion 8-13 eingeteilt in die drei Fraktionen.

Tabelle 11: Fraktionen mit Ausbeute [mg] der Etherphase Fraktion 8-13.

Fraktion Nummer	Tara	Fraktionsglas	Tara	Fraktionsglas	Ausbeute [mg]
	[mg]		[mg]		plus Ausbeute [mg]
Fraktion 1-5	12320		12335		15
Fraktion 6-9	13208		13408		200
Fraktion 10-16	12737		12761		24

Die Resultate des Well Diffusion Assays mit den vier einzelnen Fraktionen von EtoAC F11-17 und den drei Fraktionen von der Etherphase F8-13 zeigten keine Hemmungen des *E. coli* WDCM 0013 Wachstums. Hingegen kann festgestellt werden, dass nach dem Zusammenführen (pool) der vier Fraktionen von EtoAC F11-17 ein kleiner Hemmhof ersichtlich ist (Abbildung 54). Der Pool der drei Fraktionen von der Etherphase F8-13, zeigt kein Hemmhof (Abbildung 54). In den Abbildungen Abbildung 56 Abbildung 57 sind die Resultate des technischen Replikats der Fraktion EtoAC F11-17 und Etherphase F8-13 zu sehen. Beide zeigten einen Hemmhof.

Folgend werden nur die Resultate abgebildet, welche eine eindeutige Hemmung zeigten.

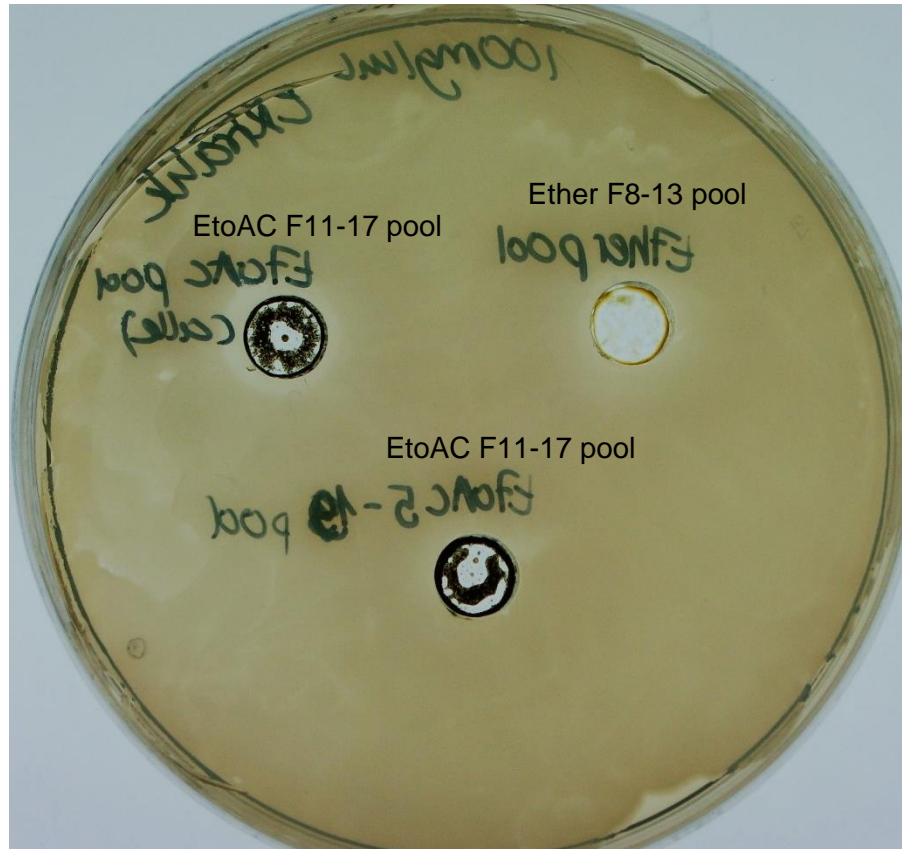


Abbildung 54: *E. coli* WDCM 0013 mit 30 mg/mL Extrakte nach 24 h. **Oben links und unten:** EtoAC F11-17 Fraktionen pool von 5-9 und 10-13 und 14-19. **oben rechts:** Ether F8-13 Fraktionen pool von 1-5 und 6-9 und 10-16.



Abbildung 55: *E. coli* WDCM 0013 mit Kontrollen nach 24 h. **Oben links:** Artemisinin [2 mg/mL], **oben rechts:** Minocycline [0.1 mg/mL], **unten:** Minocycline [0.1 mg/mL]

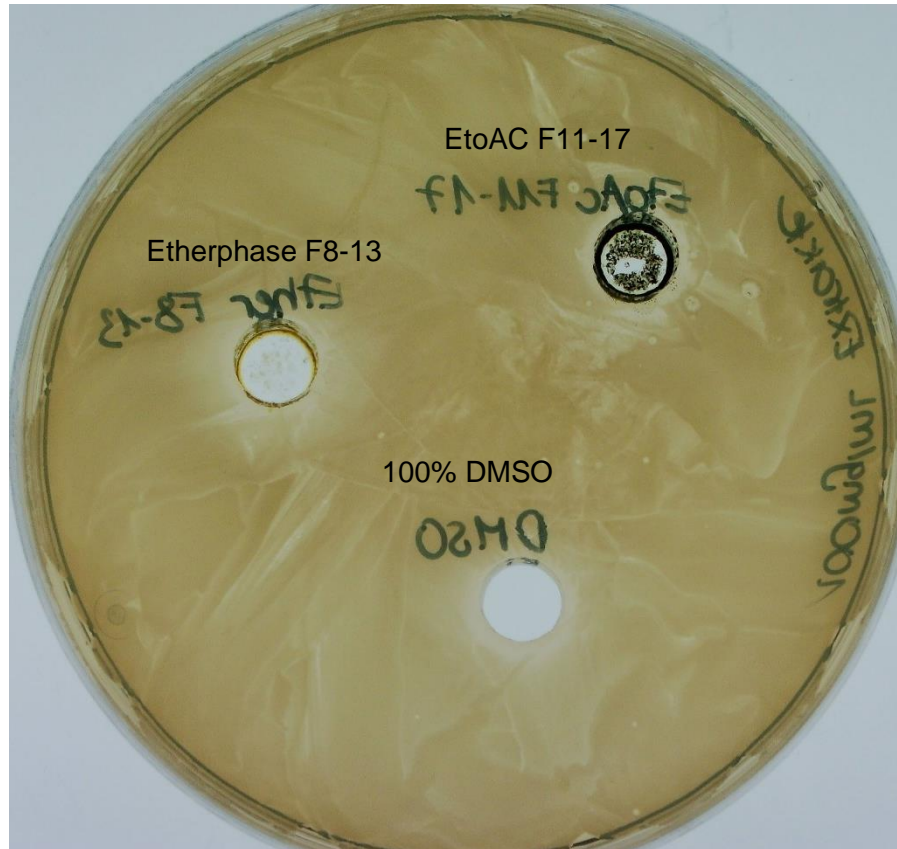


Abbildung 56: *E. coli* WDCM 0013 mit 100 mg/mL Extrakte als technische Replikate nach 24 h. **Oben links:** Etherextrakt F8-13, **oben rechts:** EtoAC F11-17 Fraktionen, **unten:** 100% DMSO

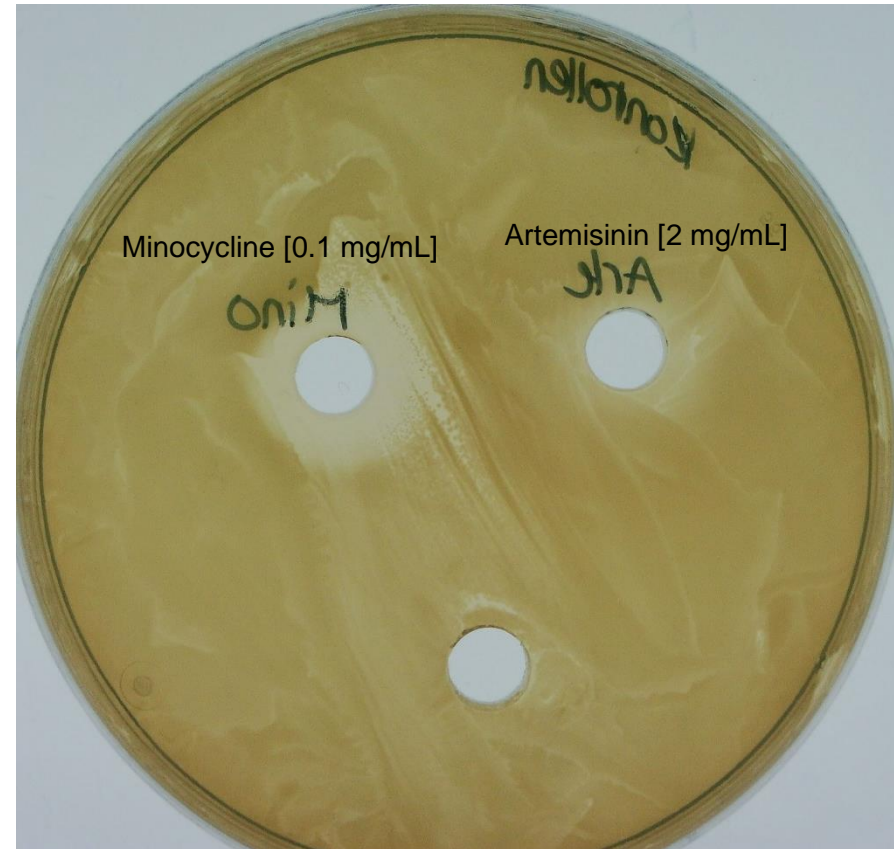


Abbildung 57: *E. coli* WDCM 0013 mit Kontrollen nach 24 h. **Oben links:** Minocycline [0.1 mg/mL], **oben rechts:** Artemisinin [2 mg/mL].

## 4.6 MALDI-TOF der drei Fraktionen von EtoAC F11-17

Die MALDI-TOF Analyse detektierte für die EtoAC Fraktion 11-17 vier mögliche Moleküle mit 871.6 m/z (Abbildung 58), 887.6 m/z, 903.6 m/z und 919.5 m/z (Abbildung 59 und Abbildung 60). Die einzelnen Chromatogramme von EtoAC (F11-17) Fraktion 5-9, EtoAC (F11-17) Fraktion 10-13 und EtoAC (F11-17) Fraktion 14-19 ohne die Markierung mit der Kopplung von Wassermolekülen sind im Anhang zu finden. Dabei entspricht 871.6 m/z einer Molekularmasse von 870.6 g/mol, 887.6 m/z einer Molekularmasse von 886.6 g/mol, 903.6 m/z einer Molekularmasse von 902.6 g/mol und 919.5 m/z einer Molekularmasse von 918.5 g/mol.

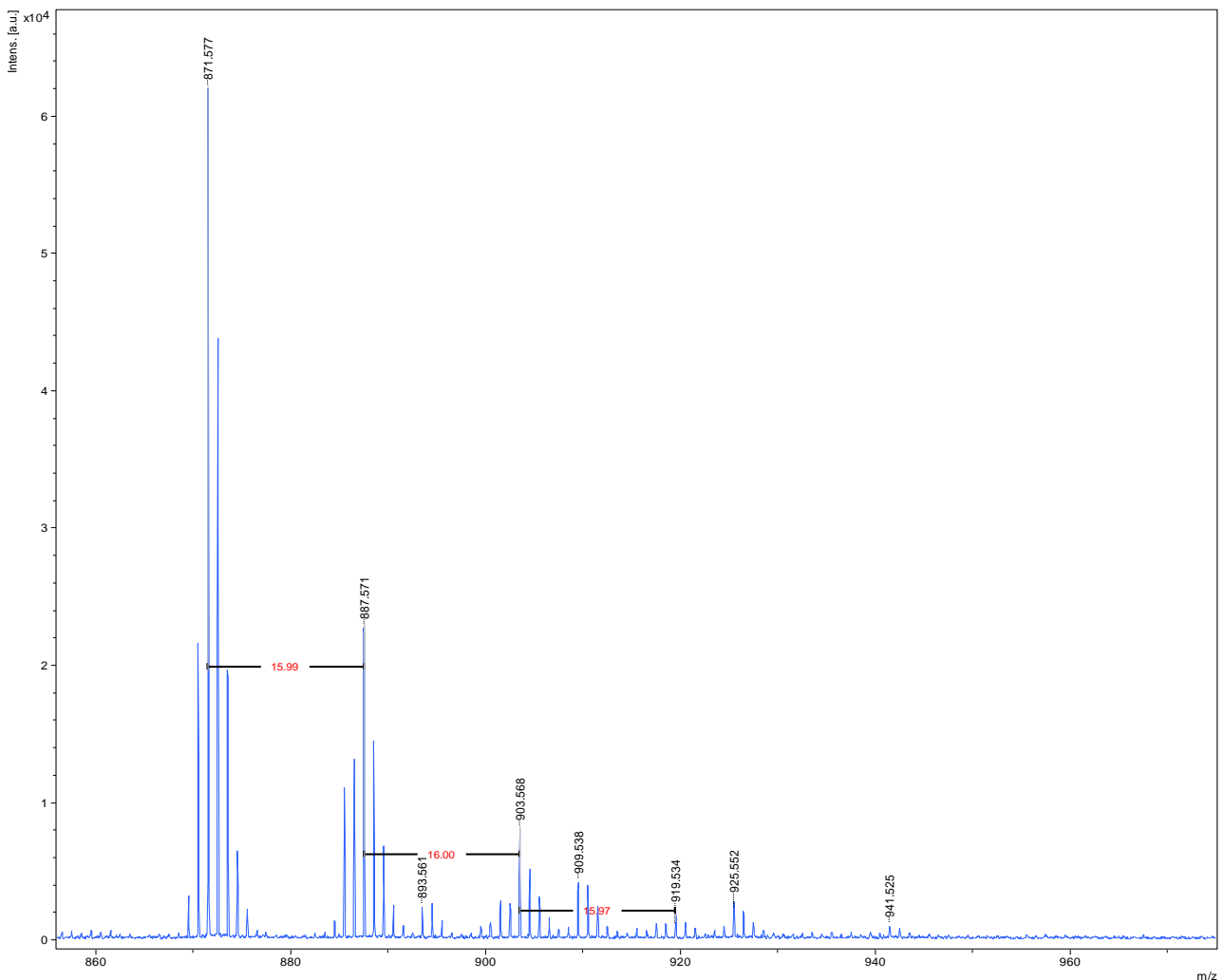


Abbildung 58: Chromatogramm EtoAC(11-17) Fraktion 5-9. Zu sehen sind einzelne Peaks mit dem Verhältnis Masse zu Ladung (m/z). Grösster Peak mit 871.6 m/z. Dargestellt sind auch die Kopplungen von Wassermolekülen (+ 16 m/z) in rot. Die x-Achse zeigt das Verhältnis m/z und die y-Achse die Intensität der Peaks

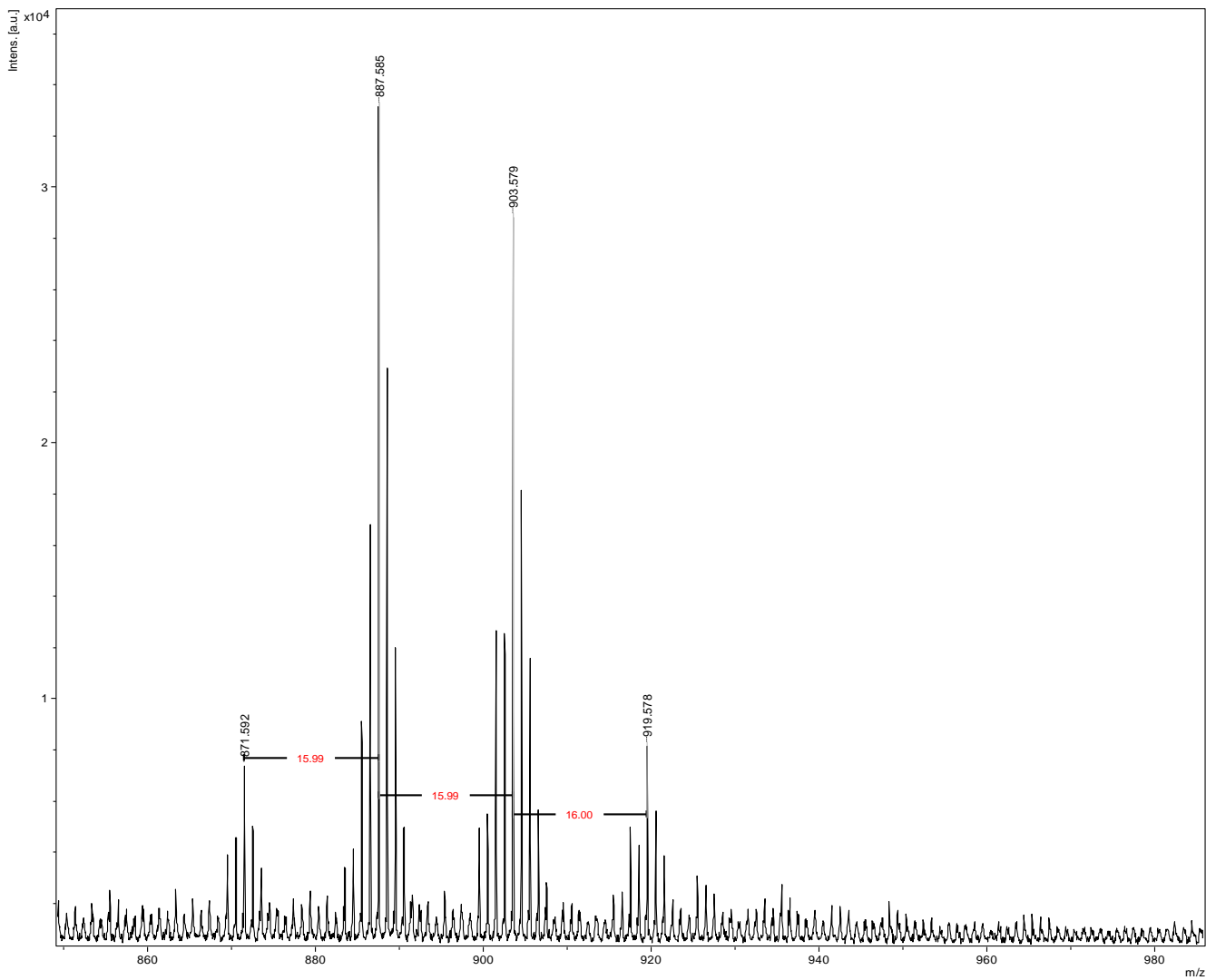


Abbildung 59: Chromatogramm EtoAC(11-17) Fraktion 10-13. Zu sehen sind einzelne Peaks mit dem Verhältnis Masse zu Ladung (m/z). Grosse Peaks mit 887.6 m/z und 903.6 m/z. Dargestellt sind auch die Kopplungen von Wassermolekülen (+ 16 m/z) in rot. Die x-Achse zeigt das Verhältnis m/z und die y-Achse die Intensität der Peaks.

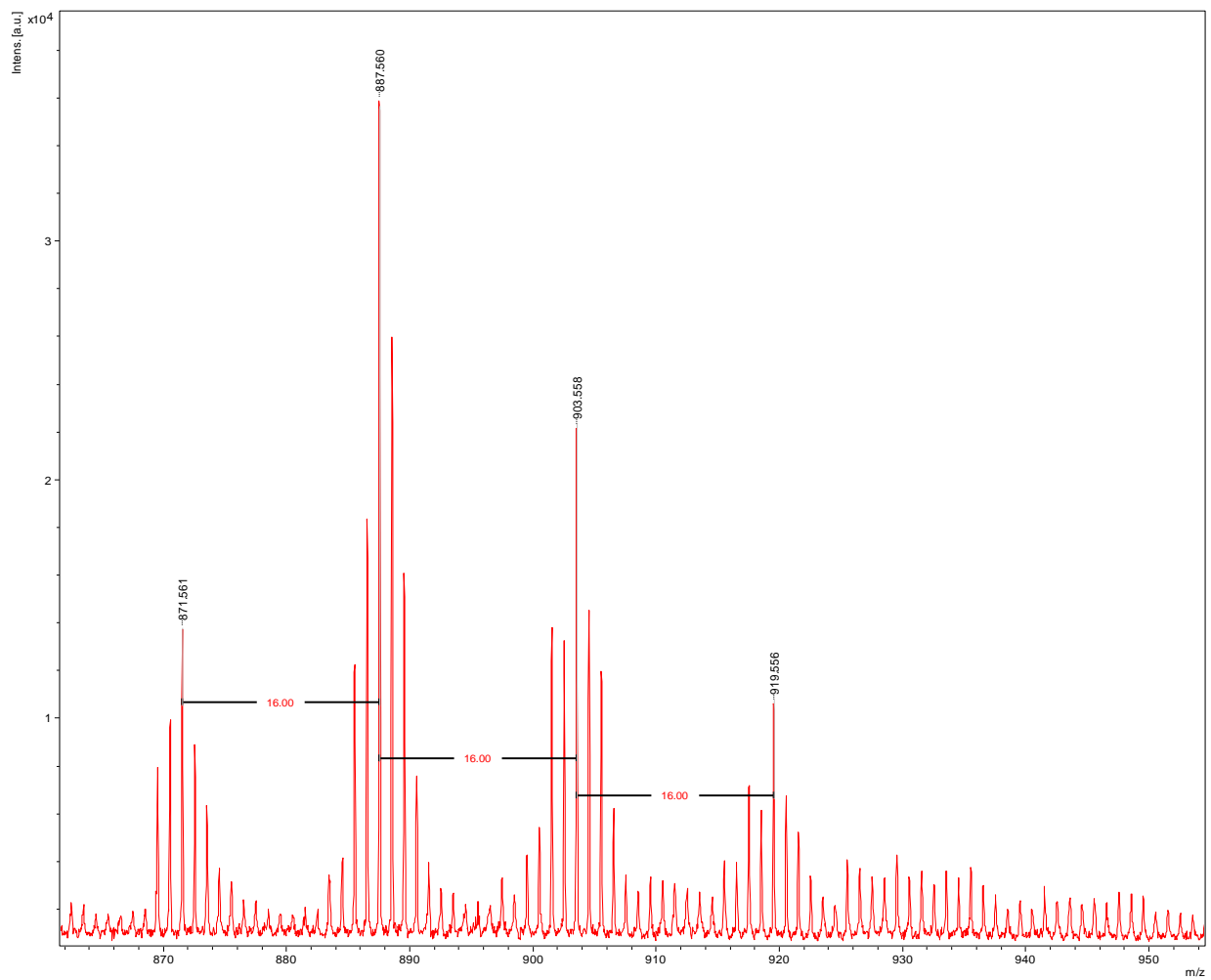


Abbildung 60: Chromatogramm EtoAC(11-17) Fraktion 14-19. Zu sehen sind einzelne Peaks mit dem Verhältnis Masse zu Ladung (m/z). Grosse Peaks mit 887.6 m/z und 903.6 m/z. Dargestellt sind auch die Kopplungen von Wassermolekülen (+ 16 m/z) in rot. Die x-Achse zeigt das Verhältnis m/z und die y-Achse die Intensität der Peaks

## 4.7 Inhibierungs- Assay mit Omnilog mit *Borrelia* sp.

Die beiden Inhibierungs- Assays mit Omnilog mit *B. afzelii*, *B. burgdorferi* und *B. garinii* mit und ohne Extrakte zeigten für alle drei Borrelien Arten kein Wachstum. In der Abbildung 61 ist eine Aufnahme nach der Messung im Omnilog von den Borrelien zu sehen, welche nicht mit den Extrakten behandelt wurden. Die vom Omnilog erstellten Grafiken zeigen den Verlauf des aufgenommenen kolometrischen Signals über die Inkubationszeit. In Bezug auf die Grafiken ist kein kontinuierlicher Anstieg des kolometrischen Signals im Verlauf der Zeit zu sehen, sondern ein konstantes Signal mit wenigen Omnilogunits wurde aufgenommen. Die Abbildung 62 zeigt die Aufnahme nach der Messung im Omnilog von den Borrelien, welche mit den Extrakten behandelt wurden. Auch hier ist in Anbetracht auf die aufgenommenen Grafiken, bei keinem well ein Wachstumsanstieg zu sehen.

Die Lebend/Tot Färbung, welche nach der Messung im Omnilog von den unbehandelten Borrelien gemacht wurde, zeigt wie in den Abbildung 63 Abbildung 64 zu sehen ist, tote sowie zystische Formen von Borrelien.

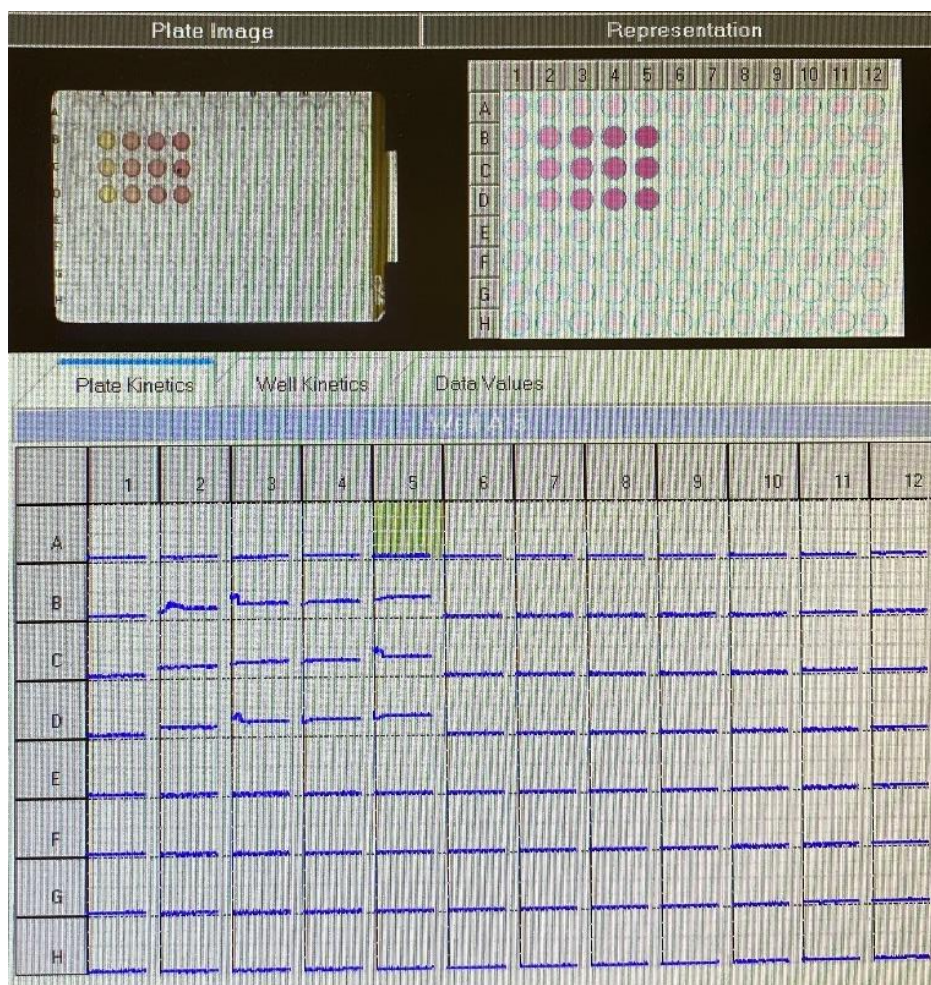


Abbildung 61: Wachstumüberprüfung der Borrelien im Omnilog. Eine Aufnahme die nach der Inkubation von 4d im Omnilog gemacht wurde. In wells B2 bis B5 *B. afzelii*, wobei B3 die 1:5 Verdünnung, B4 die 1:25 und B5 die 1:125 Verdünnung zeigt. In wells C2 bis C5 *B. burgdorferi* wobei C3 die 1:5 Verdünnung, C4 die 1:25 und C5 die 1:125

Verdünnung zeigt. In den wells D2 bis D5 *B. garinii*, wobei D3 die 1:5 Verdünnung, D4 die 1:25 und D5 die 1:125 Verdünnung zeigt. Zu sehen sind auch die für jedes Well erstellten Grafiken, welche den Verlauf des aufgenommenen kolometrischen Signals über die Inkubationszeit darstellen.

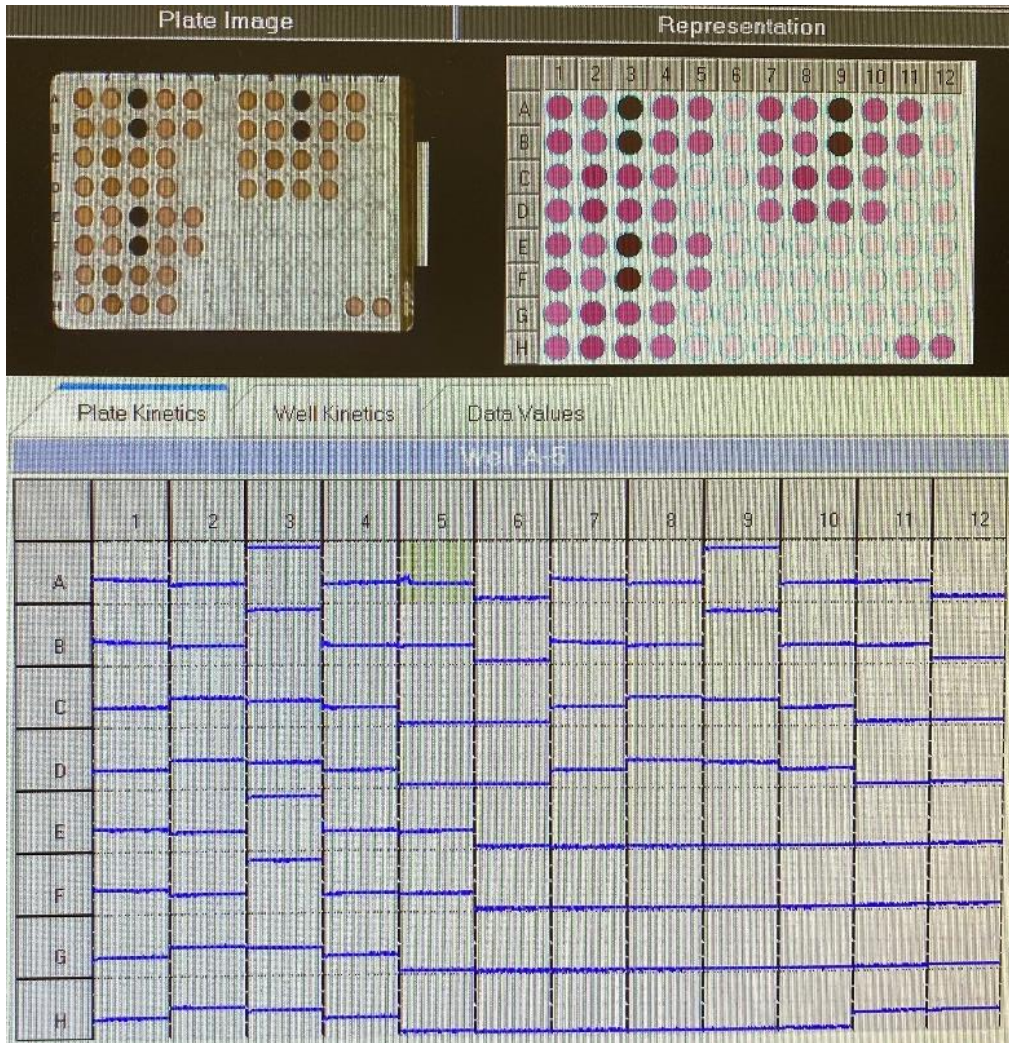


Abbildung 62: Omnilog mit *Borrelia* sp. und den Extrakten Soxhlet Ethylacetat- Extrakt, Etherphase Fraktion 8-13 und Ethylacetat Fraktion 11-17. Die Aufnahme wurde nach der Inkubation von 4 d im Omnilog gemacht. Für das Pipettierschema der Platte wird auf Abbildung 14 im Kapitel 3.6 verwiesen.

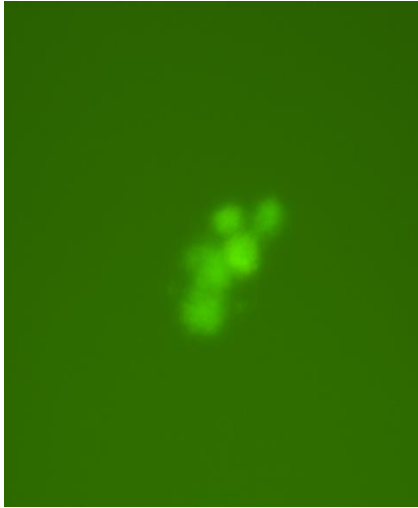


Abbildung 63: *B. afzelii* gefärbt mit SYBR Green I/ PI angeregt mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen SYBR Green I grün gefärbt.

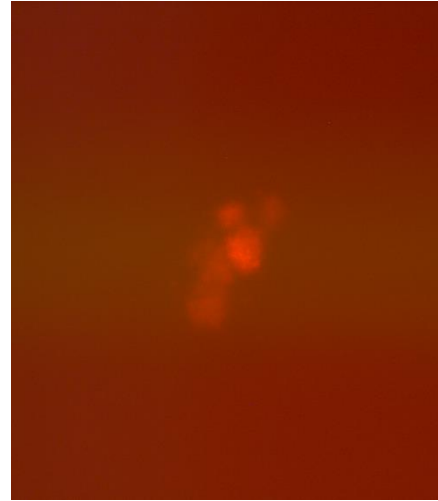


Abbildung 64: *B. afzelii* gefärbt mit SYBR Green I/ PI ange-regt mit Grünlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen Propidium-Iodid rot gefärbt und tot.

## 4.8 Borrelien Wachstumsversuche

Alle Resultate der fünf Wachstumsversuche mit den Borrelien sind in der Tabelle 12 dargestellt. Die Ansätze 1, 2 und 4 zeigten nach der Färbung mit SYBR Green I/ PI nur tote Borrelien. Abgebildet sind Aufnahmen von den Ansätzen 3 und 5.

Für den Versuch 3 sind in den Abbildung 65, Abbildung 66 und Abbildung 67 die Resultate der Kultivierung im 1.5 mL Reaktionsgefäss ersichtlich, in den Abbildung 68, Abbildung 69, Abbildung 70 die Resultate der Kultivierung im 15 mL Falkontube und die Abbildungen Abbildung 71, Abbildung 72 und Abbildung 73 zeigen den Mix aus Reaktionsgefäss und 15 mL Falkontube. Die Abbildungen von Versuch 3 zeigen, dass im 1.5 mL Reaktionsgefäss mehr tote Borrelien als lebende Borrelien ersichtlich sind (Abbildung 67), im Falkontube mehr lebende als tote Borrelien vorhanden sind (Abbildung 69) und der Mix aus Zellen aus dem Reaktionsgefäss mit Zellen aus dem Falkontube zeigt nur lebende Zellen (Abbildung 73).

Die Abbildung 74 und Abbildung 75 zeigen die Resultate des Versuchs 5 nach 7 d Inkubation. In der Abbildung 74 ist die Detektion von SYBR Green I der gefärbten *B. burgdorferi* Spirochäten mit SYBR Green I/PI, in grün zu sehen. Die Abbildung 75 zeigt die Detektion von Propidium-Iodid der gefärbten *B. burgdorferi* Spirochäten mit SYBR Green I/PI, in rot. Der Vergleich von Abbildung 74 mit Abbildung 75 zeigt, dass der Versuch 5 mit 7d Inkubation, die Kultivierung von 1 mL *B. burgdorferi* in 1.5 mL Reaktionsgefässe mehr lebende als tote Zellen aufweist.

Der Versuch 5 mit 1 mL *B. burgdorferi* Kultur mit einer Konzentration von  $3.25 \cdot 10^6$  Zellen/mL in einem 1.5 mL Reaktionsgefäss zeigt verglichen mit allen anderen Ansätzen das beste Resultat, da nach der Färbung mehr lebende Borrelien als tote Borrelien nach 7 d Inkubation vorhanden waren.

Tabelle 12: Übersicht der Resultate von den fünf verschiedenen Wachstumsansätze.

	Versuch	Resultat
1ster Ansatz	<b><i>B. burgdorferi</i></b> : 200 ul Zellen in 96- well Platte	
	Getestete Konzentrationen:	
	3.5*10 <sup>6</sup> Zellen/mL	
	1:5 Verdünnung: 7*10 <sup>5</sup> Zellen/mL	
	1:25 Verdünnung: 1.4*10 <sup>5</sup> Zellen/mL	
	1:125 Verdünnung: 2.8*10 <sup>4</sup> Zellen/mL	
	<b><i>B. afzelii</i></b> : 200 ul Zellen in 96- well Platte	
	Getestete Konzentrationen:	4 h Inkubation:
	2.75*10 <sup>6</sup> Zellen/mL	Tote Borrelien
	1:5 Verdünnung: 5.5*10 <sup>5</sup> Zellen/mL	
	1:25 Verdünnung: 1.1*10 <sup>5</sup> Zellen/mL	
	1:125 Verdünnung: 2.2*10 <sup>4</sup> Zellen/mL	
2ter Ansatz	<b><i>B. garinii</i></b> : 200 ul Zellen in 96- well Platte	
	Getestete Konzentrationen:	
	3.25*10 <sup>6</sup> Zellen/mL	
	1:5 Verdünnung: 6.5*10 <sup>5</sup> Zellen/mL	
	1:25 Verdünnung: 1.3*10 <sup>5</sup> Zellen/mL	
	1:125 Verdünnung: 2.6*10 <sup>4</sup> Zellen/mL	
	<b><i>B. burgdorferi</i></b> : 200 ul Zellen in 6-well Platte auf Endvolumen 1 mL mit BSK-H Medium/ Dulbecco's Modified Eagles's – low glucose with 10% FCS	
	Getestete Konzentrationen:	
	7*10 <sup>5</sup> Zellen/mL	
	<b><i>B. afzelii</i></b> : 200 ul Zellen in 6-well Platte auf Endvolumen 1 mL mit BSK-H Medium/ Dulbecco's Modified Eagles's – low glucose with 10% FCS	24 h Inkubation:
	Getestete Konzentrationen:	Tote Borrelien
	5.5*10 <sup>5</sup> Zellen/mL	
<b><i>B. garinii</i></b> : 200 ul Zellen in 6-well Platte auf Endvolumen 1 mL mit BSK-H Medium/ Dulbecco's Modified Eagles's – low glucose with 10% FCS		
Getestete Konzentrationen: 6.5*10 <sup>5</sup> Zellen/mL		

<b>3ter Ansatz</b>	<b>Versuch</b>	<b>Resultat</b>
	<p><b><i>B. garinii</i></b>: 200 ul Zellen in 1.5 mL Reaktionsgefäße/ 15mL Falcontube</p> <p>Getestete Konzentrationen: 3.25*10<sup>6</sup> Zellen/mL</p>	<p>24 h Inkubation: Mehrheitlich tote Borrelien</p>
<b>4ter Ansatz</b>	<p><b><i>B. garinii</i></b>: 1.5 mL Zellen 1.5 mL in Deepwell Platten</p> <p>Getestete Konzentrationen: 3.25*10<sup>6</sup> Zellen/mL</p>	<p>24 h Inkubation: Tote Borrelien</p>
<b>5ter Ansatz</b>	<p><b><i>B. burgdorferi</i></b> : 1 mL Zellen in 1.5 mL Reaktionsgefäß (Feng et al., 2020)</p> <p>Getestete Konzentrationen: 3.5*10<sup>6</sup> Zellen/mL</p>	<p>7d Inkubation: Mehr lebende Borrelien als tote</p>

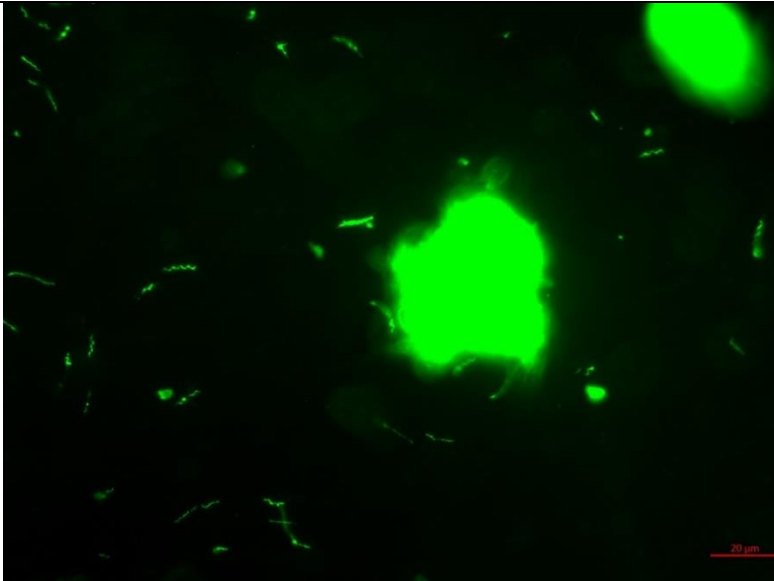


Abbildung 65: 3. Ansatz im 1.5 mL Reaktionsgefäss, *B. burgdorferi* gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen SYBR Green I grün gefärbt.

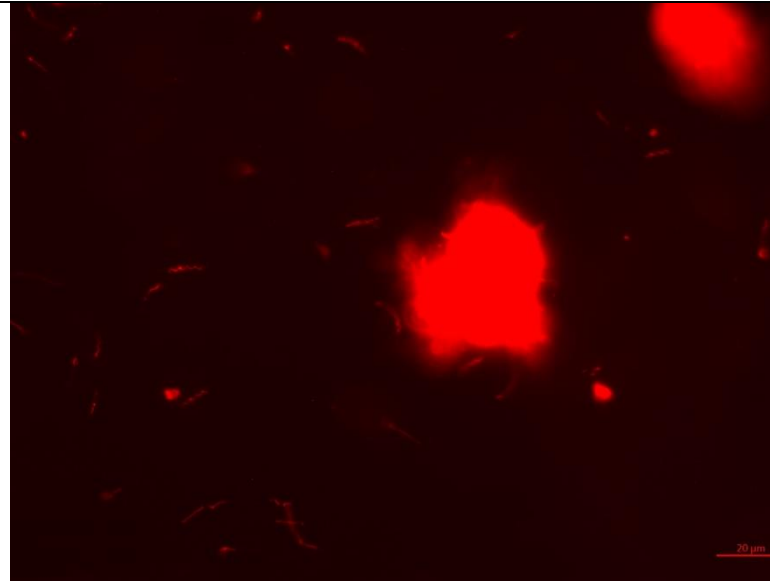


Abbildung 66: 3. Ansatz im 1.5 mL Reaktionsgefäss, *B. burgdorferi* gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Grünlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen Propidium-Iodid rot gefärbt.

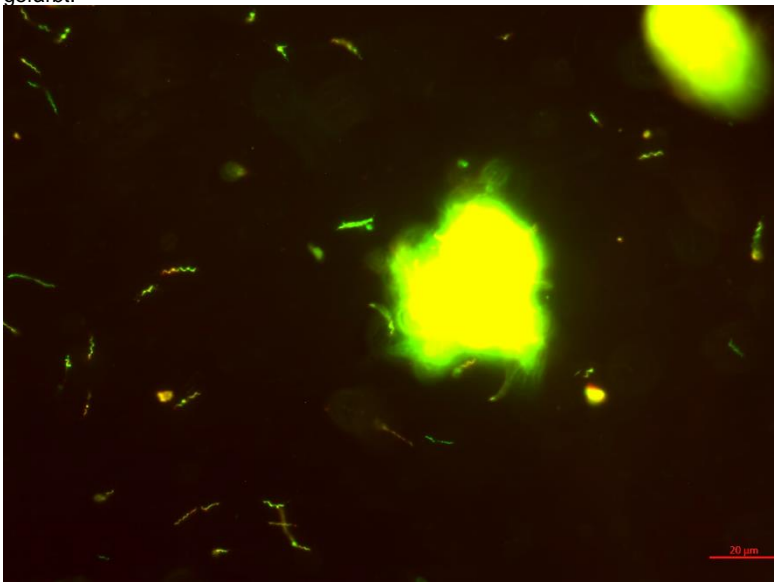


Abbildung 67: 3. Ansatz im 1.5 mL Reaktionsgefäss, *B. burgdorferi* gefärbt mit SYBR Green I/PI. Overlay der beiden Abbildungen von oben mit InDesign.

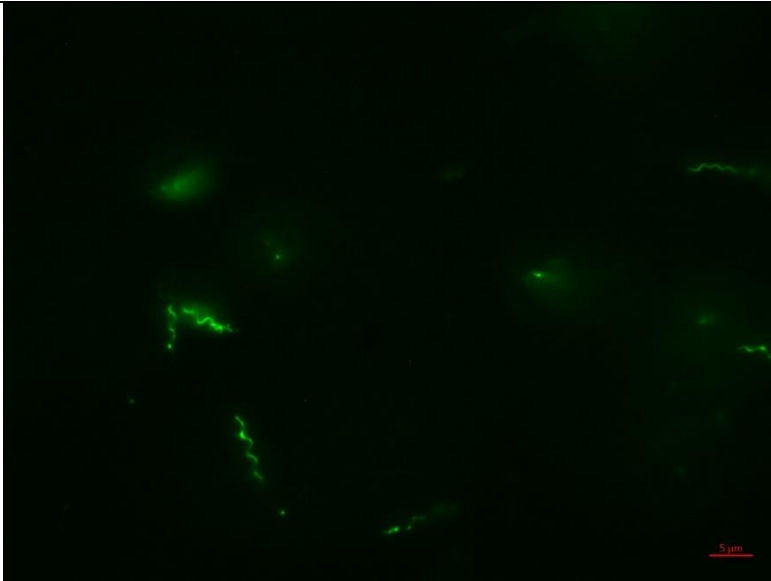


Abbildung 68: 3. Ansatz im 15 mL Falcontube, *B. burgdorferi* gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen SYBR Green I grün gefärbt.

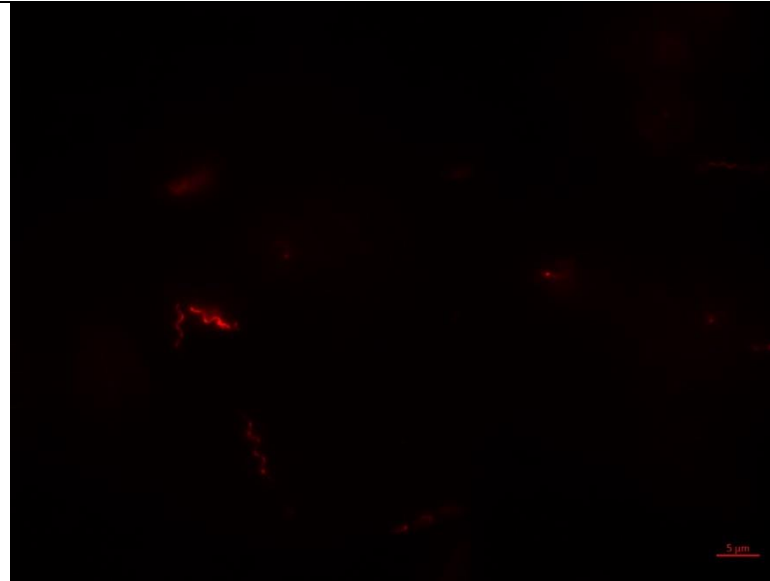


Abbildung 70: Ansatz im 15 mL Falcontube, *B. burgdorferi* gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Grünlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen Propidium-Iodid rot gefärbt.

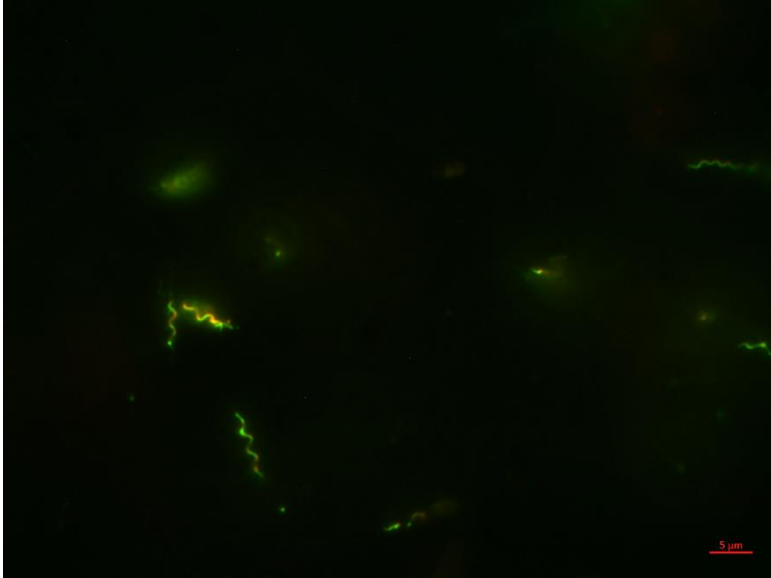


Abbildung 69: Ansatz im 15 mL Falcontube, *B. burgdorferi* gefärbt mit SYBR Green I/PI. Overlay der beiden Abbildungen von oben mit InDesign.

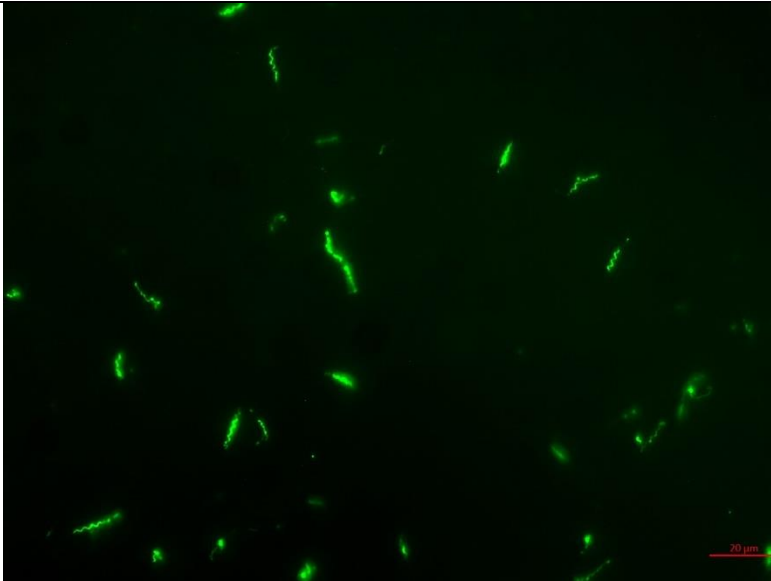


Abbildung 71: 3. Ansatz, Mix 15 mL Falcontube und Reaktionsgefäß, *B. burgdorferi* gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen SYBR Green I grün gefärbt.



Abbildung 72: 3. Ansatz, Mix 15 mL Falcontube und Reaktionsgefäß, *B. burgdorferi* gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Grünlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen Propidium-Iodid rot gefärbt.

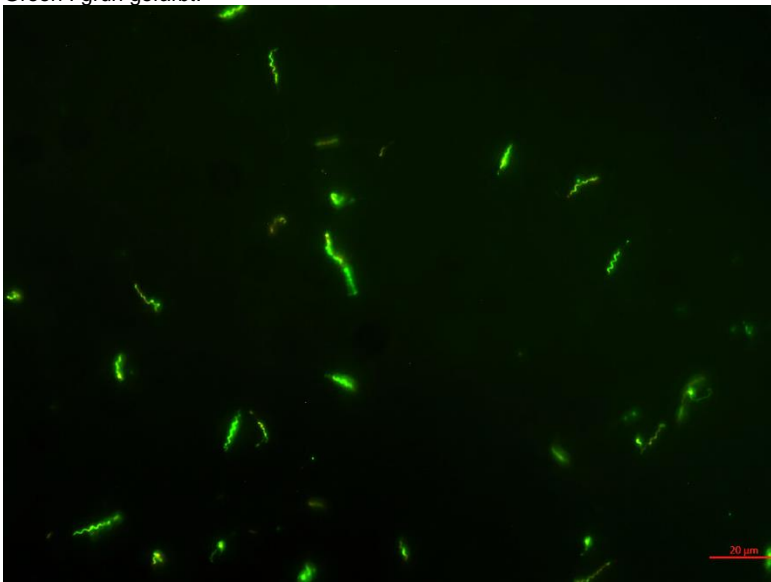


Abbildung 73: 3. Ansatz, Mix 15 mL Falcontube und Reaktionsgefäß, *B. burgdorferi* gefärbt mit SYBR Green I/PI. Overlay der beiden Abbildungen von oben mit InDesign.

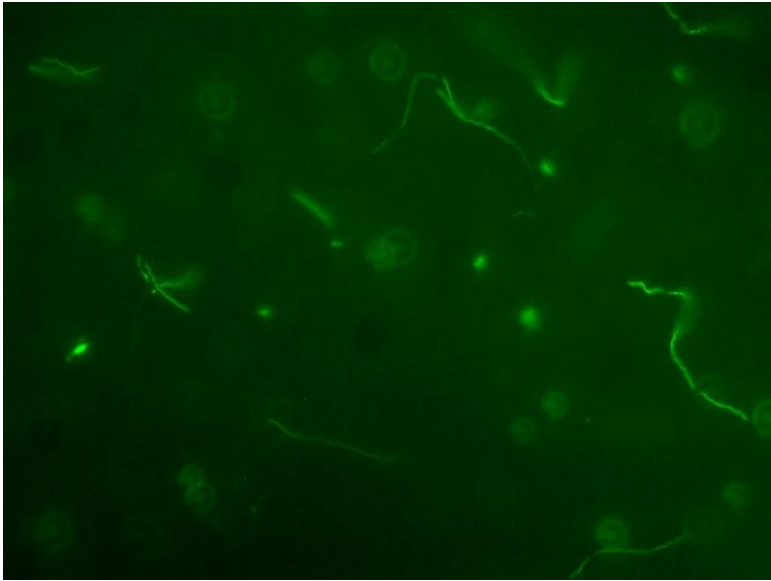


Abbildung 74: Versuch 5, *B. burgdorferi* gefärbt nach 7 d Inkubation mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Blaulicht ( $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen SYBR Green I grün gefärbt.

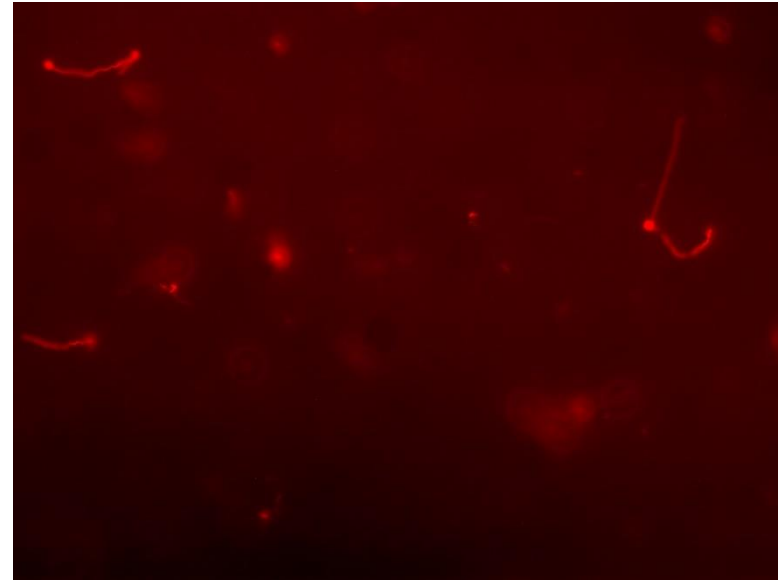


Abbildung 75: Versuch 5, *B. burgdorferi* gefärbt nach 7 d Inkubation mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Grünlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$ ). Borrelien sind wegen Propidium-Iodid rot gefärbt.

## 4.9 Inhibierungs- Assay *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 in 1.5 mL Reaktionsgefäße

In diesem Abschnitt werden die Resultate der Kultivierung von *B. burgdorferi* in 1.5 mL Reaktionsgefäße mit EtoAC F11-17 bei einer Konzentration von 5 mg/mL und den Kontrollen Artemisinin [100 µg/mL], Minocycline [5 µg/mL], 5% DMSO und Blank mit nur *B. burgdorferi* in PBS gezeigt. Die Auswertung wird auf Grund einer optischen Aussage von rot (tot) oder grün (lebend) gefärbten Borrelien durchgeführt und keine quantitative Auswertung wird vollzogen. Die Abbildungen von Abbildung 76 bis Abbildung 79 zeigen die Ergebnisse des XY-Tile von *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 nach einer Inkubation von 24 h. Zu sehen sind die vier Aufnahmen die beim XY-Tile gemacht wurden. Bei allen vier Abbildungen sind mehr tote Borrelien in rot gefärbt, als lebende Borrelien in grün zu sehen. Die Ergebnisse des gleichen Ansatzes (Replikat) mit *B. burgdorferi* und EtoAC F11-17 sind in den Abbildungen von Abbildung 80 bis Abbildung 83 zu sehen. Auch die Abbildungen des Replikates zeigen mehr tote Borrelien als lebende. Verglichen mit den Aufnahmen der Abbildung 84 bis Abbildung 87, welche einen Ansatz nur mit *B. burgdorferi* in PBS (Blank) darstellt, zeigen die Resultate der *B. burgdorferi* behandelt mit EtoAC für 24 h deutlich mehr tote Borrelien als lebende. In ditto für den Vergleich von EtoAC F11-17 behandelten *B. burgdorferi* Kulturen mit den *B. burgdorferi* Kulturen behandelt mit 5% DMSO (Abbildung 88 bis Abbildung 91). Die Abbildungen von Abbildung 92 bis Abbildung 95 zeigen die Ergebnisse des XY- Tile von *B. burgdorferi* behandelt mit Artemisinin [100 µg/mL]. In allen vier Abbildungen sind verglichen mit den Abbildungen vom Blank und DMSO mehr tote Borrelien ersichtlich als lebende, jedoch stets weniger tote Borrelien als im Ansatz mit EtoAC F11-17. Die Abbildungen von Abbildung 96 bis Abbildung 99 zeigen die Ergebnisse des XY- Tile von *B. burgdorferi* behandelt mit Minocycline [5 µg/mL]. Auch hier sind in allen vier Abbildungen verglichen mit den Abbildungen vom Blank und DMSO mehr tote als lebende Borrelien ersichtlich. Dennoch zeigt auch eine Inkubation mit Minocycline weniger tote Borrelien als im Ansatz mit EtoAC F11-17.

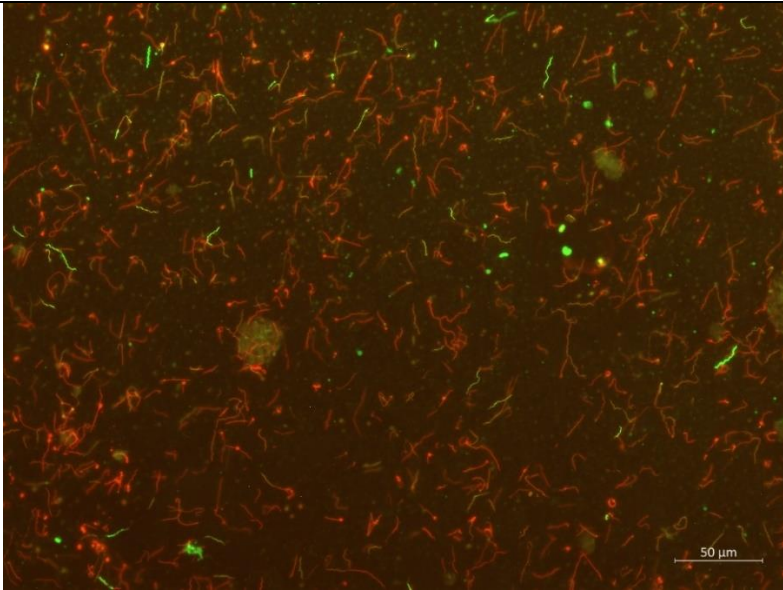


Abbildung 76: *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Erstes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm.

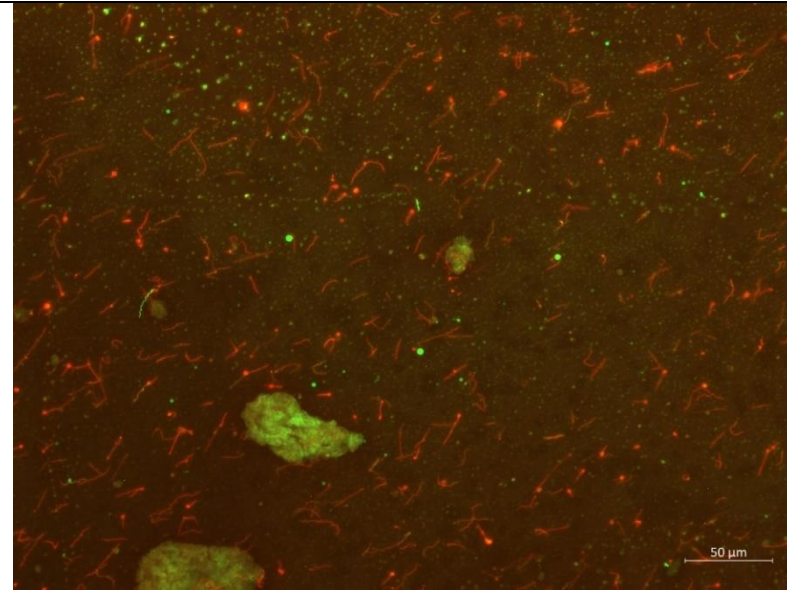


Abbildung 77: *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Zweites Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm.

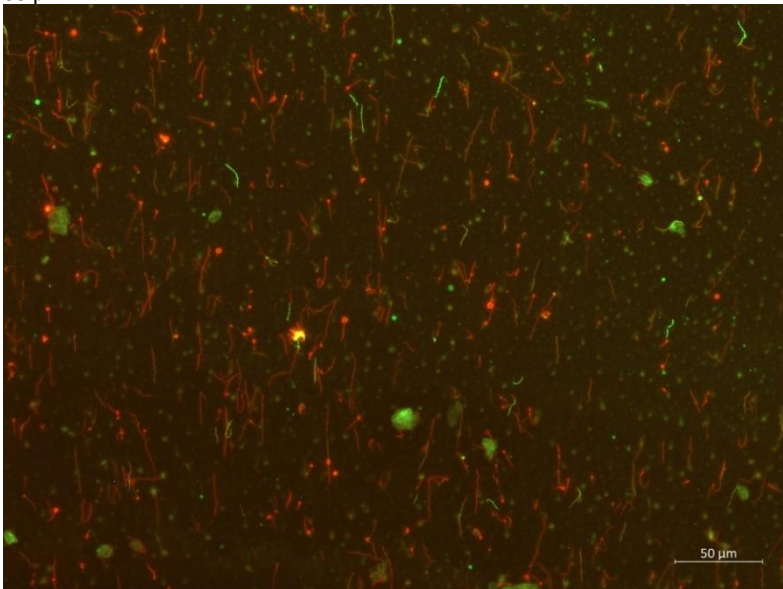


Abbildung 78: *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Drittes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm.

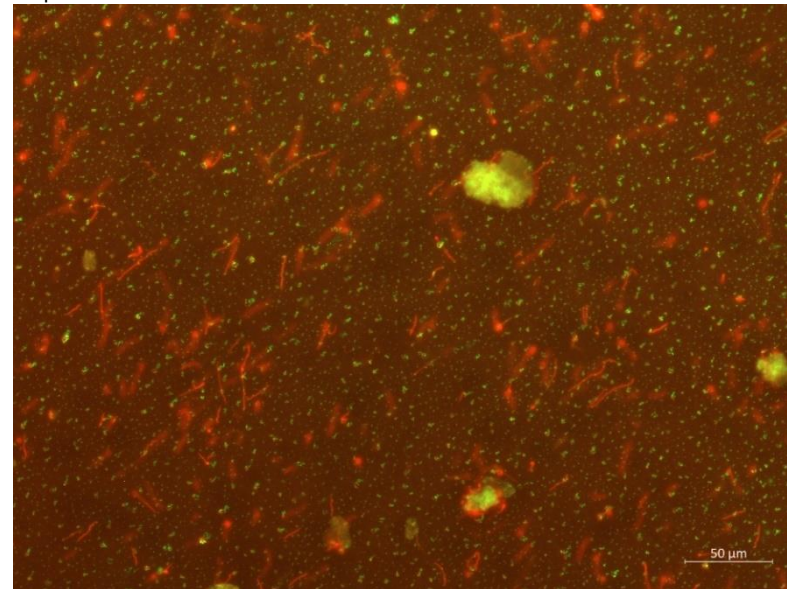


Abbildung 79: *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Viertes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm.

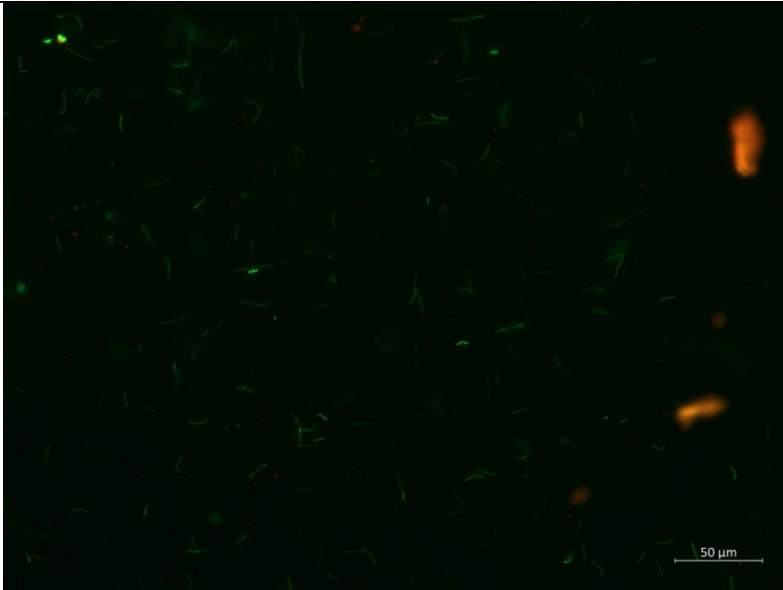


Abbildung 80: Rep. *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Erstes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 μm.

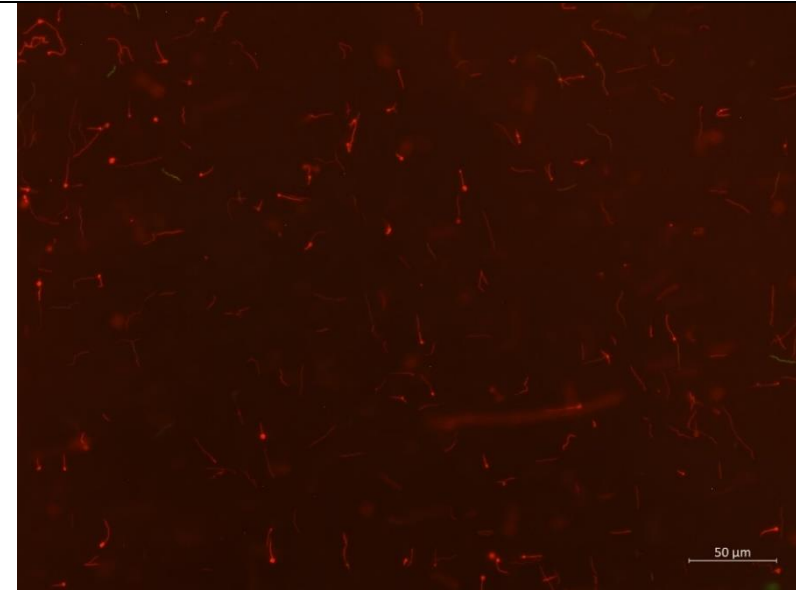


Abbildung 81: 2. Rep. *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Zweites Bild von XY-Tile

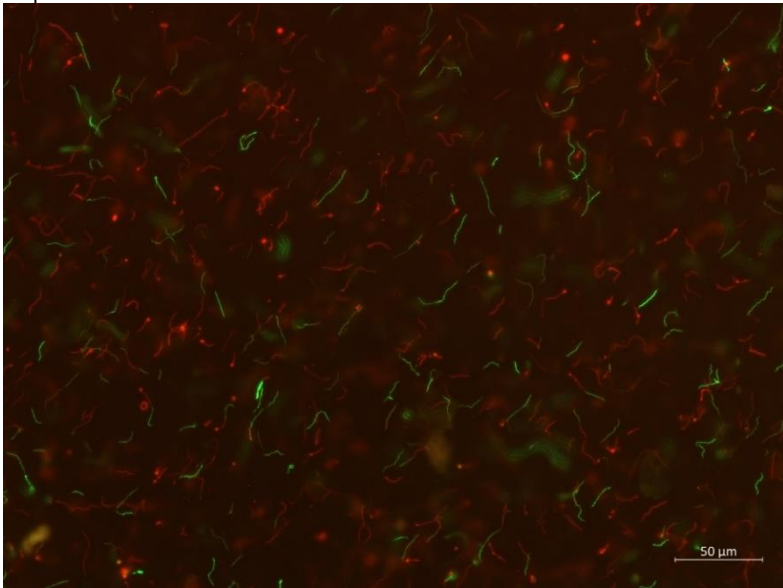


Abbildung 82: Rep. *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Drittes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 μm.

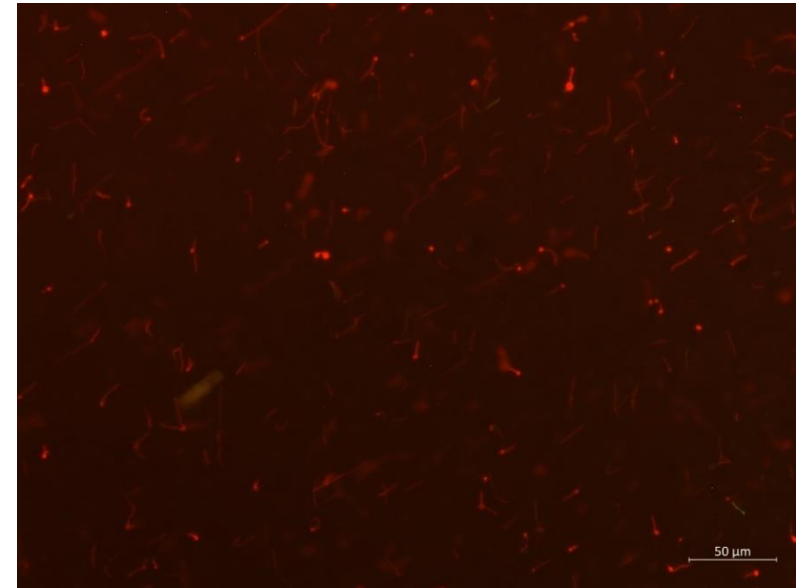


Abbildung 83: Rep. *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Viertes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 μm.

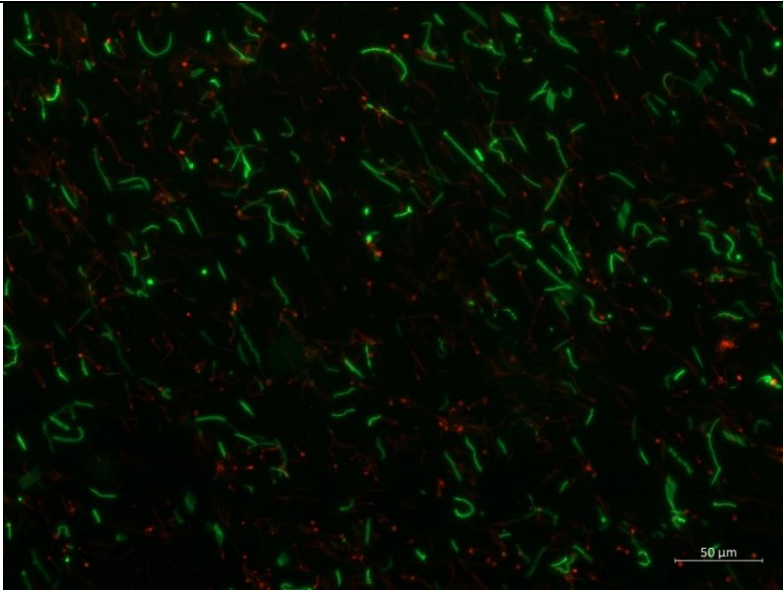


Abbildung 84: Blank *B. burgdorferi* nach 24 h. Erstes Bild von XY-Tile mit Masstab 50 µm.

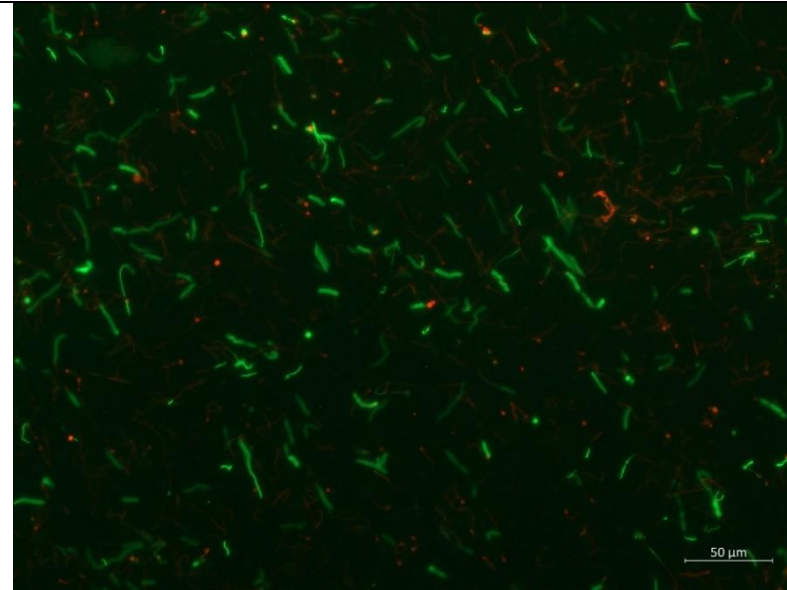


Abbildung 85: Blank *B. burgdorferi* nach 24 h. Zweites Bild von XY-Tile mit Masstab 50 µm.

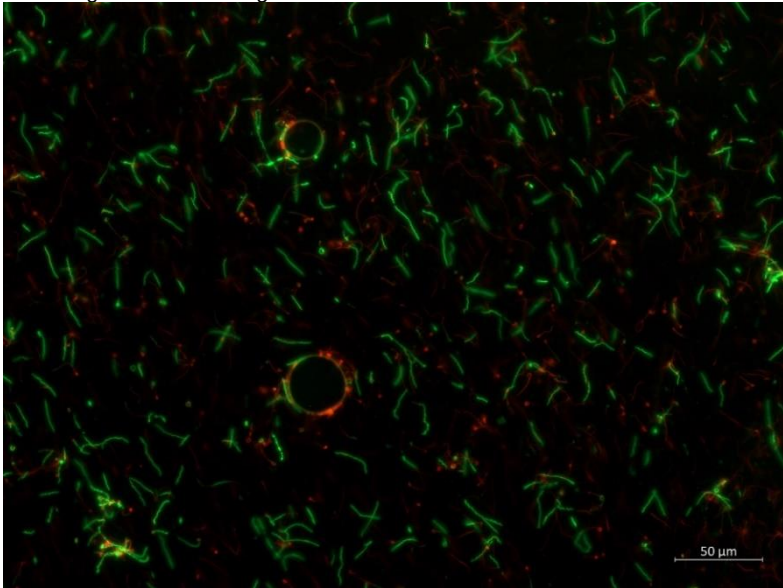


Abbildung 86: Blank *B. burgdorferi* nach 24 h. Drittes Bild von XY-Tile mit Masstab 50 µm.

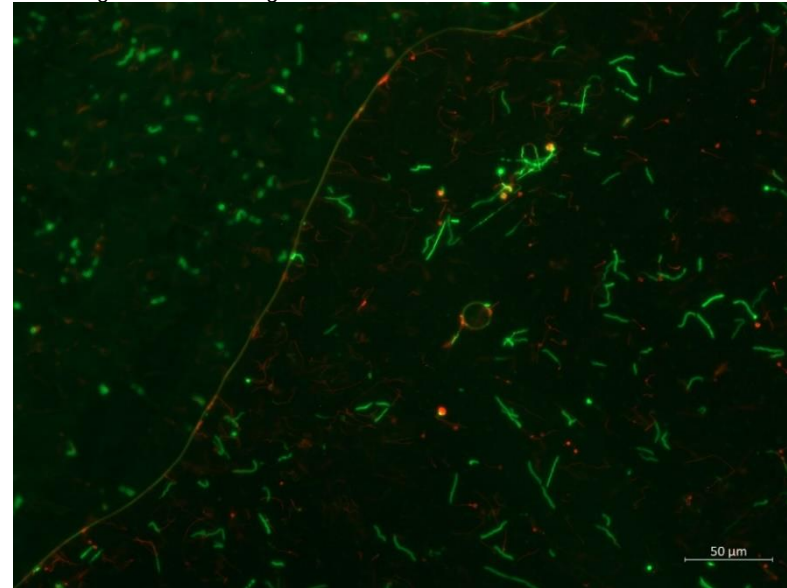


Abbildung 87: Blank *B. burgdorferi* nach 24 h. Viertes Bild von XY-Tile mit Masstab 50 µm.

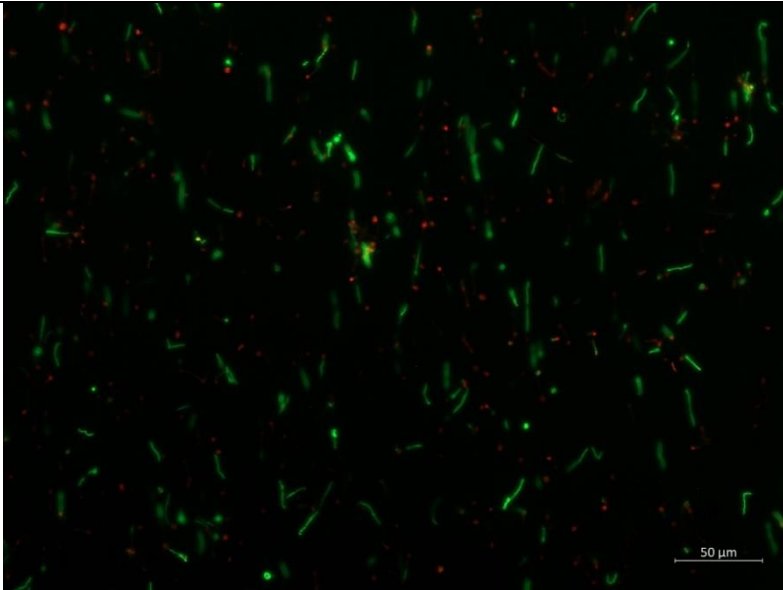


Abbildung 88: *B. burgdorferi* mit 5% DMSO nach 24 h. Erstes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 μm.

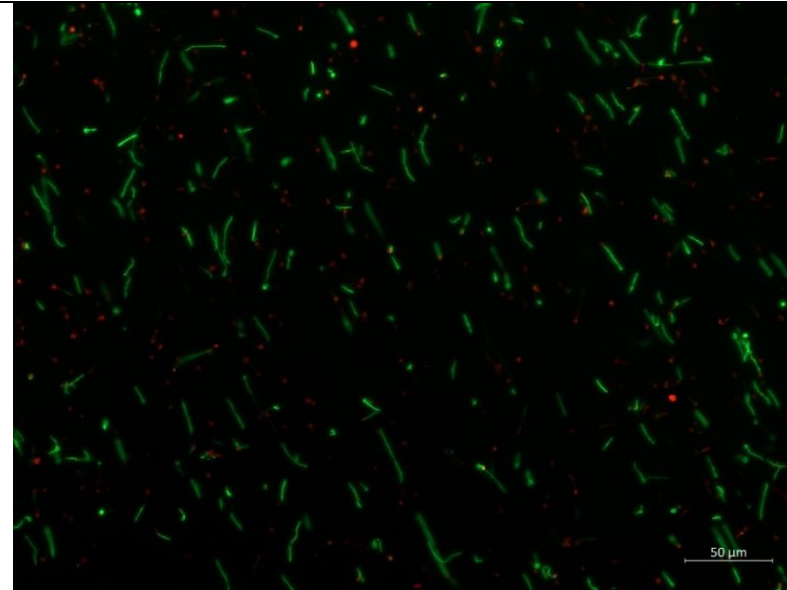


Abbildung 89: *B. burgdorferi* mit 5% DMSO nach 24 h. Zweites Bild von XY-Tile mit Massstab 50 μm.

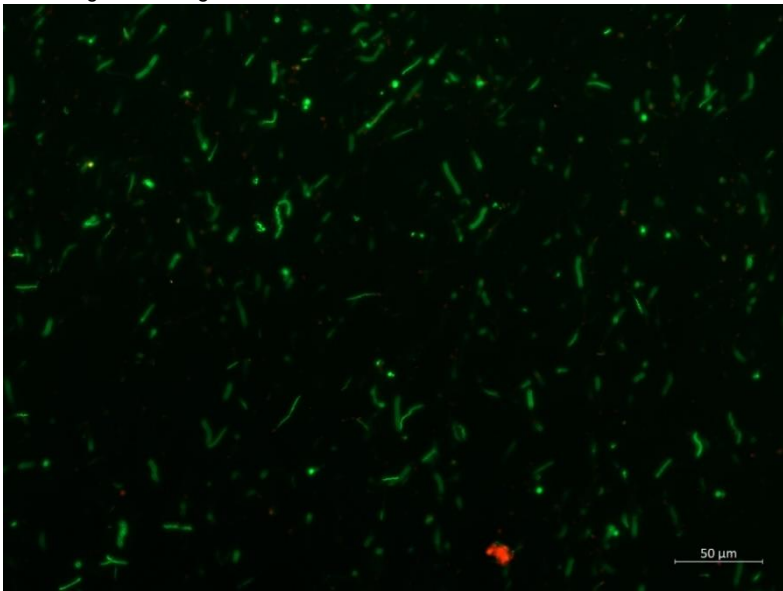


Abbildung 90: *B. burgdorferi* mit 5% DMSO nach 24 h. Drittes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 μm.

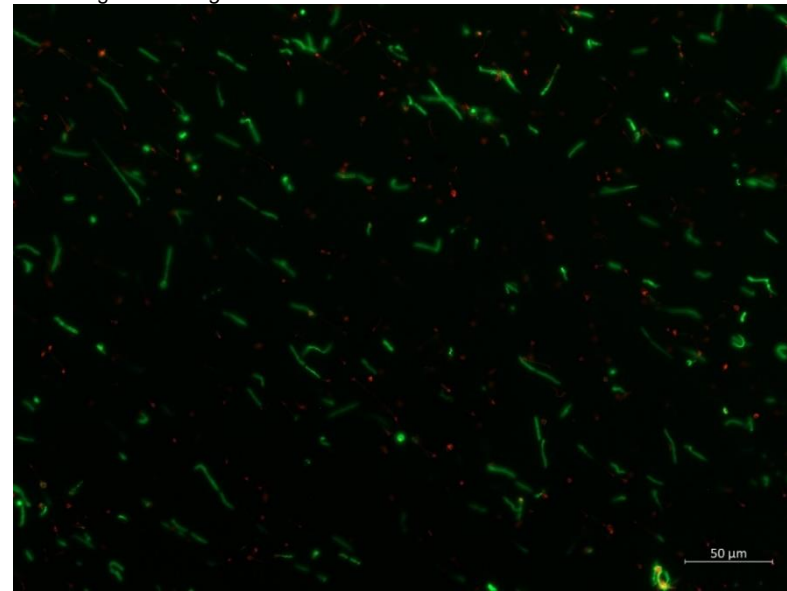


Abbildung 91: *B. burgdorferi* mit 5% DMSO nach 24 h. Viertes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 μm.

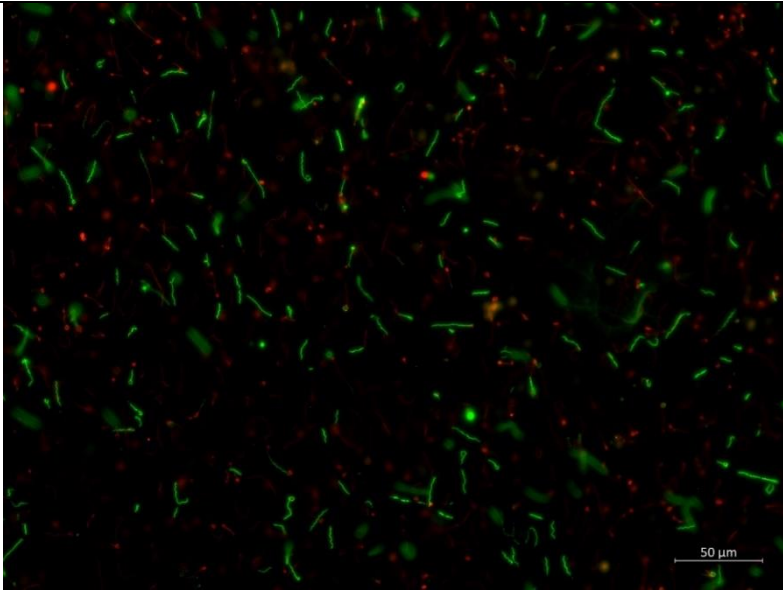


Abbildung 92: *B. burgdorferi* mit Artemisinin [100 µg/mL] nach 24 h. Erstes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm.

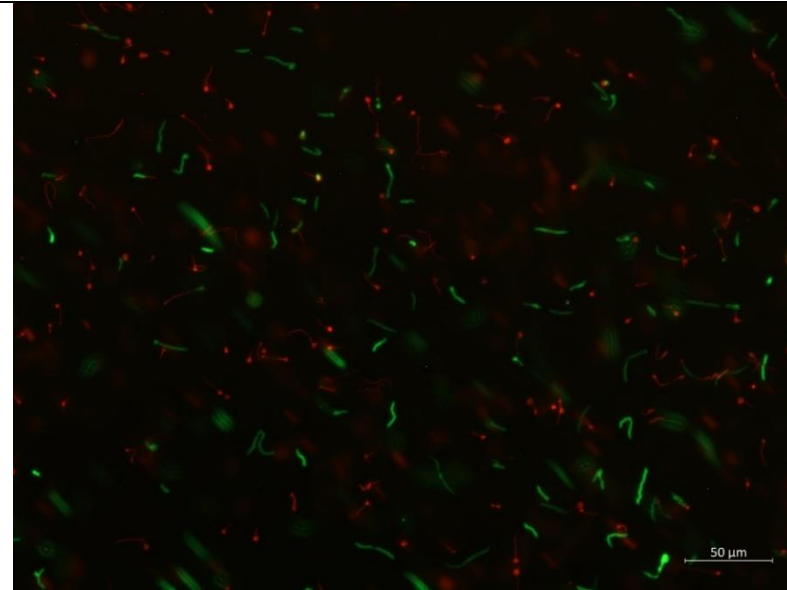


Abbildung 93: *B. burgdorferi* mit Artemisinin [100 µg/mL] nach 24 h. Zweites Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm.

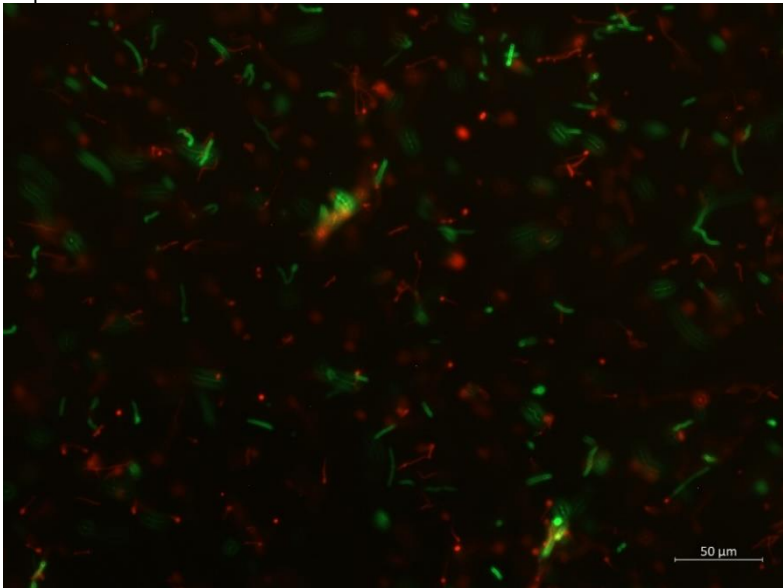


Abbildung 94: *B. burgdorferi* mit Artemisinin [100 µg/mL] nach 24 h. Drittes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm.

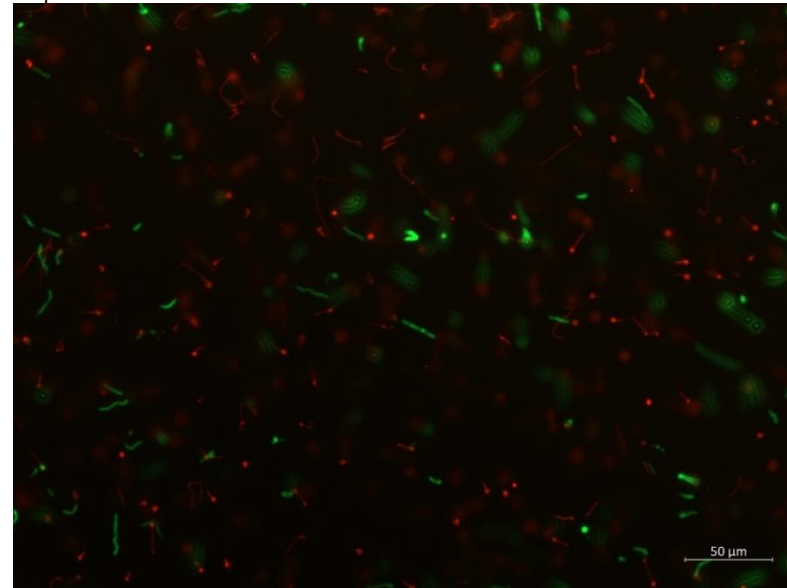


Abbildung 95: *B. burgdorferi* mit Artemisinin [100 µg/mL] nach 24 h. Viertes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm.

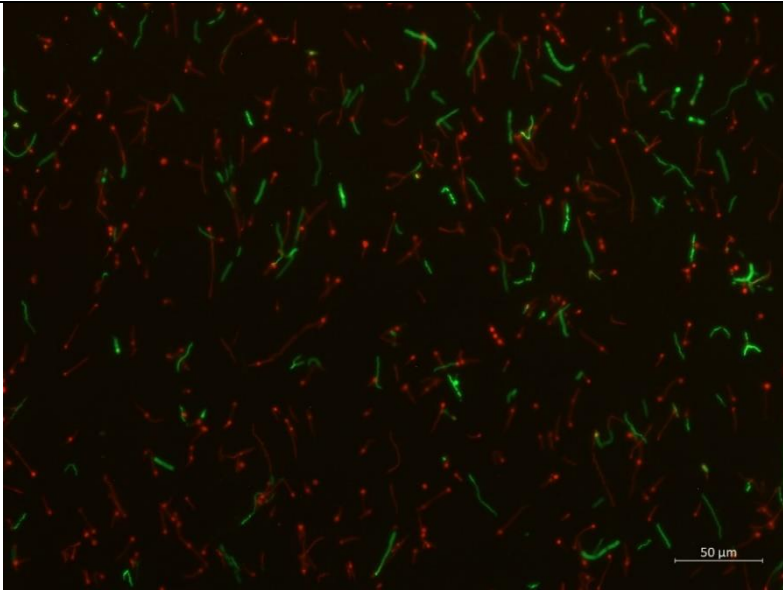


Abbildung 96: *B. burgdorferi* mit Minocycline [5 µg/mL] nach 24 h. Erstes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm.

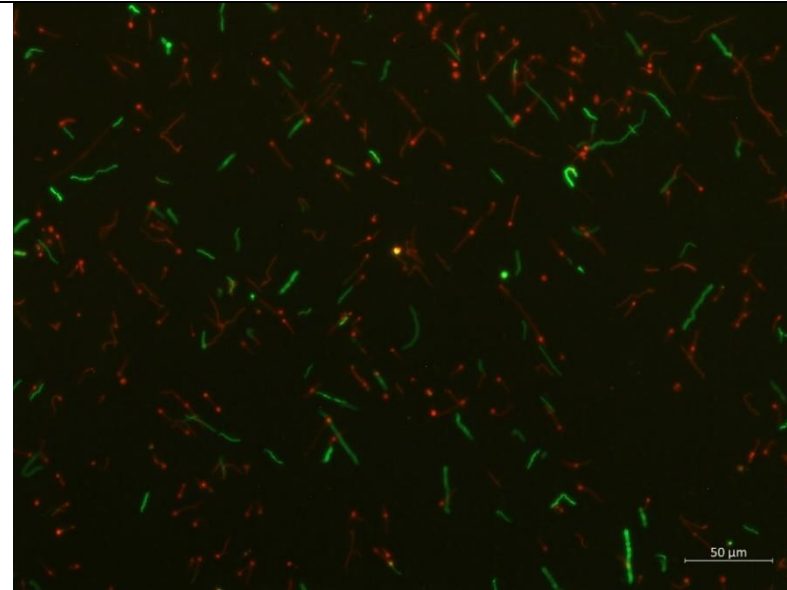


Abbildung 97: *B. burgdorferi* mit Minocycline [5 µg/mL] nach 24 h. Zweites Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm.

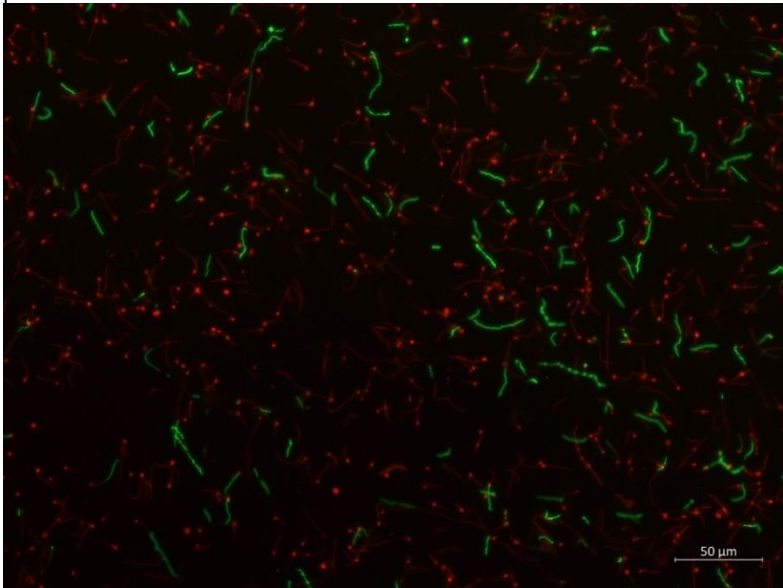


Abbildung 98: *B. burgdorferi* mit Minocycline [5 µg/mL] nach 24 h. Drittes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm.

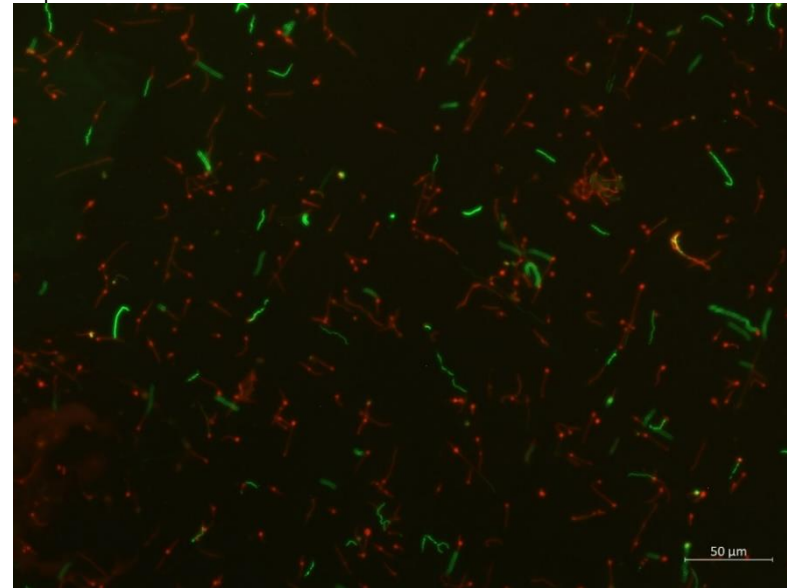


Abbildung 99: *B. burgdorferi* mit Minocycline [5 µg/mL] nach 24h. Viertes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm.

## 5 Diskussion

### A. *annua* Extrakte und Fraktionen

Verschiedene Extraktionsmethoden des *A. annua* Blätter Pulvers von Amarys sind im Labor durchgeführt worden. Dabei wurde zwischen verschiedenen Lösungsmittel sowie auch physikalischen und chemischen Aspekten unterschieden. Die Idee der Durchführung einer Extraktion mit 60% Ethanol entstand wegen des Papers von (Feng et al., 2020). Ihre publizierten Resultate zeigten unter anderem die Wirkung von einem 60% Ethanol-Extrakt von *Artemisia annua* gegen *B. burgdorferi* in der stationären Phase. In ihrem Paper ist jedoch die Durchführung der Extraktion nicht beschrieben, sondern es ist vermerkt, dass die Herstellung des Extraktes von Heron Botanicals realisiert wurde. Demnach wurde eine einfache Extraktion wie sie im Kapitel 3.2.1 beschrieben ist durchgeführt, wobei während des Extraktionsprozesses der Extrakt nicht stark erhitzt worden ist, damit wichtige temperaturempfindliche Wirkstoffe in der Pflanze nicht zerstört werden (Dr. med. Lydia Reutter, 2023). Ein weiteres weit bekanntes Lösungsmittel in der Chemie mit guter Lösungskraft ist Ethylacetat, welches ebenfalls als Extraktionsmittel des *Artemisia annua* Blätter Pulvers gebraucht wurde und im Aufarbeitungsprozess nicht erhitzt worden ist. Nach einer Recherche von bekannten Methoden zur Isolation von Pflanzenstoffen, sind die traditionelle Extraktion mit einem Soxhlet- Aufsatz sowie eine Methode in der Mikrowelle, welche beide die Verwendung von Hitze während dem Extraktionsprozess voraussetzen, zur Auswahl der Extraktionsarten miteinbezogen worden (Allemailem, 2022; Chuo et al., 2022). Als letzte Extraktionsmethode wurde noch eine Extraktion mit einem flüchtigen Extraktionsmittel mit niedrigem Siedepunkt gemacht, um mögliche chemisch wirkstoffzerstörende Verarbeitungsprozesse zu verringern und die Menge der Wirkstoffe in *Artemisia annua* zu erhöhen (Dr. med. Lydia Reutter, 2023). Die erhaltene Ausbeute der verschiedenen Extraktionen betrug bei der Ethanol- Extraktion und Ethylacetat- Extraktion, beim Etherphase- Extrakt und wässrigen Extrakt sowie bei der Soxhlet- Extraktion 3 g. Wobei die Ausgangsmenge an Pulver zwischen 21.6 g Artemisia Pulver bei der 60%- Ethanol Extraktion, 41.29 g Pulver bei der Ethylacetat- Extraktion, 62 g Pulver der Extraktion für die Etherphase und wässrige Phase und 41.29 g für die Dichlormethan- Extraktion betrug. Die Ausgangsmenge für die Extraktion mit Soxhlet betrug 12 g Pulver und eine Ausbeute von 1.24 g konnte erreicht werden. Die Ausgangsmenge für die Extraktion in der Mikrowelle betrug 1 g und eine Ausbeute von 58 mg wurde erreicht. Für die beschriebenen Experimente in diesem Bericht, reichte die Menge der verschiedenen Extraktionen aus. Ein Scale-up der Extraktionsmethoden mit einer höheren Masse an Ausgangsmaterial würde die Ausbeute erhöhen, wobei im Falle der Extraktion mit Soxhlet die Verwendung von grösseren Soxhlet- Aufsätzen schwierig sein könnte, da eine passende Hülse ebenfalls zur Verfügung stehen muss.

Die erhaltenen Chromatogramme der Extrakte, welche die Detektion von UV-aktiven Substanzen zeigen, ermöglichten eine Einteilung in Fraktionen. Die Einteilung der Fraktionen erfolgte nach ähnlicher Peakhöhe und Form sowie der Berücksichtigung einer genügenden Menge für das Testen der Fraktionen. Um die Menge der Ausbeute der Fraktionen zu erhöhen, wäre ein wiederholter Durchgang einer bestimmten Ausgangsmenge des Extraktes über die Säule eine Option. Bezüglich der Detektion von UV-aktiven Substanzen während der Normalphasenchromatographie, kann gesagt werden, dass beispielsweise aromatische Verbindungen, welche sich im Extrakt befinden können, nicht detektiert werden. Solche Verbindungen, die von einem UV-Detektor nicht erkannt werden, können mit MALDI-TOF auf ihre Molekularmasse bestimmt werden.

### **Vorversuch Borrelien Färbung mit SYBR Green I / Propidium-Iodid**

Dieser Vorversuch zeigte, dass Borrelien mit einer SYBR Green I und Propidium-Iodid Färbung mit dem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden können. Mit SYBR Green I gefärbte Borrelien wurden mit Blaulicht bei einer Wellenlänge von 498 nm detektiert und Propidium-Iodid wurde bei einer Wellenlänge von 535 nm detektiert. Aussagen über das Vorhandensein von lebenden Borrelien (grün) und geschädigten oder toten Borrelien (rot) wurden auf Grund von der Betrachtung der Probe mit dem Fluoreszenzmikroskop und einer Aufnahme gemacht. Um eine bessere Übersicht über die aufgetragene Probe auf dem Objektträger zu bekommen, müsste ein XY-Tile mit einer Auswahl einer bestimmten Fläche auf dem Objektträger ausgewählt und mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.Z2 von Zeiss mit gekoppeltem Imaging-Gerät AxioCam MR R3 aufgenommen werden. In diesem Vorversuch wurde dies nicht gemacht, da eine einzige Aufnahme und die Betrachtung der Probe mit dem Fluoreszenzmikroskop reichte um die Funktion einer Färbung mit SYBR Green I/ PI der Borrelien bestätigen zu können. Eine Schwierigkeit die festgestellt wurde, war die schnelle Verblassungszeit der Fluoreszenz von Propidium-Iodid. Aus diesem Grund sollen in weiteren Ansätzen einer Färbung mit Propidium-Iodid, der Probe Antifade dazugegeben werden, um eine schnelle Verblässung der Fluoreszenz zu verhindern.

## Assays mit *E. coli* WDCM 0013 und den Extrakten sowie Fraktionen

Bevor die hergestellten Extrakte von *A. annua* auf die Borrelien getestet wurden, sind die Extrakte zuerst auf *E. coli* WDCM 0013 und *S. aureus* DMSZ 766 getestet worden. Dies wurde zur Überprüfung der Wirkung der Extrakte gemacht, da bereits in verschiedenen Papers antibakterielle Wirkungen von unterschiedlichen *A. annua* Extrakten gegen *E. coli* und *S. aureus* gezeigt wurden (Dhingra et al., 2000; Massiha et al., 2013; Tao et al., 2020). Die Assays Disc Diffusion und Well Diffusion sowie ein Inhibierungs- Assay mit Omnilog wurden ausgewählt, um die antibakterielle Wirkung der *A. annua* Extrakte und Fraktionen gegen das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 und in einem Ansatz auch gegen *S. aureus* DMSZ 766 zu testen. Insbesondere die beiden Assays Disc Diffusion und Well Diffusion wurden ausgewählt, da sie zu den optimalen Methoden zur Bewertung der antimikrobiellen Aktivitäten von Pflanzenextrakten gehören (Othman et al., 2011). Das Testen der vier Extrakte Etherphase- Extrakt, wässriger Extrakt, Ethylacetat- Extrakt und 60% Ethanol- Extrakt zeigte, dass nur der Etherphase- Extrakt und Ethylacetat- Extrakt jeweils eine antibakterielle Wirkung gegen *E. coli* WDCM 0013 im Well Diffusion Assay aufwies. Keine Hemmungen des *E. coli* WDCM 0013- und *S. aureus* DMSZ 766 Wachstums konnten sowohl im Omnilog Assay als auch Disk Diffusion festgestellt werden. In dem Paper von Tao et al., (2020) konnte mittels Disk Diffusion Assay eine inhibitorische Wirkung eines wässrigen *A. annua* Extraktes gegen *E. coli* mit einer MIC von 31.25 mg/mL und *S. aureus* mit einer MIC von 15.62 mg/mL nachgewiesen werden. Eine weitere Publikation zeigte in ihrem Paper eine antibakterielle Wirkung von einem Ethanol-Extrakt gegen *E. coli* mit einem Hemmhof von 16 mm und eine antibakterielle Wirkung gegen *S. aureus* mit einem Hemmhof von 11 mm. Die getesteten Konzentrationen können leider dem Paper nicht entnommen werden. Zudem wurden Hemmungen eines wässrigen Extraktes von *A. annua* bereits ab einer Konzentration von 5 mg/mL gegen *E. coli* nachgewiesen. Alle erwähnten Hemmungen sind in diesem Paper mittels Well Diffusion Assay nachgewiesen worden (Massiha et al., 2013). Artemisinin bei einer Konzentration von 2 mg/mL zeigte im Well Diffusion Assay eine Hemmung gegen *E. coli* WDCM 0013, dies konnte im Paper von Dhingra et al., (2000) ebenfalls bereits bei einer Konzentration von 1 mg/mL Artemisinin bestätigt werden. Wobei in ihrem Versuch *E. coli* NCTC 9002 als Testorganismus verwendet wurde und einen Hemmhof von 23 mm gemessen worden ist. Minocycline welches als positive Kontrolle in den Assays eingesetzt wurde, zeigte wie erwartet eine Hemmung sowohl gegen *E. coli* WDCM 0013 als auch *S. aureus* DMSZ766 (Klastersky & Daneau, 1972). Da von allen Assays nur mit dem Well Diffusion Assay Hemmungen der *A. annua* Extrakte gegen das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 gezeigt werden konnten, wurde dieser zusammen mit dem Omnilog Assay für das weitere Testen des Etherphase- Extraktes sowie deren Fraktionen und des Ethylacetat- Extraktes mit Fraktionen verwendet.

Die Ergebnisse aus dem Kapitel 3.5 zeigten, dass von 21 getesteten Extrakten drei Extrakte eine antibakterielle Wirkung gegen *E. coli* WDCM 0013 im Omnilog Assay als auch im Well Diffusion Assay zeigten. Dazu zählten der Soxhlet EtoAC- Extrakt, die Etherphase F8-13 und die EtoAC F11-17. Aufgrund der starken Eigenfärbungen der beiden Extrakte Soxhlet EtoAC und EtoAC F11-17 konnten anhand der Ergebnisse des Hemm- Assays im Omnilog keine eindeutigen Bestimmungen gemacht werden. Eine Messung mit Omnilog für Extrakte mit starker Eigenfärbung zeigte sich im Laufe dieser Arbeit als problematisch da ein Farbumschlag auf violett nur sehr schwer bis gar nicht erkennbar ist und somit keine Aussagen über eine Hemmung gemacht werden können. Dennoch konnten solche Resultate wie die von der EtoAC F11-17 und vom Soxhlet EtoAC- Extrakt mit den Ergebnissen des Well Diffusion Assays verglichen werden, welche bei beiden Extrakten eine klare Hemmung bei 100 mg/mL und für die EtoAC F11-17 sogar bei 10 mg/mL eine Hemmung zeigte. Bei einzelnen Extrakten oder Fraktionen wie der Etherphase- Extrakt und die Etherphase F14-22 sind beim Inhibierungs-Assay mit Omnilog Hemmungen bei einer Konzentration von 5 mg/mL festgestellt worden nicht aber im Well Diffusion Assay bei einer Konzentration von 100 mg/mL. Solche Ergebnisse konnten nicht mit der Literatur verglichen werden und wurden auch wegen keiner zweiten Bestätigung einer Hemmung mittels Well Diffusion nicht weiter priorisiert. Die drei Extrakte Etherphase F8-13, Soxhlet EtoAC und EtoAC F11-17, welche alle eine Hemmung des *E. coli* WDCM 0013 Wachstums zeigten, wurden weiter fraktioniert und auf *E. coli* WDCM 0013 sowie auch auf die Borrelien getestet. Zusammengefasst lässt sich über die Ergebnisse der antibakteriellen Wirkung der verschiedenen Extrakte sagen, dass solche welche mit Hitze verarbeitet worden sind eine schwächere bis gar keine Wirkung aufwiesen als solche Extrakte die bei Raumtemperatur hergestellt worden sind. Im Vergleich zur EtoAC Extraktion, welche bei Raumtemperatur hergestellt wurde, sind die beiden Extrakte Etherphase F8-13 und Soxhlet EtoAC beide unter dem Einfluss von Hitze hergestellt worden. In Bezug auf die Grössen der Hemmhöfe von EtoAC F11-17, Etherphase F8-13 und Soxhlet EtoAC- Extrakt ist der Hemmhof von EtoAC F11-17 viel grösser als die Hemmhöfe der beiden anderen Extrakte. Dies kann dadurch erklärt werden, dass durch die Hitze wertvolle Wirkstoffe in den *A. annua* Extrakten verloren gehen können (Dr. med. Lydia Reutter, 2023).

## Fraktionen von EtoAC F11-17 und Etherphase F8-13 und Well

### Diffusion mit *E. coli* WDCM 0013

Die einzelnen Fraktionen von EtoAC F11-17 und Etherphase F8-13 zeigten keine Hemmungen des *E. coli* WDCM 0013 Wachstums im Well Diffusion Assay. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass eine einzelne Fraktion weniger wirksam ist als der Gesamtextrakt. Verglichen mit der Literatur wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die biologischen und pharmakologischen Funktionen von Pflanzenextrakten auf Synergien zwischen verschiedenen Komponenten zurückzuführen sind. Demnach kommt es selten vor, dass die beobachtete Wirkung auf eine einzelne Komponente beziehungsweise auf eine einzelne Fraktionen eines Extraktes zurückzuführen ist. Nur in wenigen Studien wurde gezeigt, dass eine Komponente allein für die Gesamtwirkung eines Extraktes verantwortlich ist (Allemailem, 2022; Golbarg & Mehdipour Moghaddam, 2021). Um dieser These näher zu kommen, wurden die einzelnen Fraktionen von EtoAC F11-17 sowie Etherphase F8-13 zusammen gepoolt und ihre Wirkung im Well Diffusion Assay auf *E. coli* WDCM 0013 getestet. Von den beiden Pools konnte ein schwacher Hemmhof beim EtoAC F11-17 Pool bei einer Konzentration von 30 mg/mL festgestellt werden. Im Vergleich zu dem Ergebnis des Hemmhofes der EtoAC F11-17 (Kapitel 4.4.1) die bei einer Konzentration von 100 mg/mL getestet worden ist und einen grösseren Hemmhof zeigte, ist die Konzentration entscheidend für die Grösse des Hemmhofes. Weiter zeigte das wiederholte Testen der EtoAC Fraktion 11-17 und Etherphase Fraktion 8-13 auf *E. coli* WDCM 0013 mittels Well Diffusion Assay, für beide Fraktionen einen Hemmhof. Somit konnte auch im technischen Replikate eine antibakterielle Wirkung der beiden Fraktionen gegen *E. coli* WDCM 0013 festgestellt werden.

### MALDI-TOF der drei Fraktionen von EtoAC F11-17

Die Molekularmassen die mittels Analyse mit MALDI-TOF ausgerechnet werden konnten, sind in verschiedenen Datenbanken für Naturprodukte gesucht worden. Dies diente der Überprüfung eines bereits beschriebenen Moleküls von *Artemisia annua*. Im Anhang ist eine Liste der im Rahmen der Bachelorarbeit durchsuchten Datenbanken zu finden (siehe Anhang 4: Datenbank Recherche MALDI-TOF). Von 74 Datenbanken konnten in neun Datenbanken als Sucheingabe die Molekularmasse in einem Bereich von jeweils plus/minus 0.2 eingegeben werden. Von den neun Datenbanken sind in den fünf Datenbanken ChEBI, COCONUT, NPASS, SciFinder und SuperNatural II allgemeine Treffer gefunden worden. ChEBI ergab total 13 Treffer für die vier untersuchten Molekularmassen, von denen keiner einen Bezug auf *A. annua* oder eine andere Pflanze hatte. Die Suche in der Datenbank COCONUT ergab total sechs Treffer, wobei keiner davon eine Substanz in *A. annua* oder in einer anderen Pflanze beschrieb. Die insgesamt 141 Treffer in der Datenbank NPASS, zeigten keinen Bezug auf *A. annua* jedoch

auf andere Pflanzenspezies. In der Datenbank SciFinder konnte als zusätzlicher Filter „Biological studies“ ausgewählt werden, wobei für die vier untersuchten Molekularmassen total 1972 Treffer resultierten. Diese grosse Zahl an Treffer wurden auf Grund keiner weiteren möglichen Eingrenzung bezüglich Pflanzenprodukte nicht weiter angeschaut. Auch in der Datenbank SuperNatural II konnten allein durch die Eingaben der Molekularmassen insgesamt 398 Treffer erzielt werden, die nicht weiter eingegrenzt werden konnten. Für eine weitere Eingrenzung der Treffer müssten weitere Charakterisierungen der einzelnen Fraktionen gemacht werden und in den Datenbanken erneut gesucht werden. Eine Möglichkeit wäre eine Analyse mit der Kernspinresonanz (NMR-Spektroskopie), um die Molekularstruktur sowie die chemische Zusammensetzung einer Fraktion zu bestimmen. Ein Nachteil der NMR- Spektroskopie ist, dass für die Analyse eine viel grössere Menge an Extrakt benötigt wird im Gegensatz zur Massenanalyse mit MALDI-TOF.

### **Inhibierungs- Assay mit Omnilog mit *Borrelia* sp.**

Die beiden Ansätze der Borrelien einmal mit *A. annua* Extrakten für 4d inkubiert und einmal ohne zeigten kein Wachstum von *B. afzelii*, *B. burgdorferi* und *B. garinii* in den 96- Well Platten bei einem Volumen von 200  $\mu$ L. Im Vergleich zur Literatur, wurde im Paper von (Feng et al., 2020) gezeigt, dass 100  $\mu$ L einer stationären Kultur von *B. burgdorferi* in einer 96- Well Platte unter mikroaerophilen Bedingungen (33°C mit 5% CO<sub>2</sub>) für 7d kultiviert werden können. In diesem Paper wird mit dieser Art der Kultivierung die Bewertung von Naturprodukten auf ihre Aktivität gegen *B. burgdorferi* stationäre Phase-Kulturen beschrieben. Zusätzlich wird erwähnt, dass für ihre Subkultivierung 1 mL einer stationären Kultur von *B. burgdorferi* in 1.5 mL Reaktionsgefässe für 7 d mikroaerophil kultiviert wird. Demnach sind wie im Kapitel 3.9 beschrieben, verschiedene Wachstumsversuche gemacht worden um eine Kultivierungsmethode von *B. burgdorferi* für das Testen der *A. annua* Extrakte zu etablieren.

### **Borrelien Wachstumsversuche**

Die Resultate der fünf Wachstumsansätze mit den Borrelien zeigten, dass am meisten lebende *B. burgdorferi* Spirochäten nach einer Kultivierung von 1 mL *B. burgdorferi* Kultur bei einer Zellkonzentration von  $3.5 \cdot 10^6$  Zellen/mL in einem 1.5 mL Reaktionsgefäss nach 7d gefärbt werden konnten. Interessanterweise konnten in den Versuchen mit den 96- Well Platten mit einem kleineren Volumen an Borrelien Kulturen hauptsächlich nur tote Borrelien festgestellt werden. Zusätzlich zeigte das Resultat des Versuchs mit 1.5 mL Borrelien Kultur in Deepwell Platten, das gleich schlechte Ergebnis mit mehr toten Borrelien als lebende, wie die Kultivierungen in den 96- Well Platten mit einem geringeren Volumen einer Borrelien Kultur. Die erhaltenen Resultate deuten darauf hin, dass trotz einer mikroaerophilen Kultivierung bei allen

Versuchen, die Auswahl des Kultivierungsgefäßes und das Volumen der Borrelien Kultur von entscheidender Bedeutung sind. Nichtsdestotrotz wurde für die gleichen Kultivierungsbedingungen wie sie in diesem Bericht beschrieben worden sind, in einer Studie gezeigt, dass die Kultivierung von 100  $\mu\text{L}$  *B. burgdorferi* in 96- Well Platten als Methode geeignet ist (Feng et al., 2020). Die Autoren des Papers wurden im Rahmen dieser Bachelorarbeit kontaktiert, im Interesse die genaue Vorgehensweise ihrer Kultivierung zu erfahren. Dank den gesammelten Erfahrungen und erhaltenen Resultaten der Wachstumsansätze, konnte die Durchführung des Assays der Borrelien mit dem *A. annua* EtoAC F11-17 Extrakt, in den 1.5 mL Reaktionsgefäße erfolgen.

## **Inhibierungs- Assay *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 in 1.5 mL**

### **Reaktionsgefäße**

Die Resultate der Experimente mit *B. burgdorferi* und EtoAC F11-17 sowie den drei verschiedenen Kontrollen zeigten, dass in beiden Ansätzen mit EtoAC F11-17 verglichen mit den Kontrollen mehr tote als lebende Borrelien nach der Färbung mit SYBR Green I/ PI vorhanden waren. Für einen besseren Überblick der jeweiligen Proben wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Axio Imager.Z2 von Zeiss mit gekoppeltem Imaging- Gerät AxioCam MR R3 ein XY-Tile gemacht der für vier festgelegte Standorte verteilt über die Probe auf dem Objektträger, Aufnahmen machte. Trotz einem Waschschrift der Borrelien mit PBS um Partikel der Extrakte loszuwerden, konnten bleibende Hintergrundgeräusche festgestellt werden. Demnach kann nicht davon ausgegangen werden, dass zu 100% nur Borrelien gefärbt wurden. Ein Filtrieren der Borrelien Kulturen über einen 0.20  $\mu\text{m}$  und 0.45  $\mu\text{m}$  Filter wurde ausprobiert, wobei auch hier noch Partikel der Extrakte übrig blieben die gefärbt wurden. In diesem Versuch wurden die Testsubstanzen für 24 h mit den Borrelien inkubiert, in weiteren Experimenten wäre eine längere Inkubationszeit von 7d und die Auswertung der Wirkung der Extrakte auf die Borrelien interessant. Das Resultat des Wachstumsversuchs von *B. burgdorferi* im 1.5 mL Reaktionsgefäß hat gezeigt, dass eine mikroaerophile Kultivierung von 7 d möglich ist und demnach auch diese Zeitspanne für den Inhibierungs- Assay von *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 getestet werden kann.

## Ausblick

Für eine signifikante Auswertung eines Hemm- Assays mit Borrelien und dem EtoAC F11-17 Extrakt sowie den Kontrollen, müsste nach einer statistischen Versuchsplanung gearbeitet werden. Weitere Versuche mit mehreren biologischen als auch technischen Replikaten müssten gemacht werden. Um eine quantitative Auswertung des Hemm- Assays machen zu können, wäre die Messung des Verhältnis von grüner (lebend) zu roter Fluoreszenz (tot) von *B. burgdorferi* mit beispielsweise dem HTS 7000 Plus Bio Assay Reader vorteilhaft (Feng, Wang, Zhang, et al., 2014). Damit könnte, wie es im Paper von Feng et al., (2015) beschrieben ist, die Fluoreszenzintensität für 100 bis 200 Zellen pro Bild gemessen und mit Hilfe der Software Image Pro-Plus quantitativ ausgewertet werden. Folglich wäre eine Berechnung des Anteils an lebenden Zellen für jede Probe möglich. In weiteren Experimenten sollte die Durchführung des Hemm- Assays mit *B. burgdorferi* und EtoAC F11-17 über eine längere Zeitspanne hinweg gemacht werden. Sodass nach 24 h, 3 d und 7 d Auswertungen mit dem HTS 7000 Plus Bio Assay Reader erfolgen und mit einem Vergleich der Resultate Aussagen über die Wirkung von EtoAC F11-17 gemacht werden können. Ausserdem könnten in weiteren Versuchen MIC-Tests für den EtoAC F11-17 Extrakt mit *B. burgdorferi* gemacht werden.

Zusätzlich wären Stabilitätstests des *A. annua* Extraktes interessant um eine Idee über die Haltbarkeit des Extraktes sowie dessen Wirkungspotenzial zu bekommen. Bezüglich der Recherche der erhaltenen Molekulargewichte der MALDI-TOF Analyse von EtoAC F11-17 wäre eine weitere Charakterisierung der Fraktionen mittels NMR nötig, um die Molekularstruktur sowie die chemische Zusammensetzung einer Fraktion zu bestimmen. So könnte mit mehr Hintergrundwissen der Moleküle eine Recherche in den Datenbanken eingeschränkt und vereinfacht werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Allemailem, K. S. (2022). Aqueous Extract of *Artemisia annua* Shows In Vitro Antimicrobial Activity and an In Vivo Chemopreventive Effect in a Small-Cell Lung Cancer Model. *Plants*, 11(23), 3341. <https://doi.org/10.3390/plants11233341>
- Alvarez-Manzo, H., Zhang, Y., Shi, W., & Zhang, Y. (2020). Evaluation of Disulfiram Drug Combinations and Identification of Other More Effective Combinations against Stationary Phase *Borrelia burgdorferi*. *Antibiotics*, 9(9), 542. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090542>
- Anibogwu, R., Jesus, K. D., Pradhan, S., Pashikanti, S., Mateen, S., & Sharma, K. (2021). Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from *Artemisia* and Their Biological Significance: A Review. *Molecules*, 26(22), 6995. <https://doi.org/10.3390/molecules26226995>
- Bobbe, J. R., Jutras, B. L., Horn, E. J., Embers, M. E., Bailey, A., Moritz, R. L., Zhang, Y., Soloski, M. J., Ostfeld, R. S., Marconi, R. T., Aucott, J., Ma'ayan, A., Keesing, F., Lewis, K., Ben Mamoun, C., Rebman, A. W., McClune, M. E., Breitschwerdt, E. B., Reddy, P. J., ... Fallon, B. A. (2021). Recent Progress in Lyme Disease and Remaining Challenges. *Frontiers in Medicine*, 8, 666554. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.666554>
- Chuo, S. C., Nasir, H. M., Mohd-Setapar, S. H., Mohamed, S. F., Ahmad, A., Wani, W. A., Muddassir, Mohd., & Alarifi, A. (2022). A Glimpse into the Extraction Methods of Active Compounds from Plants. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 52(4), 667–696. <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1820851>
- Dhingra, V., Pakki, S. R., & Narasu, M. L. (2000). Antimicrobial activity of artemisinin and its precursors. *Current Science*, 78(6), 709–713.
- Dr. med. Lydia Reutter. (2023). *Amarys\_Newsletter\_Borreliose\_die\_unterschaetzte\_Gefahr*. Zuletzt abgerufen am 03.07.2023 unter <https://amarys.de/borreliose-die-unterschaetzte-gefahr/>
- Eckhardt, K., Zeller, K.-P., Siehl, H.-U., Berger, S., & Sicker, D. (2016). Ein Wirkstoff gegen Malaria aus der Natur: Artemisinin: Nobelpreisgekrönt: Qinghaosu,. *Chemie in unserer Zeit*, 50(5), 326–335. <https://doi.org/10.1002/ciuz.201600762>
- Ekiert, H., Świątkowska, J., Klin, P., Rzepiela, A., & Szopa, A. (2021). *Artemisia annua* – Importance in Traditional Medicine and Current State of Knowledge on the Chemistry, Biological Activity and Possible Applications. *Planta Medica*, 87(08), 584–599. <https://doi.org/10.1055/a-1345-9528>
- Feng, J., Leone, J., Schweig, S., & Zhang, Y. (2020). Evaluation of Natural and Botanical Medicines for Activity Against Growing and Non-growing Forms of *B. burgdorferi*. *Frontiers in Medicine*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2020.00006>
- Feng, J., Shi, W., Miklossy, J., Tauxe, G. M., McMenemy, C. J., & Zhang, Y. (2018). Identification of Essential Oils with Strong Activity against Stationary Phase *Borrelia burgdorferi*. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 7(4), 89. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040089>

- Feng, J., Shi, W., Zhang, S., Sullivan, D., Auwaerter, P. G., & Zhang, Y. (2016). A Drug Combination Screen Identifies Drugs Active against Amoxicillin-Induced Round Bodies of In Vitro *Borrelia burgdorferi* Persisters from an FDA Drug Library. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00743>
- Feng, J., Wang, T., Shi, W., Zhang, S., Sullivan, D., Auwaerter, P. G., & Zhang, Y. (2014). Identification of novel activity against *Borrelia burgdorferi* persisters using an FDA approved drug library. *Emerging Microbes & Infections*, 3(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.53>
- Feng, J., Wang, T., Zhang, S., Shi, W., & Zhang, Y. (2014). An Optimized SYBR Green I/PI Assay for Rapid Viability Assessment and Antibiotic Susceptibility Testing for *Borrelia burgdorferi*. *PLoS ONE*, 9(11), e111809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111809>
- Feng, J., Weitner, M., Shi, W., Zhang, S., Sullivan, D., & Zhang, Y. (2015). Identification of Additional Anti-Persister Activity against *Borrelia burgdorferi* from an FDA Drug Library. *Antibiotics*, 4(3), 397–410. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4030397>
- Feng, J., Weitner, M., Shi, W., Zhang, S., & Zhang, Y. (2016). Eradication of Biofilm-Like Microcolony Structures of *Borrelia burgdorferi* by Daunomycin and Daptomycin but not Mitomycin C in Combination with Doxycycline and Cefuroxime. *Frontiers in Microbiology*, 7, 62. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00062>
- Feng, J., Yee, R., Zhang, S., Tian, L., Shi, W., Zhang, W.-H., & Zhang, Y. (2018). A Rapid Growth-Independent Antibiotic Resistance Detection Test by SYBR Green/Propidium Iodide Viability Assay. *Frontiers in Medicine*, 5, 127. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00127>
- Feng, J., Zhang, S., Shi, W., Zubcevik, N., Miklossy, J., & Zhang, Y. (2017). Selective Essential Oils from Spice or Culinary Herbs Have High Activity against Stationary Phase and Biofilm *Borrelia burgdorferi*. *Frontiers in Medicine*, 4, 169. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00169>
- Flora Helvetica. (2018). *Artemisia annua* L. (*Art Info*). Art Info. <https://www.infoflora.ch/de/flora/artemisia-annua.html>
- Goc, A., Niedzwiecki, A., & Rath, M. (2015). In vitro evaluation of antibacterial activity of phytochemicals and micronutrients against *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia garinii*. *Journal of Applied Microbiology*, 119(6), 1561–1572. <https://doi.org/10.1111/jam.12970>
- Goc, A., & Rath, M. (2016). The anti-borreliae efficacy of phytochemicals and micronutrients: An update. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(3–4), 75–82. <https://doi.org/10.1177/2049936116655502>
- Golbarg, H., & Mehdipour Moghaddam, M. J. (2021). Antibacterial Potency of Medicinal Plants including *Artemisia annua* and *Oxalis corniculata* against Multi-Drug Resistance *E. coli*. *BioMed Research International*, 2021, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2021/9981915>
- Gupta, P., Dutta, B., Pant, D., Joshi, P., & Lohar, D. (2009). In vitro antibacterial activity of *Artemisia annua* Linn. Growing in India. *International Journal of Green Pharmacy*, 3(3), 255. <https://doi.org/10.4103/0973-8258.56287>

- Hu, Z., Guan, Y., Hu, W., Xu, Z., & Ishfaq, M. (2022). An overview of pharmacological activities of baicalin and its aglycone baicalein: New insights into molecular mechanisms and signaling pathways. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences, Online First*. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2022.60380.13381>
- Huppertz, H.-I., & Krause, A. (2003). Lyme-Borreliose. *Der Internist, 44*(2), 175–183. <https://doi.org/10.1007/s00108-002-0770-y>
- Hutschenreuther, A., Birkemeyer, C., Grötzinger, K., Straubinger, R. K., & Rauwald, H. W. (2010). Growth inhibiting activity of volatile oil from *Cistus creticus* L. against *Borrelia burgdorferi* s.s. In vitro. *Die Pharmazie, 65*(4), 290–295.
- J. Weathers, P. (2023). Artemisinin as a therapeutic vs. Its more complex Artemisia source material. *Natural Product Reports*. <https://doi.org/10.1039/D2NP00072E>
- Klastersky, J., & Daneau, D. (1972). Bacteriological Evaluation of Minocycline. *Chemotherapy, 17*(1), 51–58. <https://doi.org/10.1159/000220838>
- Liebold, T., Straubinger, R. K., & Rauwald, H. W. (2011). Growth inhibiting activity of lipophilic extracts from *Dipsacus sylvestris* Huds. Roots against *Borrelia burgdorferi* s. S. In vitro. *Die Pharmazie, 66*(8), 628–630.
- Massiha, A., Khoshkholgh-Pahlaviani, M. M., Issazadeh, K., Bidarigh, S., & Zarrabi, S. (2013). *Antibacterial Activity of Essential Oils and Plant Extracts of Artemisia (Artemisia annua L.) In Vitro*.
- Mohammed, S., Dekabo, A., & Hailu, T. (2022). Phytochemical analysis and anti-microbial activities of *Artemisia* spp. And rapid isolation methods of artemisinin. *AMB Express, 12*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01346-5>
- Nitbani, F. O., Tjitda, P. J. P., Nitti, F., Jumina, J., & Detha, A. I. R. (2022). Antimicrobial Properties of Lauric Acid and Monolaurin in Virgin Coconut Oil: A Review. *ChemBioEng Reviews, 9*(5), 442–461. <https://doi.org/10.1002/cben.202100050>
- Othman, M., Loh, H. S., Wiart, C., Khoo, T. J., Lim, K. H., & Ting, K. N. (2011). Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. *Journal of Microbiological Methods, 84*(2), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.11.008>
- Peng, Y., Chen, T., Luo, L., Li, L., Cao, W., Xu, X., Zhang, Y., Yue, P., Dai, X., Ji, Z., Jian, M., Bai, R., Ding, Z., Wang, F., Wen, S., Zhou, G., Kong, J., Luo, S., Liu, A., & Bao, F. (2020). Isoforskolin and Cucurbitacin IIa promote the expression of anti-inflammatory regulatory factor SIGIRR in human macrophages stimulated with *Borrelia burgdorferi* basic membrane protein A. *International Immunopharmacology, 88*, 106914. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106914>
- Rauwald, H. W., Liebold, T., Grötzinger, K., Lehmann, J., & Kuchta, K. (2019). Labdanum and Labdanes of *Cistus creticus* and *C. ladanifer*: Anti-*Borrelia* activity and its phytochemical profiling☆. *Phytomedicine, 60*, 152977. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152977>

- Tao, A., Song, Z., Feng, X., Zhang, A., He, H., & Chen, Y. (2020). Antibacterial and Antiviral Activities of Artemisia Annua Aqueous Extract in Vitro. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 565, 012053. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/565/1/012053>
- Wu, C., Yan, Y., Wang, Y., Sun, P., & Qi, R. (2020). Antibacterial epoxy composites with addition of natural *Artemisia annua* waste. *E-Polymers*, 20(1), 262–271. <https://doi.org/10.1515/epoly-2020-0029>
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Artemisia annua</i> L. ( <i>A. annua</i> ) .....	20
Abbildung 2: Hauptkomponenten des <i>A. annua</i> Pulvers und einzelne chemische Strukturen von Komponenten von <i>Artemisia naphtha</i> (AN).....	22
Abbildung 3: <i>A. annua</i> Blätter Pulver (65.2 g) wurde in einem 1L Rundkolben mit 99% Ethanol .....	33
Abbildung 4: <i>A. annua</i> Rohextrakt mit Aktivkohle (26 g) .....	33
Abbildung 5: 1 L Scheidetrichter gefüllt mit gelbem Filtrat und Diethylether (150 mL).....	34
Abbildung 6: Schlecht löslicher Rückstand (Salze) des wässrigen Extraktes.....	34
Abbildung 7: Aufbau der Soxhlet- Extraktion mit Soxhlet Aufsatz .....	36
Abbildung 8: Abbildung einer Nahaufnahme des Soxhlet- Aufsatzes mit Extraktionshülse ...	36
Abbildung 9: Mikrowelle von CEM .....	37
Abbildung 10: Schema der 96-well Platte des Inhibierungs- Assays mit Omnilog der vier Extrakte .....	42
Abbildung 11: Ablauf des Disk Diffusion Tests für die vier Extrakte .....	43
Abbildung 12: Schema des Well Diffusion Assays für die vier Extrakte .....	44
Abbildung 13: Schema der 96-well Platte des Hemm- Assays mit Omnilog mit den 17 Extrakten .....	47
Abbildung 14: Schema der 96-well Platte des Inhibierungs -Assays mit Omnilog mit <i>B. afzelii</i> , <i>B. burgdorferi</i> und <i>B. garinii</i> .....	51
Abbildung 15: Chromatogramm des EtoAC- Extraktes eingeteilt in die sechs Fraktionen.....	56
Abbildung 16: Chromatogramm des Etherphase- Extraktes eingeteilt in die vier Fraktionen.....	56
Abbildung 17: Chromatogramm des Soxhlet EtoAC- Extraktes eingeteilt in die drei Fraktionen.. ..	57
Abbildung 18: Chromatogramm des Dichlormethan- Extraktes eingeteilt in die drei Fraktionen. ....	57
Abbildung 19: Lebendprobe von <i>B. afzelii</i> gefärbt mit SYBR Green I/PI .....	59
Abbildung 20: Totprobe von <i>B. afzelii</i> gefärbt mit SYBR Green I/ PI.....	59
Abbildung 21: Lebendprobe von <i>B. garinii</i> gefärbt gefärbt mit SYBR Green I/PI.....	59
Abbildung 22: Totprobe von <i>B. garinii</i> gefärbt mit SYBR Green I/ PI.....	59
Abbildung 23: Lebendprobe <i>B. burgdorferi</i> gefärbt mit SYBR Green I/PI.....	60
Abbildung 24: Totprobe <i>B. burgdorferi</i> gefärbt gefärbt mit SYBR Green I/ PI.....	60
Abbildung 25: Inhibierungs- Assay mit Omnilog der drei Kontrollen Minocycline, Artemisinin und DMSO .....	63
Abbildung 26: Aufnahme der Platte des Hemm- Assays mit Omnilog der vier Extrakte zum Zeitpunkt 0h. ....	63

Abbildung 27: Aufnahme der Platte des Hemm- Assays mit Omnilog der vier Extrakte zum Zeitpunkt nach 72h.....	63
Abbildung 28: Disk Diffusion Platte mit <i>E. coli</i> WDCM 0013 und den vier Extrakten. <i>E. coli</i> WDCM 0013 wurde mit einem Wattestäbchen auf der Platte verteilt. ....	64
Abbildung 29: Disk Diffusion Platte mit <i>E. coli</i> WDCM 0013 und den vier Extrakten. <i>E. coli</i> WDCM 0013 wurde mit einem Spatel auf der Platte verteilt.....	64
Abbildung 30: <i>E. coli</i> WDCM 0013 mit 100 mg/mL Pflanzenextrakte.....	65
Abbildung 31: <i>E. coli</i> WDCM 0013 mit 100 mg/mL Pflanzenextrakte und Kontrollen. ....	65
Abbildung 32: <i>E. coli</i> WDCM 0013 mit Minocycline [0.1 mg/mL].....	66
Abbildung 33: <i>S. aureus</i> DMSZ 766 mit Minocycline [0.1 mg/mL].....	66
Abbildung 34: <i>E.coli</i> mit 100 mg/mL Etherphase-Extrakt Fraktionen.....	70
Abbildung 35: <i>E.coli</i> mit 100 mg/mL Etherphase-Extrakt Fraktionen und Soxhlet EtoAC-Fraktion.....	70
Abbildung 36: <i>E.coli</i> mit 10 mg/mL EtoAC-Fraktionen .....	71
Abbildung 37: <i>E.coli</i> mit 100 mg/mL EtoAC-Fraktionen .....	71
Abbildung 38: <i>E.coli</i> mit 10 mg/mL EtoAC-Extrakt, Microwave-EtoAC und Artemisinin.....	72
Abbildung 39: <i>E.coli</i> mit Kontrollen Minocycline und DMSO (Repilkat) .....	72
Abbildung 40: Hemm- Assay mit Omnilog des Etherphase- Extraktes mit <i>E. coli</i> WDCM0013 .....	73
Abbildung 41: Etherphase- Extraktes <b>A)</b> Platte bei 0h <b>B)</b> Platte nach 72h.....	73
Abbildung 42: Hemm- Assay mit Omnilog der Etherphase Fraktion 8-13 mit <i>E. coli</i> WDCM0013 .....	74
Abbildung 43: Etherphase Fraktion 8-13 <b>A)</b> Platte bei 0h <b>B)</b> Platte nach 72h.....	74
Abbildung 44: Hemm- Assay mit Omnilog der Etherphase Fraktion 14-22 mit <i>E. coli</i> WDCM0013.....	75
Abbildung 45: Etherphase Fraktion 14-22 <b>A)</b> Platte bei 0h <b>B)</b> Platte nach 72h.....	75
Abbildung 46: Hemm- Assay mit Omnilog des Soxhlet EtoAC Extraktes mit <i>E. coli</i> WDCM0013. ....	76
Abbildung 47: Soxhlet EtoAC- Extrakt <b>A)</b> Platte bei 0h <b>B)</b> Platte nach 72h.....	76
Abbildung 48: Hemm- Assay mit Omnilog der EtoAC Fraktion 11-17 mit <i>E. coli</i> WDCM0013. ....	77
Abbildung 49: Soxhlet EtoAC- Extrakt <b>A)</b> Platte bei 0h <b>B)</b> Platte nach 72h.....	77
Abbildung 50: Hemm- Assay mit Omnilog der drei Kontrollen Minocycline [5 µg/mL] .....	78
Abbildung 51: Kontrollen Minocycline [5 µg/mL] (blau), Artemisinin [0.1 mg/mL] (orange) und DMSO 50% (grau). <b>A)</b> Platte bei 0h <b>B)</b> Platte nach 72h .....	78
Abbildung 52: Chromatogramm der EtoAC Fraktion 11-17 eingeteilt in die vier Fraktionen. .	79

Abbildung 53: Chromatogramm der Etherphase Fraktion 8-13 eingeteilt in die drei Fraktionen. .....	80
Abbildung 54: <i>E. coli</i> WDCM 0013 mit 30 mg/mL Extrakte. ....	81
Abbildung 55: <i>E. coli</i> WDCM 0013 mit Kontrollen. ....	81
Abbildung 56: <i>E. coli</i> WDCM 0013 mit 100 mg/mL Extrakte als technische Replikate .....	82
Abbildung 58: Chromatogramm EtoAC(11-17) Fraktion 5-9 .....	83
Abbildung 59: Chromatogramm EtoAC(11-17) Fraktion 10-13.....	84
Abbildung 60: Chromatogramm EtoAC(11-17) Fraktion 14-19. ....	85
Abbildung 61: Wachstumüberprüfung der Borrelien im Omnilog. Eine Aufnahme die nach der Inkubation von 4d im Omnilog gemacht wurde. ....	86
Abbildung 62: Omnilog mit Borrelien sp. und den Extrakten Soxhlet Ethylacetat- Extrakt, Etherphase Fraktion 8-13 und Ethylacetat Fraktion 11-17. Die Aufnahme wurde nach der Inkubation von 4d im Omnilog gemacht.....	87
Abbildung 63: <i>B. afzelii</i> gefärbt mit SYBR Green I/ PI angeregt mit Blaulicht ( $\lambda_{max} = 498$ nm).....	88
Abbildung 64: <i>B. afzelii</i> gefärbt mit SYBR Green I/ PI angeregt mit Grünlicht ( $\lambda_{max} = 535$ nm). .....	88
Abbildung 65: 3. Ansatz im 1.5 mL Reaktionsgefäß, <i>B. burgdorferi</i> gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Blaulicht( $\lambda_{max} = 498$ nm).....	91
Abbildung 66: 3. Ansatz im 1.5 mL Reaktionsgefäß, <i>B. burgdorferi</i> gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Grünlicht ( $\lambda_{max} = 535$ nm).....	91
Abbildung 67: 3. Ansatz im 1.5 mL Reaktionsgefäß, <i>B. burgdorferi</i> gefärbt mit SYBR Green I/PI. Overlay der beiden Abbildungen von oben mit InDesign. ....	91
Abbildung 68: 3. Ansatz im 15 mL Falcontube, <i>B. burgdorferi</i> gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Blaulicht ( $\lambda_{max} = 498$ nm).....	92
Abbildung 69: Ansatz im 15 mL Falcontube, <i>B. burgdorferi</i> gefärbt mit SYBR Green I/PI. Overlay der beiden Abbildungen von oben mit InDesign. ....	92
Abbildung 70: Ansatz im 15 mL Falcontube, <i>B. burgdorferi</i> gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Grünlicht ( $\lambda_{max} = 535$ nm).....	92
Abbildung 71: 3. Ansatz, Mix 15 mL Falcontube und Reaktionsgefäß, <i>B. burgdorferi</i> gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Blaulicht ( $\lambda_{max} = 498$ nm) .....	93
Abbildung 72: 3. Ansatz, Mix 15 mL Falcontube und Reaktionsgefäß, <i>B. burgdorferi</i> gefärbt mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Grünlicht ( $\lambda_{max} = 535$ nm).....	93
Abbildung 73: 3. Ansatz, Mix 15 mL Falcontube und Reaktionsgefäß, <i>B. burgdorferi</i> gefärbt mit SYBR Green I/PI. Overlay der beiden Abbildungen von oben mit InDesign. ....	93
Abbildung 74: Versuch 5, <i>B. burgdorferi</i> gefärbt nach 7d Inkubation mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Blaulicht ( $\lambda_{max} = 498$ nm).....	94

Abbildung 75: Versuch 5, <i>B. burgdorferi</i> gefärbt nach 7d Inkubation mit SYBR Green I/PI und angeregt mit Grünlicht ( $\lambda_{\text{max}} = 535 \text{ nm}$ ).....	94
Abbildung 76: <i>B. burgdorferi</i> mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Erstes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ . .....	96
Abbildung 77: <i>B. burgdorferi</i> mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h . Zweites Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ . .....	96
Abbildung 78: <i>B. burgdorferi</i> mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Drittes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ . .....	96
Abbildung 79: <i>B. burgdorferi</i> mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24h. Viertes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ . .....	96
Abbildung 80: Rep. <i>B. burgdorferi</i> mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Erstes Bild von XY-Tile mit Massstab .....	97
Abbildung 81: 2. Rep. <i>B. burgdorferi</i> mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Zweites Bild von XY-Tile .....	97
Abbildung 82: Rep. <i>B. burgdorferi</i> mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Drittes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ .....	97
Abbildung 83: Rep. <i>B. burgdorferi</i> mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL] nach 24 h. Viertes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ .....	97
Abbildung 84: Blank <i>B. burgdorferi</i> nach 24 h. Erstes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ . .....	98
Abbildung 85: Blank <i>B. burgdorferi</i> nach 24 h. Zweites Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ . .....	98
Abbildung 86: Blank <i>B. burgdorferi</i> nach 24 h. Drittes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ . .....	98
Abbildung 87: Blank <i>B. burgdorferi</i> nach 24 h. Viertes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ . .....	98
Abbildung 88: <i>B. burgdorferi</i> mit 5% DMSO nach 24 h. Erstes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ . .....	99
Abbildung 89: <i>B. burgdorferi</i> mit 5% DMSO nach 24 h. Zweites Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ . .....	99
Abbildung 90: <i>B. burgdorferi</i> mit 5% DMSO nach 24 h. Drittes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ . .....	99
Abbildung 91: <i>B. burgdorferi</i> mit 5% DMSO nach 24 h. Viertes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ . .....	99
Abbildung 92: <i>B. burgdorferi</i> mit Artemisinin [100 $\mu\text{g/mL}$ ] nach 24 h. Erstes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 $\mu\text{m}$ . .....	100

---

Abbildung 93: <i>B. burgdorferi</i> mit Artemisinin [100 µg/mL] nach 24 h. Zweites Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm. ....	100
Abbildung 94: <i>B. burgdorferi</i> mit Artemisinin [100 µg/mL] nach 24 h. Drittes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm. ....	100
Abbildung 95: <i>B. burgdorferi</i> mit Artemisinin [100 µg/mL] nach 24 h. Viertes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm. ....	100
Abbildung 96: <i>B. burgdorferi</i> mit Minocycline [5 µg/mL] nach 24 h. Erstes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm. ....	101
Abbildung 97: <i>B. burgdorferi</i> mit Minocycline [5 µg/mL] nach 24 h. Zweites Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm. ....	101
Abbildung 98: <i>B. burgdorferi</i> mit Minocycline [5 µg/mL] nach 24h. Drittes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm. ....	101
Abbildung 99: <i>B. burgdorferi</i> mit Minocycline [5 µg/mL] nach 24h. Viertes Bild von XY-Tile mit Massstab 50 µm. ....	101

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Studien welche die <i>in-vitro</i> Wirksamkeit von 26 verschiedenen Pflanzenspezies zur Bekämpfung der Lyme-Borreliose aufzeigen. ....	13
Tabelle 2: Vier <i>A. annua</i> Blätter Pulver Extrakte mit einem Verweis zu den beschriebenen Methoden. ....	40
Tabelle 3: 21 <i>A. annua</i> Blätter Pulver Extrakte mit einem Verweis zu den beschriebenen Methoden. ....	45
Tabelle 4: Fraktionen mit Ausbeute [mg] des EtoAC- Extraktes.....	56
Tabelle 5: Fraktionen mit Ausbeute [mg] des Etherphase- Extraktes.....	56
Tabelle 6: Fraktionen mit Ausbeute [mg] des Soxhlet EtoAC- Extraktes.....	57
Tabelle 7: Fraktionen mit Ausbeute [mg] des Dichlormethan- Extraktes.....	57
Tabelle 8: Übersicht über die Resultate der drei verschiedenen Assays, Hemm Assay mit Omnilog, Disk Diffusion und Well Diffusion mit den vier <i>A. annua</i> Extrakten.....	61
Tabelle 9: Übersicht über die Resultate der zwei Assays, Hemm Assay mit Omnilog und Disk Diffusion mit den 21 <i>A. annua</i> Extrakten.....	67
Tabelle 10: Fraktionen mit Ausbeute [mg] der EtoAC Fraktion 11-17. ....	79
Tabelle 11: Fraktionen mit Ausbeute [mg] der Etherphase Fraktion 8-13.....	80
Tabelle 13: Übersicht der Resultate von den fünf verschiedenen Wachstumsansätzen.....	89

## 9 Anhang

Anhang 1: Aufgabenstellung.....	I
Anhang 2: Einverständniserklärung.....	IV
Anhang 2: MALDI-TOF Resultate.....	V
Anhang 3: Datenbank Recherche MALDI-TOF.....	IX
Anhang 4: Poster.....	IIX

## Anhang 1: Aufgabenstellung

N-FQ-Aufgabenstellung studentische Arbeiten

Zürcher Hochschule  
für Angewandte WissenschaftenLife Sciences und  
Facility Management

Stabsbereich Bildung

Aufgabenstellung für die Projekt-, Literatur-, Semester- und Bachelorarbeit

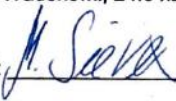

Institut für **Chemie und Biotechnologie**Art der Arbeit **Bachelorarbeit**

<b>Name Student/Studentin 1</b>	Julia Nafger	
<b>Name Student/Studentin 2</b>		
<b>Name Student/Studentin 3</b>		
<b>Studienjahrgang</b>	BT20	
<b>Titel</b>	Wirkung von Extrakten von Artemisia annua auf Borrelien	
<b>Vertraulich</b>	Vertrauliche Aufbewahrung/Korrektur	Ja <input type="checkbox"/> Nein <input checked="" type="checkbox"/>
	Geheimhaltungsvereinbarung	Ja <input type="checkbox"/> Nein <input checked="" type="checkbox"/>
<b>Fachgebiet</b>	Mikrobiologie und Molekularbiologie	
<b>Korrektor/Korrektorin</b>	<b>1.</b>	Name: Martin Sievers Firma: ZHAW Adresse: Einsiedlerstrasse 31 Tel.Nr.: 0589345716 E-Mail: martin.sievers@zhaw.ch
	<b>2.</b>	Name: Tobias Wermelinger Firma: ZHAW Adresse: Einsiedlerstrasse 31 Tel.Nr.: 0589345671 E-Mail: tobias.wermelinger@zhaw.ch
	<b>3.</b>	Name: Firma: Adresse: Tel.Nr.: E-Mail:

## N-FO-Aufgabenstellung studentische Arbeiten

Life Sciences und  
Facility Management

Stabsbereich Bildung

<b>Aufgabenstellung</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ausgangslage</b></li> <li>• <b>Zielsetzungen</b></li> <li>• <b>Zusätzliche Auftragsmodalitäten</b></li> </ul>	<p>Extrakte von <i>Artemisia annua</i> zeigen antimikrobielle Wirkung gegen <i>E. coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Candida albicans</i>. Die MIC betrug zwischen 15 und 31 mg/ml (Tao et al. 2020). Ein ethanolischer Extrakt von <i>Artemisia annua</i> ist auch mit einer inhibierenden Wirkung gegen <i>Borrelia burgdorferi</i> beschrieben worden (Feng et al. 2020). Der bekannte Wirkstoff von <i>Artemisia annua</i> ist Artemisinin, welches als Antimalariamittel eingesetzt wird.</p> <p>Im Rahmen der Bachelorarbeit sollen verschiedene Extrakte ausgehend von einem Bio-Kräuter-Pulver von <i>Artemisia annua</i>, das von Dr. Lydia Reutter, amarys, bereitgestellt wird, hergestellt werden. Die Extrakte basieren auf einer wässrigen, Ethanol-haltigen oder Ethylacetat-haltigen Lösung werden fraktioniert und auf antibakterielle Wirkung gegen verschiedene Borrelienarten untersucht. Eine Soxhlet-Extraktion als kontinuierliches Verfahren kann die Ausbeute am gewonnenen Wirkstoff erhöhen. Der Nachweis der Wirkung verschiedener Fraktionen der Extrakte und Kombinationen von einzelnen Fraktionen gegen Borrelien geschieht über eine Fluoreszenzfärbung mit SYBR Green I und Propidiumiodid. Lebende Borrelien-Zellen sind grün und tote Borrelienzellen rot gefärbt. Mögliche inhibierende Substanzen in den einzelnen Fraktionen können mittels MALDI-TOF-MS auf das Molekulargewicht bestimmt werden.</p> <p>Die Bachelorarbeit ist in Zusammenarbeit mit der Fachgruppe Organische Chemie und Medizinalchemie und mit Herbert Heller und Dr. Lydia Reutter.</p>
<b>Formale Anforderungen</b>	Alle relevanten <a href="#">Merkblätter</a> zu studentischen Arbeiten
<b>Termine</b>	
<b>Abgabetermin (12.00 Uhr)</b>	KW27, 06.07.2023
<b>Bemerkungen (z.B. Budgetplan)</b>	
<b>Arbeitsort</b>	ZHAW, Campus Reidbach
<b>1. Korrektor/Korrektorin</b>  Ort, Datum: Wädenswil, 24.04.2023  Unterschrift: 	<b>2. Korrektor/Korrektorin</b>  Ort, Datum: Wädenswil, 24.04.2023  Unterschrift: 

**N-FO-Aufgabenstellung studentische Arbeiten**



**Life Sciences und  
Facility Management**

Stabsbereich Bildung

<p><b>3. Korrektor/Korrektorin</b></p> <p>Ort, Datum:</p> <p>Unterschrift: _____</p>	<p><b>Student/Studentin 1</b></p> <p>Ort, Datum: Wädenswil, 24.04.2023</p> <p>Unterschrift: <i>J. Nafzger</i></p>
<p><b>Student/Studentin 2</b></p> <p>Ort, Datum:</p> <p>Unterschrift: _____</p>	<p><b>Student/Studentin 3</b></p> <p>Ort, Datum:</p> <p>Unterschrift: _____</p>

Erlassverantwortliche/-r	LeiterIn Stabsbereich Bildung	Ablageort	2.05.00 Erlasse Lehre Studium	
Beschlussinstanz	LeiterIn Stab	Publikationsort	Public	
Version	Beschluss	Beschlussinstanz	Inkrafttreten	Beschreibung Änderung
1.0.0	14.03.2017	LeiterIn Stab	14.03.2017	Anpassung und neues Layout, Überführung ins GPM
1.1.0	15.03.2018	LeiterIn Stab	15.03.2018	Anpassungen Text, Formatvorlage
1.2.0	13.01.2020	LeiterIn Stab	13.01.2020	Anpassung Stabsbereich Bildung

## Anhang 2: Einverständniserklärung

### Selbständigkeitserklärung für studentische Arbeiten am Departement Life Sciences und Facility Management

Mit der Abgabe der beiliegenden

- Projektarbeit
- Literaturarbeit
- Semesterarbeit
- Minorarbeit
- Bachelorarbeit
- Masterarbeit

versichert der/die Studierende, dass er/sie die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst hat.

Der/die unterzeichnende Studierende erklärt, dass alle verwendeten gedruckten und elektronischen Quellen im Text und im Literaturverzeichnis korrekt ausgewiesen sind, d.h. dass die Arbeit keine Plagiate enthält, also keine Teile, die teilweise oder vollständig aus einem fremden Text oder einer fremden Arbeit ohne klare Kennzeichnung und ohne Quellenangabe übernommen worden sind.

Bei Verfehlungen aller Art treten Paragraph 39 und Paragraph 40 der Rahmenprüfungsordnung für die Bachelor- und Masterstudiengänge an der Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften vom 29. Januar 2008 sowie die Bestimmungen der Disziplinarmaßnahmen der Hochschulordnung in Kraft.

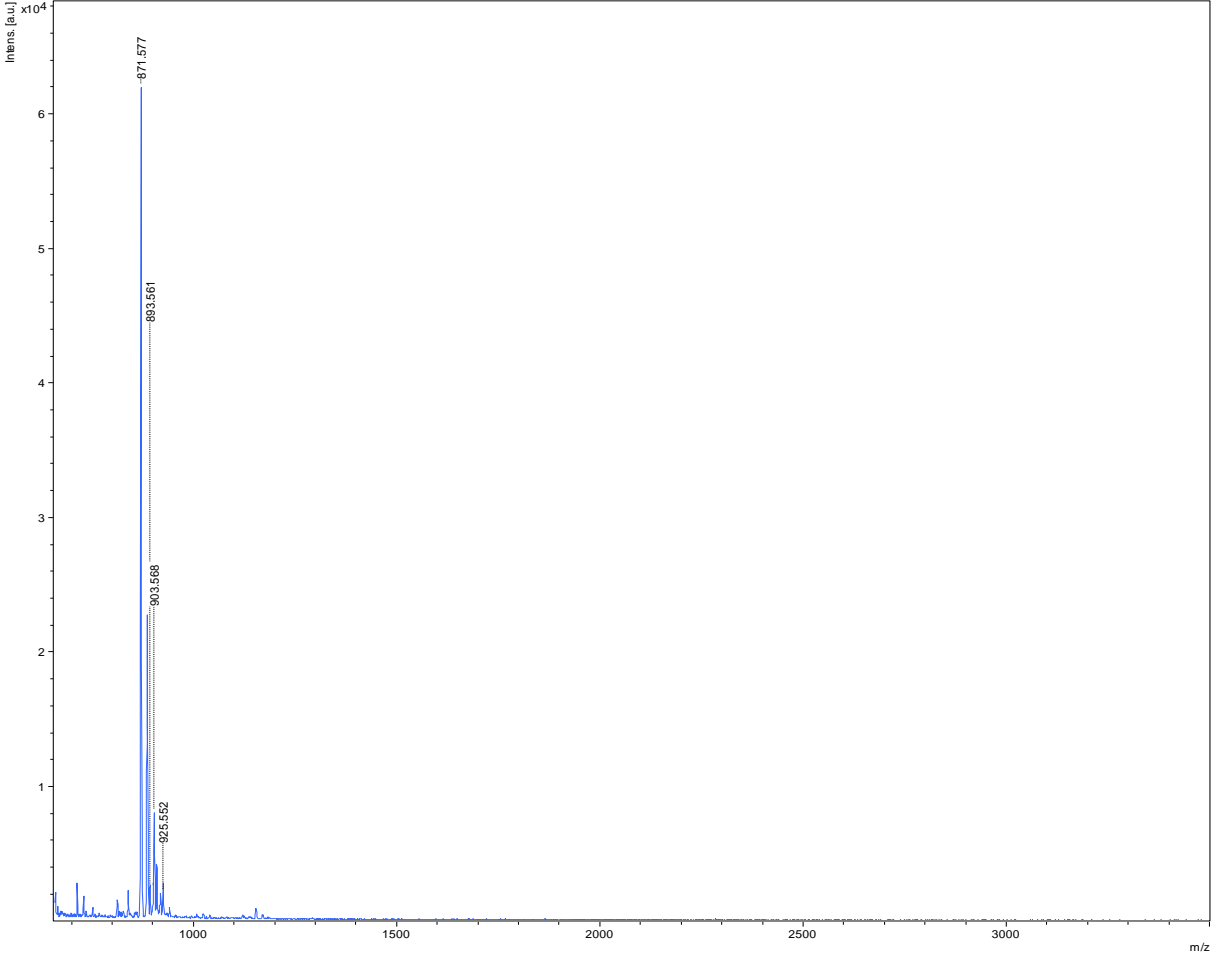
Ort, Datum: Wädenswil, 06.07.23

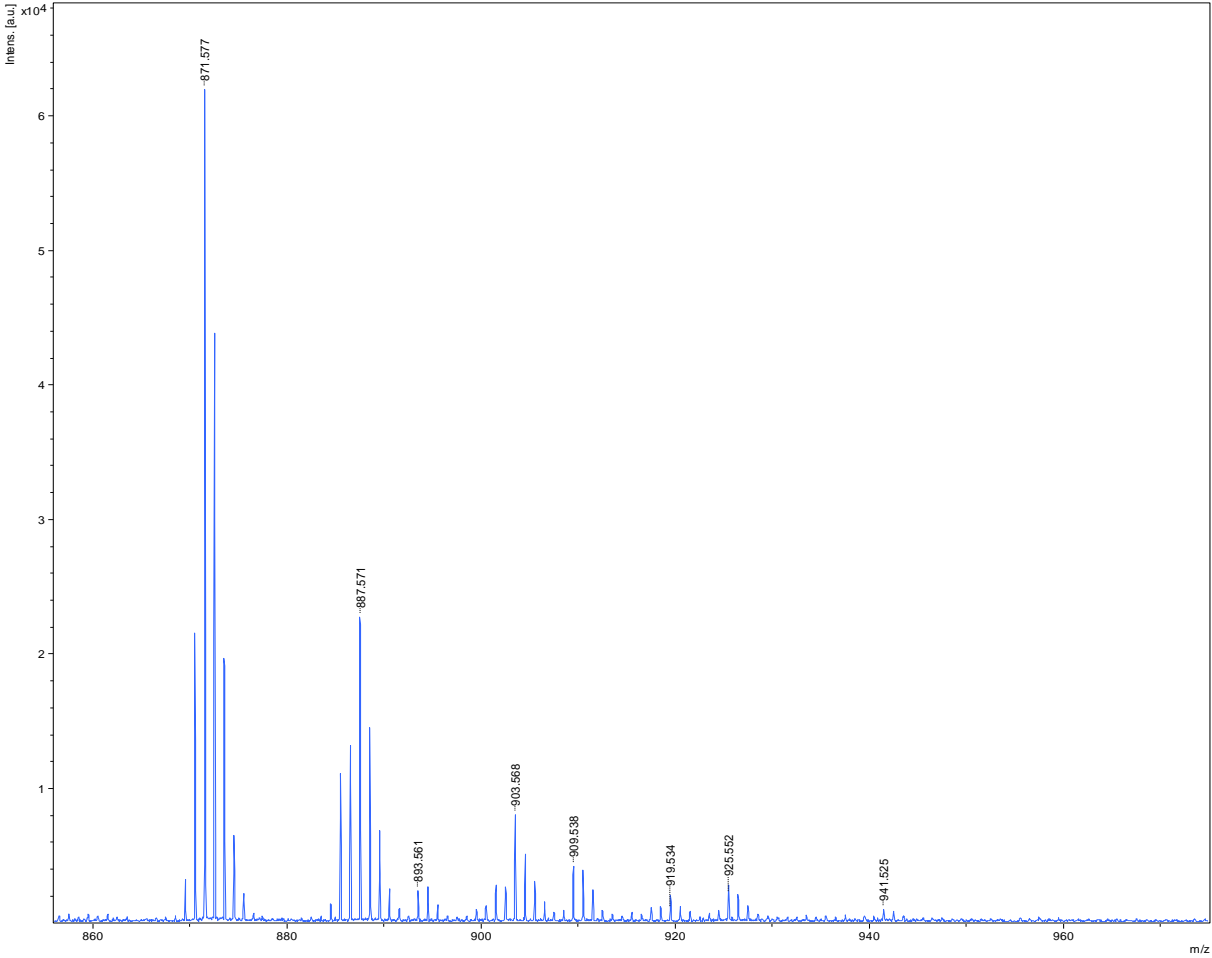
Unterschrift des/der Studierenden:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Nafzger', written over a horizontal line.

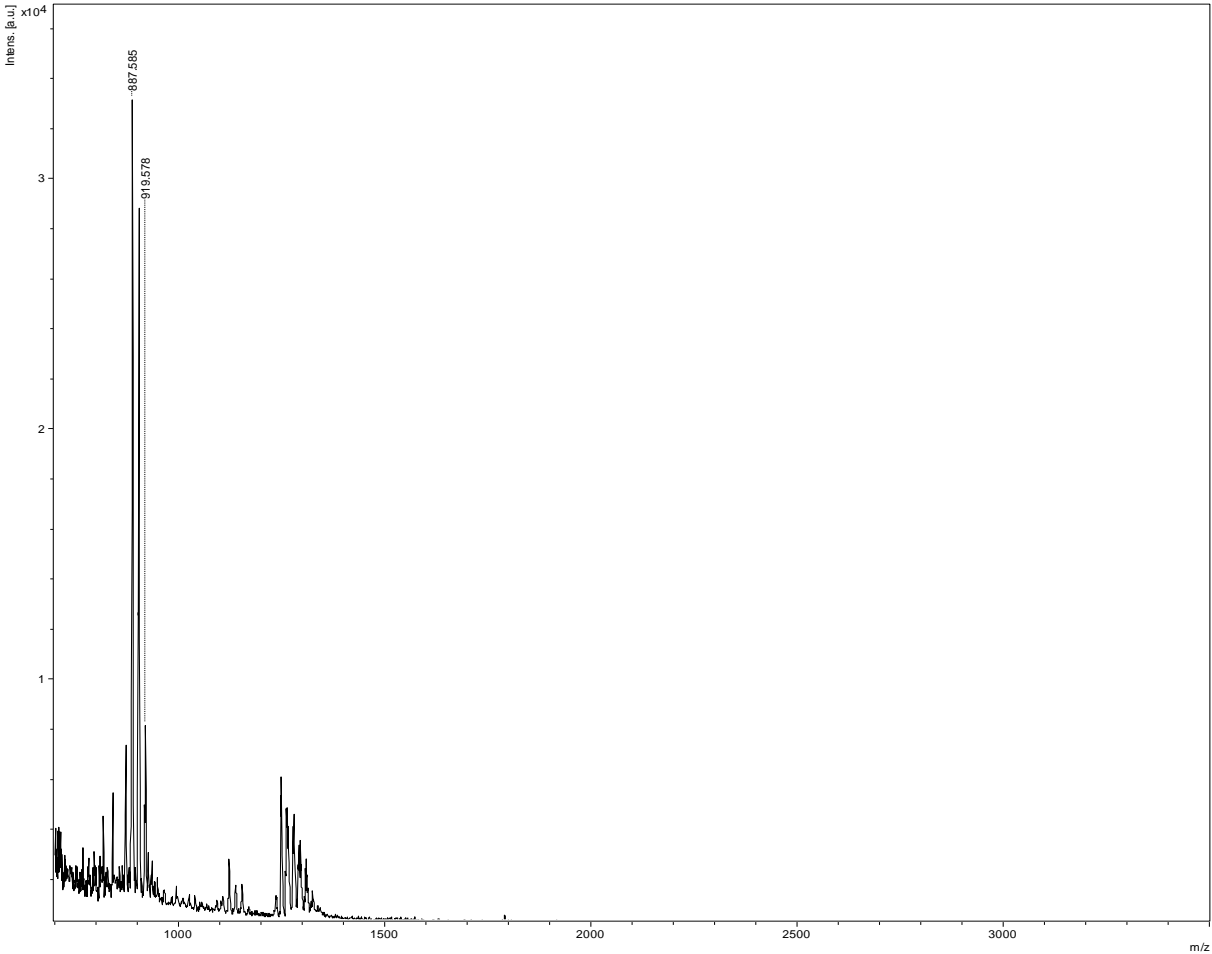
### Anhang 3: MALDI-TOF Resultate

#### EtoAC (F11-17) Fraktion 5-9

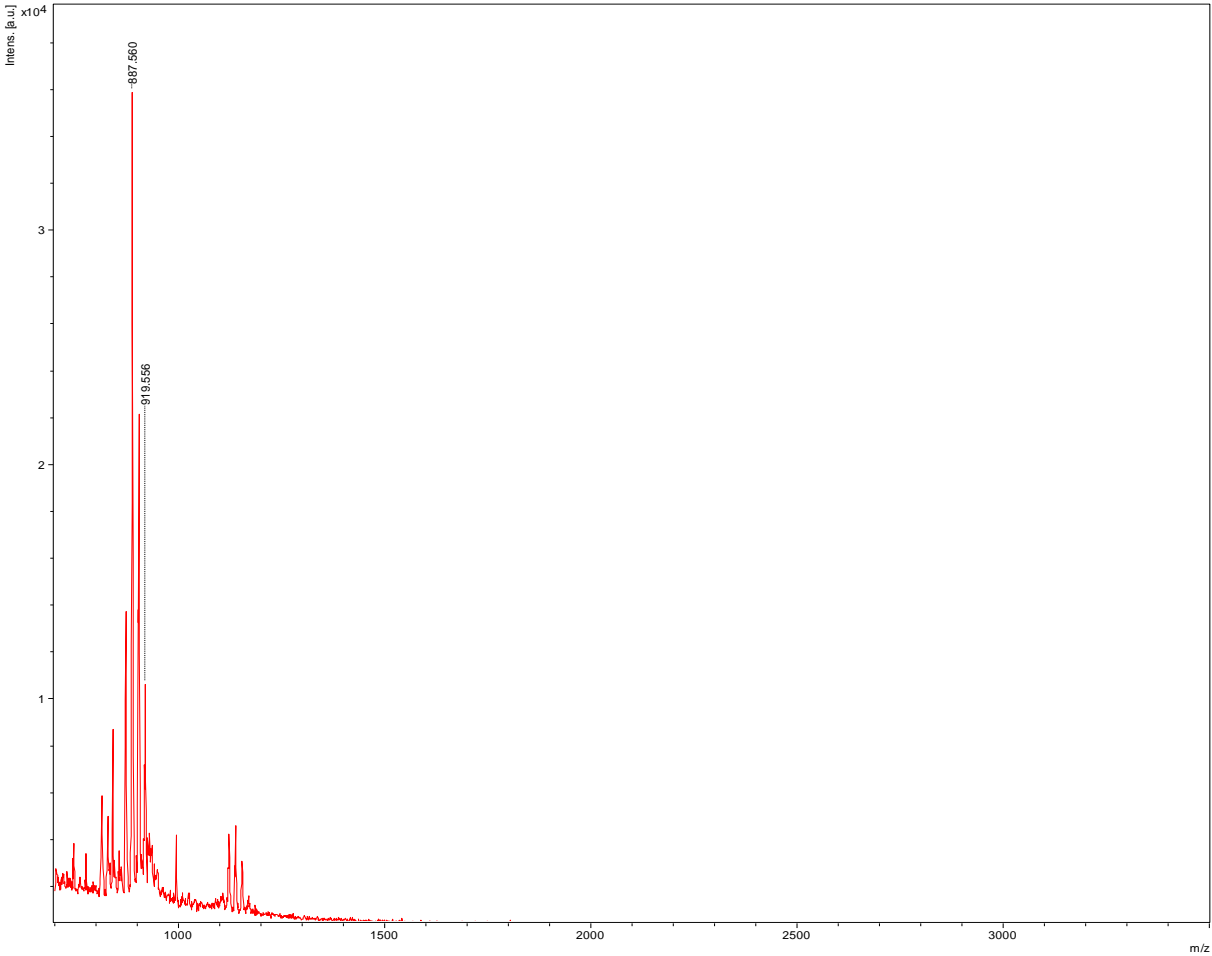




EtoAC (F11-17) Fraktion 10-13



EtoAC (F11-17) Fraktion 14-19



## Anhang 4: Datenbank Recherche

Datenbank	Sucheingabe/Bemerkung	870.6 g/mol	886.6 g/mol	902.6 g/mol	918.5 g/mol
TriForC	Compounds, Filter <i>Artemisia annua</i>	keine Treffer	keine Treffer	keine Treffer	keine Treffer
(GPNCL)	kein Zugriff				
3DMET	kein Zugriff				
3DMET	kein Zugriff				
AfroCancer	kein Zugriff				
AfroDB	kein Zugriff				
AfroMalariaDB	kein Zugriff				
Afrotryp	kein Zugriff				
Alkamid database	kein Zugriff				
AnalytiCon Discovery	kein Zugriff				
AnalytiCon Discovery MEGx	kein Zugriff				
AntiBase	kein Zugriff				
AntiBase	kein Zugriff				
Ayurveda	Suche nach MW?				
Berdy's Bioactive Natural	kein Zugriff				
BIOFAQUIM	kein Zugriff				
BioPhytMol	kein Zugriff				
CamMedNP	kein Zugriff				
CEMTDD	kein Zugriff				
ChEBI	Advanced search [MW]	2 Treffer (keine in <i>A. annua</i> oder anderen Pflanzen)	2 Treffer (keine in <i>A. annua</i> oder anderen Pflanzen)	3 Treffer (keine in <i>A. annua</i> oder anderen Pflanzen)	6 Treffer (keine in <i>A. annua</i> oder anderen Pflanzen)
Chem TCM	kein Zugriff				
ChemBank	kein Zugriff				

Datenbank	Sucheingabe/Bemerkung	870.6 g/mol	886.6 g/mol	902.6 g/mol	918.5 g/mol
ChEMBL	keine Suche nach MW				
ChemBridge diversity datasets	kein Zugriff				
ChemDB	keine Suche nach <i>A. annua</i> und MW				
ChemIDplus	kein Zugriff				
CHMIS-C	kein Zugriff				
CMAUP	keine Suche nach MW möglich				
CNPD	kein Zugriff				
COCONUT	'Artemisia annua' Advanced search [MW]	6 Treffer (keine in <i>A. annua</i> oder anderen Pflanzen)	keine Treffer	keine Treffer	keine Treffer
ConMedNP	kein Zugriff				
ConMedNP	kein Zugriff				
Database of Indonesian Medicinal Plants	kein Zugriff				
ETM-DB	keine Suche nach MW möglich und <i>Artemisia annua</i> keine Treffer				
HIM (Herbal Ingredients in-vivo Metabolism database)	kein Zugriff				
HIT (Herbal Ingredients Targets)	Suche nach MW?				
IMPPAT	Advanced search [MW]	keine Treffer	keine Treffer	keine Treffer	keine Treffer
InflamNat	Advanced search [MW]	keine Treffer	keine Treffer	keine Treffer	keine Treffer
InPACdb	kein Zugriff				
KEGG	Suche nach MW?				
KNAPsACK	kein Zugriff				
MedPServer	kein Zugriff				
MetaCyc	Suche nach MW?				
Mitishamba database	kein Zugriff				
NADI	kein Zugriff				

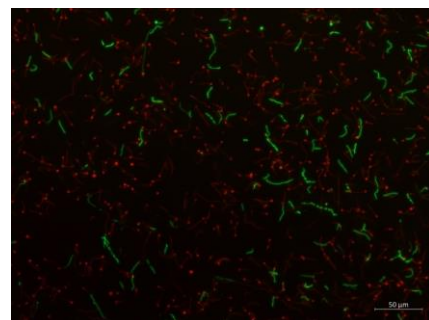
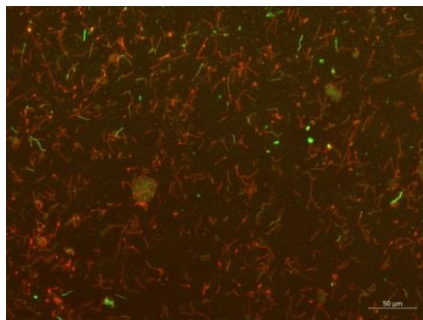
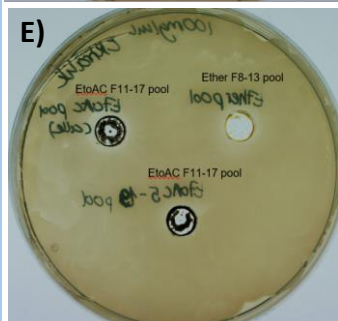
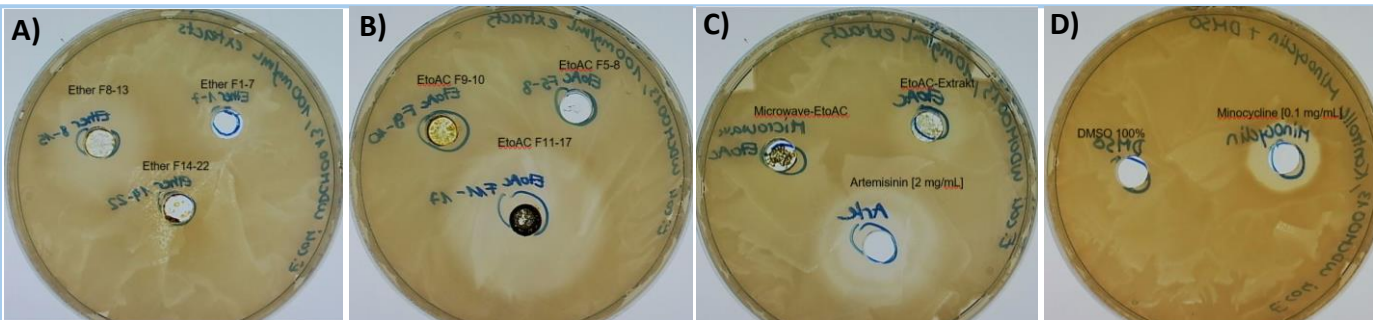
Datenbank	Sucheingabe/Bemerkung	870.6 g/mol	886.6 g/mol	902.6 g/mol	918.5 g/mol
NANPDB	kein Zugriff				
NeMedPlant	kein Zugriff				
NIST	kein Zugriff				
NMRDATA	kein Zugriff				
NMRShiftDB	kein Zugriff				
Novel Antibiotics database	kein Zugriff				
NPACT	kein Zugriff				
NPASS	By properties [MW]	29 Treffer (keine in A. annua aber anderen Pflanzen)	45 Treffer (keine in A. annua aber anderen Pflanzen)	42 Treffer (keine in A. annua aber anderen Pflanzen)	25 Treffer (keine in A. annua aber anderen Pflanzen)
NPL (library)	kein Zugriff				
NuBBEDB	kein Zugriff				
p-ANAPL (Pan-African Natural Product Library )	kein Zugriff				
Phytochemica	kein Zugriff				
PhytoHub	keine Suche nach MW				
Pi Chemicals System Natural Products	kein Zugriff				
Prestwick	kein Zugriff				
Products database	kein Zugriff				
PubChem	Suche nach MW?				
Sandra C. Gouveia et al. 2012	MW	keine Treffer	keine Treffer	keine Treffer	keine Treffer
SciFinder	Filter „Biological studies“ Eingabe: MW	309 Treffer	601 Treffer	655 Treffer	407 Treffer
SuperNatural II	By properties [MW]	100 Treffer	100 Treffer	100 Treffer	98 Treffer
TC-MC	kein Zugriff				

---

<b>Datenbank</b>	<b>Sucheingabe/Bemerkung</b>	<b>870.6 g/mol</b>	<b>886.6 g/mol</b>	<b>902.6 g/mol</b>	<b>918.5 g/mol</b>
TCMID	Suche nach MW?				
TCMSP	Suche nach MW?				
TIM	kein Zugriff				
TPPT	kein Zugriff				
TriForC	Suche nach MW?				
UEFS	kein Zugriff				
UNPD (Universal Natural Products Database)	kein Zugriff				
ZINC natural products	kein Zugriff				

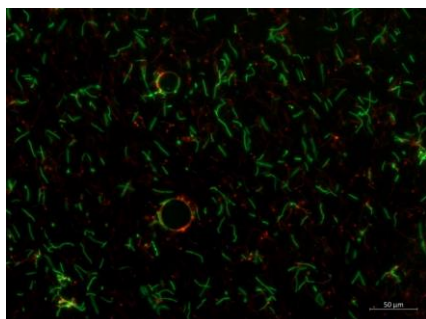
## Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von *Artemisia annua* auf Borrelien-Zellen

Der Hintergrund dieser Arbeit ist, in Zusammenarbeit mit der Fachgruppe Organische Chemie und Medizinalchemie und Herrn Herbert Heller und Frau Dr. Lydia Reutter, verschiedene Extrakte ausgehend von einem Bio-Kräuter Pulver von *Artemisia annua* von Amarys herzustellen und auf ihre antibakterielle Wirkung gegen *B. burgdorferi* zu untersuchen. Im Ganzen sind sechs verschiedene Extraktionen hergestellt und mittels Normalphasenchromatographie fraktioniert worden. Darunter eine Extraktion mit 60% Ethanol, eine mit 99.7% Ethylacetat und eine Extraktion die auf dem Isolierungsprinzip von Artemisinin basierte und aus dem ein wässriger Extrakt sowie ein Etherphase-Extrakt resultierte. Zusätzlich wurde eine Extraktion mit Ethylacetat, welche mit einer Soxhlet-Apparatur realisiert wurde, sowie eine weitere Extraktion mit Ethylacetat in der Mikrowelle und eine letzte Extraktion mit Dichlormethan durchgeführt. Alle Extrakte sind zur Überprüfung ihrer Wirkung zuerst auf *E. coli* WDCM 0013 getestet worden. Ziel ist es, die Wirkung verschiedener Fraktionen der Extrakte sowie Kombinationen der Extrakte auf Borrelien mit einer SYBR Green I und Propidium-Iodid Färbung nachzuweisen. Mögliche inhibierende Fraktionen werden weiter mittels MALDI-TOF auf das Molekulargewicht bestimmt und in Datenbanken gesucht.

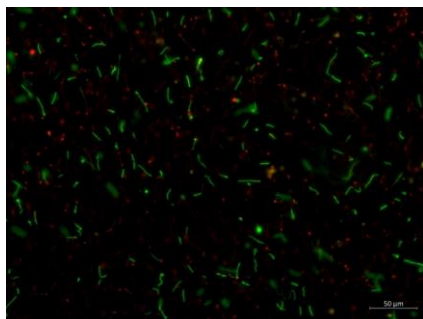


F) *B. burgdorferi* mit EtoAC F11-17 [5 mg/mL]

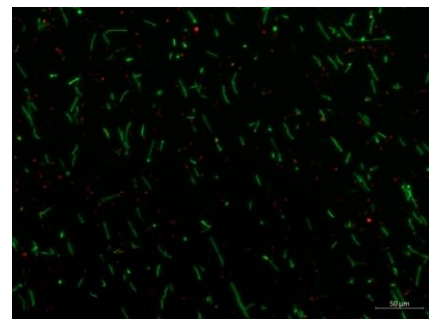
G) *B. burgdorferi* mit 5% DMSO



H) Blank *B. burgdorferi*



I) *B. burgdorferi* mit Artemisinin [100 µg/mL]



J) *B. burgdorferi* mit Minocycline [5 µg/mL]

A) Well Diffusion *E. coli* WDCM 0013 mit 100 mg/mL Etherphase F8-13 B) *E. coli* WDCM 0013 mit 100 mg/mL EtoAC F11-17  
 C) *E. coli* WDCM 0013 mit 30 mg/mL Pool der Fraktionen für EtoAC F11-17 und Etherphase F8-13 D) *E. coli* WDCM 0013 mit positiv Kontrolle Artemisinin [2 mg/mL] E) *E. coli* WDCM 0013 mit negativ Kontrolle DMSO 100% und positiv Kontrolle Minocycline [0.1 mg/mL]

Die drei Extrakte Etherphase F8-13, EtoAC F11-17 und Soxhlet EtoAC inhibierten das Wachstum von *E. coli* WDCM 0013 im Well Diffusion Assay. Die Wirkung des Extraktes EtoAC F11-17 ist stärker als die Wirkung der Etherphase F8-13. Grund dafür ist, dass bei der Etherphase F8-13 während des Extraktionsprozesses Hitze verwendet wurde und somit wertvolle Wirkstoffe in *A. annua* verloren gehen (Dr. med. Lydia Reutter, 2023). Weiter wurde gezeigt, dass nicht einzelne Fraktionen von EtoAC F11-17 sondern nur die Gesamtfraktion eine antibakterielle Wirkung gegen *E. coli* WDCM0013 aufweist. Die Ergebnisse der Inhibierungs-Assays in den 1.5 mL Reaktionsgefäßen mit *B. burgdorferi* und EtoAC F11-17 zeigten, verglichen mit den Kontrollen mehr tote (rot gefärbt) als lebende Borrelien (grün gefärbt). Die Analyse von EtoAC F11-17 mit MALDI-TOF ergab vier Moleküle mit 870.6 g/mol, 886.6 g/mol, 902.6 g/mol und 918.5 g/mol, die in den Datenbanken von natürlichen Produkten ohne weitere Eingrenzungen keine Treffer bezüglich *A. annua* ergaben. Weitere Inhibierungs-Assay mit *B. burgdorferi* und EtoAC F11-17 mit Hilfe von einem HTS 7000 Plus Bio Assay Reader sind nötig, um quantitative Auswertungen machen zu können. Zusätzlich sollte für die EtoAC Fraktion 11-17 eine Analyse mit der NMR-Spektroskopie gemacht werden, um die Suche in den Datenbanken einzuzugrenzen.