

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR DERMATOLOGIE
PROF. DR. MED. MARK BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Nachweis und Lokalisation von Photosensibilisatoren bei der
photodynamischen Inaktivierung von *Candida albicans*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Thomas Voit

2016

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR DERMATOLOGIE
PROF. DR. MED. MARK BERNEBURG
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Nachweis und Lokalisation von Photosensibilisatoren bei der
photodynamischen Inaktivierung von *Candida albicans*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Thomas Voit

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Tim Maisch
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Buchalla
Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2016

Meinen Großeltern Johann und Therese Hoffmann
in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1. <i>Candida albicans</i> – ein zunehmendes Gesundheitsproblem.....	1
1.2. Zellwandaufbau von <i>C. albicans</i>	3
1.3. Antimikrobielle photodynamische Therapie.....	5
1.4. Fluoreszenzmikroskopie – Meilensteine der optischen Darstellung	7
1.5. Funktionsweise eines Fluoreszenzmikroskops.....	10
2. Fragestellung	13
3. Material und Methoden.....	15
3.1. <i>Candida albicans</i> Stamm	15
3.2. Kulturmedien.....	15
3.3. Photosensibilisatoren.....	15
3.4. Chemikalien	17
3.5. Technische Geräte und Hilfsmittel	18
3.6. Kultivierungsverfahren für <i>Candida albicans</i>	22
3.7. Auszählen von <i>Candida albicans</i> mit der Neubauer Zählkammer	22
3.8. Herstellung der Photosensibilisator-Lösungen	23
3.9. Versuchsaufbau der Phototoxizitätsversuche	23
3.10. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten.....	24
3.11. Auswertung der Phototoxizitätsversuche.....	25
3.12. Versuchsaufbau der Uptakeversuche.....	25
3.13. Probenvorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie.....	26
4. Ergebnisse und Diskussion	30
4.1. Phototoxizitätsversuche	30
4.2. Uptakeversuche.....	41
4.3. Vergleich der Absorptionsquerschnitte der PS.....	47
4.4. Zusammenfassung der Phototoxizitäts- und Uptake-Versuche	50
4.5. Kontrollversuche für die Mikroskopie.....	51
4.6. Lokalisation von TMPyP vor Bestrahlung	54

4.7.	Verifizierung der Lokalisation von TMPyP vor Bestrahlung mit WGA.....	57
4.8.	Lokalisation von TMPyP nach Bestrahlung	60
4.9.	Photobleaching	64
4.10.	Diskussion der Mikroskopieergebnisse.....	65
5.	Zusammenfassung.....	69
5.1.	Phototoxizitätsversuche und Uptake	69
5.2.	Mikroskopie.....	71
6.	Ausblick.....	73
7.	Literaturverzeichnis.....	III
8.	Abkürzungsverzeichnis	
9.	Danksagungen	
10.	Lebenslauf	
11.	Eidesstattliche Versicherung	

1. Einleitung

1.1. *Candida albicans* – ein zunehmendes Gesundheitsproblem

Candida albicans ist der beim Menschen am häufigsten vorkommende pathogene Pilz und Auslöser einer Vielzahl von Mykosen und invasiven Pilzkrankungen (siehe Abb. 1) ¹. Er gehört zur Gattung der Hefepilze und ist Bestandteil der oralen und dermalen Flora. Die von *C. albicans* hervorgerufenen Mykosen lassen sich in oberflächliche (Haut und Haare), subkutane (Epidermis, Nägel) und systemische (Organbeteiligung) Krankheitsbilder einteilen. Des Weiteren lässt sich bei systemischen Erkrankungen zwischen opportunistischen und nicht-opportunistischen Formen unterscheiden ². Studien belegen, dass 20-80% der Bevölkerung eine Besiedlung mit *C. albicans* aufweisen. Das Bemerkenswerte dabei ist, dass sich der Hefepilz in jedem Abschnitt des Verdauungstrakts von der Mundhöhle bis hin zum Enddarm finden lässt. Dies unterscheidet *C. albicans* deutlich von anderen Mikroorganismen, die den menschlichen Körper besiedeln, wie beispielsweise Bakterien ³. Sobel *et al.* beschrieben 2007, dass ca. 75% aller Frauen mindestens einmal in ihrem Leben an einer vaginalen Candidose erkranken ⁴. Doch nicht nur Infektionen des Urogenitaltrakts, auch das Auftreten von Pilzkrankungen im Bereich der Mundschleimhaut (Soor) wird zunehmend beobachtet. Orale *Candida*-Infektionen führen zu chronischen Schmerzen, Missempfindungen bei der Nahrungsaufnahme und dadurch nicht selten zu Unterernährung bei älteren oder immunsupprimierten Patienten. Als Risikofaktoren für das Entstehen von oralen Candidosen werden in der Literatur häufig geringer Speichelfluss, Tabakkonsum, fortgeschrittenes Alter oder die Einnahme von Antibiotika über einen längeren Zeitraum angeführt. Eine Infektion der Mundhöhle mit *Candida spp.* kann sich klinisch unterschiedlich darstellen. Häufig manifestiert sie sich in Form einer pseudomembranösen Candidiasis. Die Mukosa ist dabei übersät von weißen bis gelblichen, konfluenten Plaques, die aus epithelialen Zellen, Pilzen, Hyphen, Fibrin und nekrotischem Gewebe bestehen ⁵. Im Bereich der Zahnmedizin ist vor allem auch das Auftreten von Candidosen bei Prothesenträgern zu beobachten. Studien gehen davon aus, dass etwa 50-65% der Patienten

mit herausnehmbarer Prothese eine Form der Prothesenstomatitis aufweisen^{6, 7}. Als Symptome geben die Patienten häufig Brennen oder Schmerzen der Schleimhaut an. Die Prothesenstomatitis tritt oft zusammen mit einer Cheilitis angularis oder einer Glos-sitis mediana rhombica auf⁵. Das Vorliegen von *C. albicans* ist an sich noch kein pa-thologischer Zustand, sondern kann vielmehr sogar der Ausdruck einer physiologi-schen Flora sein. Eine Etablierung von *C. albicans* tritt meist erst bei einer Floraverän-derung auf, die durch Antibiotika oder Immunsuppression entstehen kann. Es kommt dann zu einem Überwuchern des Pilzes^{5, 8}. Besonders gefährdet für das Entstehen von *C. albicans*-Infektionen sind Tumorpatienten, Organtransplantierte oder Patienten, die an einer anderen Form der Immunsuppression, wie beispielsweise AIDS leiden⁹. Ein großer Anstieg der Candidosen ist in den letzten Jahren wahrscheinlich auch deshalb speziell auf Intensivstationen festzustellen^{10, 11}. Das *National Nosocomial Infections Surveillance Program, USA* zeigte, dass *C. albicans* in einem Zeitraum von 1980 bis 1989 zu einem der am häufigsten isolierten Keime in amerikanischen Intensivabteilungen gehörte¹¹. Auch AIDS-Patienten zählen zur Hochrisikogruppe für eine *Candida*-Infek-tion. 1981, als die AIDS-Erkrankung noch weitgehend unerforscht war, wurden Pilzer-krankungen als erste Symptome einer neuen zellulären Immunschwäche beschrie-ben^{12, 13}. Esebelahie *et al.* zeigten, dass eine hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) das Risiko einer Infektion mit *Candida* senken und so zu einer Erhöhung der Lebensqualität von AIDS-Patienten beitragen kann¹⁴. Als zunehmendes Problem wird eine systemische bzw. invasive *Candida*-Infektion angesehen. Diese geht einher mit einer hohen Mortalität und langen Krankenhausaufenthalten, was viele Kliniken vor im-mer größere Herausforderungen stellt¹⁵. Die Kosten für die Behandlung solcher Er-krankungen belaufen sich auf bis zu 320 Millionen US-Dollar pro Jahr¹⁶.



Abb. 1: Darstellung typischer Lokalisationen für das Auftreten von Candidosen

A zeigt eine Candidose mit Angulus infectiosus und Glossitis, in B ist eine interdigitale Candidose dargestellt, wohingegen C eine Candidaintertrigo veranschaulichen soll ⁸.

1.2. Zellwandaufbau von *C. albicans*

Pilze als eukaryotische Organismen haben einen charakteristischen Zellaufbau, der sie von anderen Mikroorganismen, wie beispielsweise Bakterien unterscheidet. Besonders der Zellwand kommen wichtige Aufgaben zu. Zum einen schützt sie die Zelle und trägt zu deren Formerhalt bei, zum anderen spielt sie eine entscheidende Rolle für die Wirtsreaktion. Viele Interaktionen zwischen Pilz und Wirt werden von Bestandteilen der Zellwand gesteuert. Sie gehört so zu einem der essentiellen Zellorganellen der Pilze ^{3,17}. In ihrem Aufbau lassen sich eine innere und eine äußere Zone unterscheiden. Die innere Zone weist eine Zusammensetzung aus 5% Chitin, 40% β -1,3-Glucan und 20% β -1,6-Glucan auf. Der Rest besteht aus stark Mannose-haltigen Proteinen (Abb. 2) ³. Chitin und β -1,3-Glucan bilden das Skellet der Zellwand und sorgen für die Formstabilität der Zelle ¹⁸.

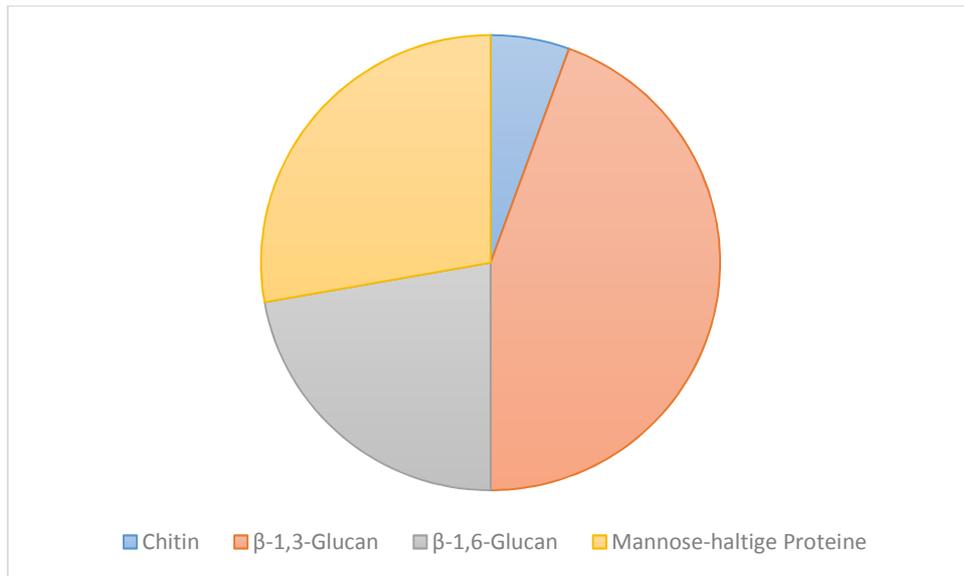


Abb. 2: Übersicht über die prozentuale Zusammensetzung der Zellwand bei *C. albicans*

Der Großteil der Zellwand wird von 1,3-glykosydisch verknüpften Glucanen gebildet³.

Die äußere Schicht der Zellwand wird von O- und N-verknüpften Mannose-Polymeren („mannans“) gebildet, die über kovalente Bindungen mit Proteinen verbunden sind. Äußere und innere Zone der Zellwand werden durch β -1,6-Glucane verknüpft^{3,18}. Eine schematische Übersicht über den Aufbau der Zellwand bei *C. albicans* gibt Abb. 3.

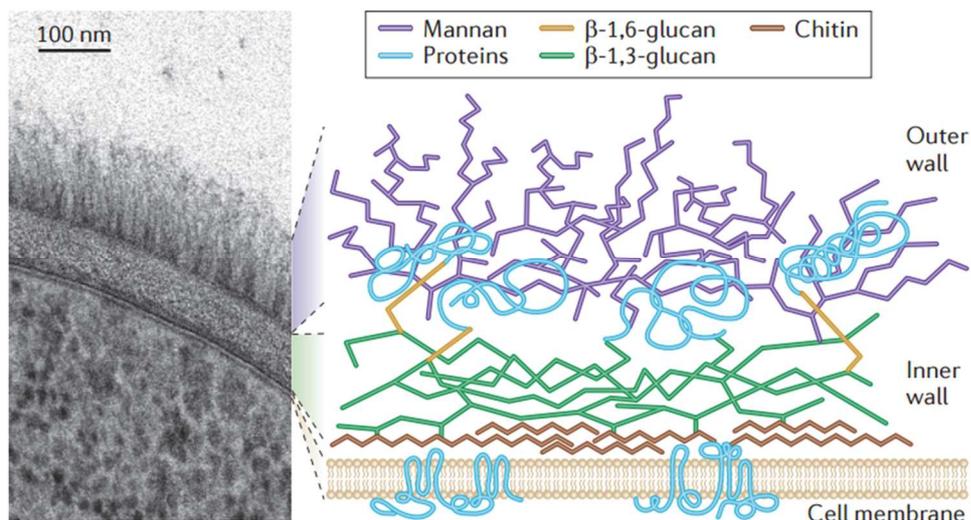


Abb. 3: Schematischer Aufbau der Zellwand von *C. albicans*

Im Aufbau der Zellwand lässt sich zwischen einer inneren und einer äußeren Schicht unterscheiden. Die innere Schicht besteht hauptsächlich aus Chitin und β -1,3-Glucan, die für die Formstabilität der Zelle verantwortlich sind. Die äußere Schicht enthält vor allem Mannose-haltige Proteine („mannans“). Äußere und innere Schicht werden durch β -1,6-Glucanen verknüpft¹⁸.

1.3. Antimikrobielle photodynamische Therapie

C. albicans besitzt die Eigenschaft, sich auf Oberflächen in Form eines Biofilms zu organisieren. Dieser Biofilm ist in den meisten Fällen ein wichtiger ätiologischer Faktor für die Entstehung persistierender Infektionen¹⁹. Er besteht aus einer Mischung von Hefen, Hyphen und Pseudohyphen, die an Oberflächen anhaften und von einer Matrix aus Polysacchariden umgeben sind^{20, 21}. Durch die Organisation der Pilze im Biofilm schützen sie sich vor dem Zutritt antimikrobieller Substanzen¹⁹. Die für die Therapie von *Candida*-Infektionen geeigneten Medikamente beschränken sich auf wenige zur Verfügung stehende Pharmaka, darunter Fluconazol, Amphotericin B und Caspofungin²². Das Auftreten von Resistenzen spielt dabei eine wichtige Rolle. Vor allem im Hinblick auf Fluconazol wird immer häufiger von resistenten *C. albicans*-Stämmen berichtet^{23, 24}. Xu *et al.* stellten fest, dass von 426 klinischen Patientenisolaten 68,6% eine Kolonisation mit *C. albicans* aufwiesen. 5,1% der *Candida*-Stämme zeigten sich dabei resistent gegen Fluconazol²⁵. Betrachtet man die steigende Zahl von Resistenzen nicht nur im Bereich fungizider Substanzen, sondern auch im Hinblick auf Antibiotika, so ist die Entwicklung alternativer Behandlungsstrategien dringend erforderlich. Eine vielversprechende Methode zur Therapie von Pilzinfektionen stellt die antimikrobielle photodynamische Therapie (aPDT) dar²⁶. Dieses von OSKAR RAAB erstmals beschriebene Verfahren beruht auf der Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die zu einer Inaktivierung der Mikroorganismen führen²⁷. Hierbei wird von einem sogenannten Photosensibilisator (PS) ein Photon geeigneter Wellenlänge absorbiert. Das PS-Molekül wird dadurch in einen kurzlebigen angeregten Zustand gehoben, der eine Halbwertszeit von maximal 10^{-6} Sekunden besitzt. Der angeregte PS kann anschließend durch Emission eines zweiten Photons (Fluoreszenz) oder durch Abgabe von Wärme in den Grundzustand zurückkehren. Durch ein sogenanntes „intersystem crossing“ (ISC) kann das Molekül auch in einen Triplettzustand übergehen, der eine geringere Energie und eine höhere Halbwertszeit (ca. 10^{-3} Sekunden) besitzt. Aus diesem Triplettzustand können zytotoxische Sauerstoffspezies auf zwei verschiedene Arten generiert werden. Beim Typ-I-Mechanismus überträgt der PS Elektronen auf umliegende Biomoleküle

und es entstehen Radikale, wie Superoxidanionen (O^{2-}) und Hydroxylradikale (OH^{\cdot}). Durch die Reaktion dieser Radikale mit Sauerstoff entsteht Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Sowohl die Radikale als auch Wasserstoffperoxid können Zellbestandteile schädigen. Beim Typ-II-Mechanismus wird Energie (keine Ladung) auf molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch der hoch reaktive Singulett-Sauerstoff (1O_2) entsteht. Obwohl dieser nur eine kurze Halbwertszeit von 10^{-6} Sekunden besitzt, kann er einen erheblichen Zellschaden bei Mikroorganismen bewirken. Der PS wird durch den Übergang in den Tripletzustand nicht notwendigerweise zerstört, sondern kann durch Phosphoreszenz wieder in den Grundzustand übergehen. Eine Zerstörung des PS ist jedoch durch Oxidationsvorgänge beim Photobleaching möglich²⁸⁻³⁰. Eine Übersicht über die Energieübergänge bei der aPDT zeigt Abb. 4.

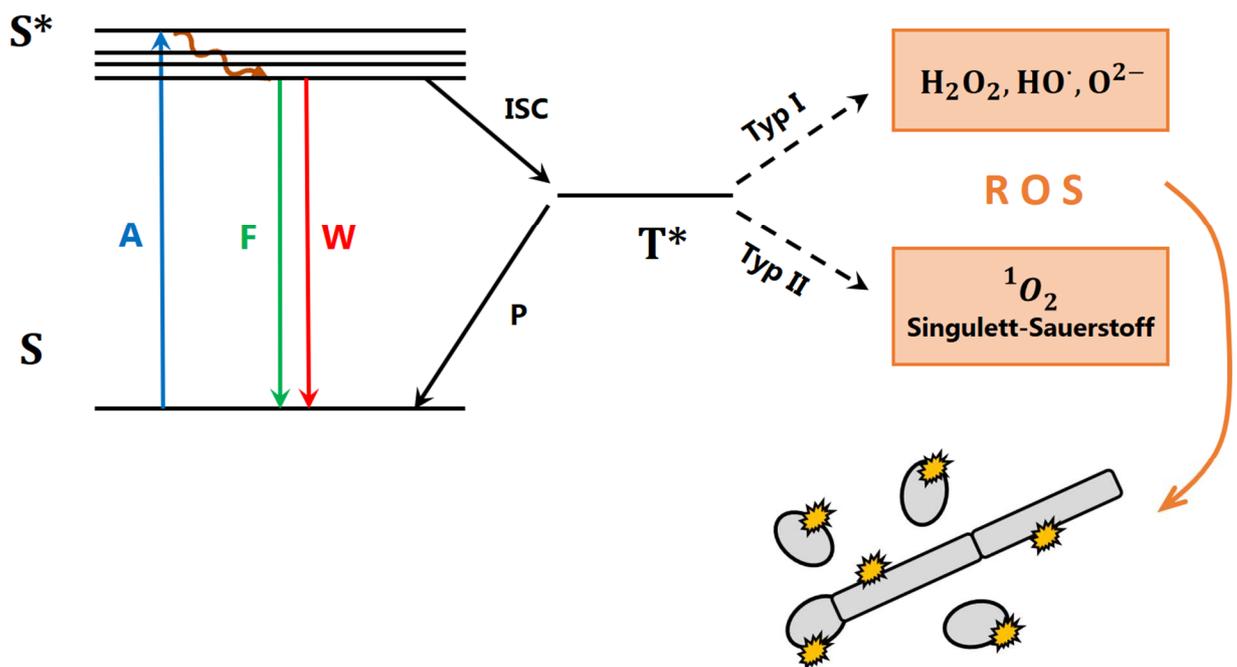


Abb. 4: Schematische Übersicht über den Funktionsmechanismus bei aPDT

Ein PS wird durch Lichtzufuhr vom Grundzustand S in den angeregten Zustand S^* überführt. Ein Teil der Energie wird durch Fluoreszenz (F) oder Wärme (W) abgegeben. Durch das „intersystem crossing“ (ISC) kann das angeregte PS-Molekül auch in den Tripletzustand T^* übergehen. Durch Typ-I- oder Typ-II-Reaktionen entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die zelluläre Bestandteile von *C. albicans* schädigen können (hier dargestellt durch gelbe Sterne). Durch Phosphoreszenz (P) kann der PS vom Tripletzustand wieder in den Grundzustand zurückkehren²⁹.

Für die aPDT sind nach Literaturangaben bis heute keine Resistenzmechanismen bekannt. Dies bedeutet, dass die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies im Allgemeinen und von Singulett-Sauerstoff im Speziellen während der Bestrahlung genau am Ort des PS stattfindet^{31,32}. Die aPDT besitzt zudem ein breites Wirkspektrum mit hoher Effizienz auch gegenüber Biofilmen. Im Vergleich zu Antibiotika beschränkt sich ihr Einsatzgebiet nicht nur auf Bakterien, sondern kann auch in der Bekämpfung von Pilzen, Parasiten und Viren Anwendung finden³³. Sie stellt so in vielen Belangen eine Alternative zur herkömmlichen Therapie von mikrobiellen Erkrankungen dar.

1.4. Fluoreszenzmikroskopie – Meilensteine der optischen Darstellung



Abb. 5: Antony van Leeuwenhoek (Ölgemälde von Johannes Verkolje)³⁴

Niederlande, 1673. In einem Brief an Henry Oldenburg, den Sekretär der Royal Society (London) berichtet Reinier de Graaf über einen genialen Textilhändler namens LEEUWENHOECK (Abb. 5), der mit selbstentwickelten Mikroskopen für die damalige Zeit Unglaubliches sichtbar machte. Und tatsächlich: ANTONY VAN LEEUWENHOECK (1632-1723) gilt heute als Pionier in der Darstellung von Mikroorganismen und der Durchführung kontrollierter Experimente. Durch die Weiterentwicklung der Ideen von Robert Hook, der durch das Hook'sche Gesetz bekannt ist, gelang ihm die Darstellung von Objekten in bis zu 100-facher Vergrößerung mit Objektiven, die nur in geringfügig abgewandelter Form noch heute Anwendung finden³⁴. Über die Beobachtung von Mikroorganismen („animalcules“) schreibt LEEUWENHOECK am 7. September 1674 in einem Brief:

„The motion of these animalcules in the water was so swift, and so various, upwards, downwards and round about, that it was wonderful to see.“³⁴

Getreu dem häufig zitierten Motto „Seeing is believing“ hat sich die Mikroskopie und speziell die Fluoreszenzmikroskopie seit dem 17. Jahrhundert zu einer wirksamen Methode entwickelt, um die Physiologie von Zellen und Mikroorganismen in Echtzeit zu verstehen^{35, 36}. Dies hat nach Hickey *et al.* folgende Gründe:

- 1) Vor allem in den letzten 20 Jahren haben sich neue Technologien, wie die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM), entwickelt. Diese gilt heute als die bedeutendste Erfindung des 20. Jahrhunderts im Bereich der Lichtmikroskopie.
- 2) Es steht eine Vielfalt an Farbstoffen und Färbemethoden zur Verfügung, mit deren Hilfe gezielt Zellbestandteile im Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden können.
- 3) Der schnelle Fortschritt in der Entwicklung von leistungsstarken Computern sowie effektiver Hard- und Software ermöglicht eine effiziente und zeitnahe Verarbeitung der durch die Mikroskopie erhaltenen Daten³⁷.

Hickey *et al.* zeigten 2009 in einem Übersichtsartikel am Beispiel von *Aspergillus fumigatus*, welches Potential in der Echtzeit-Fluoreszenzmikroskopie steckt. In der genannten Publikation sind Wachstumsprozesse, Kernteilungen, Zellorganellen, wie Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat sowie viele andere Zellstrukturen dargestellt. Die Autoren beschreiben eine Reihe von Anfärbemethoden, mit deren Hilfe die Zielstrukturen im CLSM sichtbar werden³⁷. Auch in der Medizin gewinnt die fluoreszenzunterstützte Mikroskopie mehr und mehr an Bedeutung. Im klinischen Alltag kann die Fluoreszenzmikroskopie mittlerweile helfen, Krankheitsbilder durch Erregernachweis in wenigen Stunden zu diagnostizieren. Dabei werden Blutproben mithilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisation (FISH) vorbehandelt und im Anschluss mikroskopiert. In Kombination mit PCR-Tests ist die Fluoreszenzmikroskopie so eine wirkungsvolle Methode in der Diagnostik³⁸. Jahanshahi *et al.* untersuchten die Assoziation von oralen Plattenepithelkarzinomen mit einer Kolonisation von *C. albicans*. Sie verwendeten dabei sowohl fluoreszenzmikroskopische Methoden als auch Lichtmikroskopie in Kombination mit histochemischen Färbungen (periodic acid-Schiff [PAS]). Die Autoren beschrieben im Vergleich eine signifikant höhere Sensitivität für

den Nachweis von *C. albicans* mit der Fluoreszenzmikroskopie als mit der PAS-Methode. Jahanshahi *et al.* zufolge stellt die Fluoreszenzmikroskopie mittlerweile den Goldstandard dar, um die Anwesenheit von Mikroorganismen in Geweben nachzuweisen³⁹.

Durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie ist es heute möglich Proteinuntereinheiten in Poren von Kernkomplexen in einer Auflösung von 20 nm darzustellen (Abb. 6). Hierfür wird ein spezielles STED-Mikroskop (*stimulated emission depletion*) verwendet, das diese hohe Auflösung ermöglicht⁴⁰.

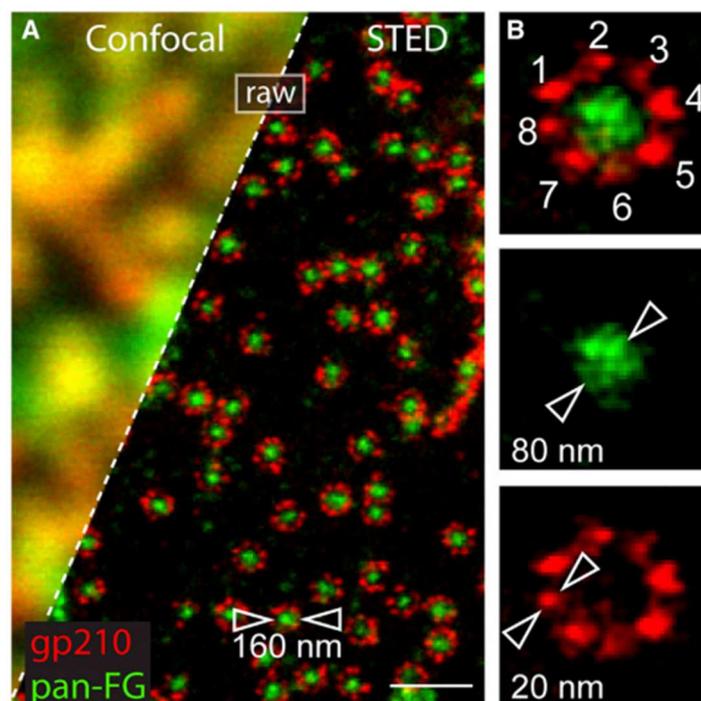


Abb. 6: Fluoreszenznanoskopie von Proteinkomplexen in Kernporen mit dem STED-Mikroskop

A zeigt die immunologisch markierten Untereinheiten eines Kernporenkomplexes (NPC) bei Amphibien mit STED im Vergleich zur konfokalen Mikroskopie. Der Durchmesser des gp210-Rings liegt dabei bei 160 nm. Unter B sind acht antikörpermarkierte Homodimere des NPC in einer Größe von 20-40 nm und der zentrale Kanal (Durchmesser 80 nm) dargestellt⁴⁰.

Dabei wird durch die Überlagerung zweier Laser (STED-Laser) die Anregungsfläche stark verkleinert. Dies führt dazu, dass individuelle Fluoreszenzsignale getrennt voneinander aufgefangen werden können und hierdurch eine höhere Auflösung zulassen³⁶. Dadurch eröffnen sich ganz neue Möglichkeiten im Bereich der Mikroskopie. Dendritische Aktivität beispielsweise kann im Gehirn eines lebenden Versuchstiers in Echtzeit

dargestellt werden ⁴¹. Auch das Verstehen von Signalwegen, z.B. an der Oberfläche von Leukozyten, wird durch hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie möglich ⁴². Die Royal Swedish Academy of Sciences würdigte 2014 die Verdienste von Prof. Dr. Stefan Hell (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) in der Entwicklung der STED-Mikroskopie mit dem Nobelpreis für Chemie. In der Pressemitteilung vom 8. Oktober 2014 heißt es: „The Royal Swedish Academy of Sciences has decided to award the Nobel Prize in Chemistry for 2014 to [...] Stefan W. Hell [...] *for the development of super-resolved fluorescence microscopy*“ ⁴³.

1.5. Funktionsweise eines Fluoreszenzmikroskops

Die Fluoreszenzmikroskopie basiert auf dem physikalischen Prozess der Fluoreszenz, der von GEORGE GABRIEL STOKES 1852 zum ersten Mal beschrieben wurde ⁴⁴. Dabei wird

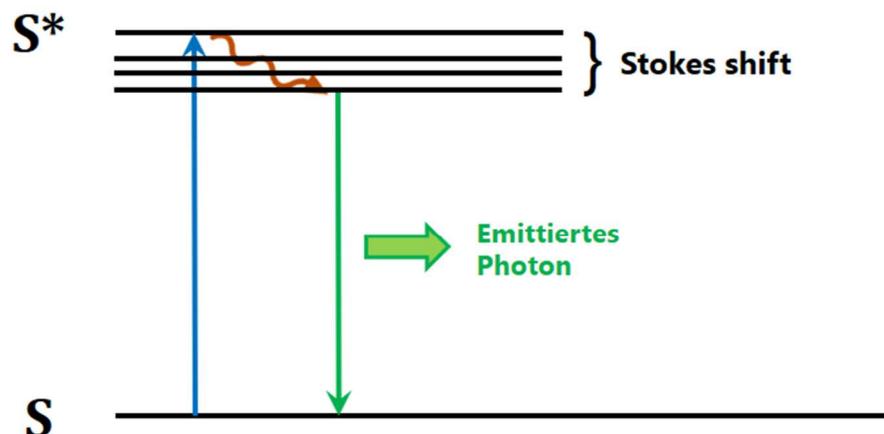


Abb. 7: Jablonski-Diagramm der Energieübergänge bei der Fluoreszenz

Durch die Absorption eines Photons geht das Fluorochrommolekül in einen angeregten Zustand (S^*) über (blau). Ein Teil der Energie wird in Form eines Photons höherer Wellenlänge abgestrahlt (grün). Durch diesen Vorgang geht das Molekül wieder in den Grundzustand (S) über. Der Energieunterschied zwischen anregendem und emittiertem Photon wird als „Stokes shift“ bezeichnet ³⁶.

von einem zur Fluoreszenz befähigtem Molekül (Fluorochrom) ein Photon der Energie $E = h\nu$ absorbiert. Das Molekül geht dadurch in einen angeregten Zustand über und gibt innerhalb von Nanosekunden einen Teil der Energie in Form eines neu emittierten Photons wieder ab. Da die ursprünglich absorbierte Energie nicht auf einmal emittiert

wird, ist die Wellenlänge des abgegebenen Photons größer als die des Ausgangsphotons. Dieser Wellenlängenunterschied wird als „Stokes shift“ bezeichnet³⁶. Die zugrundeliegenden Energieübergänge sind in Abb. 7 dargestellt. Essentiell für die Funktionsweise eines Fluoreszenzmikroskops ist die Trennung der Anregungs- und Emissionslichtwege. Für die Fluoreszenzmikroskopie eignen sich deshalb Fluorochrome, die einen hohen Stokes shift besitzen. Das Anregungslicht wird über einen Strahlenteiler-Spiegel zum Objektträger geleitet. Das vom Präparat emittierte Licht wird durch denselben Spiegel hindurch zu den Detektoren gelenkt. Um Licht anderer Wellenlänge abzuschirmen, werden in Fluoreszenzmikroskopen Anregungs- und Emissionsfilter verwendet. Das von der Lichtquelle kommende Licht ist polychromatisch, d.h. es besteht aus Photonen unterschiedlicher Wellenlänge. Den Anregungsfilter können nur Photonen passieren, deren Energie zur Anregung der Fluorochrome geeignet ist. Der Emissionsfilter ist im Vergleich zum Anregungsfilter für höhere Wellenlängen durchlässig. Das Anregungslicht wird dadurch gesperrt, sodass nur das von den Fluorochromen emittierte Fluoreszenzlicht von den Detektoren aufgefangen wird. Den Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops gibt Abb. 8 wieder. Die Grenzen der Empfindlichkeit des jeweiligen Fluoreszenzmikroskops für ein bestimmtes Fluorochrom sind durch die Fluoreszenzemission dieses Fluorochroms gegeben. Diese ist abhängig vom Lichtfluss I , von der Quantenausbeute Q und dem molekularen Absorptionsquerschnitt σ_A . Für die Fluoreszenzemission F gilt dann⁴⁵:

$$F = \sigma_A \cdot Q \cdot I$$

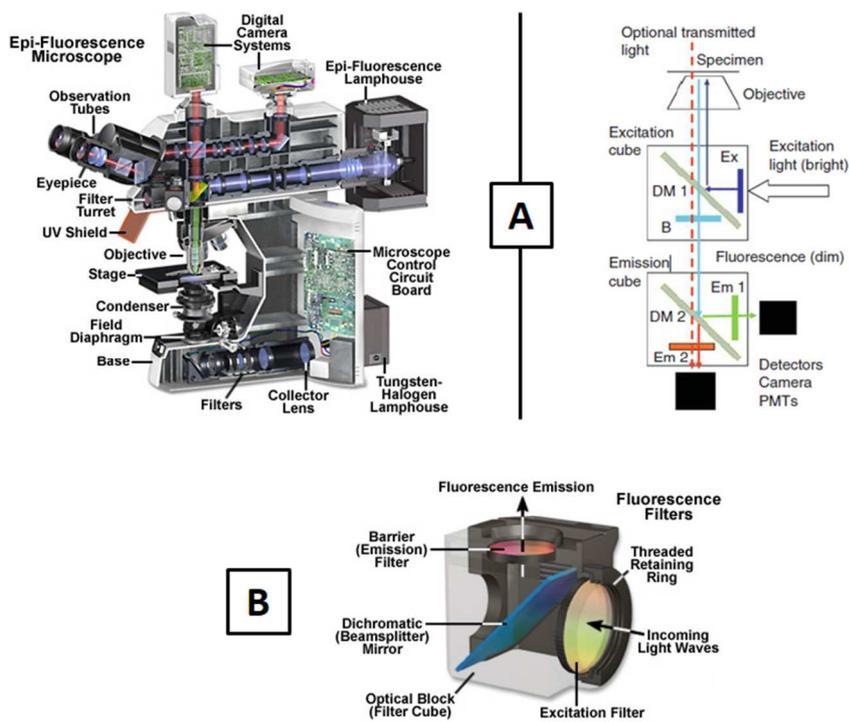


Abb. 8: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops

A zeigt einen Längsschnitt durch ein herkömmliches Fluoreszenzmikroskop und schematisch dessen Lichtwege. Das von der Fluoreszenzlampe erzeugte Licht wird über einen Strahlenteiler-Spiegel zum Objektträger geleitet. Das vom Präparat emittierte Licht gelangt über den Strahlenteiler-Spiegel hindurch zu den beiden Detektoren. Zur Abschirmung unerwünschten Lichts anderer Wellenlänge werden Filtersätze verwendet. In B ist der Aufbau eines solchen Filterblocks dargestellt. Essentielle Bestandteile sind der Strahlenteiler-Spiegel sowie Anregungs- und Sperrfilter (Emissionsfilter) ^{36, 45}.

2. Fragestellung

C. albicans verursacht vor allem bei immunsupprimierten Patienten oberflächliche Haut- und Schleimhautentzündungen sowie invasive Mykose. Die aPDT kann durch die Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies die sofortige oxidative Abtötung von Mikroorganismen bewirken. Die Nutzung von aPDT als antimikrobielle Behandlung gegen oberflächliche Krankheiten und Hautkrankheiten stellt daher eine effektive Methode zur Eliminierung von Mikroorganismen dar. Bisherige Ergebnisse im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Dr. Fernanda Gonzales (Antimicrobial photodynamic and cold plasma research unit, Department of Dermatology, University Medical Center Regensburg) zeigten, dass unter Verwendung der zweifach und vierfach positiv geladenen Porphyrinmolekülen XF73 bzw. TMPyP eine erfolgreiche Inaktivierung von monomikrobiell wachsenden *C. albicans* möglich ist⁴⁶⁻⁴⁸. In der Dissertation von Frau Dr. Gonzales wurden erste Versuche unternommen, die Lokalisation der PS in *C. albicans* zu visualisieren. PS sind Substanzen, die neben der Generierung von ROS auch fluoreszieren können. Neben Porphyrinen spielen auch andere PS, wie z.B. Phenothiazine, eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung von pathogenen Keimen. Sie werden beispielsweise in der Zahnheilkunde zur Therapie von Parodontitiden verwendet (HELBO-Verfahren)^{49, 50}. Dabei ist Methylenblau einer der wichtigsten Vertreter der Phenothiazine in der Photodynamik^{51, 52}. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es, zunächst Bedingungen zu finden, bei welchen eine photodynamische Inaktivierung von *C. albicans* möglich ist. Als Referenzphotosensibilisatoren sollen dabei TMPyP (Porphyrin), Methylenblau und Toluidinblau O (Phenothiazine) sowie Flavin 7 (Riboflavinderivat) als Vertreter verschiedener Substanzklassen verwendet werden. Mithilfe spektrometrischer Untersuchungsmethoden soll darüber hinaus die PS-Aufnahme von *C. albicans* charakterisiert werden, um daraus Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der PS zu gewinnen. Im zweiten Abschnitt der Doktorarbeit sollen bildgebende Verfahren verwendet werden, um genauere Erkenntnisse über die Lokalisation von PS in *C. albicans* zu erhalten. Mit

Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie soll untersucht werden, wo die PS in *C. albicans* lokalisieren und wie diese während photodynamischer Behandlung delokalisieren. In Abhängigkeit verschiedener Parameter, wie Inkubationszeit und PS-Konzentration, soll mit Hilfe der Fluoreszenz die Lokalisation der PS in Echtzeit beobachtet werden. Dazu werden planktonisch wachsende *Candida*-Kulturen verwendet. Gleichzeitig wird die Wirkung der PS während der photodynamischen Inaktivierung von *C. albicans* untersucht. Hierzu werden bestimmte Organellen mit Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt. Dadurch können in Abhängigkeit der chemischen und physikalischen Eigenschaften der PS neue Erkenntnisse über den Wirkmechanismus der aPDT gewonnen werden. Die Ergebnisse ermöglichen dann eine gezielte Optimierung von PS, um eine effektivere Inaktivierung von *C. albicans* zu erzielen.

3. Material und Methoden

3.1. *Candida albicans* Stamm

Candida albicans ATCC MYA-273 wurde bezogen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig-Strain DSM.

3.2. Kulturmedien

3.2.1. Sabouraud-Bouillon

30 g des pulverförmigen Sabouraud-Mediums (Carl Roth, Karlsruhe) wurden in 1 Liter Millipore-Wasser (mH₂O) unter ständigem Rühren gelöst. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert und bis zum Gebrauch im Kühlschrank (ca. 4°C) gelagert. Das Pulver besteht aus mykologischen Peptonen (10 $\frac{g}{L}$) und Dextrose (20 $\frac{g}{L}$).

3.2.2. Sabouraud-Agar

Die benötigten Agar-Platten wurden vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Regensburg hergestellt und bezogen.

3.3. Photosensibilisatoren

Als PS wurden TMPyP, Methylenblau (MB), Toluidinblau O (TBO) und Flavin 7 (FL7) verwendet. Eine Übersicht mit den Strukturformeln der PS zeigt Abb. 9.

3.3.1. TMPyP

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete TMPyP (5,10,15,20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphyrin tetra(p-toluensulfonat)) wurde von der Firma Sigma-Aldrich® Chemistry (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Der Reinheitsgehalt des PS beträgt 97%, sein Molekulargewicht 1.363,63 $\frac{g}{mol}$. TMPyP wurde in vitro bereits vielfach erfolgreich

als wirksamer PS in der photodynamischen Inaktivierung von Mikroorganismen eingesetzt^{47, 53, 54}. Der PS besitzt eine ausreichende Singulett-Quantenausbeute, die in der Literatur mit $\Phi_{\Delta} = 0,74$ angegeben wird⁵⁵.

3.3.2. Methylenblau

Der PS Methylenblau (3,7-Bis(dimethylamino)-phenothiaziniumchlorid) wurde von der Firma Sigma-Aldrich[®]Chemistry (Steinheim, Deutschland) bezogen. Er gehört zur Gruppe der Phenothiazine. Das Molekulargewicht liegt bei $373,90 \frac{g}{mol}$. MB besitzt eine Singulett-Quantenausbeute von $\Phi_{\Delta} = 0,52$ ⁵⁵.

3.3.3. Toluidinblau O

Das verwendete Toluidinblau O (3-Amino-7-(dimethylamino)-2-methylphenothiazinium-chlorid) wurde von TCI EUROPE NV (Zwijndrecht, Belgien) bezogen. Auch dieser PS gehört zur Gruppe der Phenothiazine. Das Molekulargewicht beträgt $305,83 \frac{g}{mol}$. Die Singulett-Quantenausbeute wird in der Literatur mit $\Phi_{\Delta} \approx 0,40$ angegeben⁵⁶.

3.3.4. Flavin 7

Der PS Flavin 7 (Flash7a-Hydrochlorid) wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg synthetisiert⁵⁷. Der Reinheitsgrad beträgt >95%, das Molekulargewicht liegt bei $1.180,74 \frac{g}{mol}$. Die Singulett-Quantenausbeute von FL7 beträgt $\Phi_{\Delta} = 0,78 \pm 0,05$ ⁵⁷.

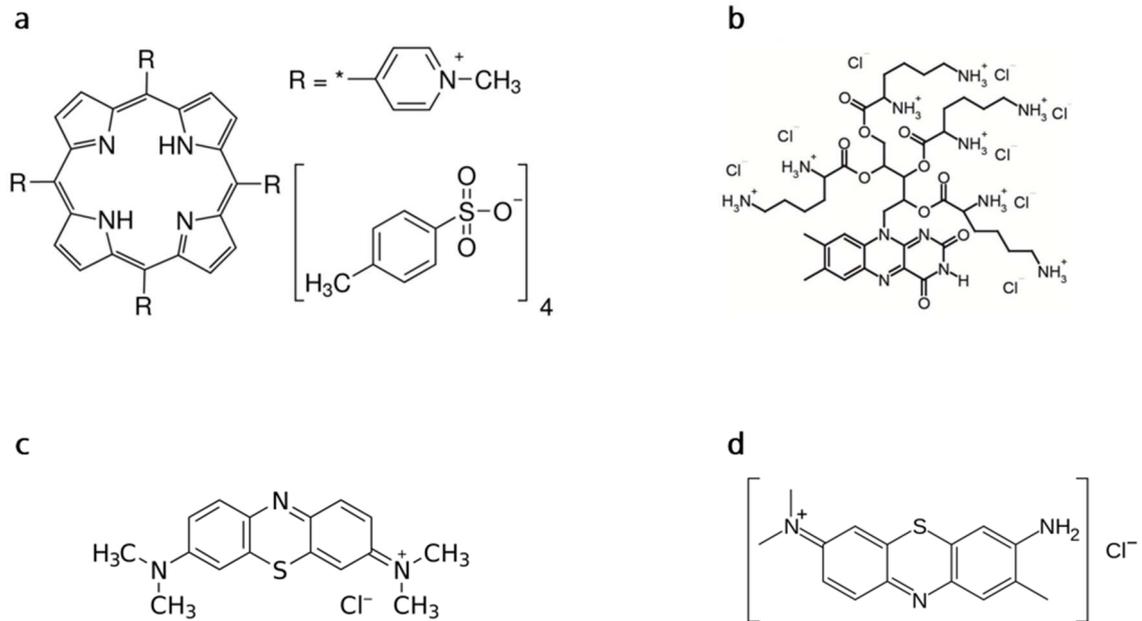


Abb. 9: Darstellung der Strukturformeln der PS TMPyP (a), FL7 ⁵⁷ (b), MB (c) und TBO (d)

3.4. Chemikalien

3.4.1. Poly-D-Lysine

Poly-D-Lysine (PDL) wurde verwendet, um die Zellen für die Mikroskopie am Objektträger zu fixieren. Es wurde von Grace Bio Labs (Oregon, USA) bezogen.

3.4.2. Hoechst 33342

Der Farbstoff Hoechst 33342 trihydrochlorid-trihydrat wurde von Molecular Probes (Oregon USA) bezogen. Er wurde verwendet, um die Zellkerne der *C. albicans*-Zellen darzustellen. Sein Molekulargewicht beträgt $615,99 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$.

3.4.3. Wheat Germ Agglutinin

Der Farbstoff Wheat Germ Agglutinin (WGA), Alexa Fluor[®] 488 conjugate wurde von der Firma Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Das WGA wurde verwendet, um die Zellwand der *C. albicans*-Zellen darzustellen. Sein Molekulargewicht beträgt $38.000 \frac{g}{mol}$. 5 mg WGA wurden in 5 mL Milliporewasser gelöst und die erhaltene Stammlösung auf 50 Eppendorf-Gefäße zu je 100 μ L alliquotiert. Die Aliquots wurden bei -20°C unter Ausschluss von Licht gelagert.

3.4.4. Bovin Serum Albumin (BSA)

Das BSA-Medium wurde von der Firma Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Das Molekulargewicht beträgt $66 \frac{g}{mol}$.

3.4.5. Natriumchlorid (NaCl)

Das NaCl wurde von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Das Molekulargewicht beträgt $58,44 \frac{g}{mol}$.

3.5. Technische Geräte und Hilfsmittel

3.5.1. Lichtquellen

3.5.1.1. Waldmann BlueV UV802L

Die inkohärente Lichtquelle stammt von der Firma Waldmann Medizintechnik (Villingen-Schwenningen, Deutschland). Ihre Flächenleistungsdichte beträgt am Ort der Bestrahlung $20 \frac{mW}{cm^2}$. Das Emissionsspektrum reicht von 380 bis 500 nm und ist in Abb. 10 gezeigt.

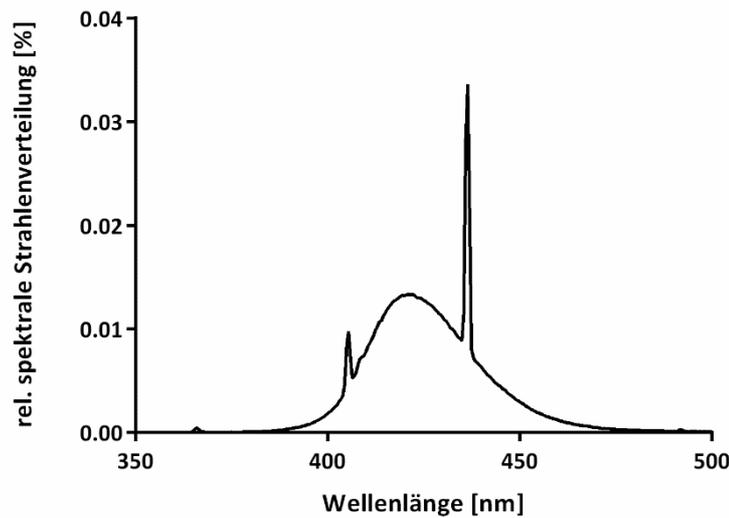


Abb. 10: Graphische Darstellung der relativen spektralen Strahlenverteilung in Abhängigkeit der Wellenlänge bei der Waldmann BlueV UV802L

3.5.1.2. Waldmann PDT 1200L

Die Lampe wurde von der Firma Waldmann Medizintechnik (Villingen-Schwenningen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Ihre maximale Flächenleistungsdichte wird mit $200 \frac{mW}{cm^2}$ angegeben. Die Leistungsdichte am Ort der Bestrahlung wird über den Abstand zur Probe eingestellt. Wie in Abb. 11 dargestellt, emittiert die Lampe inkohärentes Licht mit einem Emissionsspektrum von 570 bis 760 nm.

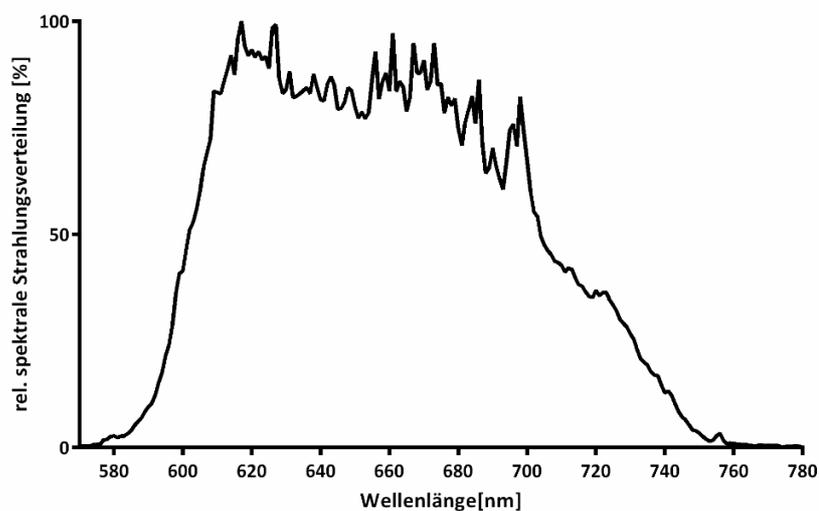


Abb. 11: Graphische Darstellung der relativen spektralen Strahlenverteilung in Abhängigkeit der Wellenlänge bei der PDT 1200L

3.5.2. Zentrifugen

Megafuge 1.0 der Firma Heraeus Sepatech (Hanau, Deutschland)

Centrifuge 5415R der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

3.5.3. Spektralphotometer

Specord 50 plus der Firma Analytik Jena (Jena, Deutschland)

3.5.4. Küvetten

Die verwendeten Acrylküvetten wurden von der Firma Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland) bezogen. Ihre Abmessungen betragen 10 x 4 x 45 mm.

3.5.5. Waage

CP225 D der Firma Sartorius (Göttingen, Deutschland)

3.5.6. Sterilbank

Laminaflow Hera Safe der Firma Kendro Laboratory Products (Hanau, Deutschland)

3.5.7. Neubauer Zählkammer Improved

Zählkammer der Firma Marienfeld GmbH & Co.KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)

3.5.8. Axio Imager Z1

Das Mehrkanal-3D-Fluoreszenzmikroskop AxioImager Z1 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) wurde freundlicherweise vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt. Das Mikroskop verfügt über sechs Objektive mit 5-, 10-, 20-, 40-, 60- bzw. 100-facher Vergrößerung. Eine Übersicht über die

vorhandenen Fluoreszenzfilter zeigt Abb. 12. Für die Mikroskopieversuche wurden die Filter „RedFP“, „Oregon Green“ sowie „DAPI“ verwendet (rot gekennzeichnet). Die verschiedenen Eigenschaften der Fluoreszenzfilter sind in Tab. 1 zusammengefasst. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der Software AxioVision Rel. 4.6 der Firma Zeiss.

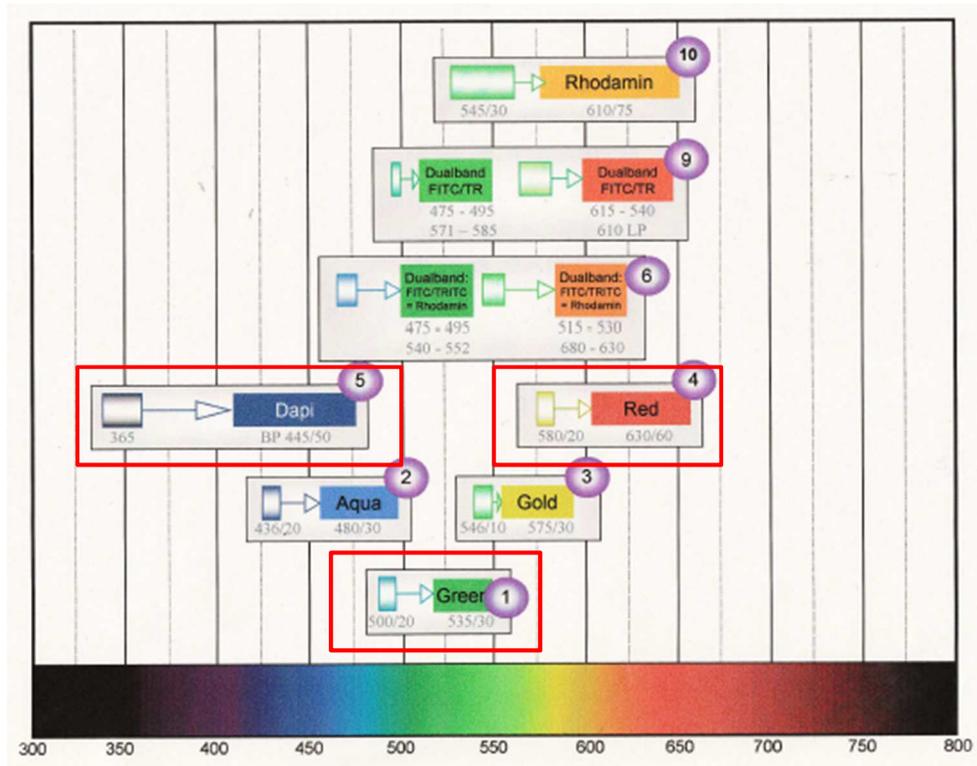


Abb. 12: Darstellung der verschiedenen UV-Filter am AxioImager Z1 in Abhängigkeit der Anregungs- und Emissionswellenlänge (die verwendeten Fluoreszenzfilter sind mit rot markiert)

Filter	Anregung	Emission
RedFP	$\lambda_{ex} = 580 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$	$\lambda_{em} = 630 \pm 60 \text{ nm}$
Oregon Green	$\lambda_{ex} = 500 \pm 20 \text{ nm}$	$\lambda_{em} = 535 \pm 30 \text{ nm}$
DAPI	$\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$	$\lambda_{em} = 445 \pm 50 \text{ nm}$

Tab. 1: Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfilter

3.5.9. Auswertungssoftware

Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurde das Statistikprogramm Graph Pad Prism® Version 6 der Firma Graph Pad Software (La Jolla, USA) verwendet. Für die Überlagerung der Mikroskopiebilder wurde das Programm Paint.net v4.0.9 benutzt.

3.6. Kultivierungsverfahren für *Candida albicans*

Unter sterilen Bedingungen wurden ein bis zwei Kolonien *C. albicans* mit einer sterilen Impföse in 5 mL Sabouraud-Bouillon überführt. Die Probe wurde anschließend bei 37°C unter aeroben Bedingungen auf einem Horizontalschüttler über Nacht inkubiert. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen aus dem Brutschrank genommen und bei $3.000 \frac{U}{min}$ für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in 5 mL Milliporewasser resuspendiert.

3.7. Auszählen von *Candida albicans* mit der Neubauer Zählkammer

Die erhaltenen *Candida*-Suspensionen wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer und dem Mikroskop ausgezählt. Hierfür wurde ein Deckglas auf die Zählkammer gelegt und 10 µL *C. albicans* in die Kammer eingebracht. Ausgezählt wurden dann zwei kleine Quadrate des Zählrasters (Abb. 13).

Die Anzahl N der in 5 mL enthaltenen Zellen errechnet sich dann nach der Formel

$$N = \frac{n_1 + n_2}{2} \cdot 25 \cdot 10^4 \cdot 5$$

n_1	Anzahl der Zellen im 1. Quadrat	Faktor 25	Anzahl der Quadrate
n_2	Anzahl der Zellen im 2. Quadrat	Faktor 5	Anzahl in 5 mL
10^4	Kammerfaktor		

Die gezählte Zellanzahl wurde der Auswertung zugrunde gelegt.

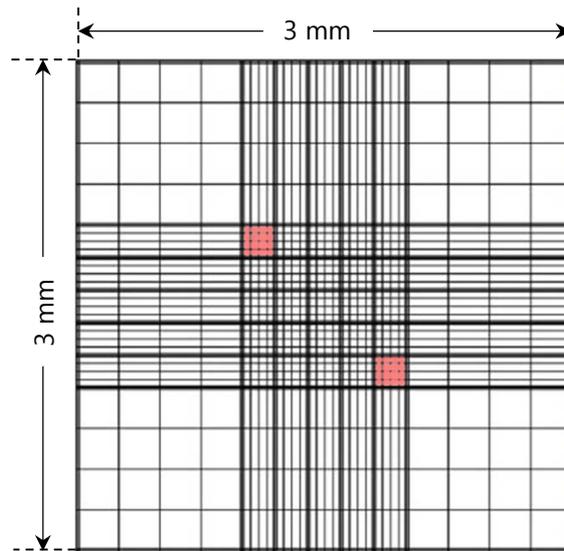


Abb. 13: Darstellung des Zählrasters in der Neubauer Zählkammer

Die mit rot markierten Quadrate wurden mit dem Mikroskop ausgezählt.

3.8. Herstellung der Photosensibilisator-Lösungen

Von jedem PS wurde eine Stammlösung mit der Konzentration 1 mM hergestellt. Hierzu wurde die entsprechende Masse der in Pulverform vorliegenden PS mithilfe einer Feinwaage eingewogen und in 10 mL Milliporewasser gelöst. Um den Lösungsvorgang zu verbessern, wurden die Aufbewahrungsgefäße mit den Stammlösungen für 10 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben. Durch die Verdünnung mit Milliporewasser wurde für jeden PS eine Konzentrationsreihe hergestellt. Die PS-Lösungen wurden bis zu ihrem Gebrauch bei ca. 4°C unter Ausschluss von Licht gelagert.

3.9. Versuchsaufbau der Phototoxizitätsversuche

In einer sterilen 96-Well-Platte wurden jeweils 100 μL *C. albicans* zu 100 μL PS unterschiedlicher Konzentrationen gegeben. Die Proben wurden im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde die Well-Platte mit der jeweils entsprechenden Lampe bestrahlt. Als Kontrollen wurden durchgeführt:

- a) PS / kein Licht (Dunkelkontrolle)
- b) Kein PS / Licht (Lichtkontrolle)
- c) Kein PS / kein Licht (Nullkontrolle)

forming units, CFU) eine sichere Unterscheidung zwischen den einzelnen Kolonien nicht mehr möglich ist, wurden als obere Zählgrenze 65 KBE festgesetzt. Mehr als diese 65 Kolonien wurden als „unendlich“ angesehen. Die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt und die Ergebnisse mithilfe der Software Graph Pad Prism[®], Version 6 (La Jolla, USA) graphisch dargestellt.

3.11. Auswertung der Phototoxizitätsversuche

Die erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms Graph Pad Prism[®], Version 6 ausgewertet und in einem Diagramm dargestellt. In die Auswertung gingen dabei mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche ein. Die Diagramme zeigen das aus den Messwerten erhaltene arithmetische Mittel mit einem Konfidenzintervall von $\pm 95\%$. Eine antimikrobielle Wirkung ist hinsichtlich der Leitlinien für Händedesinfektion dann gegeben, wenn eine Inaktivierung der Mikroorganismen von mindestens 99,9% erreicht wird. Dies entspricht einer Logstufenreduktion von 3 \log_{10} -Stufen^{59, 60}.

3.12. Versuchsaufbau der Uptakeversuche

In einem sterilen Eppendorf-Gefäß wurden 750 μL *C. albicans* mit 750 μL PS unterschiedlicher Konzentrationen im Dunkeln inkubiert. Die Konzentrationen der einzelnen PS richteten sich dabei nach den in den Phototoxizitätsversuchen verwendeten Konzentrationen. Die Proben wurden anschließend mithilfe einer Eppendorf-Zentrifuge (Centrifuge 5415R) für 10 Minuten bei $13.000 \frac{U}{min}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert, in eine Acrylküvette überführt und die optische Dichte (OD) spektrometrisch gegen eine Referenz aus PS und Milliporewasser gemessen (Abb. 15). Der Unterschied in der optischen Dichte (OD) zwischen Probe und Referenz ist ein qualitatives

Maß für die von *C. albicans* aufgenommene Menge an PS. Für diese Arbeit wurde definiert, dass ein Unterschied von mindestens 30% zwischen Probe und Referenz gegeben sein muss, um von einer Aufnahme des PS sprechen zu können.

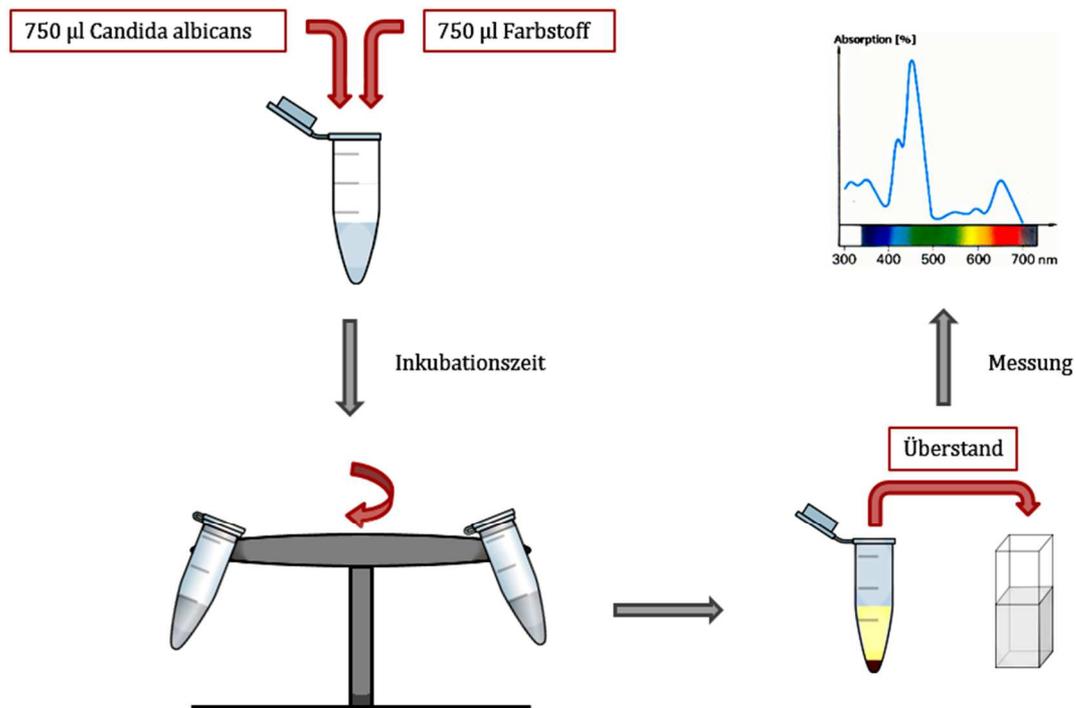


Abb. 15: Versuchsaufbau eines Uptakeversuchs

Gleiche Mengen an PS und *C. albicans* wurden inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Küvette überführt und die OD gegen eine Referenz spektrometrisch gemessen. Die gelbe Farbe des Überstands nach der Zentrifugation soll den nicht gebundenen PS darstellen.

3.13. Probenvorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie

3.13.1. Vorbereitung der Objektträger

Auf einen Objektträger wurden mittig 20 µL PDL aufgebracht. Die Flüssigkeit wurde für ca. 10 Minuten auf dem Objektträger belassen. Im Anschluss wurde das PDL abpipetiert und die Objektträger mit klarem Wasser abgespült. Die Trocknung erfolgte mit Druckluft.

PDL lädt den Objektträger positiv auf und fördert dadurch die Adhäsion der Zellen an dessen Oberfläche ⁶¹. Dies führt zu einer stärkeren Immobilisation der Zellen und erleichtert dadurch die Fokussierung. PDL hat zudem den Vorteil, dass es von zelleigenen Proteasen nicht verdaut wird ⁶².

Für die Mikroskopie wurde ein Tropfen der jeweiligen Probe (ca. 5 µL) auf einen mit PDL vorbehandelten Objektträger gegeben und mit einem Deckglaschen bedeckt. Für die Vergrößerungsstufen 63x und 100x wurde zusätzlich Immersionsöl aufgetragen. Eine schematische Darstellung hierzu ist in Abb. 16 gezeigt.

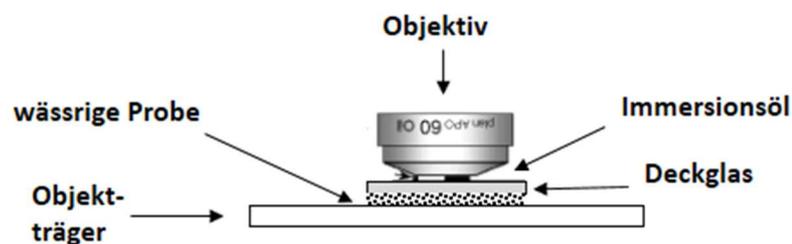


Abb. 16: Vorbereitung der Proben für die Mikroskopie (modifiziert nach Hickey *et al.* ³⁷)

3.13.2. Inkubation von *Candida albicans* mit Hoechst 33342

In ein Eppendorf-Gefäß wurden 250 µL *C. albicans* und 250 µL Hoechst 33342 der Konzentration 10 µM gegeben und für 15 Minuten unter Ausschluss von Licht inkubiert. Die Probe mit einer Endkonzentration von 5 µM an Hoechst-Farbstoff wurde im Anschluss bei $13.000 \frac{U}{min}$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet in 500 µL mH₂O resuspendiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt und die Probe im Folgenden mikroskopiert.

3.13.3. Inkubation von *Candida albicans* mit TMPyP

In zwei Eppendorf-Gefäße wurden jeweils 250 µL *C. albicans* und 250 µL TMPyP gegeben und für 15 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Alle Proben wurden für 5

Minuten bei $13.000 \frac{U}{min}$ zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und verworfen. Die Proben wurden anschließend in Milliporewasser resuspendiert. Die unbestrahlte Probe wurde vor Lichtzufuhr geschützt und nicht weiter behandelt (Dunkelkontrolle). Die zweite Probe wurde in eine transparente Petrischale gegeben und für 10 Minuten mit der Waldmann BlueV UV802L bei einer Flächenleistungsdichte von $20 \frac{mW}{cm^2}$ bestrahlt (Lichtdosis $12 \frac{J}{cm^2}$). Nachfolgend wurde die Suspensionsprobe wieder in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

3.13.4. Inkubation von *C. albicans* mit WGA

Um *C. albicans* mit WGA zu inkubieren, ist eine BSA-NaCl-Lösung nötig. Hierfür wurden 125 mg 0,25%iges BSA-Pulver und 438,3 mg NaCl in 50 mL Milliporewasser gelöst und anschließend sterilfiltriert. 5 mL *C. albicans*-Suspension wurden sodann für 10 Minuten bei $3.000 \frac{U}{min}$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das erhaltene Pellet wurde in BSA-NaCl-Lösung resuspendiert. In ein Eppendorf-Gefäß wurden im Anschluss 450 µL *C. albicans* in BSA-NaCl-Lösung und 50 µL WGA Stammlösung ($1 \frac{g}{L}$) gegeben, um eine Endkonzentration von $100 \frac{\mu g}{mL}$ zu erreichen. Die Probe wurde für 15 Minuten inkubiert, bei $13.000 \frac{U}{min}$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachfolgend wurde das erhaltene Pellet in 500 µL BSA-NaCl-Lösung resuspendiert und mikroskopiert.

3.13.5. Inkubation von *C. albicans* mit TMPyP und WGA

Zwei 5 mL *C. albicans*-Suspensionen wurden bei $3.000 \frac{U}{min}$ zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die erhaltenen Pellets wurden dann in 5 mL BSA-NaCl-Lösung bzw. in 5 mL Milliporewasser resuspendiert. In zwei Eppendorf-Gefäße wurden im Anschluss jeweils WGA-Stammlösung und BSA-*C. albicans*-Suspension gegeben, sodass eine Endkonzentration von $50 \frac{\mu g}{mL}$ entstand. Die Proben wurden für 15 Minuten inkubiert, bei $13.000 \frac{U}{min}$ zentrifugiert und die Überstände verworfen. Zu den Eppendorf-Gefäßen

wurden sodann gleiche Mengen mH₂O und 2 µM TMPyP gegeben und wiederum 15 Minuten inkubiert. Die Proben wurden im Folgenden ebenfalls bei 13.000 $\frac{U}{min}$ zentrifugiert, die Überstände verworfen und in 500 µL Milliporewasser resuspendiert. Die unbestrahlte Probe wurde bis zur Mikroskopie unter Ausschluss von Licht gelagert (Dunkelkontrolle). Die zweite Probe wurde nach Resuspension in eine transparente Petrischale gegeben und anschließend für zehn Minuten mit der Waldmann BlueV UV802L bei einer Flächenleistungsdichte von 20 $\frac{mW}{cm^2}$ bestrahlt (Lichtdosis 12 $\frac{J}{cm^2}$). Die Probe wurde im Anschluss wieder in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Phototoxizitätsversuche

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die photodynamische Inaktivierungseffizienz von verschiedenen chemischen PS-Klassen gegenüber *C. albicans* nach Bestrahlung bestimmt. Dabei sollte untersucht werden, ab welcher Konzentration ein photodynamischer Effekt von mindestens 3 \log_{10} -Stufen erzielt werden kann. Hierfür wurden die Referenzphotosensibilisatoren TMPyP, MB, TBO und FL7 als Vertreter unterschiedlicher Substanzklassen verwendet.

4.1.1. Phototoxizitätsversuche mit TMPyP

Die Phototoxizitätstests wurden, wie in Kapitel 3 beschrieben, mit den PS-Konzentrationen 0 μM , 0,5 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM und 50 μM durchgeführt. *C. albicans* wurde hierfür mit der entsprechenden Konzentration TMPyP für 15 Minuten inkubiert und anschließend für 10 Minuten mit der BlueV UV802L bei einer Flächenleistungsdichte von $20 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$ bestrahlt (Lichtdosis $12 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$). Die Ergebnisse der Phototoxizitätstests mit TMPyP sind in Abb. 17 graphisch dargestellt. Die Resultate zeigen, dass der photodynamische Effekt bei einer Konzentration von 5 μM beginnt und die zählbaren KBE bei 10 μM bereits unter das Detektionslimit fallen. Eine Reduktion der KBE um 3 \log_{10} -Stufen konnte ab 5 μM erreicht werden. Lichtapplikation allein, ohne Zusatz des PS, hatte keinen Einfluss auf das Überleben der *C. albicans*-Zellen. Weiterhin zeigte sich eine Abnahme der KBE in der nichtbestrahlten Probe ab einer Konzentration von 10 μM im Vergleich zu vorangehenden Konzentrationen. Dies deutet darauf hin, dass TMPyP bei höheren Konzentrationen einen toxischen Effekt (Dunkeltoxizität) gegenüber *C. albicans* besitzt, wie auch Untersuchungen von Quiroga *et al.* belegen konnten⁶³. Abb. 18 zeigt die relative Log-Stufen-Reduktion der Überlebensrate von *C. albicans* bei photodynamischer Inaktivierung mit TMPyP. Dabei ist die Inaktivierung dar-

gestellt, die rein auf einen photodynamischen Effekt zurückzuführen ist. Die Log-Stufen-Reduktion geht aus diesem Grund ab einer Konzentration von 10 μM wieder zurück, da mit steigender Konzentration des PS die Dunkeltoxizität zunimmt.

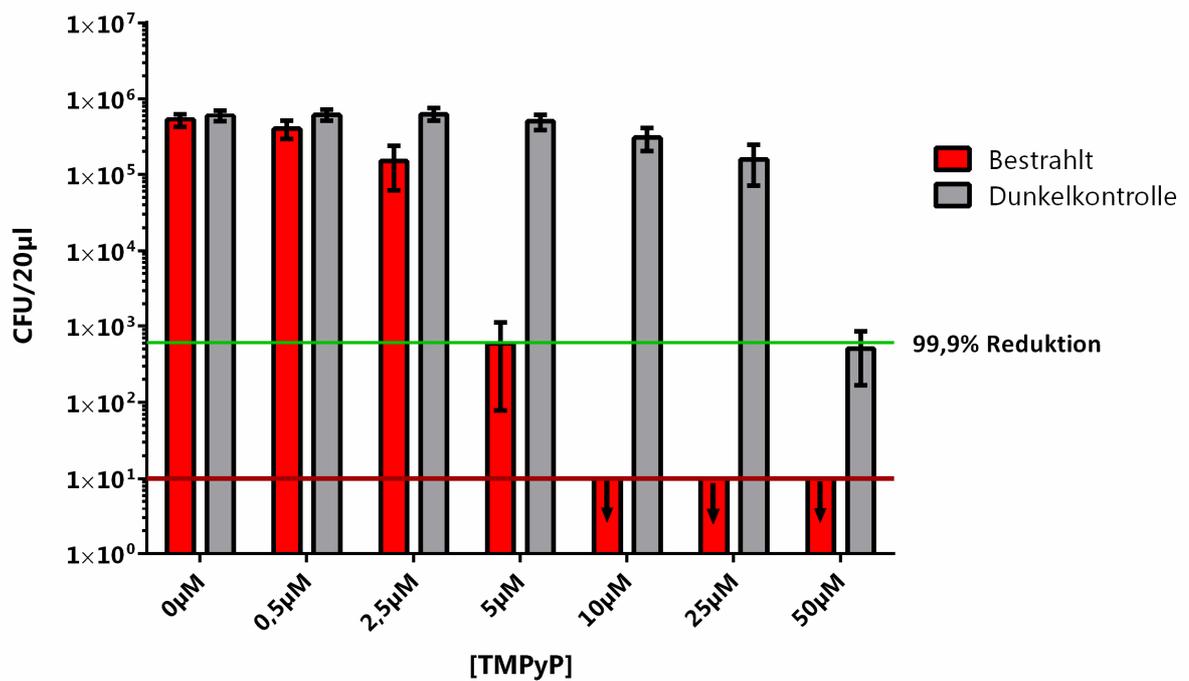


Abb. 17: Phototoxizitätstests mit TMPyP

C. albicans wurde mit verschiedenen Konzentrationen TMPyP für 15 Minuten inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei $20 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$ bestrahlt. Ab 5 μM ist eine Reduktion der KBE um 3 \log_{10} -Stufen zu erkennen, die mit steigender Konzentration zunimmt. Der Abfall der KBE in der Dunkelkontrolle ab 10 μM ist durch die Dunkeltoxizität des PS bei höheren Konzentrationen zu erklären. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der erhaltenen KBE/20 μL bei einem Konfidenzintervall von 95% ($n = 3$). Grüne Linie: Reduktion um 99,9% (3 \log_{10} -Stufen). Rote Linie: Detektionslimit bei 10^1 KBE/20 μL .

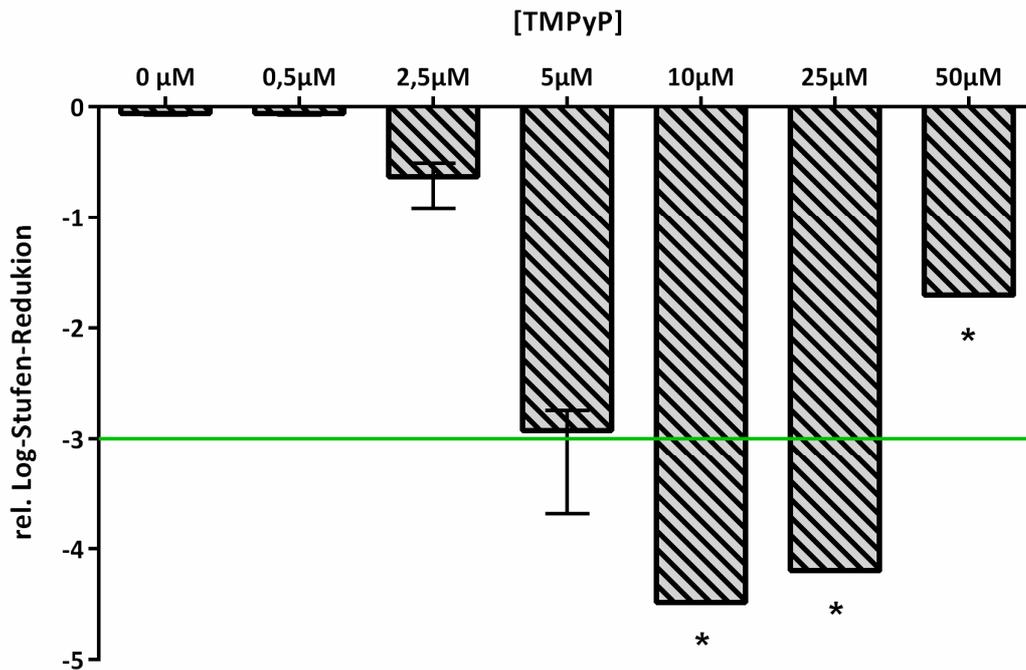


Abb. 18: Relative Log-Stufen-Reduktion bei Phototoxizitätsversuchen mit *C. albicans* und TMPyP

In der Darstellung der relativen Log-Stufen-Reduktion zeigt sich ebenfalls eine photodynamische Wirkung ab 5 μM . Grüne Linie: Reduktion um 99,9% (3 \log_{10} -Stufen).

*-Markierung: Da die KBE der bestrahlten Proben bei diesen Konzentrationen unter das Detektionslimit fallen (siehe Abb. 17), wurde kein Fehlerintervall angegeben.

Quiroga *et al.* konnten darüber hinaus feststellen, dass eine Reduktion der KBE um 5 \log_{10} -Stufen erreicht werden konnte, wenn *C. albicans* mit 5 μM TMPyP für 30 Minuten inkubiert und 30 Minuten bestrahlt wurde ($90 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$)⁶³. Cormick *et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass eine Reduktion der koloniebildenden Einheiten von *C. albicans* um 5 \log_{10} -Stufen bei einer Konzentration von 5 μM möglich ist. Die Inkubationszeit betrug hier 30 Minuten mit folgender Bestrahlung der Proben für wiederum 30 Minuten mit sichtbarem Licht der Wellenlänge 350-800 nm und einer Flächenleistungsdichte von $90 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$ ⁶⁴. Gonzales *et al.* stellten fest, dass ein photodynamischer Effekt bereits bei einer Konzentration von 2 μM TMPyP und gleichem Versuchsaufbau wie in der vorliegenden Arbeit nachweisbar war⁴⁷. Vergleicht man TMPyP hinsichtlich der Effektivität gegenüber *C. albicans* und Bakterien so fällt auf, dass für die Inaktivierung von *C. albicans*

deutlich höhere Konzentrationen notwendig sind. Eine Reduktion um 3 log₁₀-Stufen konnte für MRSA bereits bei einer Konzentration von nur 0,5 µM erreicht werden, wenn man eine Bestrahlungszeit von 10 Sekunden bei 50 $\frac{mW}{cm^2}$ zugrunde legt. Für eine Inaktivierung von EHEC um mehr als 3 log₁₀-Stufen war bei sonst gleichen Bedingungen eine Konzentration von 1 µM TMPyP notwendig⁴⁸. Dieses unterschiedliche Verhalten von Pilzen und Bakterien kann möglicherweise durch deren unterschiedlichen Zellaufbau erklärt werden. Zum einen besitzt *C. albicans* im Vergleich zu Bakterien eine Zellwand, die die Zelle sowohl vor einem Eindringen des PS als auch vor einer Penetration reaktiver Sauerstoffspezies schützt (siehe auch Abb. 3). Zum anderen sind Pilzzellen wesentlich größer als Bakterien, wodurch eine höhere Menge reaktiver Sauerstoffspezies notwendig ist, um eine vergleichbare Inaktivierung zu erreichen^{48, 65}. Auch die Untersuchungen von Demidova *et al.* kamen zu dem Schluss, dass *C. albicans* im Vergleich zu Bakterien deutlich widerstandsfähiger gegenüber aPDT ist⁶⁵.

Wie unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen konnte, ist der photodynamische Effekt auch abhängig von der Anzahl absorbierter Photonen, da nach photodynamischem Prinzip jeweils ein Photon mit einem Molekül PS wechselwirkt. Dieser Zusammenhang zwischen dem photodynamischen Effekt und der Zahl der absorbierten Photonen kann durch die Formel

$$\frac{\text{absorbierte Photonen}}{\text{Sekunde}} = \sum_{\lambda} (1 - 10^{-\varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d}) \cdot P_{em}(\lambda) \cdot \frac{\lambda}{c_0 \cdot h}$$

$\varepsilon(\lambda)$ Extinktionskoeffizient [(mol · cm)⁻¹]

$P_{em}(\lambda)$ spektrale Strahlungsleistung der jeweiligen Lichtquelle [mW/nm]

c Konzentration des PS [µM]

d Schichtdicke der Lösung [mm]

c₀ Lichtgeschwindigkeit [m/s]

h Planck'sches Wirkungsquantum [Js]

λ Wellenlänge [nm]

zum Ausdruck gebracht werden. Um die Effektivität der photodynamischen Wirkung unterschiedlicher Arbeitsgruppen adäquat vergleichen zu können, sollte deshalb die Anzahl der absorbierten Photonen berücksichtigt werden⁶⁶. Dies würde auch die unterschiedlichen Ergebnisse der photodynamischen Effizienz bei den einzelnen Publikationen erklären, da bisher die Zahl der absorbierten Photonen als Parameter nicht berücksichtigt worden ist.

4.1.2. Phototoxizitätsversuche mit Methylenblau

C. albicans wurde für 4 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen MB (Endkonzentrationen: 0 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM) inkubiert. Es erfolgte anschließend eine Bestrahlung der Proben für 10 Minuten bei einer Leistungsdichte von 50 $\frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$ mit der PDT 1200L (Lichtdosis: 30 $\frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$). Die Ergebnisse sind in Abb. 19 graphisch dargestellt. Lichtaktiviertes MB bewirkte keine Reduktion der KBE. Des Weiteren blieb die Überlebensrate der Zellen von reiner Lichtexposition ohne PS unberührt (Lichtkontrolle). Eine Dunkeltoxizität wie bei den Versuchen mit TMPyP konnte nicht beobachtet werden.

Da diese Versuchsbedingungen keine Inaktivierung der Zellen zeigten, wurde die Bestrahlungsintensität erhöht, um gegebenenfalls dadurch eine photodynamische Wirkung zu induzieren. Hierfür wurde *C. albicans* mit MB der Konzentrationen 0 μM , 100 μM und 500 μM für 4 Stunden inkubiert und dann mit einer Lichtdosis von 180 $\frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$ bei einer Leistungsdichte von 50 $\frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$ bestrahlt. Wie in Abb. 20 graphisch dargestellt, zeigt die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten keine Verminderung in den Überlebenszahlen von *C. albicans*.

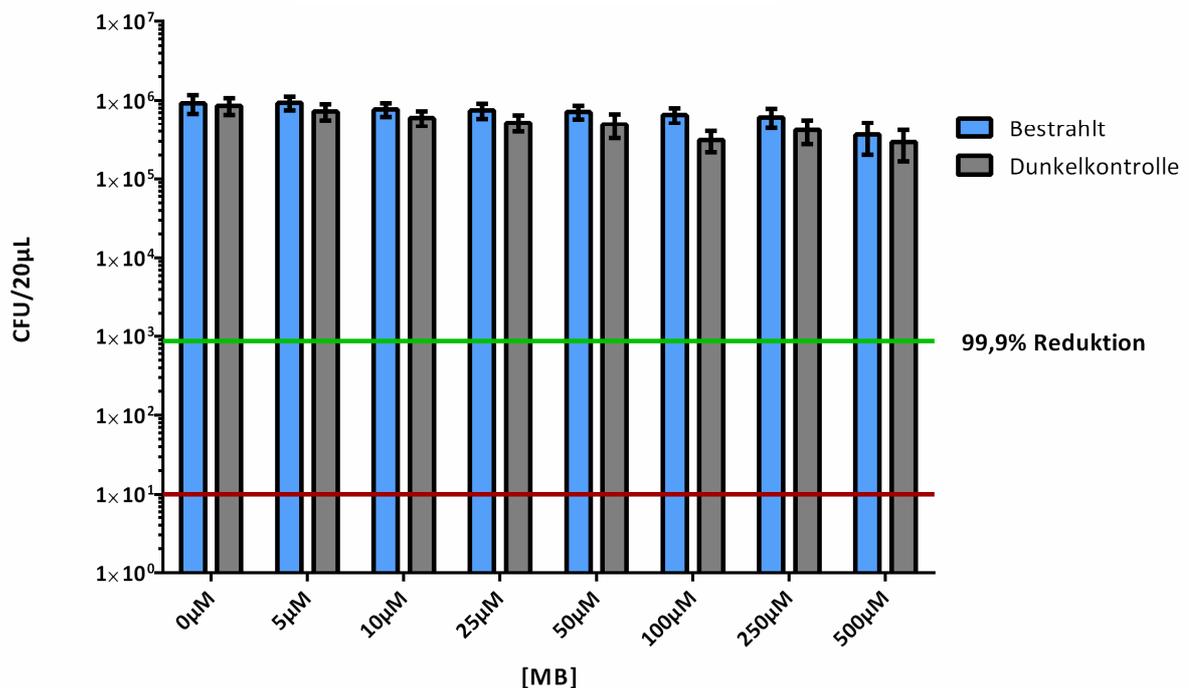


Abb. 19: Phototoxizitätstests mit MB

C. albicans wurde mit verschiedenen Konzentrationen MB für 4 Stunden inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei $50 \frac{mW}{cm^2}$ bestrahlt. Sowohl Lichtkontrolle als auch Dunkelkontrolle zeigen keinen negativen Einfluss, d.h. keine Reduktion der Anzahl an KBE. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der erhaltenen KBE/20µL bei einem Konfidenzintervall von 95% ($n = 3$). Grüne Linie: Reduktion um 99,9% (3 \log_{10} -Stufen). Rote Linie: Detektionslimit bei 10^1 KBE/20µL.

De Souza *et al.* konnten eine relative Logstufen-Reduktion von 1,01 \log_{10} -Stufen bei einer Inkubation von *C. albicans* mit MB der Konzentration $0,1 \frac{mg}{ml}$ und Bestrahlung mit einem Diodenlaser InGaAIP (Energiedosis: $25 \frac{J}{cm^2}$) erzielen ⁶⁷. Der Unterschied zu den Ergebnissen in dieser Arbeit beruht möglicherweise darauf, dass bei De Souza *et al.* ein Laser verwendet wurde, der als monochromatische Lichtquelle das Absorptionsmaximum von MB besser trifft als die PDT 1200L. Dennoch wurde nur eine Reduktion um 88,6% erreicht. Definitionsgemäß ergibt sich eine antimikrobielle Wirkung jedoch erst bei einer Reduktion der KBE um 99,9% ^{59, 60}. Pupo *et al.* verzeichneten in ähnlichen Untersuchungen ebenfalls lediglich eine Logstufen-Reduktion von 0,36 \log_{10} -Stufen

bei Bestrahlung mit einer Energiedosis von $53 \frac{J}{cm^2}$ und ansonsten gleichen Bedingungen wie de Souza *et al.*⁶⁸. Vor diesem Hintergrund erscheinen die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten als annähernd in derselben Größenordnung.

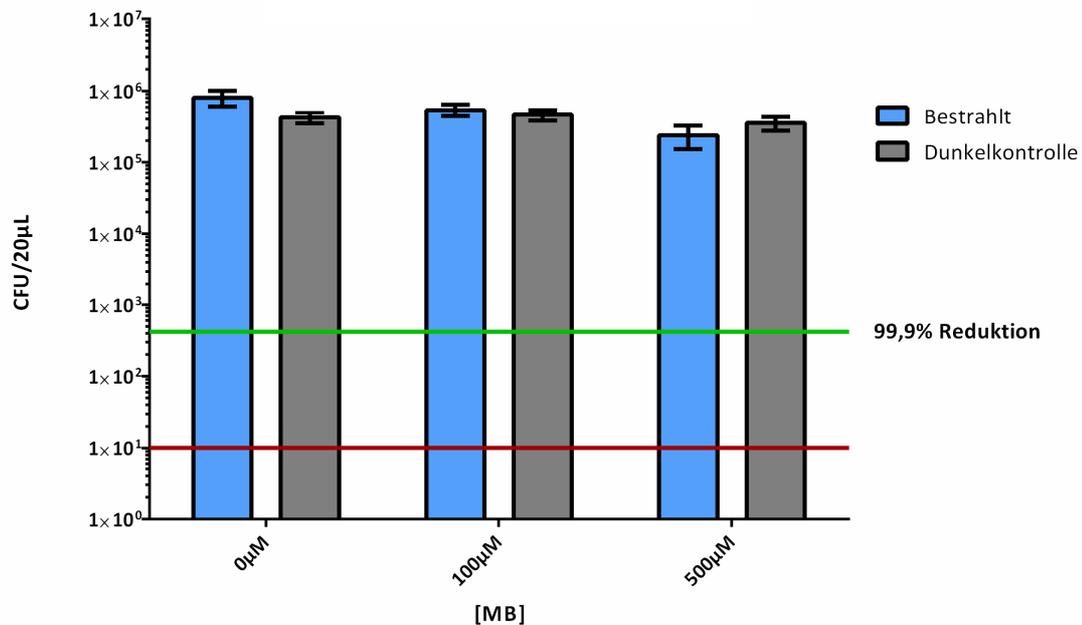


Abb. 20: Phototoxizitätstest mit MB

Die Versuchsbedingungen waren analog zu Abb. 19, jedoch wurde die Bestrahlungsdosis auf $180 \frac{J}{cm^2}$ erhöht.

4.1.3. Phototoxizitätsversuche mit Toluidinblau O

Da Toluidinblau O (TBO) eine ähnliche Struktur besitzt wie MB und bereits in mehreren Studien als PS gegenüber *C. albicans* eingesetzt wurde, wurden Phototoxizitätstests mit TBO durchgeführt^{68, 69}. Hierfür wurde *C. albicans* mit TBO verschiedener Konzentrationen (Endkonzentrationen: 0 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM) für 4 Stunden inkubiert. Die Bestrahlung erfolgte bei einer Energiedosis von $180 \frac{J}{cm^2}$ und einer Leistungsdichte von $50 \frac{mW}{cm^2}$. Nach Bestimmung der KBE konnte keine Reduktion in der Überlebensrate von *C. albicans* festgestellt werden. Wie auch bei MB

war die Lichtkontrolle negativ und eine Dunkeltoxizität des PS im gewählten Konzentrationsbereich nicht zu verzeichnen. Die Ergebnisse sind in Abb. 21 graphisch dargestellt.

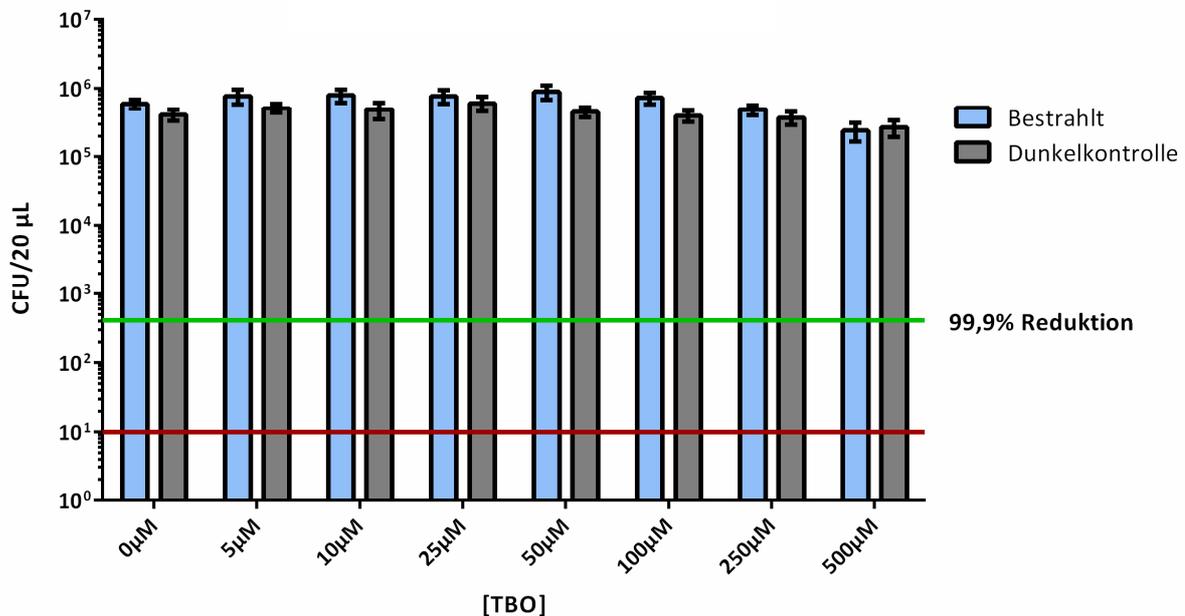


Abb. 21: Phototoxizitätstests mit TBO

C. albicans wurde mit verschiedenen Konzentrationen TBO für 4 Stunden inkubiert und anschließend bei einer Energiedosis von $180 \frac{J}{cm^2}$ bestrahlt. Die Proben wurden nach der modifizierten Methode von MILES, MISRA & IRWIN ausplattiert und die KBE 24 Stunden später nach Inkubation im Brutschrank bestimmt. Sowohl Lichtkontrolle als auch Dunkelkontrolle zeigen keinen negativen Einfluss, d.h. keine Reduktion der Anzahl an KBE. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der erhaltenen KBE/20µL bei einem Konfidenzintervall von 95% (n = 3). Grüne Linie: Reduktion um 99,9% (3 log₁₀-Stufen). Rote Linie: Detektionslimit bei 10¹ KBE/20µL.

In der Studie von Pupo *et al.* wurde neben dem photodynamischen Effekt von MB auch die Wirksamkeit von TBO auf *C. albicans* untersucht. Es konnte eine Reduktion der KBE um 0,34 log₁₀-Stufen ($\cong 73,6\%$) bei einer Konzentration von $0,1 \frac{mg}{ml}$ TBO beobachtet werden⁶⁸. Auch Wilson *et al.* erreichten lediglich eine Effektivität von 64-77% bei Verwendung derselben TBO-Konzentration⁶⁹. Andere Studien wiederum zeigen deutlich bessere Ergebnisse. De Souza *et al.* zeigten unter Verwendung verschiedener Bestrahlungsparameter eine Reduktion der KBE von bis zu 3 log₁₀-Stufen bei einer PS-Konzentration von $0,1 \frac{mg}{mL}$ ⁷⁰. Auch bei TBO liegt der Grund für diese sehr unterschiedlichen

Ergebnisse bezüglich der Wirksamkeit gegenüber *C. albicans* vermutlich in den verschiedenen Lichtquellen, die für die Bestrahlung der Proben verwendet wurden.

Autor	Lichtquelle (J/cm ²)	λ (nm)	TBO (mg/mL)	Ergebnisse
Pupo (2011)	InGaAlP (53,0) *	660	0,1	73,6%
Soares (2009)	LED (54,0)	630	0,1	5,2 log ₁₀
Souza (2010)	GaAlAs (39,5) *	660	0,1	3,0 log ₁₀
Wilson (1993)	HeNe (66,3) *	632,8	0,1	64-77%

Tab. 2: Übersicht über Versuchsaufbau und Ergebnisse der in der Literatur angegebenen Inaktivierungsversuche von *C. albicans* mit TBO (die Verwendung von Lasern ist mit * markiert).

Bei allen oben genannten Literaturstellen kamen Laser variierender Wellenlängenbereiche und Leistungsdichten zur Anwendung. Diese Laser sind monochromatische Lichtquellen. Dies bedeutet, dass sie ausschließlich Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Dadurch treffen sie das Absorptionsspektrum von TBO möglicherweise besser als die in dieser Arbeit verwendete PDT 1200L. Soares *et al.* konnten mit einer LED, die monochromatisches Licht der Wellenlänge 630 nm erzeugte, mit $200 \frac{mW}{cm^2}$ und einer Bestrahlungszeit von 9 Minuten ($108 \frac{J}{cm^2}$) bei zwei *Candida spp.* sogar eine Reduktion der KBE um bis zu 5 log₁₀-Stufen erreichen ⁷¹. Eine Übersicht über die verschiedenen Bestrahlungsparameter der angegebenen Literaturstellen zeigt Tab. 2. Ein anderer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse in den einzelnen Studien könnte sein, dass verschiedene *C. albicans*-Stämme nicht in gleicher Weise sensitiv für aPDT sind. Walker *et al.* konnten darüber hinaus feststellen, dass *C. albicans* bei Inkubation mit L-3,4-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) Melanin bilden. Das Melanin wird dann in Form von Melanozyten an die Zelloberfläche gebracht ⁷². Dies könnte zu einer Beeinflussung der aPDT führen und so zur schlechteren Wirkung von PS bei *C. albicans* beitragen.

4.1.4. Phototoxizitätsversuche mit Flavin 7

Wie unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigen konnte, besitzt FL7 eine hohe Effektivität gegenüber multiresistenten Bakterien und Sporen^{57, 73}. Um zu untersuchen, ob FL7 ebenso wirksam in der photodynamischen Inaktivierung von *C. albicans* ist, wurde *C. albicans* mit FL7 unterschiedlicher Konzentrationen (Endkonzentrationen: 0 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM) für 15 Minuten inkubiert und anschließend für 10 Minuten mit der BlueV UV802L bei einer Leistungsdichte von $20 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$ bestrahlt (Lichtdosis: $12 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$). Die Ergebnisse sind in Abb. 22 dargestellt. Nach Bestimmung der KBE konnte kein Unterschied in der Überlebensrate zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben festgestellt werden. Die Lichtkontrolle zeigte sich negativ. Eine Dunkeltoxizität, wie sie bei TMPyP in höheren Konzentrationen auftritt, konnte nicht nachgewiesen werden. Da die Inkubationszeit mit 15 Minuten keine Effektivität zeigte, wurde die Inkubationszeit auf 4 Stunden unter Beibehaltung aller anderen Parameter erhöht. Allerdings konnte auch hier keine Inaktivierung von *C. albicans* erreicht werden. Maisch *et al.* zeigten, dass eine Inkubation von MRSA mit 50 μM FL7 zu einer Reduktion der Überlebensrate von über 6 \log_{10} -Stufen bei einer Energiedosis von nur $1 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$ führt⁵⁷. Für eine photodynamische Inaktivierung von 6,7 \log_{10} -Stufen war bei *Pseudomonas aeruginosa* ebenfalls eine Konzentration von 50 μM FL7 notwendig⁵⁷. Da *C. albicans*, wie oben beschrieben, schwerer zu inaktivieren ist als Bakterien, sind die in dieser Arbeit erhaltenen Daten gegebenenfalls besser mit denen für die Inaktivierung von Sporen zu vergleichen⁶⁵. Eine relevante Abtötung von *Bacillus atrophaeus*-Sporen *in vitro* konnte ab einer Konzentration von 4 mM FL7 erreicht werden (4,4 \log_{10} -Stufen). Die Erhöhung der Konzentration auf 8 mM bei gleichzeitiger Fixierung der Sporen auf einer PET-Oberfläche konnte die Effektivität noch steigern und die Überlebensrate um

7 \log_{10} -Stufen senken. Um diese Ergebnisse zu erreichen, waren sehr hohe Bestrahlungsparameter notwendig ($70 \frac{J}{cm^2}$)⁷³.

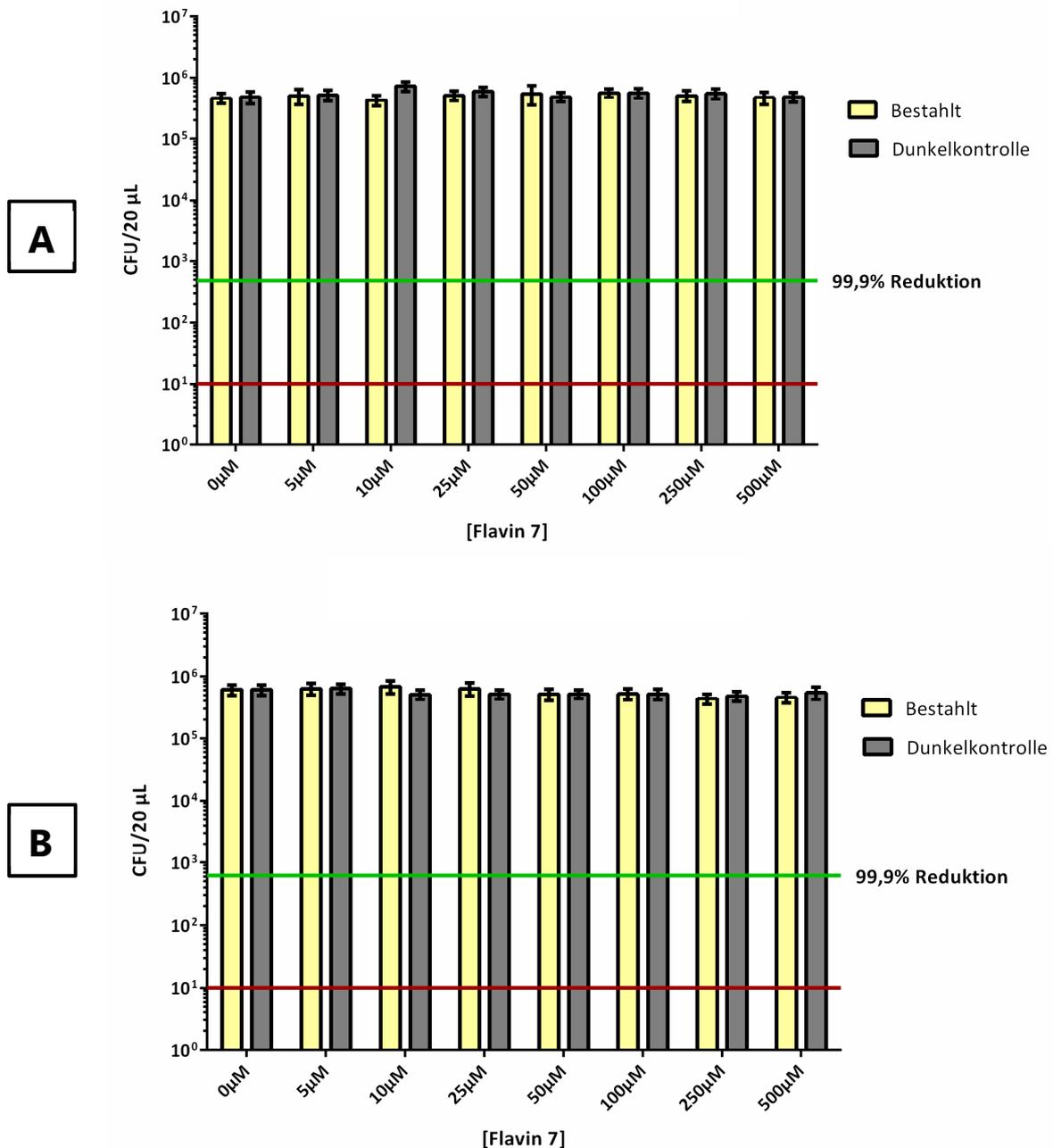


Abb. 22: Phototoxizitätstests mit FL7

C. albicans wurde mit verschiedenen Konzentrationen FL7 für 15 Minuten (A) bzw. 4 Stunden (B) inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei $20 \frac{mW}{cm^2}$ bestrahlt. Die Proben wurden nach der modifizierten Methode von MILES, MISRA & IRWIN ausplattiert und die KBE 24 Stunden später nach Inkubation im Brutschrank bestimmt. In keinem der Versuchsansätze konnte eine Reduktion der KBE erreicht werden. Die Lichtkontrolle war negativ und eine Dunkeltoxizität nicht zu verzeichnen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der erhaltenen KBE/20µL bei einem Konfidenzintervall von 95% (n = 3). Grüne Linie: Reduktion um 99,9% (3 \log_{10} -Stufen). Rote Linie: Detektionslimit bei 10^1 KBE/20µL.

Da die Untersuchungen in dieser Arbeit auch darauf abzielten, geeignete Bedingungen für die Lokalisation von PS mittels Mikroskopie zu finden, wurden die Konzentrationen in einem niedrigeren Bereich gewählt. PS-Konzentrationen von über 1 mM führen bei der Fluoreszenzmikroskopie zu einer deutlichen Überbelichtung, die die Detektion einer Lokalisation des PS unmöglich macht. Da dies das Ziel dieser Dissertation ist, wurde FL7 im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt.

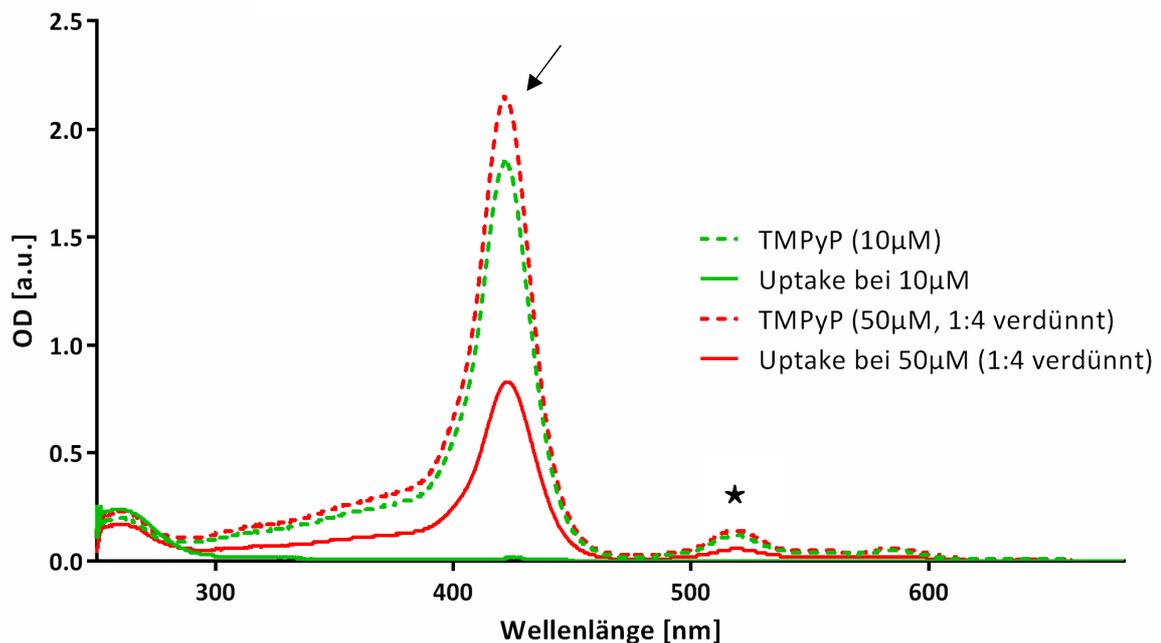
4.2. Uptakeversuche

Wie von Bakterien bekannt, setzt die photodynamische Wirksamkeit eines PS eine mehr oder weniger starke Bindung an die Zielzellen voraus. Dabei kann die Aufnahme durch Diffusion, durch aktiven Transport der Zellen oder durch Bindung des PS an die Zelloberfläche erfolgen⁷⁴⁻⁷⁶. Auch für die Darstellung einer Lokalisation des PS innerhalb der Pilzzellen ist eine Aufnahme des PS durch *C. albicans* essentiell. Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit untersucht, in welchem Maße die einzelnen PS von *C. albicans* aufgenommen werden.

4.2.1. Uptakeversuche mit TMPyP

Die Uptakeversuche mit TMPyP wurden mit den Konzentrationen 10 μ M und 50 μ M durchgeführt. Die Proben mit der Konzentration 50 μ M wurden dabei 1:4 verdünnt, um die Messung mit Acrylküvetten der Abmessungen 10 x 4 x 45 mm durchführen zu können. Die Inkubationszeit der Proben betrug 15 Minuten. Abb. 23 zeigt, dass aufgrund der unterschiedlichen OD vor und nach Inkubation von *C. albicans* mit PS sich PS angelagert hat bzw. dieser von *C. albicans* aufgenommen worden ist. Bei einer Konzentration von 10 μ M lässt der Unterschied in den OD-Werten zwischen der durchgezogenen und der gestrichelten Linie in Abb. 23 darauf schließen, dass praktisch die gesamte Menge an PS aufgenommen wurde. Auch bei den Proben mit der Konzentration 50 μ M findet man geringere OD-Werte für die mit *C. albicans* inkubierte Probe als bei der

Referenz aus reinem PS. Dies spricht dafür, dass die *Candida*-Zellen qualitativ eine Menge an TMPyP aufgenommen haben. Während des Experiments konnte dies auch an der intensiven Färbung des *C. albicans*-Pellets nach der Zentrifugation beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Resultaten der Phototoxizitätsversuche. Die Vermutung liegt nahe, dass die photodynamische Wirkung von TMPyP gegenüber *C. albicans* auch deshalb gegeben ist, weil der PS durch die Zellen aufgenommen wird. Die erhaltenen Resultate korrelieren mit den Untersuchungen von Quiroga *et al.*, die eine hohe Affinität von TMPyP gegenüber *C. albicans* feststellten. Die Aufnahme des Porphyrins lag dabei bei 1,7 nmol pro 10^6 Zellen, wenn nicht gewaschen wurde. Waschvorgänge mit PBS zeigten eine geringere Menge an zellgebundenem TMPyP. Diese war bei hohen Inkubationszeiten (30 Minuten) höher als bei niedrigen (15 Minuten). Dies ist ein Hinweis dafür, dass es sich bei langen Inkubationszeiten um eine stärkere Bindung des PS an die Zellen handelt⁶³. Ähnliche Ergebnisse zeigt auch eine Studie von Cormick *et al.* Die Autoren untersuchten dabei zusätzlich das Porphyrinderivat TMAP. Auch hier bestätigte sich die hohe Affinität von Porphyrinen gegenüber *C. albicans*⁷⁷. Oriol *et al.* konnten nachweisen, dass bei einer einstündigen Inkubation von *C. albicans* mit TMPyP der Konzentration 3,5 μM die Fluoreszenzintensität der inkubierten Probe um 64% gegenüber der Referenzprobe abnimmt. Die Aufnahme von TMPyP durch die Pilzzellen wurde in dieser Studie mit 70% angegeben⁷⁵. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen können nicht zwischen intrazellulärer Aufnahme und oberflächlicher Anlagerung unterscheiden. Um eine eindeutige Aussage hierüber zu treffen, müsste in einem Folgeversuch das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet mit einem organischen Lösungsmittel behandelt werden. Der durch die Lyse der Zellen freiwerdende PS kann wiederum spektrometrisch gemessen werden und ist dann ein Maß für die intrazellulär aufgenommene Menge an PS. Diese Methode wurde auch in der Publikation von Oriol *et al.* verwendet⁷⁵. Die aufgeführten Studien führen unter Berücksichtigung der Resultate dieser Arbeit zu dem Schluss, dass sich TMPyP aufgrund seiner Aufnahme durch *C. albicans* für die Untersuchung mit der Fluoreszenzmikroskopie eignet.

**Abb. 23: Uptakeversuche mit TMPyP**

C. albicans wurde mit 10 μM bzw. 50 μM TMPyP für 15 Minuten inkubiert und dann gegen eine Referenz gemessen. Es zeigt sich, dass es zu einer Aufnahme des PS durch *C. albicans* kommt. Das TMPyP-Spektrum weist mit der Soret-Bande (\rightarrow) und den Q-Banden (\star) mehrere Absorptionsmaxima auf.

4.2.2. Uptakeversuche mit Methylenblau

Bei den Uptakeversuchen mit MB wurden die Konzentrationen 50 μM , 100 μM und 250 μM bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden untersucht. Die Messung erfolgte mit Glasküvetten der Abmessungen 10 x 2 x 45 mm, weshalb im Vergleich zu TMPyP keine Verdünnung notwendig war. Die graphische Auswertung der erhaltenen Messwerte in Abb. 24 zeigt, dass es zwar einen erkennbaren Unterschied zwischen den inkubierten Proben und dem jeweiligen Referenzphotosensibilisator hinsichtlich ihrer OD gibt, dieser Unterschied jedoch nicht so stark ausgeprägt ist wie bei TMPyP. Dies bedeutet gleichzeitig, dass MB zwar von *C. albicans* aufgenommen wird, jedoch in geringerem Maße als Porphyrine, was im Vergleich auf eine geringere Affinität von MB gegenüber *C. albicans* schließen lässt. Die Ergebnisse der Uptakeuntersuchungen korrelieren daher auch mit den erhaltenen Resultaten der Phototoxizitätsversuche. Die Menge an MB,

die von *C. albicans* gebunden wird, ist offensichtlich zu gering, um eine photodynamische Wirkung, d.h. eine Reduktion von über 3 \log_{10} -Stufen, zu erzielen. Prates *et al.* konnten zeigen, dass die intrazelluläre Aufnahme von MB durch *C. albicans* wesentlich vom Vorhandensein von Multidrug-Efflux-Systemen (MESs) als Bestandteil des ABC-Systems (ATP-binding cassette) beeinflusst wird. Amphipathische, kationische PS stellen für diese Systeme ein natürliches Substrat dar. Eine Überexpression der oben genannten Systeme führte deshalb zu einer signifikant geringeren Aufnahme von MB in die *C. albicans*-Zellen⁷⁸. Dies könnte auch in dieser Arbeit der Grund für die geringere Inaktivierung von *C. albicans* durch MB im Vergleich zu TMPyP sein.

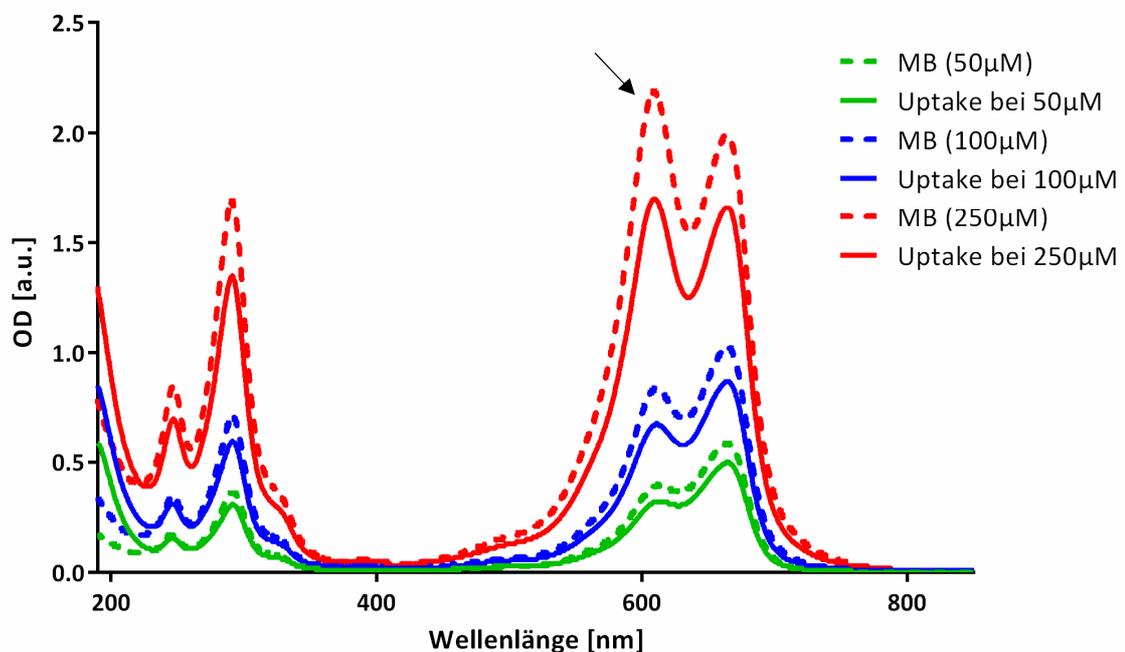
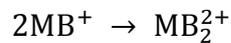


Abb. 24: Uptakeversuche mit MB

Untersucht wurden die Konzentrationen 50 μM , 100 μM und 250 μM bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden. Es zeigt sich eine geringere Aufnahme von MB durch die *C. albicans*-Zellen als bei TMPyP. Mit steigender Konzentration dimerisiert der PS bei einer Wellenlänge von 610 nm (D-Bande \rightarrow).

Bei näherer Betrachtung der Spektrometerdaten von MB fällt ein relatives Absorptionsmaximum bei 610 nm (D-Bande) auf, das mit steigender Konzentration an optischer Dichte zunimmt. Diese Bande ist auf eine Dimerisierung von MB zurückzuführen, die

bei höheren Konzentrationen auftritt. Innerhalb der D-Bande liegt MB vorwiegend in seiner dimeren Form MB_2^{2+} vor. Das Monomer MB^+ und sein Dimer MB_2^{2+} stehen dabei im Zusammenhang:



Die M-Bande bei 664 nm tritt v.a. bei wässrigen bzw. alkoholischen Lösungen von MB auf. Hier liegt MB überwiegend in der monomeren Form vor⁷⁹. Usacheva *et al.* zeigten, dass die Dimerisierung von MB Einfluss auf die photodynamische Wirksamkeit des PS gegenüber Bakterien hat. Die Überlebensraten sanken dabei bei steigenden Konzentrationen und damit zunehmender Dimerisierung des PS. Auch die Anwesenheit der Bakterien selbst scheint einen Einfluss auf die Dimerisierung von MB zu haben⁸⁰.

4.2.3. Uptakeversuche mit Toluidinblau O

Bei den Uptakeversuchen mit TBO wurden die Konzentrationen 50 μM , 100 μM und 250 μM bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden untersucht. Die Konzentrationen 100 μM und 250 μM wurden 1:4 verdünnt, um Transmissionswerte zu messen, die zwischen 0% und 100% liegen. Wie schon bei MB beobachtet, zeigte sich auch bei TBO eine geringere Aufnahme durch *C. albicans* als bei TMPyP. Wie in Abb. 25 dargestellt, wurde der PS zwar von den Zellen gebunden, jedoch offensichtlich in zu geringem Maße, als dass ein photodynamischer Effekt ($\geq 3 \log_{10}$ -Stufen) detektierbar wäre. Der Uptake von TBO ist in etwa mit demjenigen von MB vergleichbar. Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von Demidova *et al.*, die ebenfalls Uptakeuntersuchungen mit *C. albicans* durchführten. Auch hier war eine geringere Aufnahme von TBO verglichen mit anderen PS festgestellt worden⁶⁵. Da die chemische Struktur von TBO ähnlich der von MB ist, könnte auch TBO ein natürliches Substrat von MESS sein. Wie in der Studie von Tegos *et al.* für Bakterien beschrieben, könnten somit diese Efflux-Systeme auch bei TBO der Grund für den geringen Uptake sein⁸¹.

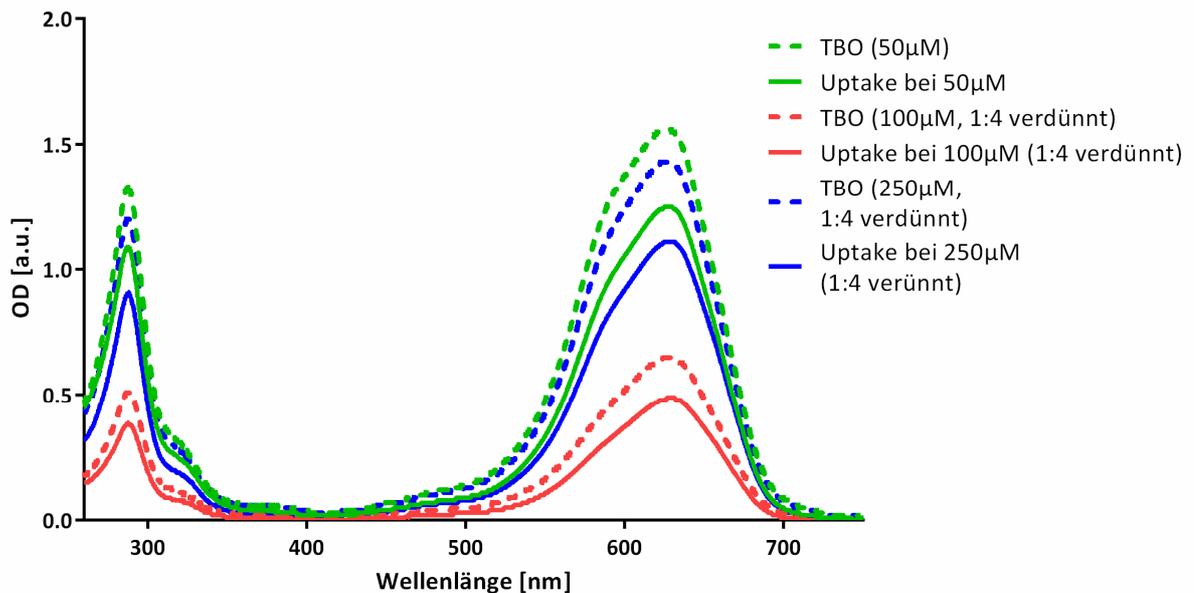


Abb. 25: Uptakeversuche mit TBO

Untersucht wurden die Konzentrationen 50 μM , 100 μM und 250 μM bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden. Es zeigt sich eine ähnliche Aufnahme von TBO durch die *C. albicans*-Zellen wie bei MB.

4.2.4. Uptakeversuche mit Flavin 7

Bei den Uptakeversuchen mit FL7 wurden die Konzentrationen 50 μM , 100 μM und 250 μM bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten bzw. 4 Stunden untersucht. Die Konzentration 250 μM wurde 1:4 verdünnt, um für die Messung Acrylküvetten der Abmessungen 10 x 4 x 45 mm verwenden zu können. Anders als bei den oben beschriebenen Uptakeversuchen mit TMPyP, MB und TBO konnte bei FL7 unabhängig von der Inkubationszeit keine Aufnahme durch *C. albicans* festgestellt werden. Die graphische Darstellung der Messwerte der inkubierten Probe und der jeweils zugehörigen Referenzprobe sind nahezu deckungsgleich. Diese Ergebnisse passen zu den Resultaten der Phototoxizitätsversuche, die bei keiner der beiden Inkubationszeiten eine Inaktivierung von *C. albicans* zeigten.

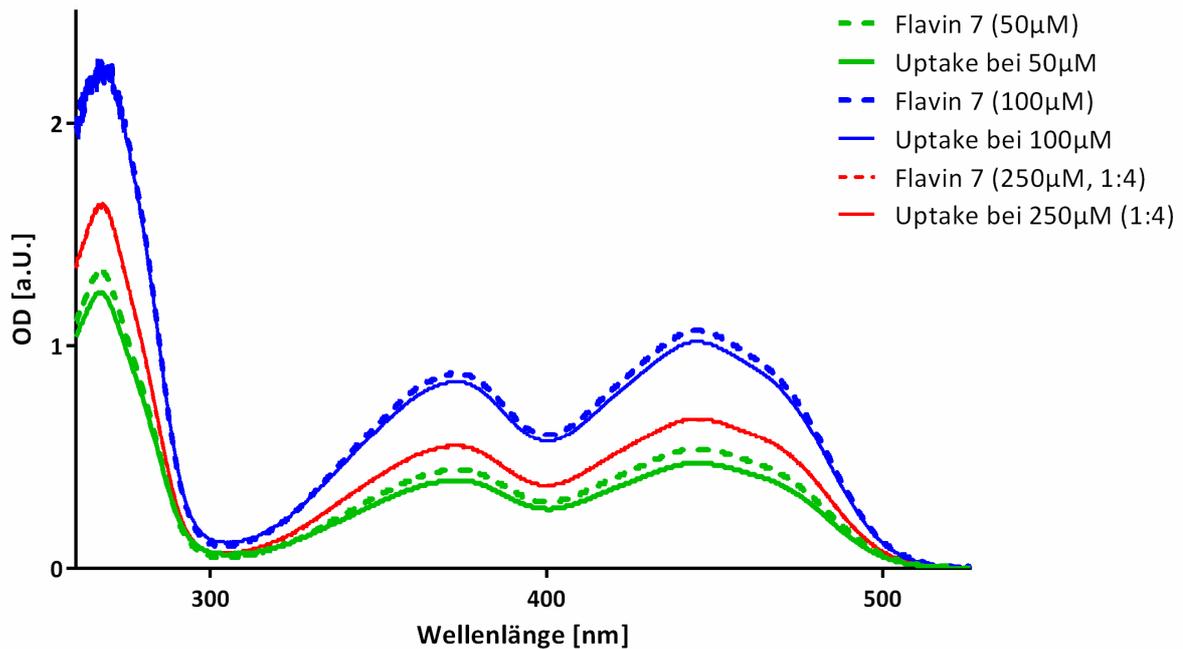


Abb. 26: Uptakeversuche mit FL7

Untersucht wurden die Konzentrationen 50 μM , 100 μM und 250 μM bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden. Es zeigte sich, dass der PS von *C. albicans* kaum aufgenommen wird. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Phototoxizitätsversuche.

4.3. Vergleich der Absorptionsquerschnitte der PS

Wie oben beschrieben, wurden die PS TMPyP und FL7 mit der Lampe BlueV UV802L bestrahlt. Für die Belichtung der mit MB und TBO inkubierten Proben wurde die PDT 1200L verwendet. Die verwendeten PS unterscheiden sich dabei in ihrem Absorptionsquerschnitt. Der Absorptionsquerschnitt σ_A gibt die Wahrscheinlichkeit einer Teilchen-Teilchen-Interaktion zwischen Photon und PS an. Im Vergleich besitzt TMPyP als Vertreter der Porphyrine sehr hohe σ_A -Werte, während die Absorptionsquerschnitte für MB, TBO und FL7 sehr viel geringer sind. Dies ist möglicherweise ein weiterer Grund für die stärkere photodynamische Inaktivierung von *C. albicans* durch TMPyP. Eine Darstellung der unterschiedlichen Absorptionsquerschnitte zeigt Abb. 27.

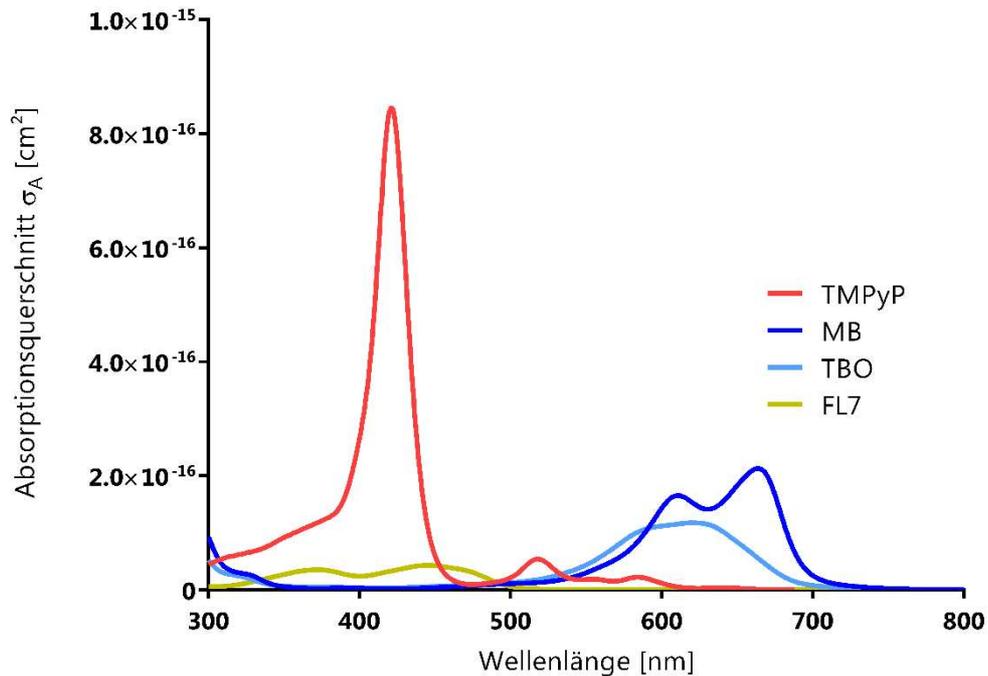


Abb. 27: Absorptionsquerschnitte σ_A der verwendeten PS bei 100 μM

Im Vergleich zu den anderen PS zeigt TMPyP einen sehr hohen Absorptionsquerschnitt. Dies kann möglicherweise auch ein Grund für die bessere Inaktivierung von *C. albicans* durch TMPyP sein.

Auch die Emissionsspektren der Lampen unterscheiden sich hinsichtlich der Absorptionsmaxima der verwendeten PS. Wie in Abb. 28 gezeigt, passen das Emissionsspektrum der BlueV UV 802L und die Soret-Bande des TMPyP-Spektrums gut zueinander. FL7 dagegen weist eine geringere Überlagerung mit dem BlueV-UV-802L-Spektrum auf. Bei MB und TBO wird nur ein Teil der von der PDT 1200L emittierten Photonen für die Anregung der PS genutzt. Dies ist daran erkennbar, dass die Lampe Photonen bis zu einer Wellenlänge von 760 nm emittiert, während die D-Bande von MB bei 610 nm liegt. Laser, wie sie in den Studien von Pupo *et al.* oder de Souza *et al.* verwendet wurden, treffen die Absorptionsmaxima von MB bzw. TBO möglicherweise besser und führen somit zu einer stärkeren Inaktivierung von *C. albicans* als in der vorliegenden Arbeit^{67, 68}.

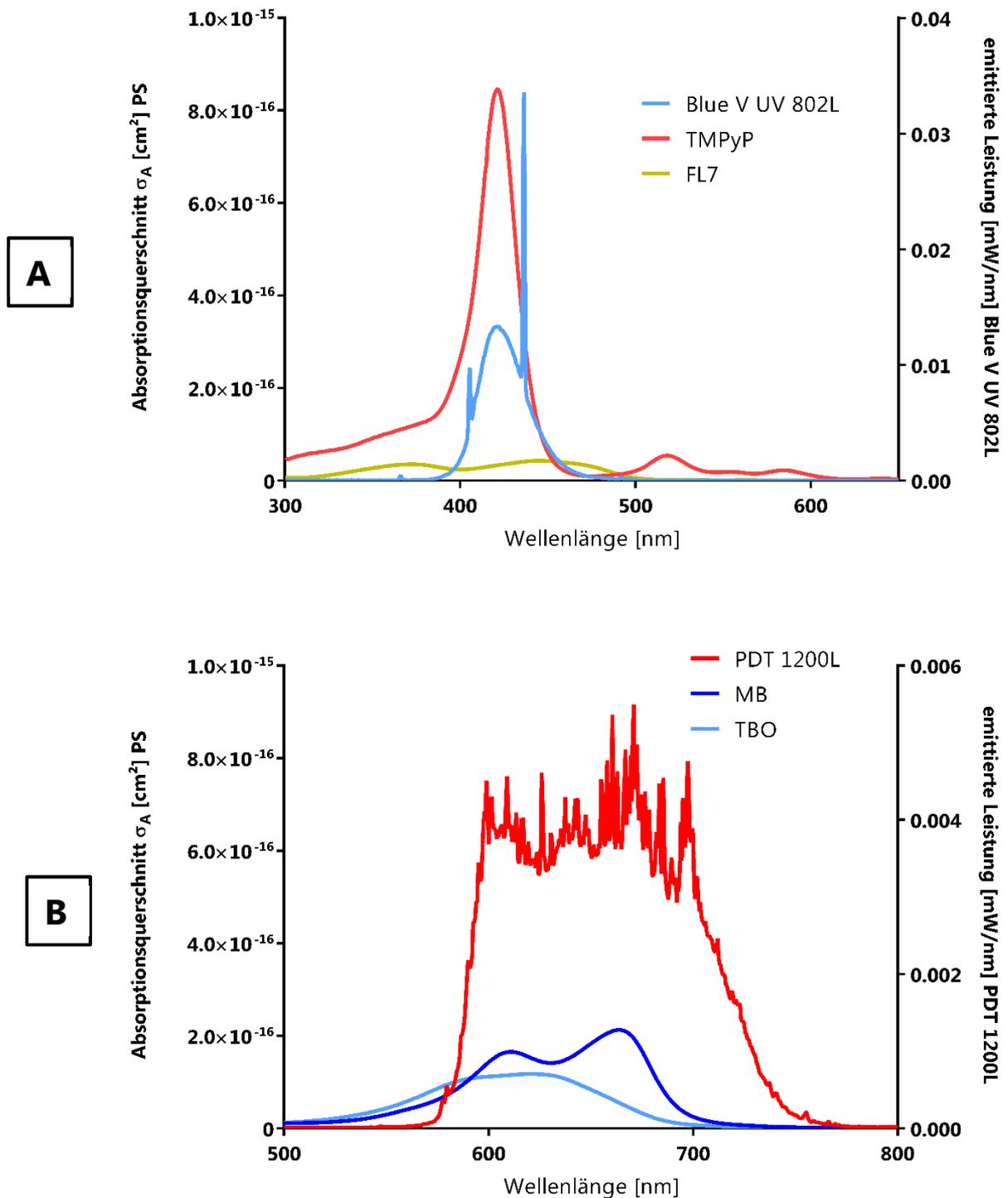


Abb. 28: Vergleich der PS-Spektren (jeweils 100 μM) mit den Spektren der verwendeten Lampen
 A zeigt die Absorptionsspektren von TMPyP (rot) und Flavin 7 (gelb) im Vergleich zum Emissionsspektrum der BlueV UV802L (blau). Die Soret-Bande von TMPyP stimmt dabei gut mit dem Emissionsspektrum der BlueV UV 802L überein. Bei MB und TBO ist nur ein Teil der von der PDT 1200L emittierten Photonen zur Anregung der PS fähig (B).

4.4. Zusammenfassung der Phototoxizitäts- und Uptake-Versuche

Die aPDT stellt eine vielversprechende Alternative zu konventionellen antimikrobiellen Substanzen dar. Die Referenzphotosensibilisatoren TMPyP, MB, TBO und FL7 sollten dabei hinsichtlich ihrer Effektivität gegenüber *C. albicans* untersucht werden. Mit MB, TBO und FL7 konnte keine ausreichende Inaktivierung von über 3 log₁₀-Stufen (Reduktion um 99.9%) erzielt werden. Die Phototoxizitätstests zeigten keine Verringerung in der Überlebensrate der Zellen. Auch die Uptakeversuche führten zu der Erkenntnis, dass im Falle von MB und TBO der PS zwar aufgenommen wird, diese Menge aber offensichtlich nicht ausreicht, um eine relevante Abtötung der Keime zu erzielen. Im Falle von FL7 konnte kein Unterschied in den OD-Werten von Probe und Referenz festgestellt werden. Dies bedeutet, dass der PS von *C. albicans* nicht aufgenommen wurde. TMPyP als Vertreter der Porphyrine dagegen zeigte eine antimikrobielle Wirkung mit einer Logstufen-Reduktion von über 3 log₁₀-Stufen. Die Aufnahme des PS erfolgte ebenfalls in hohem Maße, wie die Uptakeversuche zeigten. Da das Ziel dieser Arbeit darin liegt, die Lokalisation des PS innerhalb der lebenden Zelle vor und nach Lichtbehandlung zu untersuchen, eignet sich für die Mikroskopie nur TMPyP. Dies hat folgende Gründe:

- a) TMPyP wird von den Zellen in hoher Menge aufgenommen, sodass eine ausreichende Intensität des PS während der Mikroskopie angenommen werden kann.
- b) Mit TMPyP kann eine Inaktivierung der Zellen bereits bei relativ geringen Konzentrationen erreicht werden. Dies ist deshalb besonders wichtig, weil bei hohen PS-Konzentrationen häufig eine Überbelichtung der Mikroskopiebilder erfolgt.

Photosensibilisator	Lampe	Bestrahlungsparameter	Inkubationszeit	Max. Log-Reduktion	Uptake
TMPyP	BlueV UV802L	$P = 20 \frac{mW}{cm^2}$ $E = 12 \frac{J}{cm^2}$ $t = 600s$	15 min	4,5	> 30%
MB	PDT 1200L	$P = 50 \frac{mW}{cm^2}$ $E = 30 \frac{J}{cm^2} \left(180 \frac{J}{cm^2} \right)$ $t = 600s (3.600s)$	4 h	< 3 log ₁₀	< 30%
TBO	PDT 1200L	$P = 50 \frac{mW}{cm^2}$ $E = 180 \frac{J}{cm^2}$ $t = 3.600s$	4 h	< 3 log ₁₀	< 30%
FL7	BlueV UV 802L	$P = 20 \frac{mW}{cm^2}$ $E = 12 \frac{J}{cm^2}$ $t = 600s$	15 min 4 h	< 3 log ₁₀	< 30%

Tab. 3: Übersicht über die verschiedenen PS und die erhaltenen Ergebnisse der Phototoxizitäts- und Uptakeversuche

MB, TBO und FL7 erfüllen diese Anforderungen nicht bzw. nicht in gleichem Ausmaß. Die nachfolgenden Untersuchungen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie wurden daher ausschließlich mit dem Referenzphotosensibilisator TMPyP durchgeführt. Eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse aus den Phototoxizitäts- und Uptakeversuchen zeigt Tab. 3.

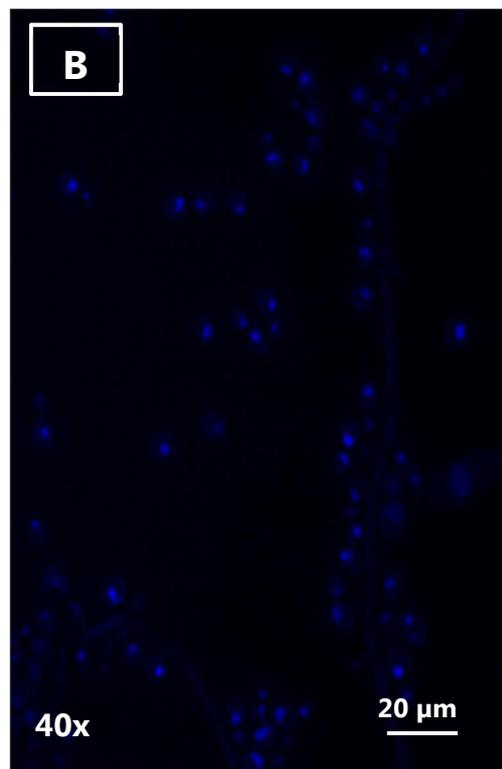
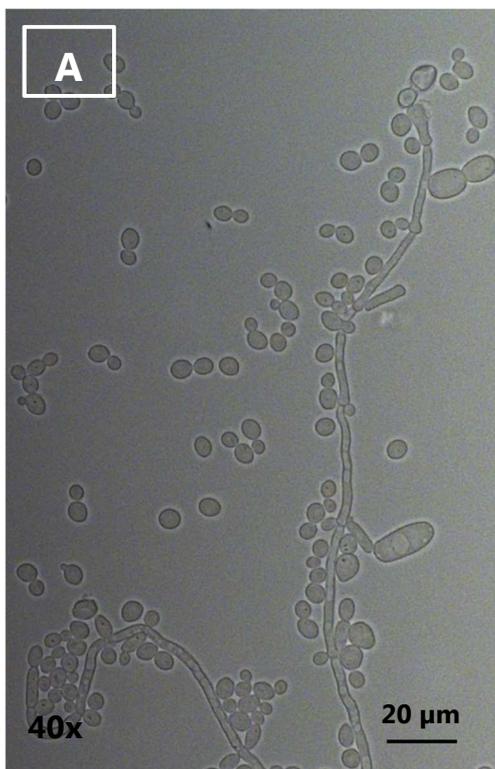
4.5. Kontrollversuche für die Mikroskopie

Für die Mikroskopie von *C. albicans* wurden folgende Kontrollen durchgeführt:

- C. albicans* resuspendiert in mH₂O ohne Zusatz von PS (Nullkontrolle), um die Autofluoreszenz von *C. albicans* darzustellen
- C. albicans* inkubiert mit Hoechst 33342 (5 µM) zur Darstellung der Zellkerne

4.5.1. Nullkontrolle

Bei der Mikroskopie von *C. albicans* ohne Zusatz von PS wurden Bilder im Hellfeld und im Fluoreszenzlicht mithilfe der Filter RedFP, Oregon Green und DAPI angefertigt. Die Ergebnisse sind in Abb. 29 dargestellt. Vor allem im Fluoreszenzfilter DAPI ist eine Eigenfluoreszenz von *C. albicans* sichtbar, wogegen in den beiden anderen Filtern kaum Fluoreszenzsignale detektierbar sind.



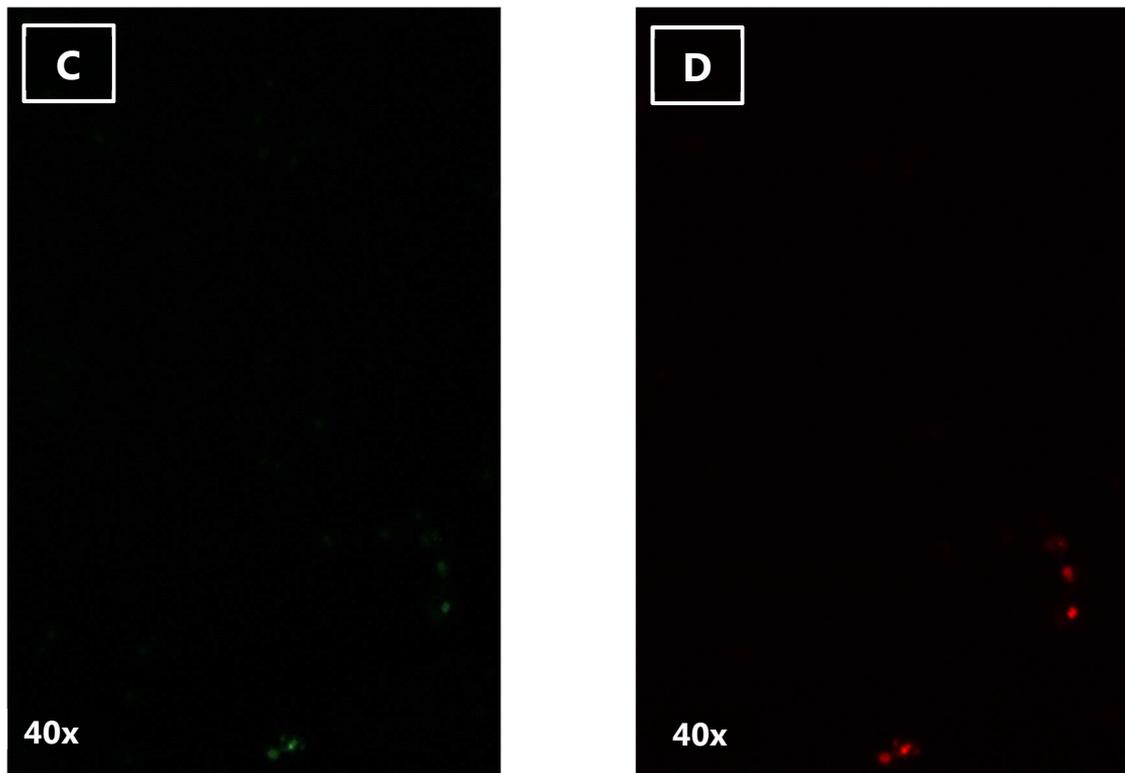


Abb. 29: Mikroskopie von *C. albicans* ohne Zusatz eines PS (Nullkontrolle)

A zeigt *C. albicans* im Hellfeld, die Abbildungen B-D zeigen die Fluoreszenzaufnahmen von *C. albicans* bei Verwendung der Filter DAPI (B), Oregon Green (C) und RedFP (D).

4.5.2. Darstellung der Zellkerne

Um die Zellkerne von *C. albicans* anzufärben, wurde dieser mit Hoechst 33342 angefärbt. Hoechst 33342 bindet an alle Nukleinsäuren, wobei AT-reiche Stränge der dsDNA doppelt so stark zur Fluoreszenz beitragen wie GC-reiche Stränge⁸². Die Ergebnisse sind in Abb. 30 dargestellt.

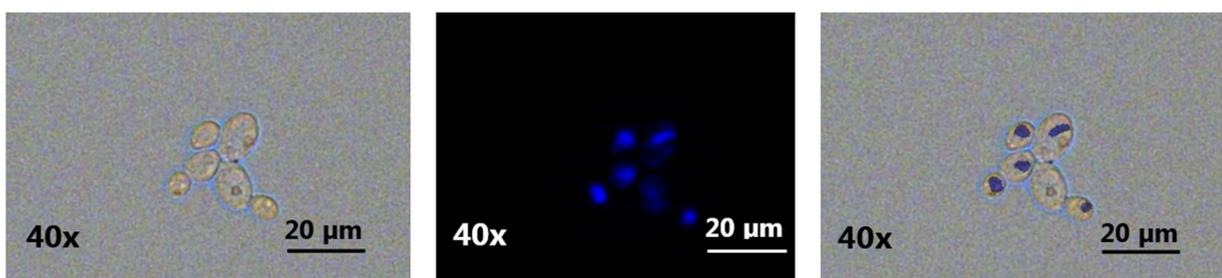


Abb. 30: Mikroskopie von *C. albicans* mit Hoechst 33342

A zeigt *C. albicans* im Hellfeld. In B ist die Situation im Fluoreszenzbild unter Zuhilfenahme des Filters DAPI dargestellt. Die mit Hoechst 33342 angefärbten Zellkerne leuchten intensiv blau. C zeigt die Überlagerung der Bilder A und B.

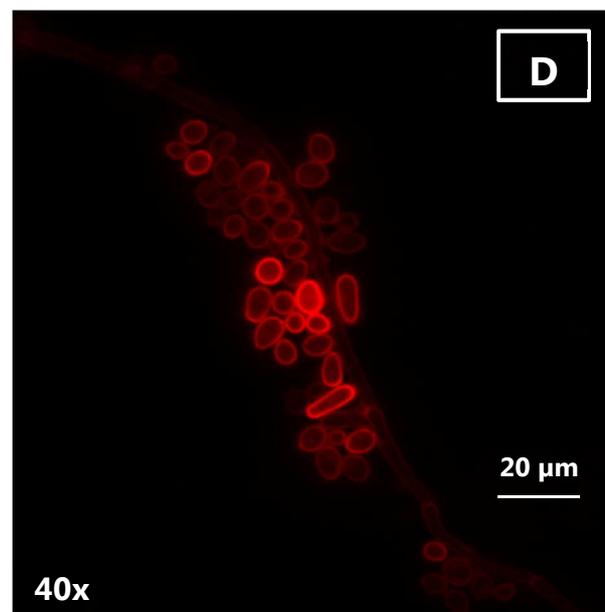
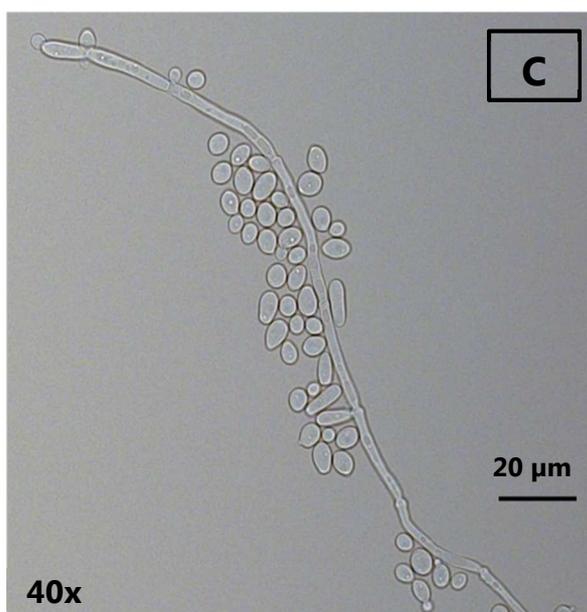
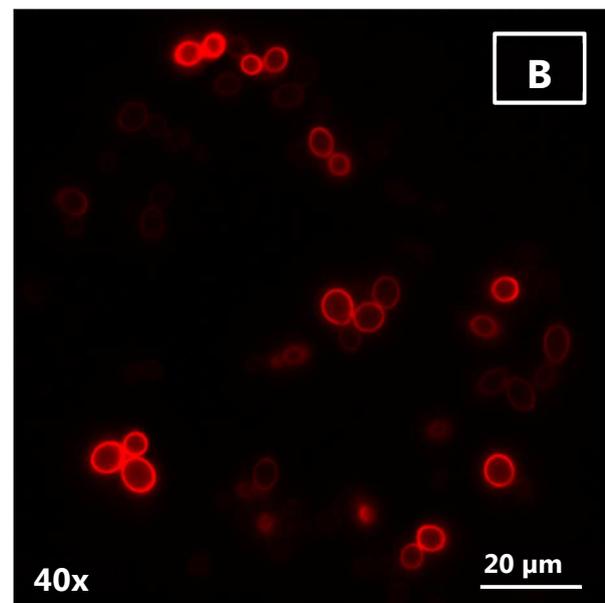
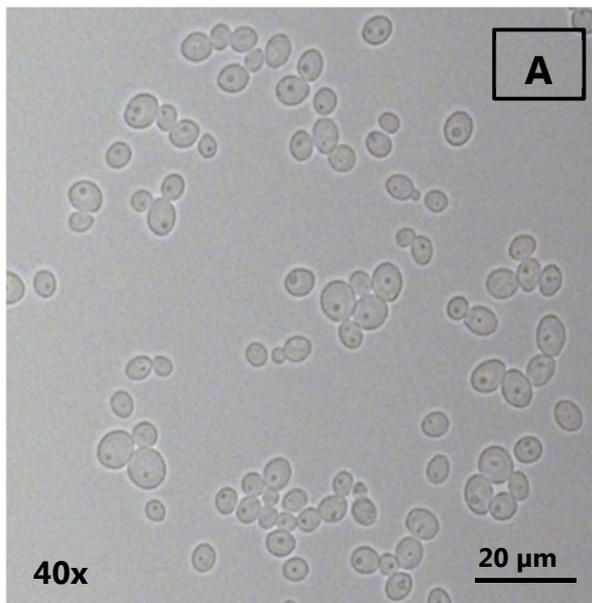
4.6. Lokalisation von TMPyP vor Bestrahlung

Die Ergebnisse aus 4.1 und 4.2 haben gezeigt, dass mit dem vierfach positiv geladenen Porphyrin TMPyP eine Inaktivierung von *C. albicans* möglich ist. Da die verwendeten PS neben der Erzeugung von reaktiven Sauerstoffspezies auch fluoreszieren können, ist eine Untersuchung der PS-Lokalisation mit dem Fluoreszenzmikroskop möglich. Durch die Kenntnis der genauen Lokalisation des PS ist es möglich, eine gezielte Optimierung von PS zu erreichen, mit deren Hilfe eine effektive Inaktivierung von *C. albicans* erzielt werden kann. Auch Rückschlüsse auf den Reaktionsmechanismus der photodynamischen Therapie bei Pilzen lassen sich aus der Detektion der PS-Lokalisation ziehen.

Zunächst war es wichtig, geeignete Versuchsbedingungen zu finden, bei denen sich die Lokalisation von TMPyP im Fluoreszenzlicht darstellen lässt. Die Konzentration des PS muss so gewählt werden, dass während der Mikroskopie eine ausreichende Farbquantenausbeute gegeben ist. Nur so ist es möglich, mit der CCD Kamera des Mikroskops ein repräsentatives Bild zu generieren. Gleichzeitig darf die Konzentration des PS auch nicht zu hoch sein, weil dann die Gefahr einer Überbelichtung des Bildes besteht. Um das Verhältnis zwischen Hyphen und Zellen mehr in Richtung der planktonischen *C. albicans*-Zellen zu lenken, wurde die Übernachtskultur in frische Sabouraud-Lösung überführt und für weitere 5 Stunden in den Brutschrank gestellt.

Um optimale Versuchsparameter für die Fluoreszenzmikroskopie zu erhalten, wurden die Parameter PS-Konzentration und Inkubationszeit variiert. Als geeignet wurde eine Konzentration von 1 μM bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten befunden. Die Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem Zeiss AxioImager Z1 durchgeführt. Die Darstellung erfolgte unter Verwendung des Fluoreszenzfilters „RedFP“ mit einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{ex} = 580 \text{ nm} \pm 20 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{em} = 630 \pm 60 \text{ nm}$ (Abb. 12). Dieser Anregungswellenlängenbereich entspricht den Q-Banden ($\lambda_Q = 518 - 638 \text{ nm}$) des TMPyP-Spektrums (siehe auch Abb. 23)⁸³. Parallel zu

den Fluoreszenzbildern wurden Weißlichtbilder angefertigt. Die erhaltenen Abbildungen zeigen das Vorhandensein von TMPyP in einer ringförmigen Anordnung um die *C. albicans*-Zellen. Es fällt auf, dass nicht alle vorhandenen Pilzzellen Fluoreszenz zeigen. Dies liegt auch daran, dass sich nicht alle Zellen in derselben Ebene befinden. Die Fluoreszenzsignale von Zellen, die über oder unter der abgebildeten Ebene liegen, können nicht detektiert werden.



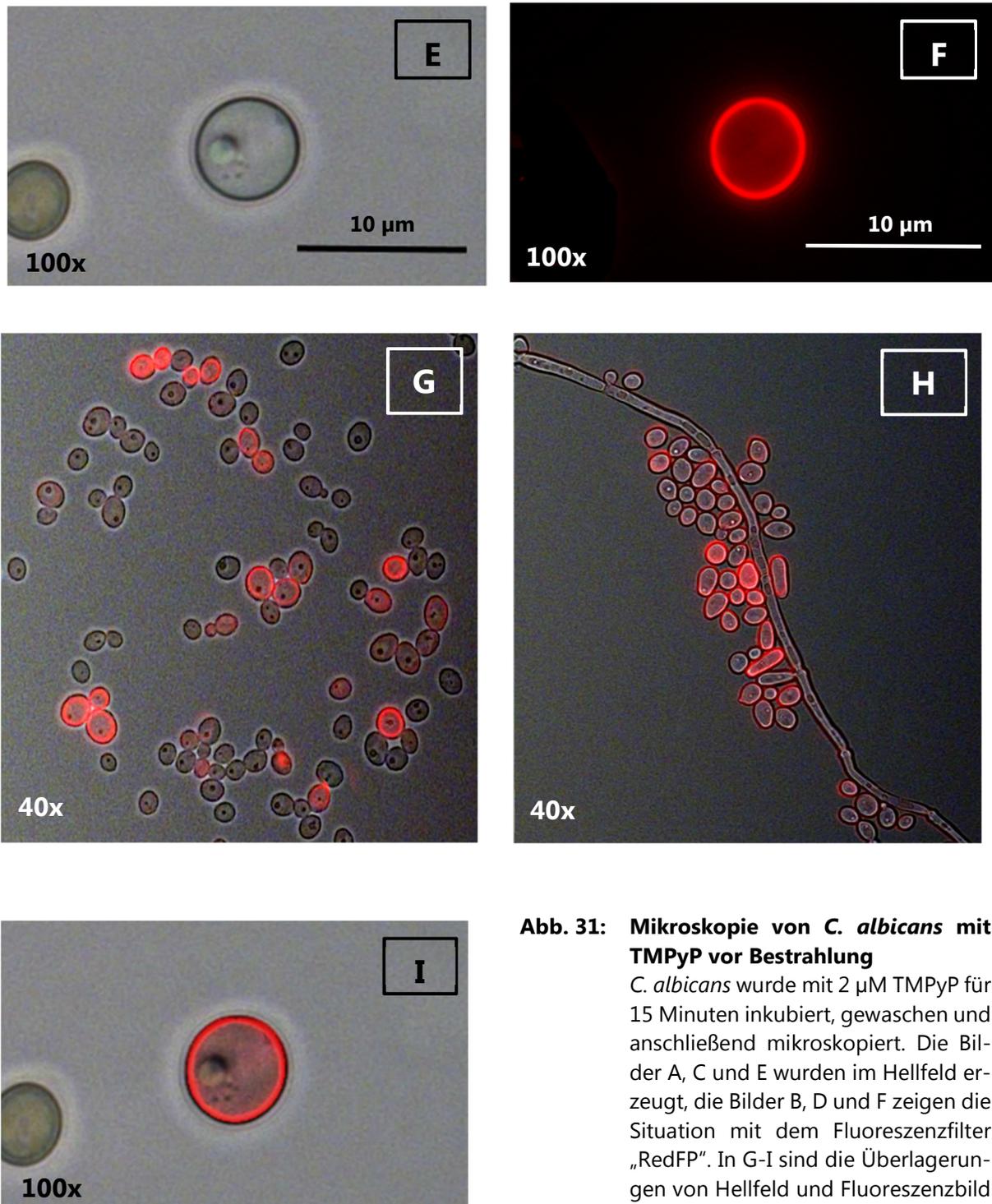


Abb. 31: Mikroskopie von *C. albicans* mit TMPyP vor Bestrahlung

C. albicans wurde mit $2 \mu\text{M}$ TMPyP für 15 Minuten inkubiert, gewaschen und anschließend mikroskopiert. Die Bilder A, C und E wurden im Hellfeld erzeugt, die Bilder B, D und F zeigen die Situation mit dem Fluoreszenzfilter „RedFP“. In G-I sind die Überlagerungen von Hellfeld und Fluoreszenzbild dargestellt. TMPyP lokalisiert im Bereich der Zellmembran.

4.7. Verifizierung der Lokalisation von TMPyP vor Bestrahlung mit WGA

Aufgrund der ringförmigen Lokalisation des PS TMPyP um die *C. albicans*-Zellen liegt die Vermutung nahe, dass es sich um eine Ansammlung des PS innerhalb der Zellwand handelt. Um die Zellwand während der Mikroskopie zu markieren und so diese Vermutung zu bestätigen, wurde WGA verwendet.

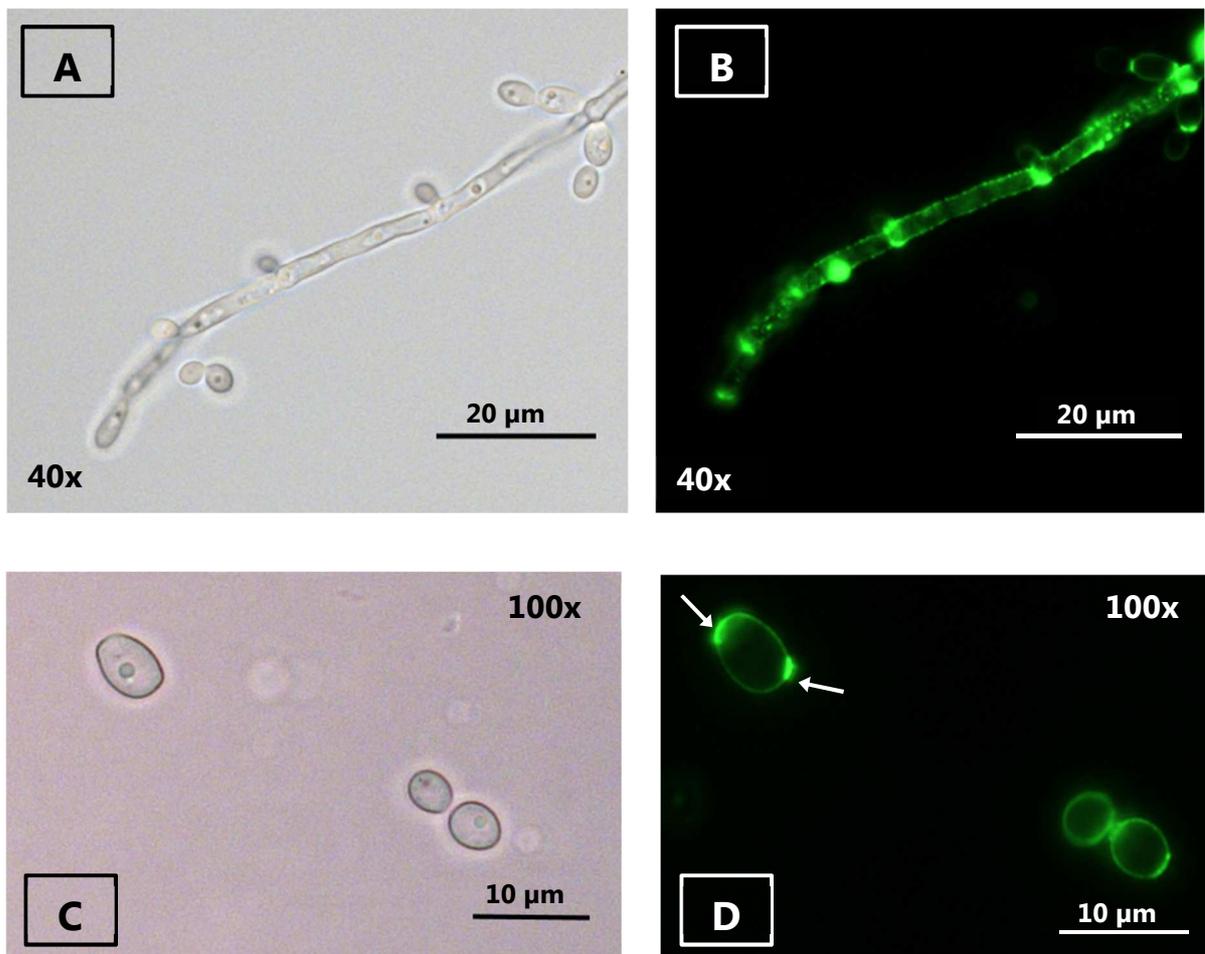


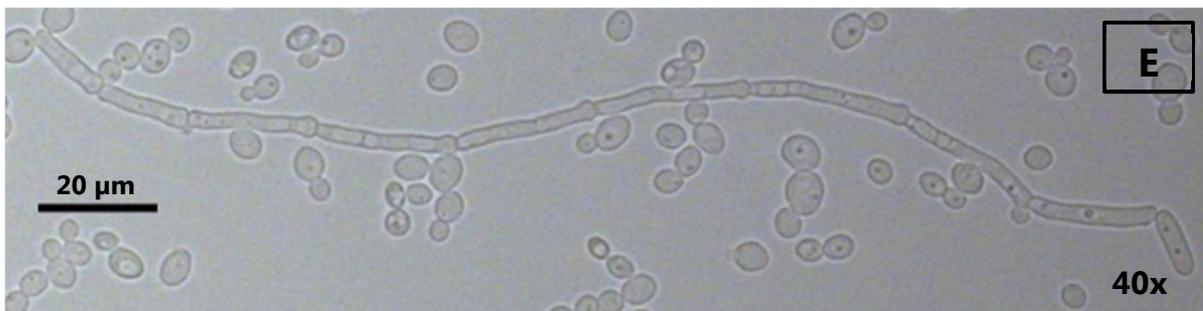
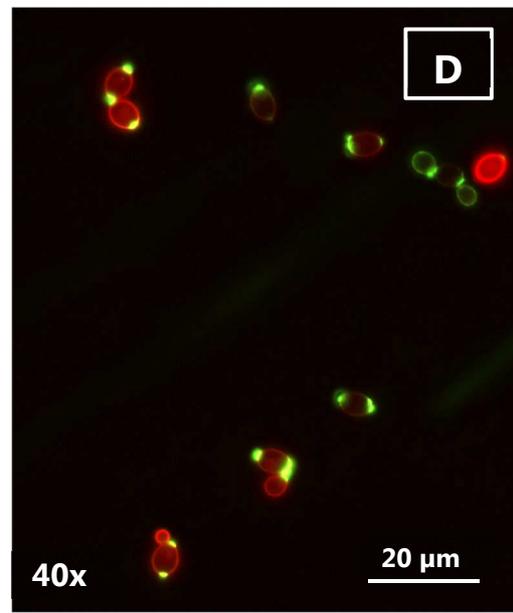
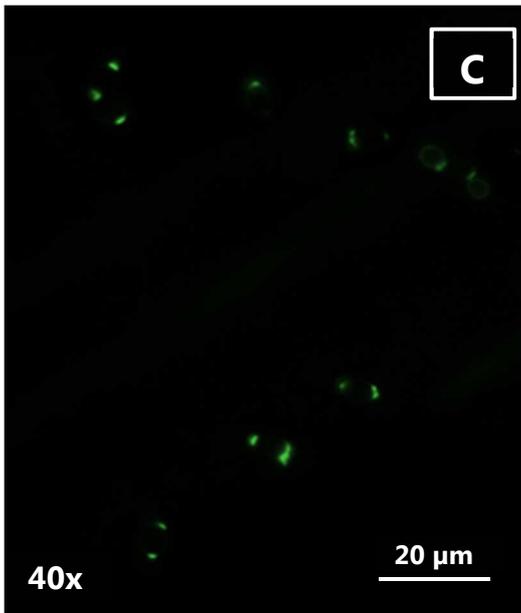
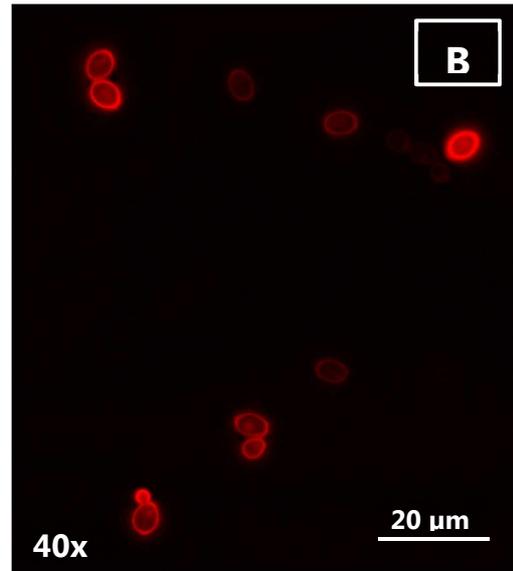
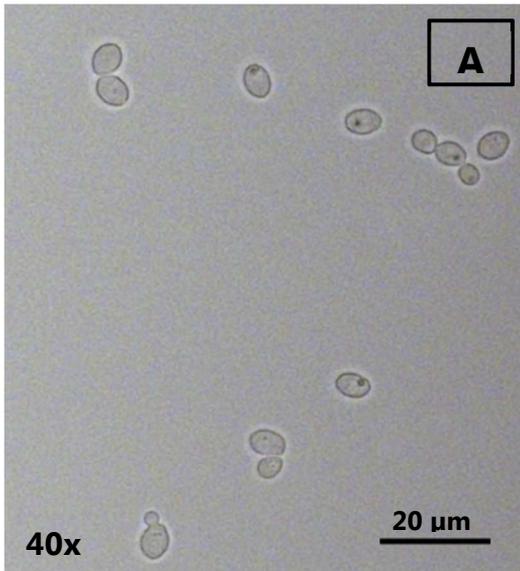
Abb. 32: Mikroskopie von *C. albicans* mit WGA

C. albicans wurde mit WGA für 15 Minuten inkubiert (Endkonzentration $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$), gewaschen und anschließend mikroskopiert. A und C zeigen die Pilzzellen im Hellfeld, B und D dieselbe Situation unter Verwendung des Fluoreszenzfilters „Oregon Green“. Der PS lagert sich entlang der Zellwand an. Im Unterschied zu TMPyP ist diese Anlagerung aber nicht homogen, sondern konzentriert sich in bestimmten Bereichen (→).

WGA bindet spezifisch an N-Acetyl-D-Glucosamin⁸⁴. Dieses Monosaccharid wird von *C. albicans* verwendet, um Chitin zu synthetisieren, einem elementaren Bestandteil der Pilzzellwand (Abb. 3). Durch die Fluoreszenzmikroskopie der mit WGA inkubierten *C. albicans*-Zellen kann die Zellwand dargestellt werden. Die Mikroskopieversuche mit

WGA alleine wurden bei einer Endkonzentration von $100 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ und dem Fluoreszenzfilter „Oregon Green“ durchgeführt. Dieser besitzt eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{ex} = 500 \pm 20 \text{ nm}$ und eine Emissionswellenlänge von $\lambda_{em} = 535 \pm 30 \text{ nm}$. Anders als bei TMPyP ist die Verteilung des WGA nicht homogen über die Zellwand, sondern konzentriert sich in bestimmten Bereichen. Ein Grund hierfür könnte das Vorhandensein von sogenannten „bud scars“ sein. Dies sind „Narbenzüge“, die sich an der Oberfläche von Mutterzellen befinden und als Überreste des Septums gesehen werden, das sich bei der Zellteilung zwischen Mutter- und Tochterzelle ausbildet. „Bud scars“ weisen hohe Mengen an Chitin auf, an die das WGA gebunden ist^{18, 85}. Um eine Überbelichtung der Bilder zu vermeiden, konnten deshalb nur diejenigen Anteile der Zellwand abgebildet werden, die eine hohe Menge WGA enthielten.

Inkubiert man *C. albicans* zunächst mit TMPyP und anschließend mit WGA (Endkonzentration $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$), so lässt sich die Lokalisation der beiden PS simultan im Fluoreszenzmikroskop abbilden. Hierbei ergibt sich allerdings das Problem, dass die Intensität von TMPyP sehr stark abnimmt, sodass die Färbung unter dem Fluoreszenzlicht schwächer erscheint. Dies könnte sich durch eine Konkurrenz der PS um die Bindungsstellen an der Zellwand erklären lassen, bei der sich TMPyP und WGA gegenseitig verdrängen. Für die Bestätigung dieser Annahme sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich. Dennoch lässt sich zeigen, dass WGA und TMPyP am selben Ort zu lokalisieren scheinen.



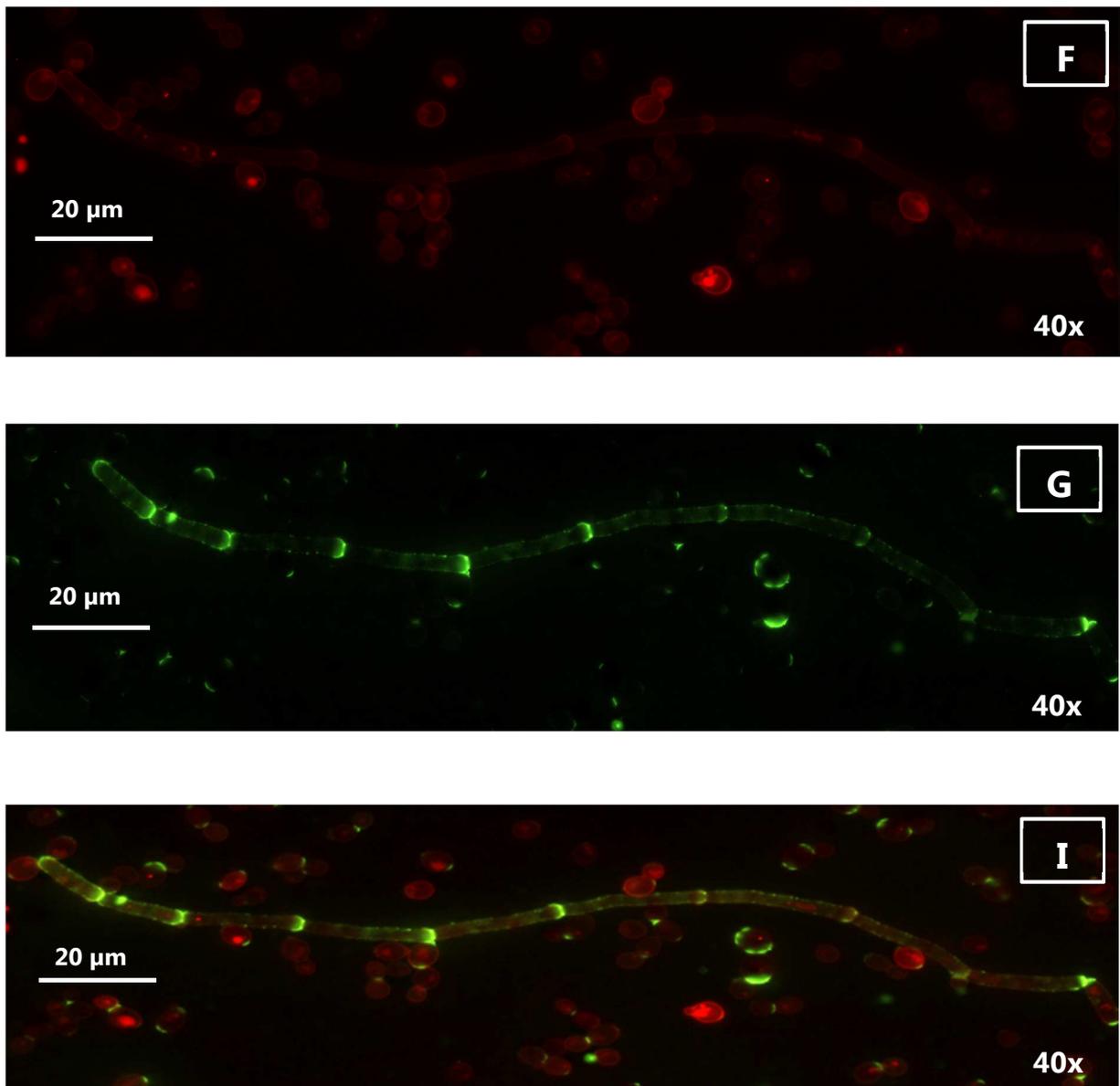


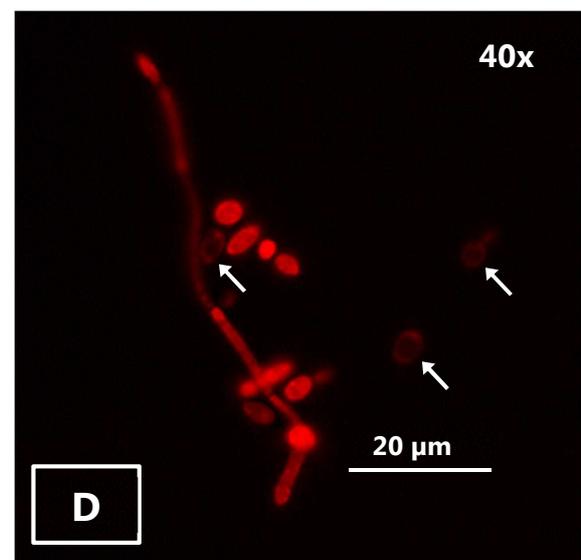
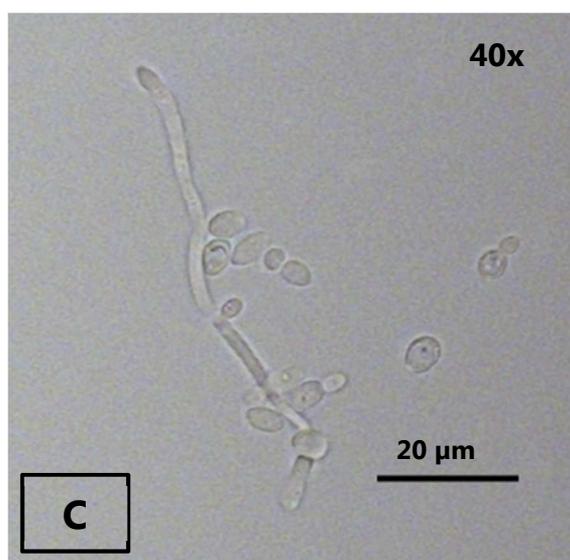
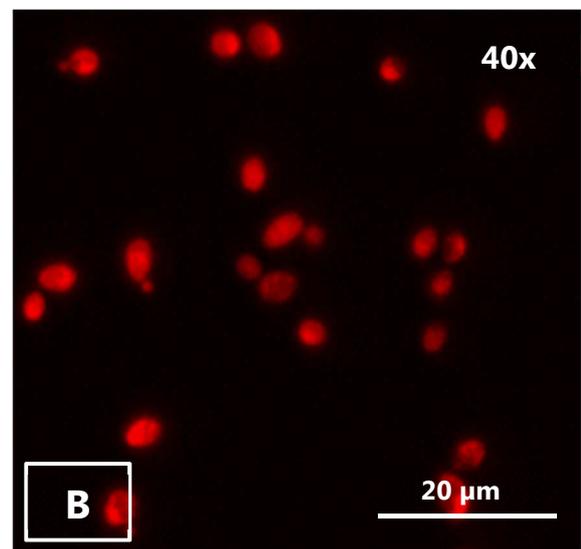
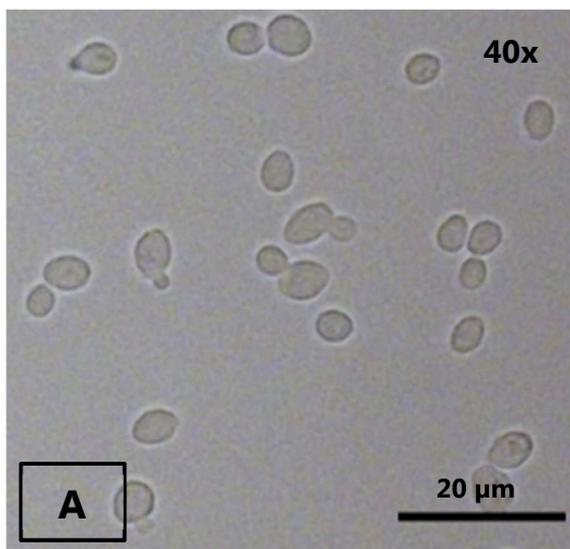
Abb. 33: Mikroskopie von *C. albicans* mit TMPyP und WGA vor Bestrahlung

C. albicans wurde zunächst mit TMPyP und anschließend mit WGA inkubiert, gewaschen und mit den Filtern „RedFP“ und „Oregon Green“ mikroskopiert. A und E zeigen die Pilzzellen im Hellfeld, B und F stellen die rote Fluoreszenz von TMPyP dar (RedFP), in C und G ist die grüne Fluoreszenz von WGA sichtbar (Oregon Green) und D und I zeigen die Überlagerung der Fluoreszenzbilder. Die PS lokalisieren beide im Bereich der Zellwand. Es fällt jedoch auf, dass die Intensität von TMPyP im Vergleich zur alleinigen Inkubation von *C. albicans* mit TMPyP (Abb. 31) deutlich abgenommen hat.

4.8. Lokalisation von TMPyP nach Bestrahlung

Die Lokalisationsuntersuchungen bei *C. albicans* vor Bestrahlung zeigten eine Anreicherung von TMPyP im Bereich der Zellwand. Eine Markierung mit WGA konnte dies

bestätigen. Bestrahlt man die Proben mit einer Energiedosis von $12 \frac{J}{cm^2}$, so konnten vereinzelt weiterhin PS-Ringe um die Zellen beobachtet werden. Der überwiegende Teil der untersuchten *C. albicans*-Zellen zeigte jedoch Fluoreszenzsignale, die über die gesamte Zelle verteilt waren (Abb. 34). Dies ist ein Hinweis dafür, dass TMPyP bei der Bestrahlung von *C. albicans* delokalisiert. Die Zellwand wurde deshalb nachfolgend wiederum mit WGA markiert und die Lokalisation von TMPyP nach Bestrahlung untersucht. Wie in Abb. 35 gezeigt, delokalisiert das Porphyrin, während WGA an der Zellwand gebunden bleibt. APDT scheint also die Zellwand der *C. albicans*-Pilze zu schädigen und so seine fungizide Wirkung zu vermitteln.



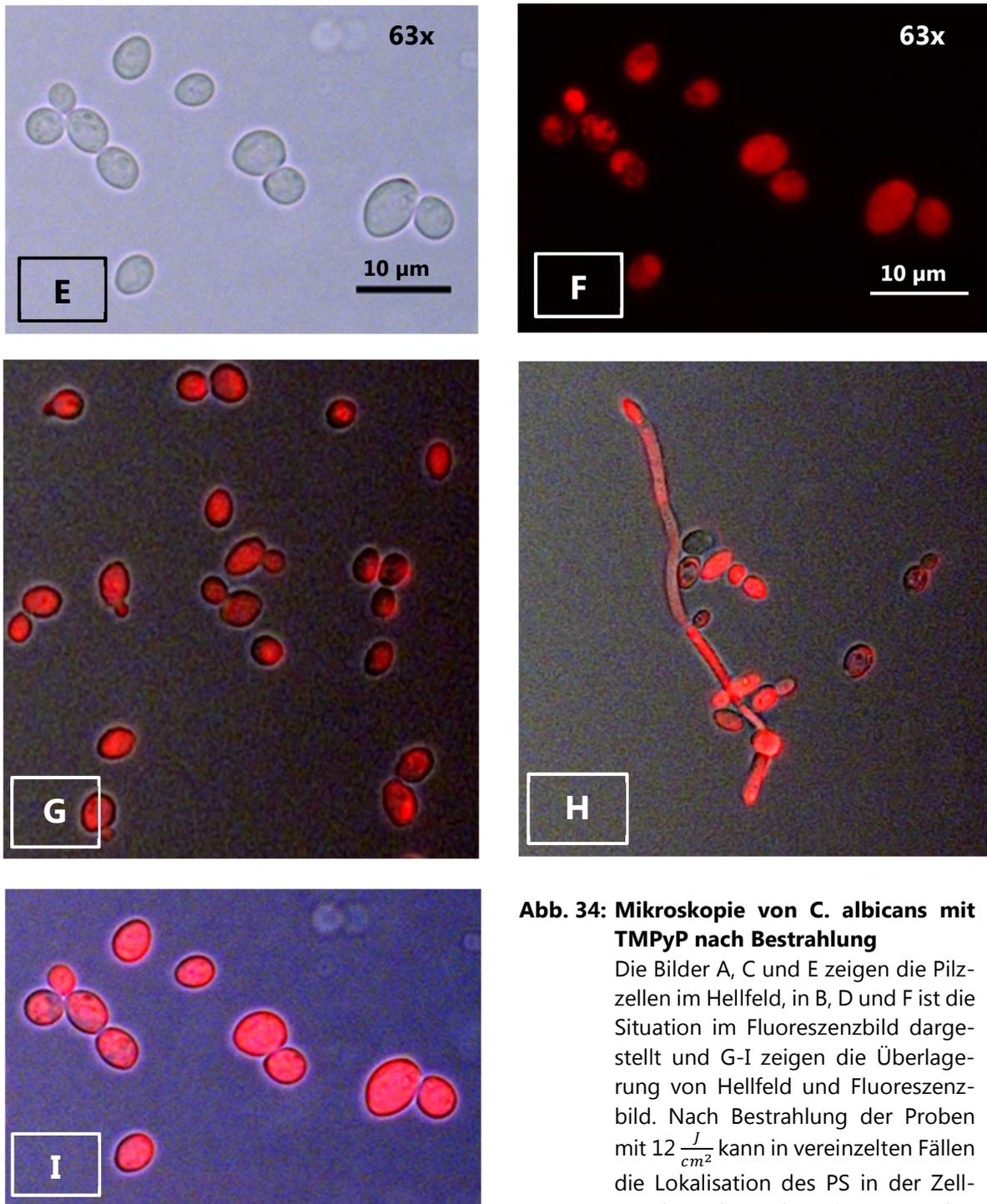


Abb. 34: Mikroskopie von *C. albicans* mit TMPyP nach Bestrahlung

Die Bilder A, C und E zeigen die Pilzzellen im Hellfeld, in B, D und F ist die Situation im Fluoreszenzbild dargestellt und G-I zeigen die Überlagerung von Hellfeld und Fluoreszenzbild. Nach Bestrahlung der Proben mit $12 \frac{J}{cm^2}$ kann in vereinzelt Fällen die Lokalisation des PS in der Zellwand noch nachgewiesen werden (\rightarrow). Der überwiegende Teil der Probe zeigt jedoch rote Fluoreszenz, die über die ganze Zelle verteilt ist. Nach Bestrahlung scheint daher ein deutliches Eindringen von TMPyP ins Zellinnere stattgefunden zu haben.

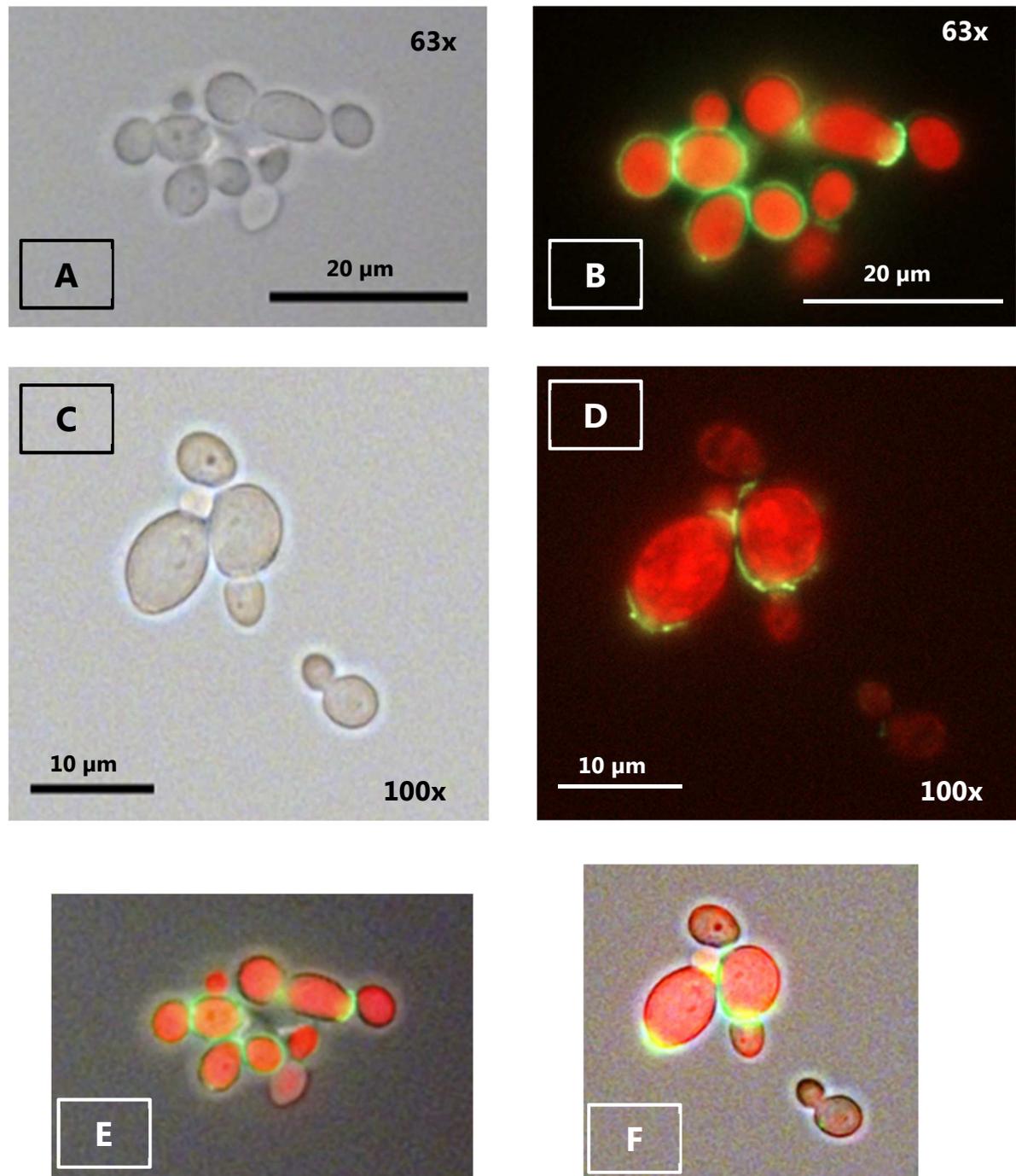


Abb. 35: Mikroskopie von *C. albicans* mit TMPyP und WGA nach Bestrahlung

Es sind Hellfeld (A, C), Fluoreszenzbild (B, D) sowie die Überlagerung beider Bilder (E, F) dargestellt. Bei Inkubation von *C. albicans* mit TMPyP (Endkonzentration $1 \mu\text{M}$) und WGA (Endkonzentration $50 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) zeigt sich ein ähnliches Bild wie in Abb. 34. Die grüne Fluoreszenz zeigt das an N-Acetyl-D-Glucosamin gebundene WGA an. TMPyP (rote Fluoreszenz) ist über die gesamte Zelle verteilt. Dies macht deutlich, dass es nach der Bestrahlung zu einem Eintritt des Porphyrins ins Zellinnere gekommen ist.

4.9. Photobleaching

Im Zuge der Mikroskopieversuche stellte sich heraus, dass die Intensität von TMPyP während der Betrachtung unter der Fluoreszenzlampe sehr schnell abnimmt. Durch dieses Ausbleichen des PS war dessen Lokalisation nach einiger Zeit nur noch sehr schwer abzubilden. Um das Ausmaß des Photobleachings zu verdeutlichen, wurde eine mit TMPyP inkubierte *C. albicans*-Probe für 180 Sekunden bei eingeschaltetem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und eine Fotoserie mit dem Zeitintervall $\Delta t = 1s$ durchgeführt. Dabei wurde die Belichtungszeit jeweils konstant gehalten. Die Ergebnisse der Fotoserie sind in Abb. 36 dargestellt.

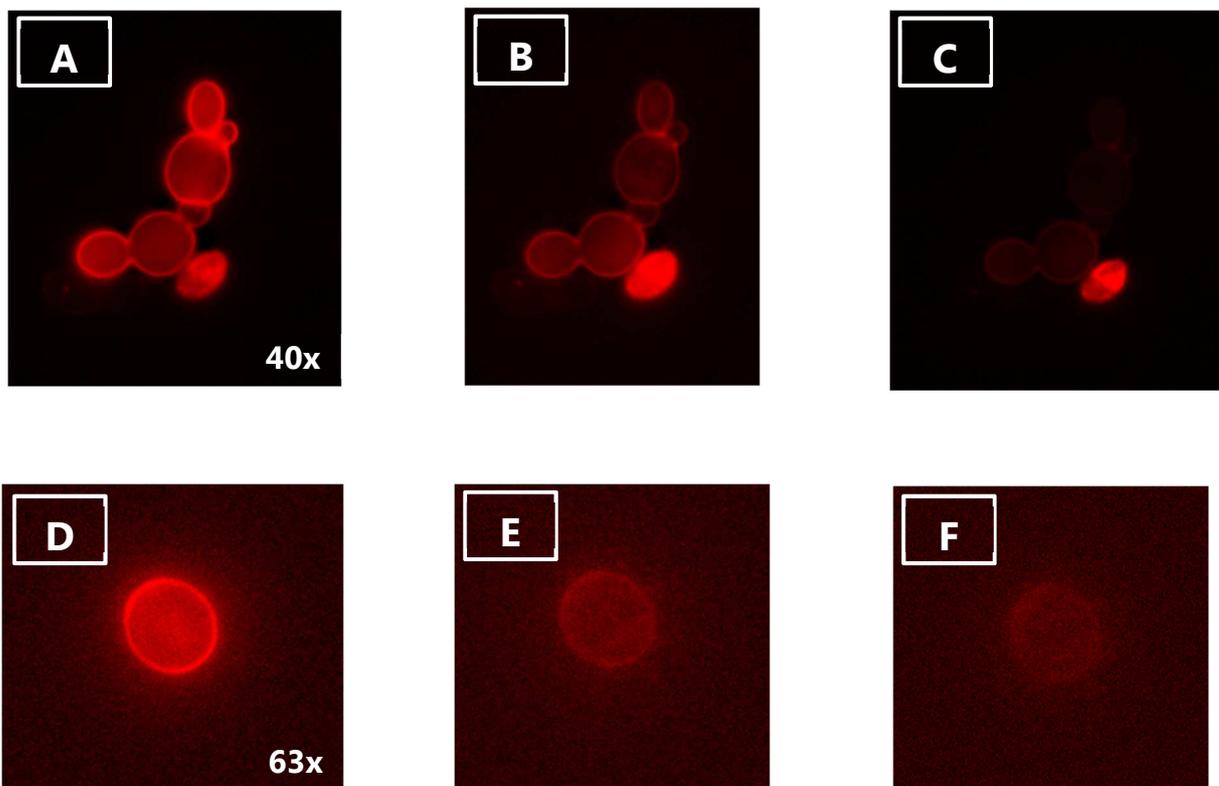


Abb. 36: Photobleaching von TMPyP unter dem Fluoreszenzmikroskop

Um das Photobleaching von TMPyP während der Mikroskopie darzustellen, wurden die mit TMPyP inkubierten *C. albicans*-Proben 180 Sekunden bei eingeschalteter Fluoreszenzlampe beobachtet. Dabei wurde die Belichtungszeit konstant bei 347 ms (A-C) bzw. 157 ms (D-F) gehalten. Eine Fotoserie mit dem Zeitintervall $\Delta t = 1s$ wurde angefertigt. Der Bildverlauf zeigt das Fluoreszenzbild von TMPyP bei $t = 0s$ (A, D), $t = 90s$ (B, E) und $t = 180s$ (C, F).

4.10. Diskussion der Mikroskopieergebnisse

Durch die Fluoreszenzmikroskopie kann die Lokalisation von PS innerhalb von lebenden Zellen detektiert werden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich der vierfach positiv geladene PS TMPyP ringförmig um die *C. albicans*-Zelle anlagert. Durch die Markierung der Zellwand mit WGA ließ sich darstellen, dass der mikroskopisch sichtbare PS-Ring auf eine Anlagerung des TMPyP an die Zellwand zurückzuführen ist. Bei Untersuchungen von Lambrechts *et al.* konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden⁸⁶. *C. albicans* wurde dabei für 15 Minuten mit TriP[4] in PBS inkubiert. TriP[4] gehört ebenfalls zur Gruppe der Porphyrine und unterscheidet sich von TMPyP in der Anzahl der Ladungen. Bei TriP[4] ist im Vergleich zu TMPyP ein Rest durch einen Benzolring ersetzt, wodurch TriP[4] nur drei positive Ladungen besitzt. Die von Lambrechts *et al.* für die Mikroskopie verwendete Konzentration des PS lag mit 25 μM höher als die in dieser Arbeit verwendete Konzentration von 1 μM . Die Autoren beobachteten eine ringförmige Verteilung des PS um die *C. albicans*-Zellen, jedoch keine Fluoreszenz in deren Inneren⁸⁶. Frau Dr. Fernanda P. Gonzales konnte in ihrer Dissertation im Rahmen von Uptakeversuchen ebenfalls zeigen, dass die Inkubation von *C. albicans* mit TMPyP zu einer ringförmigen Färbung der Pilzzellen führte⁴⁶. Wie in der vorliegenden Arbeit dargestellt, konnte nach einer Bestrahlung der mit TMPyP inkubierten Zellen (Lichtdosis: $12 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$) vereinzelt noch eine Lokalisation des PS in der Zellwand festgestellt werden. Beim Großteil der Zellen war jedoch eine Färbung der gesamten Zelle sichtbar. Dies ist ein Hinweis darauf, dass durch die photodynamische Behandlung ein Schaden an der Zellwand der Hefezellen eingetreten ist. Smijs *et al.* untersuchten in einer Studie die Wirksamkeit von Porphyrinphotosensibilisatoren gegenüber *Trichophyton rubrum*. Dieser Pilz gehört zur Gattung der Dermatophyten und führt, wie auch *C. albicans*, zu verschiedenen Dermatomykosen⁸. Von den verwendeten PS unterscheidet sich Sylsens B nur geringfügig von TMPyP. Smijs *et al.* vermuteten ebenso, dass die photodynamische Wirkung von Sylsens B auf einen Schaden in der Zellwand zurückzuführen ist⁸⁷.

In der Studie von Lambrechts *et al.* wurde ebenfalls die Lokalisation des PS nach erfolgter Bestrahlung untersucht. Durch die Lichtapplikation ($1,8 \frac{J}{cm^2}$, $5,4 \frac{J}{cm^2}$, $9 \frac{J}{cm^2}$ und $27 \frac{J}{cm^2}$) verschwand die ringförmige Verteilung des PS und die gesamte Zelle zeigte homogene Fluoreszenz mit Ausnahme der Vakuole. Lambrechts *et al.* erklärten dies ebenfalls durch eine Zerstörung der Zellwand und der Zellmembran, wodurch es zu einem massiven Eintreten des PS TriP[4] in das Innere der Zelle kommt⁸⁶. Eine Freeze-Fracture-Mikroskopie der bestrahlten Proben zeigte eine Veränderung der Zellmembran mit Rissen und Brüchen⁸⁶. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit korrelieren auch mit Untersuchungen von Bertoloni *et al.* Hier wurde die photodynamische Wirkung von Haematoporphyrin auf *C. albicans* betrachtet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der bestrahlten Zellen wiesen dabei auf eine Veränderung der Zellmorphologie im Vergleich zu unbestrahlten Proben hin. Mit steigender Bestrahlungszeit wurden die Zellen weniger elektronendicht und die Zellmembran nahm mehr und mehr eine zerklüftete Form an. Bei einer Bestrahlungszeit von 10 Minuten kam es zu einem Zusammenbruch der Plasmamembran und die Zellorganellen waren kaum mehr zu identifizieren⁸⁸.

Im Zuge der Mikroskopieversuche konnte eine stetige Abnahme der Fluoreszenz von TMPyP beobachtet werden (Abb. 36). Dadurch wurde die Abbildung durch die CCD-Kamera zunehmend erschwert. Song *et al.* definierten den Begriff des Photobleachings als einen Vorgang, bei dem ein PS durch die Bestrahlung mit Anregungslicht seine Fähigkeit zur Fluoreszenz verliert⁸⁹. Dies beruht auf einem komplexen photophysikalischen Zusammenhang, der vereinfacht in Abb. 37 dargestellt ist. Ein PS-Molekül absorbiert ein Photon der Energie $E = h\nu$ und wird vom Grundzustand S in den angeregten Zustand S* gehoben (k_a). Das angeregte PS-Molekül kann unter Emission eines Photons oder durch interne Umwandlung der Energie in den Grundzustand S zurückkehren (k_d). Weiterhin ist ein Übergang in einen Triplettzustand T* denkbar (k_{isc}), von dem aus eine Rückkehr in den Grundzustand möglich ist (k_1). Unter Photobleaching versteht man den Prozess, dass die Anzahl der PS-Moleküle im Grundzustand durch andauernde photochemische Zerstörung während dem S* oder T*-Zustand abnehmen. Der

Grund für diese Zerstörung liegt darin, dass Fluorochrome im angeregten Zustand höhere Energiewerte als im Grundzustand besitzen und leicht mit Molekülen, wie beispielsweise Sauerstoff, zu nicht-fluoreszierenden Verbindungen reagieren können. Das Photobleaching kann daher sowohl ausgehend vom S^* - als auch vom T^* -Zustand erfolgen (k_{bs} , k_{bt}). Die gebleichten PS-Moleküle können so nicht mehr am Anregungs-Emissions-Prozess teilnehmen ⁸⁹.

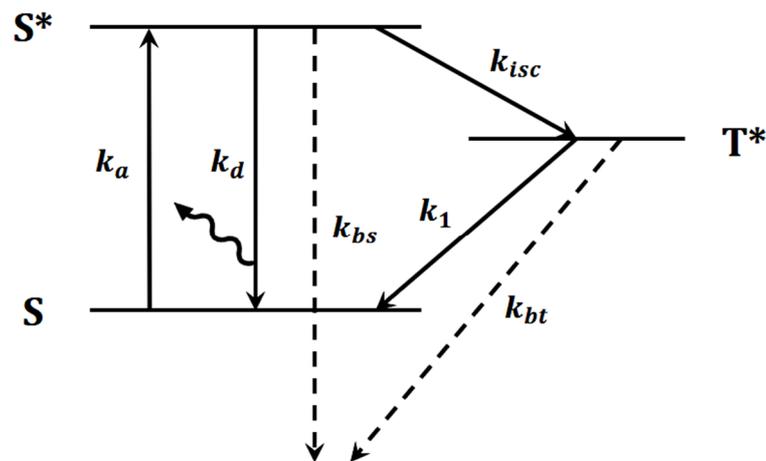


Abb. 37: Vereinfachter Reaktionsmechanismus des Photobleachings nach SONG

Ein PS-Molekül wird durch Absorption eines Photons ($E=h\nu$) vom Grundzustand (S) in einen angeregten Zustand (S^*) gehoben (k_a). Ein Übergang in den Grundzustand ist durch Emission eines Photons oder durch einen internen Energieübergang möglich (k_d). Die Energie kann zunächst auch in einen Triplettzustand (T^*) übergehen (k_{isc}), von wo aus wiederum eine Rückkehr in den Grundzustand möglich ist (k_1). Beim Photobleaching kann der Energieübergang des PS-Moleküls sowohl vom S^* - als auch vom T^* -Zustand erfolgen (k_{bs} , k_{bt}) ⁸⁹.

Reddi *et al.* untersuchten die Photostabilität verschiedener Porphyrinphotosensibilisatoren, die hinsichtlich ihrer Kettenlänge am R_4 -Rest unterschiedlich waren. Hierfür wurden jeweils eine $0,8 \mu\text{M}$ Lösung der Porphyrine mit weißem Licht ($\lambda = 400\text{-}800 \text{ nm}$) und einer Leistungsdichte von $150 \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2}$ bestrahlt. Die Konzentration der PS wurde dabei spektrometrisch nach verschiedenen Bestrahlungszeiten gemessen. Reddi *et al.* stellten fest, dass es sowohl in Wasser als auch in PBS zu einer Abnahme der Porphyrinkonzentration kam. Die Abnahme der Absorbance bei TMPyP beträgt dabei innerhalb der ersten 5 Minuten ca. $0,04$ ⁹⁰. Auch Mang *et al.* konnten einen Photobleaching-Effekt bei

Photofrin™ II (DHE) feststellen⁹¹. Mosinger *et al.* stellten bei Bestrahlung mit geringer Lichtdosis und in Abwesenheit von Sauerstoff keinen spektrometrisch messbaren Unterschied in den Absorbance-Werten von TMPyP fest und schlossen daraus, dass TMPyP unter diesen Bedingungen als photostabil angenommen werden kann⁹².

5. Zusammenfassung

Die Anzahl ernster *C. albicans*-Infektionen hat in den letzten Jahren beträchtlich zugenommen. Candidiasis ist häufig assoziiert mit Patienten, die an AIDS oder einer anderen Form der Immunsuppression, z.B. infolge einer Organtransplantation, leiden. Dabei spielt die Entstehung von Resistenzen gegen gängige Antimykotika, wie Fluconazol, eine immer wichtigere Rolle. Eine vielversprechende Möglichkeit zur Inaktivierung von Pilzen und anderen Mikroorganismen stellt die aPDT dar. Der große Vorteil dieser Methode ist die Tatsache, dass nach bisherigem Stand der Forschung keine Resistenzen gegen die photodynamische Therapie auftreten. In Zeiten, in denen multiresistente Keime oft in Zusammenhang mit nosokomialen Erkrankungen stetig zunehmen, ist dies von entscheidender Bedeutung. In der Literatur wurden viele verschiedene Klassen von PS und ihre Wirksamkeit gegenüber *C. albicans* beschrieben^{63, 68, 47}. Während die Wirksamkeit der einzelnen PS durch viele Studien gut belegt ist, ist über den genauen Wirkmechanismus, der zur Inaktivierung der Zellen führt, nur wenig bekannt. Durch die Erforschung dieses Mechanismus ist es möglich, PS gezielt zu modifizieren, um eine Optimierung der aPDT in Bezug auf *C. albicans* zu erreichen. In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, mit welchem PS eine Inaktivierung von *C. albicans* möglich ist und wo der PS vor und nach Bestrahlung lokalisiert. Dadurch ist ein besseres Verständnis dafür möglich, wie es auf zellulärer Ebene zu einer Abtötung der Mikroorganismen kommt.

5.1. Phototoxizitätsversuche und Uptake

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten Bedingungen erarbeitet werden, bei denen eine photodynamische Inaktivierung von *C. albicans* möglich ist. Diese Ergebnisse dienten als Grundlage für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen im zweiten Teil der Arbeit. Die Phototoxizitätsversuche eignen sich dazu, die Wirksamkeit von PS *in vitro* nachzuweisen. Als Vertreter verschiedener Substanzklassen wurden TMPyP

(Porphyrin), Methylen- und Toluidinblau O (Phenothiazine) sowie Flavin 7 (Vitaminderivat) und ihre Wirkung gegen *C. albicans* untersucht. Hierfür wurden die *C. albicans*-Proben mit unterschiedlichen PS-Konzentrationen inkubiert und anschließend mit einer geeigneten Lampe bestrahlt. Im Falle von MB und TBO betrug die Inkubationszeit 4 Stunden, mit TMPyP wurde für 15 Minuten inkubiert. Bei FL7 wurde sowohl eine Inkubationszeit von 4 Stunden als auch eine Inkubationszeit von 15 Minuten untersucht. Die Uptakeversuche, die parallel durchgeführt wurden, geben Aufschluss darüber, wie stark die jeweiligen PS von den Mikroorganismen aufgenommen wurden. Eine Aufnahme bzw. Anlagerung der PS ist eine wichtige Voraussetzung für die photodynamische Wirksamkeit und die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der PS-Lokalisation. Die *C. albicans*-Proben wurden dafür mit verschiedenen PS-Konzentrationen inkubiert, zentrifugiert und die optische Dichte des Überstands gegen eine Referenz gemessen.

Methylen- und Toluidinblau zeigten bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden und einer applizierten Lichtdosis von $30 \frac{J}{cm^2}$ bzw. $180 \frac{J}{cm^2}$ keinen photodynamischen Effekt gegenüber *C. albicans*. Die Überlebensraten der bestrahlten Proben unterschieden sich nur geringfügig von den parallel durchgeführten Dunkel- und Lichtkontrollen. In den Uptakeversuchen zeigte sich, dass die beiden Phenothiazine zwar von den Pilzzellen in geringem Maße aufgenommen werden, dies aber offensichtlich zu gering ist, um eine Inaktivierung der Mikroorganismen zu erreichen.

FL7 wurde in der Vergangenheit erfolgreich zur photodynamischen Inaktivierung von Bakterien und bakteriellen Endosporen eingesetzt^{57, 73}. Die Phototoxizitätsuntersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ergaben, dass eine Inkubation von *C. albicans* mit FL7 bei anschließender Bestrahlung ($12 \frac{J}{cm^2}$) keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Pilzzellen hatte. Weder bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten, noch bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden konnte eine Inaktivierung von *C. albicans* erreicht werden. Die Uptakeversuche zeigten, dass FL7 von den Mikroorganismen nicht aufgenommen wurde. Diese Tatsache steht mit den Ergebnissen der Phototoxizitätstests in Einklang.

Unter den verwendeten PS führte nur TMPyP zu einer photodynamischen Wirksamkeit gegenüber *C. albicans*. Ab einer Konzentration von 5 μM konnte eine Inaktivierung von über 3 \log_{10} -Stufen festgestellt werden. Es ist anzumerken, dass TMPyP in Konzentrationen über 10 μM dunkeltoxisch wird. Dies bedeutet, dass die Zellen alleine durch die Anwesenheit des PS, also ohne Applikation von Licht, abgetötet werden. Die Uptakeuntersuchungen ergaben, dass TMPyP von *C. albicans* in hohem Maße aufgenommen wird. Dies ist an der OD-Differenz zwischen inkubierter Probe und Referenz ersichtlich. Da die Aufnahme des PS, wie oben erwähnt, ein wichtiger Bestandteil des photodynamischen Wirkmechanismus ist, korreliert diese Beobachtung mit den Ergebnissen der Phototoxizitätsversuche. Um die Lokalisation des PS innerhalb der Zelle abzubilden, ist es ebenso wichtig, dass eine ausreichende Aufnahme des PS gegeben ist. In dieser Arbeit konnte nur TMPyP die Voraussetzungen für eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung erfüllen:

- a) Der PS zeigt eine photodynamische Wirksamkeit gegenüber *C. albicans*
- b) *C. albicans* nimmt den PS in ausreichender Menge auf.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde deshalb das Lokalisationsverhalten nur im Hinblick auf TMPyP näher betrachtet.

5.2. Mikroskopie

Der Hauptteil der Mikroskopieversuche konzentrierte sich darauf, nachzuweisen, wo TMPyP vor und nach Bestrahlung lokalisiert. Um die Lokalisation des PS abzubilden, mussten geeignete Bedingungen gefunden werden, die zum einen eine Auflösung der Lokalisation zulassen, zum anderen aber nicht zu Unter- oder Überbelichtung der Probe führen. Die Versuchsparameter wurden hinsichtlich Konzentration und Inkubationszeit variiert. Die 15-minütige Inkubation von *C. albicans* mit TMPyP der Endkonzentration 1 μM erwies sich als geeignet, eine Lokalisation des PS nachzuweisen. Die Auswertung der Fluoreszenzbilder ergab eine ringförmige Anordnung des PS um die

Pilzzellen. Dies führte zu der Annahme, dass TMPyP innerhalb der Zellwand von *C. albicans* lokalisiert. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde die Zellwand mit WGA markiert und die Probe nach Co-Inkubation mit TMPyP im Fluoreszenzlicht betrachtet. Es stellte sich heraus, dass die grüne Fluoreszenz des WGA und die rote Fluoreszenz des TMPyP deckungsgleich waren.

Um die Delokalisation des PS nach der Bestrahlung zu untersuchen, wurden die Proben mit TMPyP (Endkonzentration 1 μM) für 15 Minuten inkubiert, anschließend bestrahlt ($12 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}$) und die Probe mit dem Mikroskop betrachtet. Es stellte sich heraus, dass sich beim Großteil aller Zellen die rote Fluoreszenz des TMPyP auf die gesamte Zelle erstreckte. Eine erneute Markierung der Zellwand mit WGA zeigte die grüne Fluoreszenz des WGA als immer noch ringförmige Anordnung, während TMPyP ins Zellinnere vorgedrungen zu sein schien. Dies ist ein Hinweis dafür, dass es während der photodynamischen Therapie zu einer Schädigung der Zellwand und in diesem Zusammenhang möglicherweise auch zu einem Schaden an der Zellmembran kommt, der das Eindringen des Porphyrins in das Innere der Zelle möglich macht.

Während der Mikroskopie nahm die Intensität des TMPyP sehr schnell ab. Durch die geringere Fluoreszenzquantenausbeute wurde die Detektion der PS-Lokalisation zunehmend erschwert. Um dieses Photobleaching von TMPyP darzustellen, wurde eine Fotoserie aufgenommen. Bei konstanter Belichtungszeit und eingeschalteter Fluoreszenzlampe wurden im Zeitintervall $\Delta t = 1\text{s}$ für 3 Minuten Bilder angefertigt. Die Auswertung der erhaltenen Aufnahmen zeigt eine stetige Abnahme der PS-Intensität über 180 Sekunden.

6. Ausblick

Die amerikanischen „Centers for Disease Control and Prevention“ schilderten 2013 in ihrem Bericht „Antibiotic Resistance Threats in the United States“ das Ausmaß der landesweit fortschreitenden antimikrobiellen Resistenzen. Fluconazol-resistente *Candida*-Stämme führen in den Vereinigten Staaten jährlich zu 3.400 Neuinfektionen, von denen 220 tödlich verlaufen. Die finanzielle Belastung des Einzelnen durch die Therapie von *Candida*-Infektionen beläuft sich pro Klinikaufenthalt auf geschätzt 6.000 bis 29.000 US-Dollar²⁴. Mit Antimykotika, wie beispielsweise Amphotericin B, stehen wirksame Substanzen zur Bekämpfung von *Candida spp.* zur Verfügung⁴⁶. Dennoch gewinnen alternative Behandlungsverfahren wegen zunehmender Resistenzentwicklung mehr und mehr an Bedeutung. Die aPDT könnte in den nächsten Jahren in diesem Bereich einen wertvollen Beitrag leisten. Auch wenn eine photodynamische Behandlung von *Candida*-Infektion nicht das gesamte Spektrum der konventionellen Antimykotika abdeckt, so kann sie doch helfen, ihren Einsatz im Kampf gegen Pilzkrankungen zu begrenzen.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass TMPyP zur Inaktivierung von *C. albicans* geeignet ist. Durch die Markierung mit WGA wurde nachgewiesen, dass die Zellwand das primäre Angriffsziel des Porphyrins ist. Weiter konnte gezeigt werden, dass es während der photodynamischen Therapie zu einer Veränderung an der Zellwand kommt, was zu einem Eindringen des PS in die Zelle führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden die Grundlage, auf der weitere Untersuchungen aufbauen können. In einem nächsten Schritt könnte elektronenmikroskopisch die Morphologie der Zellwand und ihre Veränderung während der aPDT genauer beleuchtet werden. Anfänge hierzu haben Lambrechts *et al.* in ihrer Publikation gezeigt⁸⁶. Dadurch kann der Schaden, der durch die aPDT verursacht wird, genauer klassifiziert werden. Denkbar wäre auch eine Live-Darstellung der Delokalisierungsvorgänge mithilfe des Fluoreszenzmikroskops. Hierbei dient das Fluoreszenzlicht des Mikroskops als Lichtquelle, während das Mikroskop die Vorgänge innerhalb der Zelle in Echtzeit darstellt. Die Diffusion von TMPyP

ins Zellinnere könnte dadurch bei Bestrahlung sichtbar gemacht werden. Um dies zu erreichen, muss jedoch das Problem des Photobleachings berücksichtigt werden. Bei den Versuchen, die in dieser Dissertation dargestellt sind, nahm die Intensität der PS-Fluoreszenz in kurzer Zeit sehr stark ab. Für eine Echtzeit-Darstellung der Delokalisierungsvorgänge müsste die Intensität des PS allerdings über einen Zeitraum von mehreren Minuten annähernd konstant bleiben. Hickey *et al.* beschrieben 2009 anhand der Pilzart *Aspergillus fumigatus* die verschiedenen Möglichkeiten, lebende Zellen und deren Zellorganellen darzustellen. Durch gezieltes Anfärben anderer Zellorganellen, wie z.B. der Mitochondrien, wäre es so möglich, zu untersuchen, inwiefern die aPDT auch auf andere Zellbestandteile Einfluss nimmt.

7. Literaturverzeichnis

1. Larriba G, Rubio Coque JJ, Ciudad A et al. Candida albicans molecular biology reaches its maturity. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 2000; **3**: 247-52.
2. Kwon-Chung KJ, Bennett, J.E. Infections due to miscellaneous molds. *Med Mycol* 1992: 733-9.
3. Poulain D. Candida albicans, plasticity and pathogenesis. *Critical reviews in microbiology* 2015; **41**: 208-17.
4. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; **369**: 1961-71.
5. Patil S, Rao RS, Majumdar B et al. Clinical Appearance of Oral Candida Infection and Therapeutic Strategies. *Front Microbiol* 2015; **6**.
6. Ashman RB, Farah, C. S. Oral candidiasis: clinical manifestations and cellular adaptive host responses. In: Fidel PL, Huffnagle, G.B., ed. *Fungal Immunology: From an Organ Perspective*. New York: Springer, 2005; 59-83.
7. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of oral microbiology* 2011; **3**.
8. Braun-Falco O, Plewig, G., Wolff, H. H., Burgdorf, W. H. C., Landthaler, M. *Dermatologie und Venerologie*: Springer, 2005.
9. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses* 2015; **58**: 2-13.
10. Biancofiore G, Bindi ML, Baldassarri R et al. Antifungal prophylaxis in liver transplant recipients: a randomized placebo-controlled study. *Transplant Int* 2002; **15**: 341-7.
11. Vincent JL, Anaissie E, Bruining H et al. Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic Candida infection in surgical patients under intensive care. *Intens Care Med* 1998; **24**: 206-16.
12. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *The New England journal of medicine* 1981; **305**: 1425-31.

13. Masur H, Michelis MA, Greene JB et al. An Outbreak of Community-Acquired Pneumocystis-Carinii Pneumonia - Initial Manifestation of Cellular Immune Dysfunction. *New Engl J Med* 1981; **305**: 1431-8.
14. Esebelahie NO, Enweani IB, Omoregie R. Candida colonisation in asymptomatic HIV patients attending a tertiary hospital in Benin City, Nigeria. *Libyan J Med* 2013; **8**.
15. Cleary JD. Echinocandins: pharmacokinetic and therapeutic issues. *Current medical research and opinion* 2009; **25**: 1741-50.
16. Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD et al. Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infection control and hospital epidemiology* 2005; **26**: 540-7.
17. Gow NA, Hube B. Importance of the Candida albicans cell wall during commensalism and infection. *Current opinion in microbiology* 2012; **15**: 406-12.
18. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ et al. Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature reviews Microbiology* 2012; **10**: 112-22.
19. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK et al. Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: Development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology* 2001; **183**: 5385-94.
20. Ramage G, VandeWalle K, Lopez-Ribot JL et al. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in Candida albicans. *Fems Microbiol Lett* 2002; **214**: 95-100.
21. Uppuluri P, Dinakaran H, Thomas DP et al. Characteristics of Candida albicans Biofilms Grown in a Synthetic Urine Medium. *Journal of clinical microbiology* 2009; **47**: 4078-83.
22. Georgopapadakou NH, Walsh TJ. Human Mycoses - Drugs and Targets for Emerging Pathogens. *Science* 1994; **264**: 371-3.
23. Cowen LE, Sanglard D, Calabrese D et al. Evolution of drug resistance in experimental populations of Candida albicans. *Journal of bacteriology* 2000; **182**: 1515-22.
24. Dr. Tom Frieden M, MPH. Antibiotic Resistance Threats in the United States. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2013.

25. Xu YH, Chen LM, Li CY. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* species to fluconazole and detection of *Candida albicans* ERG11 mutations. *J Antimicrob Chemoth* 2008; **61**: 798-804.
26. Thompson GR, Cadena J, Patterson TF. Overview of Antifungal Agents. *Clin Chest Med* 2009; **30**: 203-+.
27. Raab O. Ueber die Wirkung Fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Zeitschrift für Biologie* 1900; **39**: 524-246.
28. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res* 2008; **163**: 1-12.
29. Konan YN, Gurny R, Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photoch Photobio B* 2002; **66**: 89-106.
30. Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2000; **42**: 389-413.
31. Maisch T, Hackbarth S, Regensburger J et al. Photodynamic inactivation of multi-resistant bacteria (PIB) - a new approach to treat superficial infections in the 21st century. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011; **9**: 360-6.
32. Bronshtein I, Afri M, Weitman H et al. Porphyrin depth in lipid bilayers as determined by iodide and parallax fluorescence quenching methods and its effect on photosensitizing efficiency. *Biophys J* 2004; **87**: 1155-64.
33. Spannberger F. Einfluss einer IPL-Blitzlichtlampe und Wirkung des Hitzeschockproteins DnaK auf den photodynamischen Prozess gegenüber *E. coli* in vitro. *Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg*. Regensburg: Universität Regensburg, 2014.
34. Ford BJ. Vanleeuwenhoek, Antony - Microscopist and Visionary Scientist. *J Biol Educ* 1989; **23**: 293-9.
35. McGeown JG. Seeing is believing! Imaging Ca²⁺-signalling events in living cells. *Exp Physiol* 2010; **95**: 1049-60.
36. Sanderson MJ, Smith I, Parker I et al. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harbor protocols* 2014; **2014**: pdb top071795.
37. Hickey PC, Read ND. Imaging living cells of *Aspergillus* in vitro. *Med Mycol* 2009; **47**: S110-S9.

38. Da Silva RM, Neto JRD, Santos CS et al. Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the detection of fungi directly from blood cultures and cerebrospinal fluid from patients with suspected invasive mycoses. *Ann Clin Microb Anti* 2015; **14**.
39. Jahanshahi G, Shirani S. Detection of *Candida albicans* in oral squamous cell carcinoma by fluorescence staining technique. *Dental research journal* 2015; **12**: 115-20.
40. Gottfert F, Wurm CA, Mueller V et al. Coaligned dual-channel STED nanoscopy and molecular diffusion analysis at 20 nm resolution. *Biophys J* 2013; **105**: L01-3.
41. Berning S, Willig KI, Steffens H et al. Nanoscopy in a living mouse brain. *Science* 2012; **335**: 551.
42. Hell SW, Sahl SJ, Bates M et al. The 2015 super-resolution microscopy roadmap. *J Phys D Appl Phys* 2015; **48**.
43. Science TRSAo. The Nobel Prize in Chemistry 2014. Stockholm, Sweden, 2014.
44. Stokes GG. On the change of refrangibility of light. *Phil Trans R Soc Lond* 1852; **142**: 463–562
45. Spring KH, Davidson, M. W. Introduction to Fluorescence Microscopy. <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html> (09.03.2016 2016, date last accessed).
46. Gonzales FP. Photodynamic inactivation of microbial biofilms: impact of Hsp70 expression and non-invasive optical monitoring of oxygen during photodynamic inactivation *Fakultät für Chemie und Pharmazie*. Regensburg: Universität Regensburg, 2013; 135.
47. Gonzales FP, Felgentrager A, Baumler W et al. Fungicidal photodynamic effect of a twofold positively charged porphyrin against *Candida albicans* planktonic cells and biofilms. *Future Microbiol* 2013; **8**: 785-97.
48. Eichner A, Gonzales FP, Felgentrager A et al. Dirty hands: photodynamic killing of human pathogens like EHEC, MRSA and *Candida* within seconds. *Photoch Photobio Sci* 2013; **12**: 135-47.
49. Arweiler NB, Pietruska M, Pietruski J et al. Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. *Clin Oral Investig* 2014; **18**: 2129-35.

50. Braun A, Dehn C, Krause F et al. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *Journal of clinical periodontology* 2008; **35**: 877-84.
51. Wainwright M. Photodynamic medicine and infection control. *J Antimicrob Chemoth* 2012; **67**: 787-8.
52. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS et al. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagn Photodyn* 2005; **2**: 175-91.
53. Hanakova A, Bogdanova K, Tomankova K et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. *Microbiol Res* 2014; **169**: 163-70.
54. Maisch T, Kowalewski E, Holzmann T et al. Photodynamic killing of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) for the first time using TMPyP. *Exp Dermatol* 2012; **21**: e40-e.
55. Redmond RW, Gamlin JN. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and photobiology* 1999; **70**: 391-475.
56. Wainwright M. Phenothiazinium photosensitisers: V. Photobactericidal activities of chromophore-methylated phenothiazinium salts. *Dyes Pigments* 2007; **73**: 7-12.
57. Maisch T, Eichner A, Spath A et al. Fast and Effective Photodynamic Inactivation of Multiresistant Bacteria by Cationic Riboflavin Derivatives. *PLoS One* 2014; **9**.
58. Miles AA, Misra SS, Irwin JO. The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of hygiene* 1938; **38**: 732-49.
59. Boyce JM, Pittet D. Guideline for Hand Hygiene in Health-Care Settings. Recommendations of the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSA Hand Hygiene Task Force. *American journal of infection control* 2002; **30**: S1-46.
60. Gebel J. D-KdD. *Anforderungskatalog für die Aufnahme von chemischen Desinfektionsverfahren in die Desinfektionsmittel-Liste der DGHM*: mhp-Verlag GmbH, 2002.
61. McKeehan WL. Methods for Preparation of Media, Supplements, and Substrata for Serum-free Animal Cell Culture. *AR Liss* 1984: 209.
62. Banker G, Goslin, K. *Culturing Nerve Cells*. MIT Press, Cambridge 1991: 65.

63. Quiroga ED, Alvarez MG, Durantini EN. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic action of 5,10,15,20-tetra(4-N-methylpyridyl)porphyrin in different media. *Fems Immunol Med Mic* 2010; **60**: 123-31.
64. Cormick MP, Quiroga ED, Bertolotti SG et al. Mechanistic insight of the photodynamic effect induced by tri- and tetra-cationic porphyrins on *Candida albicans* cells. *Photoch Photobio Sci* 2011; **10**: 1556-61.
65. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005; **49**: 2329-35.
66. Cieplik F, Pummer A, Regensburger J et al. The impact of absorbed photons on antimicrobial photodynamic efficacy. *Front Microbiol* 2015; **6**.
67. de Souza SC, Junqueira JC, Balducci I et al. Photosensitization of different *Candida* species by low power laser light. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 2006; **83**: 34-8.
68. Pupo YM, Gomes GM, Santos EB et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy using methylene blue and toluidine blue as photosensitizing dyes. *Acta odontologica latinoamericana : AOL* 2011; **24**: 188-92.
69. Wilson M, Mia N. Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *J Oral Pathol Med* 1993; **22**: 354-7.
70. Souza RC, Junqueira JC, Rossoni RD et al. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. *Lasers in medical science* 2010; **25**: 385-9.
71. Soares BM, da Silva DL, Sousa GR et al. In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 2009; **94**: 65-70.
72. Walker CA, Gomez BL, Mora-Montes HM et al. Melanin Externalization in *Candida albicans* Depends on Cell Wall Chitin Structures. *Eukaryot Cell* 2010; **9**: 1329-42.
73. Eichner A, Gollmer A, Spath A et al. Fast and effective inactivation of *Bacillus atrophaeus* endospores using light-activated derivatives of vitamin B2. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 2015; **14**: 387-96.

74. Nitzan Y, Gutterman M, Malik Z et al. Inactivation of gram-negative bacteria by photosensitized porphyrins. *Photochemistry and photobiology* 1992; **55**: 89-96.
75. Oriel S, Nitzan Y. Mechanistic aspects of photoinactivation of *Candida albicans* by exogenous porphyrins. *Photochemistry and photobiology* 2012; **88**: 604-12.
76. Shrestha A, Kishen A. Polycationic chitosan-conjugated photosensitizer for antibacterial photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology* 2012; **88**: 577-83.
77. Cormick MP, Alvarez MG, Rovera M et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by tri- and tetra-cationic porphyrin derivatives. *European journal of medicinal chemistry* 2009; **44**: 1592-9.
78. Prates RA, Kato IT, Ribeiro MS et al. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2011; **66**: 1525-32.
79. Chen J, Cesario TC, Rentzepis PM. Time resolved spectroscopic studies of methylene blue and phenothiazine derivatives used for bacteria inactivation. *Chem Phys Lett* 2010; **498**: 81-5.
80. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *J Photoch Photobio B* 2003; **71**: 87-98.
81. Tegos GP, Hamblin MR. Phenothiazinium antimicrobial photosensitizers are substrates of bacterial multidrug resistance pumps. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2006; **50**: 196-203.
82. Comings DE. Mechanisms of chromosome banding. VIII. Hoechst 33258-DNA interaction. *Chromosoma* 1975; **52**: 229-43.
83. Ou ZM, Yao H, Kimura K. Preparation and optical properties of organic nanoparticles of porphyrin without self-aggregation. *J Photoch Photobio A* 2007; **189**: 7-14.
84. Lis H, Sharon N. Citation Classic - the Biochemistry of Plant-Lectins (Phytohemagglutinins). *Cc/Life Sci* 1983: 19-.
85. Cabib E, Bowers B. Chitin and Yeast Budding - Localization of Chitin in Yeast Bud Scars. *J Biol Chem* 1971; **246**: 152-&.
86. Lambrechts SA, Aalders MC, Van Marle J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005; **49**: 2026-34.

87. Smijs TG, van der Haas RN, Lugtenburg J et al. Photodynamic treatment of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its microconidia with porphyrin photosensitizers. *Photochemistry and photobiology* 2004; **80**: 197-202.
88. Bertoloni G, Reddi E, Gatta M et al. Factors influencing the haematoporphyrin-sensitized photoinactivation of *Candida albicans*. *Journal of general microbiology* 1989; **135**: 957-66.
89. Song LL, Hennink EJ, Young IT et al. Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy. *Biophys J* 1995; **68**: 2588-600.
90. Reddi E, Ceccon M, Valduga G et al. Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins. *Photochemistry and photobiology* 2002; **75**: 462-70.
91. Mang TS, Dougherty TJ, Potter WR et al. Photobleaching of porphyrins used in photodynamic therapy and implications for therapy. *Photochemistry and photobiology* 1987; **45**: 501-6.
92. Mosinger J, Janoskova M, Lang K et al. Light-induced aggregation of cationic porphyrins. *J Photoch Photobio A* 2006; **181**: 283-9.

8. Abkürzungsverzeichnis

$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
aPDT	antimikrobielle photodynamische Therapie
BSA	Bovine Serum Albumin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CCD	charge coupled device
CFU	colony forming units (= KBE)
CLSM	konfokale Laser-scanning Mikroskopie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii / et aliae / et alia</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FL7	Flavin 7 (Flash7a-Hydrochlorid)
g	Gramm
G	Guanin
GaAlAs	Gallium-Aluminium-Arsen-Laser
h	Stunde
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HAART	hoch aktive antiretrovirale Therapie
HeNe	Helium-Neon-Laser
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
InGaAlP	Aluminiumgalliumindiumphosphid-Laser
ISC	intersystem crossing

KBE	koloniebildende Einheiten
λ	Wellenlänge
LED	Leuchtdiode
μL	Mikroliter
MB	3,7-Bis(dimehtlamino)-phenothiaziniumchlorid Methylenblau
MES	Multidrug-Efflux-System
mH ₂ O	Milliporewasser
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
mL	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NPC	Kernporenkomplex
O ²⁻	Superoxidanion
OD	optische Dichte
OH [•]	Hydroxylradikal
PAS	periodic acid-Schiff
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysine
PET	Polyethylenterephthalat
Φ_{Δ}	Singulett-Quantenausbeute
PS	Photosensibilisator
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
σ_A	Absorptionsquerschnitt
SDB	Sabouraud-Bouillon
<i>spp.</i>	<i>species pluralis</i>
STED-Mikroskopie	stimulated-emission-depletion-Mikroskopie

Sylsens B	5,10,15-tris(4-methylpyridinium)-20-phenyl-[21H,23H]-porphyrintrichlorid
T	Thymin
t	Zeit
TBO	3-Amino-7-(dimethylamino)-2-methylphenothiazin-5-ium-chlorid Toluidinblau O
TMAP	5,10,15,20-tetra(4- <i>N,N,N</i> -trimethylammonium phenyl)porphyrin <i>p</i> -tosylat
TMPyP	5,10,15,20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphyrin tetra(<i>p</i> -toluensulfonat)
TriP[4]	5-phenyl-10,15,20-Tris(<i>N</i> -methyl-4-pyridyl)porphyrinchlorid
WGA	Wheat Germ Agglutinin
XF73	5,15-bis-[4-(3-trimethylammoniopropoxy)-phenyl]-porphyrin

9. Danksagungen

Ein besonders großer Dank geht an Herrn **PD DR. TIM MAISCH** für die Annahme als Doktorrand und die überaus engagierte Betreuung während der gesamten Dissertation. Lieber Tim, danke für deine Geduld und dein offenes Ohr bei jeder noch so kleinen Frage. Deine fachlichen Ratschläge und deine unermüdliche Motivation waren mir ein stetiger Ansporn und eine große Hilfe bei der Erstellung der Doktorarbeit. Einen besseren Doktorvater kann ich mir nicht vorstellen.

Bei Herrn **PROF. DR. WOLFGANG BÄUMLER** bedanke ich mich für die Möglichkeit, den praktischen Teil der Doktorarbeit im Laborbereich der Dermatologie durchführen und Teil der Dermatologie Forschungsgruppe sein zu dürfen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau **DR. ANITA GOLLMER** für alle fachlichen Gespräche, die stets freundschaftliche Hilfe und die Weitergabe ihrer Begeisterung für das weite Feld der Mikroskopie.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht auch an Herrn **DR. JOHANNES REGENSBURGER** für die vielen physikalischen Diskussionen über Lampen, Photonen, Berechnungen, Farbstoffe und den täglichen Mensaspeiseplan. Lieber Johannes, danke, dass du dir für jede Frage Zeit genommen hast und uns sofort eine physikalisch korrekte Antwort geliefert hast.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Dermatologie-Forschungslabors, vor allem bei **SARA, LYDIA, TATJANA, EWA, EVA** und **ANJA** für die stets gute Atmosphäre und die tolle Zusammenarbeit.

Vielen Dank an das Pathologische Institut des Universitätsklinikums Regensburg für die freundliche Bereitstellung des Fluoreszenzmikroskops.

Ein großer Dank geht an meine Eltern **BRIGITTE** und **FRANZ VOIT**, deren stetige Unterstützung und Liebe mich schon mein ganzes Leben begleiten. Ohne euch wäre ich niemals so weit gekommen.

Nicht vergessen möchte ich meine übrige Familie. Danke vor allem an meine Schwester **KATRIN VOIT** für das mehrmalige Durchlesen der Doktorarbeit und dafür, dass ich auf ihre Hilfe in jeder Lebenslage bauen kann. Eine Welt ohne dich könnte ich mir nicht vorstellen.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch Herrn **PATRICK BAUER** sagen, der als mein Laborpartner und besten Freund die Höhen und Tiefen meiner Doktorarbeit miterlebt hat. Lieber Patrick, danke für die Freundschaft, die uns schon seit vielen Jahren verbindet und die Unterstützung nicht nur bei der Erstellung der Dissertation, sondern weit darüber hinaus. Deine Hilfestellungen und unsere angeregten Diskussionen während unserer Studienzeit haben mich stets motiviert und mir weitergeholfen.

Bedanken möchte ich mich weiter bei Frau **DR. DR. BRIGITTE HUNSDORFER** und Herrn **DR. ERNST HUNSDORFER** für die immerwährende Unterstützung während meines Zahnmedizinstudiums, auch wenn die Nerven blank lagen.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Thomas Voit
Geburtsdatum: 21. März 1991
Geburtsort: Mainburg
Adresse: Wichernstraße 2
84048 Mainburg

Ausbildung und beruflicher Werdegang

Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie des Universitätsklinikums Regensburg (Direktor: Prof. Dr. W. Buchalla) seit 01/2016

Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg 08/2010 – 03/2016
2015: Zahnärztliche Prüfung (Gesamtergebnis: sehr gut)
2013: Zahnärztliche Vorprüfung (Gesamtergebnis: gut)
2011: Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Gesamtergebnis: sehr gut)

Gabelsberger Gymnasium Mainburg 2001-2010
2010: Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (Abiturnote: 1,0)

Ausbildung zum nebenberuflichen Kirchenmusiker der Prüfungsordnung C am Diözesanreferat Kirchenmusik, Regensburg 2007-2009

Grundschule Mainburg 1997-2001

Praktika

Praktikum in der Gemeinschaftspraxis Dr. Dr. Brigitte Hundsdorfer und Dr. Ernst Hundsdorfer in Mainburg 07/2010 - 08/2010

Praktikum im Dentallabor Rainer und Partner in Mainburg 07/2010 – 09/2010

Stipendium

Alumni des Max-Weber-Programms seit 10/2015

Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes (Max-Weber-Programm) 10/2010 - 08/2015

Mitgliedschaften

Mitglied in der Deutschen Physikalischen Gesellschaft (DPG) seit 2010

Mitglied in der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) seit 2013

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Textpassagen, Daten, Bilder oder Grafiken sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- beziehungsweise Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 05.07.2016

Thomas Voit