Name: Ruciaka, Philip Kirianki
Email: philip.ruciaka@uni-rostock.de
Fachgebiet: Institut für Biowissenschaften, Abteilung Biochemie.
Betreuer: Prof. em. Dr. Birgit Piechulla

Abstract

The volatile organic compounds (VOCs) emitted by animals, plants and microorganisms are important players in inter- and intra-organismic interactions and function as chemical cues and antimicrobial compounds. The rhizobacterium *Serratia plymuthica* 4Rx13 emits more than 100 volatiles, whereby sodorifen, the dominant compound constitutes 45 % of the VOC spectrum. Sodorifen has a polymethylated and bicyclic structure and lacks heteroatoms ($C_{16}H_{26}$). It is a homo-sesquiterpene and was the first C_{16}-compound to be discovered whereby, it is synthesized via the novel bacterial non-canonical terpene biosynthesis pathway by the action of farnesyl pyrophosphate-methyltransferase and a C_{16}-dependent terpene synthase, that are part of a four-gene cluster which is regulated by carbon catabolite repression. Besides the discovery of sodorifen and the novel biosynthetic pathway, the ecological and biological roles remained so far unknown.

For the first time, this thesis demonstrates a concentration-dependent and species-specific growth inhibition of Gram-positive and Gram-negative bacteria after application of the pure sodorifen compound. Interestingly, sodorifen producer and non-producer *Serratia* species and isolates were resistant indicating that sodorifen may affect other organisms but not species of the same genus, hence shaping the microbiome, e.g., in the rhizosphere, towards survival advantage of *Serratia* spp. To answer the question as to whether environmental cues are able to promote sodorifen emission in *S. plymuthica* 4Rx13, several abiotic environmental conditions were tested: i) dehydration was simulated by the application of 15 % PEG 6000, ii) alteration of the pH in the soil was tested by adjusting the medium to pH 8 and 5.2, iii) oxygen stress was induced by application of 500 µM hydrogen peroxide and iv) osmotic treatment was performed by application of various salts. None of these treatments promoted emission of sodorifen: instead, in most cases, the sodorifen levels were reduced in the first 24 hours but thereafter reached same levels as the control (delayed emission). The metabolome analysis indicated high malate and low succinate levels as key metabolites in PEG 6000, pH 8 and sodium chloride conditions, in accordance with low and high sodorifen emissions determined previously in *in vitro* malate and succinate feeding studies, respectively. The amounts of the C_3-compounds e.g., pyruvate and 3-phosphoglycerate, which are substrates for MEP-dependent isopentyl pyrophosphate biosynthesis were affected differently. Interestingly, various metabolites accumulated to outstanding levels in *S. plymuthica* 4Rx13, e.g., 13-fold glutamine and 7-fold lactate in 15 % PEG 6000, 21-fold valine at pH 5.2 and 26-fold cAMP in 500 µM hydrogen peroxide.

From the original isolation site of *S. plymuthica* 4Rx13, another interesting bacterium was isolated, *Paenibacillus rostockiensis* PK1-4R. Its VOC profile led to the first discovery of acyloin esters that were active against clinically relevant cells (endocervical carcinoma cells e.g., KB3.1) and microbes (*Staphylococcus aureus* 346 and *Mucor hiemalis* 2656), and rhizobacteria (*Xanthomonas campestris* 2217, *Pseudomonas syringae* 1741 and *Agrobacterium tumefaciens* 7). In conclusion, this work presents significant knowledge on ecological/biological roles of microbial volatiles, the role of environmental cues on volatiles

emission and the potential of bacteria as natural and unusual sources of novel volatiles, especially due to the unique structure and bioactivity of acyloin esters.

Zusammenfassung

Flüchtige organische Verbindungen (VOCs), die von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen emittiert werden, spielen eine wichtige Rolle bei inter- und intraorganismischen Interaktionen und fungieren als chemische Indikatorsubstanzen und antimikrobielle Verbindungen. Das Rhizobakterium *Serratia plymuthica* 4Rx13 emittiert mehr als 100 flüchtige Substanzen, wobei Sodorifen die dominierende Verbindung ist und 45 % des VOC-Spektrums ausmacht. Sodorifen hat eine polymethylierte und bicyclische Struktur und enthält keine Heteroatome ($C_{16}H_{26}$). Es ist ein Homo-Sesquiterpen und war die erste C_{16}-Verbindung, die über den neuen bakteriellen, nicht-kanonischen Terpen-Biosyntheseweg durch die Wirkung einer Farnesylpyrophosphat-Methyltransferase und einer C_{16}-abhängigen Terpen-Synthase synthetisiert wurde, die Teil eines Vier-Gen-Clusters sind, das durch Kohlenstoff-Katabolit-Repression reguliert wird. Abgesehen von der Entdeckung des Sodorifens und des neuen Biosynthesewegs waren die ökologischen und biologischen Funktionen bisher unbekannt. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine konzentrationsabhängige und speziesspezifische Wachstumshemmung von Gram positiven und Gram negativen Bakterien nach Anwendung von reinem Sodorifen nachgewiesen. Interessanterweise waren sowohl Sodorifen-produzierende als auch nicht-produzierende *Serratia*-Arten und Isolate resistent, was darauf hindeutet, dass Sodorifen andere Organismen, nicht aber Arten der gleichen Gattung beeinflussen kann und somit das Mikrobiom, z.B. in der Rhizosphäre, zum Überlebensvorteil von *Serratia* spp. beitragen kann. Um die Frage zu beantworten, ob Umweltfaktoren die Sodorifen-Emission von *S. plymuthica* 4Rx13 fördern können, wurden verschiedene abiotische Umweltbedingungen getestet: i) Austrocknung wurde durch die Applikation von 15 % PEG 6000 simuliert, ii) die Veränderung des pH-Wertes im Boden wurde durch die Einstellung des Mediums auf pH 8 und 5,2 getestet, iii) Sauerstoffstress wurde durch die Applikation von 500 µM Wasserstoffperoxid induziert und iv) eine osmotische Behandlung wurde durch die Applikation verschiedener Salze durchgeführt. Keine dieser Behandlungen förderte die Sodorifen-Emission: Stattdessen wurden die Sodorifen Menge in den meisten Fällen in den ersten 24 Stunden reduziert, erreichten dannach aber die gleichen Werte wie in der Kontrolle (verzögerte Emission). Die metabolischem Analyse ergab hohe Malat- und niedrige Succinat-Spiegel als Hauptmetaboliten unter PEG-, pH 8- und NaCl-Bedingungen, was mit den niedrigen bzw. hohen Sodorifen-Emissionen übereinstimmt, die zuvor in vitro-Studien mit Malat- bzw. Succinat-Fütterung ermittelt wurden. Die Mengen an C_3-Verbindungen wie Pyruvat und 3-Phosphoglycerat, die Substrate für die MEP-abhängige Isopentylpyrophosphat-Biosynthese sind, wurden unterschiedlich beeinflusst. Interessanterweise akkumulierten sich verschiedene Metaboliten in *S. plymuthica* 4Rx13 auf außergewöhnliche Werte, z.B. 13-faches Glutamin und 7-faches Laktat in 15 % PEG 6000, 21-faches Valin bei pH 5,2 und 26-faches cAMP in 500 µM Wasserstoffperoxid.

Ein weiteres interessantes Bakterium, *Paenibacillus rostockiensis* PK1-4R, wurde vom ursprünglichen Isolat *S. plymuthica* 4Rx13 isoliert. Sein VOC-Profil führte zur erstmaligen Entdeckung von Acyloinestern, die gegen klinisch relevante Zellen (Endozervixkarzinomzellen, z.B. KB3.1) und Mikroben (*Staphylococcus aureus* 346 und *Mucor hiemalis* 2656) sowie Rhizobakterien (*Xanthomonas campestris* 2217, *Pseudomonas*

syringae 1741 und *Agrobacterium tumefaciens* 7) wirksam sind. Zusammenfassend liefert diese Arbeit wichtige Erkenntnisse über die ökologische/biologische Rolle mikrobieller VOCs, die Rolle von Umweltfaktoren bei der Emission von VOCs und das Potenzial von Bakterien als natürliche und ungewöhnliche Quellen neuartiger VOCs, insbesondere aufgrund der einzigartigen Struktur und Bioaktivität von Acyloinestern.