

Aus dem Bereich Mikrobiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften bzw. Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

In vitro Effektivität der Photodynamischen Therapie
gegenüber multiresistenten Mikroorganismen

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2018

vorgelegt von: Katrin Winkler

geb. am: 18. Februar 1980 in Lienz/Österreich

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Zusammenfassung/Summary	1
2. Einleitung	4
2.1 Keratitis	4
2.1.1 Anatomische Grundlagen	4
2.1.2 Keratitiden einzelner Erreger	5
2.1.3 Therapeutische Maßnahmen	5
2.1.3.1 Konventionelle, antibiotische Therapie	5
2.1.3.1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
2.1.3.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.1.3.1.3 <i>Candida albicans</i>	8
2.1.3.2 Alternative therapeutische Möglichkeiten	9
2.2 Grundlagen der Photodynamischen Therapie (PDT)	10
2.3 Photosensibilisatoren	12
2.3.1 Chlorin e6	12
2.4 Hämbiosynthese	13
2.4.1 Hämaufnahme und -metabolismus in Bakterien und Hefen	14
2.4.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.4.1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
2.4.1.3 <i>Candida albicans</i>	15
2.5 Anwendung und Grenzen der PDT	16
2.6 Zielsetzung der Arbeit	17
3. Material und Methode	18
3.1 Geräte- und Verbrauchsmaterialien	18
3.2 LED Bestrahlungskammer	18
3.3 Mikroorganismen	19
3.3.1 Verwendete Stämme	20
3.3.2 Kultivierung	22
3.4 Photodynamische Inaktivierung von Bakterien	23
3.4.1 Probenvorbereitung	23
3.4.2 Versuchsaufbau	24

3.4.3 Bestimmung der Überlebensraten	25
3.5 Fluoreszenzspektroskopische Messverfahren	25
3.5.1 Chlorin e6 Detektion	25
3.6 Statistische Auswertung der Daten	26
4. Ergebnisse	27
4.1 Korrelation des McFarland mit der Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE)	27
4.2 Dunkeltoxizität	28
4.3 Einfluss der Belichtung auf die Lebendkeimzahl der Proben	29
4.4 Fluoreszenzmessungen	29
4.4.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
4.4.1.1 Differierende Inkubationszeiten	32
4.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	33
4.4.2.1 Differierende Inkubationszeiten	34
4.4.3 <i>Candida albicans</i>	35
4.4.3.1 Differierende Inkubationszeiten	35
4.5 Bakterien mit veränderter Pigmentproduktion	36
4.5.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
4.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	37
4.6 Bestimmung des antimikrobiellen Effektes der PDT	39
4.6.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
4.6.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	44
4.6.3. <i>Candida albicans</i>	48
4.7 Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) der PDT bei ausgewählten Isolaten	51
4.7.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Pigmentmutanten	51
4.7.1.1 Differierende Bestrahlungszeiten	54
4.7.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	57
5. Diskussion	60
5.1 Dunkeltoxizität von Chlorin e6	60
5.2 Lichttoxizität	60
5.3 Bestimmung des antimikrobiellen Effektes der PDT mittels Ce6 und Rotlicht gegen <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61

5.4 Bestimmung des antimikrobiellen Effektes der PDT mittels Ce6 und Rotlicht gegen <i>Staphylococcus aureus</i>	66
5.5 Bestimmung des antimikrobiellen Effektes der PDT mittels Ce6 und Rotlicht gegen <i>Candida albicans</i>	68
5.6 Zukunft der PDT mittels Ce6 und Rotlicht bei mikrobiell induzierten Keratitiden	72
6. Literaturverzeichnis	74
7. Publikationen/Danksagungen	95
7.1 Publikationen	95
7.2 Danksagungen	96
8. Lebenslauf	97

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
ALA	Aminolävulinsäure
bzw.	beziehungsweise
CA	<i>Candida albicans</i>
Ce6	Chlorin e6
Det	Determination
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ex	Extinktion
LED	Light Emitting Diodes
l	Liter
μ	Mikro (10^{-6})
m	Milli (10^{-3})
MBK	Minimale bakterizide Konzentration
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
mol	Molar
MSSA	Methicillin sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
nm	Nanometer
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PDT	Photodynamische Therapie
PMNP	Polymyxinnanopeptid
PS	Photosensibilisator
RLU/RLE	Relative Light Units/Relative Lichteinheit
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
s. o./s. u.	siehe oben/siehe unten

1. Zusammenfassung

Der vermehrte Einsatz von Antibiotika und die damit verbundene Zunahme an Resistenzen macht eine Erweiterung der Therapiemöglichkeiten, insbesondere zur Behandlung durch multiresistente Mikroorganismen hervorgerufener Infektionen, notwendig. Eine vielversprechende Maßnahme ist die Photodynamische Therapie (PDT), die im klinischen Alltag, zum Beispiel in der Dermatologie, schon ihre Anwendung findet. Diese Form der Therapie könnte es möglich machen, auch gegen verschiedene Antiinfektiva resistente Bakterien und Pilze zu eradizieren. Diese Arbeit soll Grundlagen zur Anwendung der PDT bei infektiösen Keratitiden schaffen, deren Ursprung sich in der Besiedelung der Hornhaut mit pathogenen Keimen äußert. Von klinischer Problematik sind hier vor allem multi-resistente Varianten der Bakterienarten *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* sowie der Hefe *Candida albicans*, die vielfach mit den im Klinikalltag verfügbaren Antiinfektiva nicht mehr therapierbar sind.

Die PDT benötigt einen Photosensibilisator (PS), der mittels Lichtenergie angeregt wird, diese Energie auf Sauerstoff zu übertragen vermag und somit reaktive Sauerstoffspezies generiert. Diese können als molekulare toxische Substanzen den Zelltod hervorrufen. Als PS wurde im Rahmen dieser Arbeit das Chlorophyll-Derivat Chlorin e6 (Ce6) verwendet, welches durch Rotlicht aktiviert werden kann. Als Lichtquelle dienten LEDs (670 nm) mit einer Energiedosis (D) zwischen 1,87 J/cm² für eine und 37,2 J/cm² für zehn Minuten Bestrahlungsdauer (t) (Formel: $D = P \times t$, P = Leistungsdichte der Dioden). Für die Testreihen wurden die Bestrahlungszeiten mit einer, fünf und zehn Minuten gewählt, die Inkubationszeiten mit fünf, 15 und 30 Minuten. Für die Aufgabenstellung, nämlich die Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK), das heißt der Ce6/Lichtkombination, die eine Reduktion der bakteriellen Keimlast um mindestens 3 log₁₀-Stufen (≥ 99,9 %) bewirkt, wurden neben Gram-negativen und -positiven Bakterien auch Hefen herangezogen. Die Effektivität des PS wurde über mehrere Konzentrationen (1 - 512 µmol) getestet.

Im Einzelnen wurden von *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *C. albicans* je 20 klinische Isolate untersucht. Orientierend kann gesagt werden, dass die hier getesteten Gram-negativen Bakterien eher unempfindlich gegenüber dieser Therapieform waren, da bei den meisten *P. aeruginosa* Isolaten mit keiner der hier verwendeten PS/Lichtkombinationen eine Reduktion der Keimlast um den Faktor ≥ 3 log₁₀ erreicht werden konnte. Im Gegensatz dazu wiesen einzelne Stämme der getesteten Hefen und alle hier getesteten *S. aureus* Isolate schon bei Konzentrationen unter 100 µM des PS Abtötungsraten von ≥ 99,9 % auf. Die effektivste hier getestete Inkubationszeit lag bei allen getesteten Isolaten bei 30 Minuten, die beste Bestrahlungsdauer lag bei 10 Minuten.

Bei vergleichenden Untersuchungen mit bakteriellen Pigmentmutanten konnte beobachtet werden, dass nicht pigmentierte Bakterien, sowohl Gram-negative, als auch Gram-positive, wesentlich empfindlicher gegenüber der PDT sind.

Auffallend ist, dass die PS-Konzentrationen, die nach 30-minütiger Inkubation in bzw. an den Mikroorganismen gemessen werden konnten, nicht linear zur Abtötungsrate sind. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass sowohl die hier getesteten Hefen als auch die getesteten Gram-negativen *P. aeruginosa* Isolate bei hohen Ce6 Konzentrationen erhöhte Überlebensraten aufwiesen, ein Phänomen, das in der Literatur als „Eagle Effect“ bekannt ist. Dieses Phänomen konnte bei *S. aureus* nicht beobachtet werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen in vitro Befunde unterstreichen das Potential der PDT mittels Ce6 und Rotlicht als alternative Therapieform zur Behandlung von multiresistenten *S. aureus* Isolaten hervorgerufenen Keratitiden fungieren zu können. Sie weisen aber zum anderen auch darauf hin, dass ein Einsatz dieser PS/Lichtkombination zur Behandlung von *P. aeruginosa* und *C. albicans* induzierter Hornhautinfektionen, je nach Stammhintergrund, nicht wirksam sein könnte und das eine Überdosierung des PS vermieden werden sollte.

1. Summary

The frequent usage of antibiotics and the associated increase in multidrug resistant (MDR) microorganisms requires an expansion of our treatment options. One promising novel therapy option against MDR microorganisms is photodynamic therapy (PDT) that is already in clinical use as treatment of actinic keratosis in dermatology. This work aimed at providing a basis for the application of PDT as therapy option against infectious keratitis which is frequently caused by MDR bacterial species such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, and the yeast *Candida albicans*.

PDT requires a photosensitizer (PS), which is excited by light of a certain wavelength to generate reactive oxygen species (ROS) that cause cell death. Here, the efficiency of the photosensitizer chlorin e6 (Ce6) was tested in combination with red light ($\lambda = 670 \text{ nm}$).

A series of tests was performed with irradiation times of one, five and ten minutes, respectively, and incubation times ranging from five to 30 minutes, yielding in absorbed energy doses between 1.86 J/cm^2 and 18.6 J/cm^2 . A total of 20 clinical *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *C. albicans* isolates were used to determine the minimal bactericidal concentration (MBC) of this procedure (i.e. the minimal Ce6/red light combination resulting in a $3 \log_{10}$ reduction in viable cells), and individual microorganisms were tested with several concentrations of the PS ranging from $1 - 512 \mu\text{M}$.

These tests identified that *P. aeruginosa* isolates are rather insensitive to this type of therapy, whereas most of the yeast isolates and all *S. aureus* strains were readily killed by relatively low concentrations of the photosensitizer ($\geq 100 \mu\text{M}$).

A combination of 30 min co-incubation of the photosensitizer with the microorganisms and 10 min of light irradiation proofed to be the most effective protocol in killing the bacteria/yeast cells, while lower irradiation and incubation times had a negative impact on the MBCs. A comparison of bacterial pigment mutants and their corresponding parental strains revealed furthermore that non or low pigmented bacteria were more sensitive to photodynamic inactivation, and this was the case for both Gram-negative and Gram-positive bacteria.

For both *P. aeruginosa* and *C. albicans*, decreased killing efficiencies were noticed with the highest Ce6 concentrations ($512 \mu\text{M}$), if compared to the killing rates seen with lower Ce6 doses. Notably, this phenomenon, known in literature as „Eagle Effect“, was not observed for *S. aureus*.

Taken together, these data suggest that PDT with Ce6 and red light might be a promising new option for the treatment of corneal infections caused by MDR *S. aureus*. However, they also indicate that this therapy option might fail to cure infectious keratitis induced by *P. aeruginosa* and *C. albicans*, depending on the genetical background of the isolates, and that particular care should be taken to avoid an overdosing of the PS when treating the latter types of organisms with this type of therapy.

2. Einleitung

Entzündungen der Hornhaut, sogenannte „Keratitis“, stellen weltweit eine häufige Augenerkrankung dar und bilden damit ein wichtiges Arbeits- und Forschungsfeld innerhalb der Augenheilkunde [1].

2.1 Keratitis

In der Medizin bezeichnet der Begriff „Keratitis“ eine entzündliche Veränderung der Hornhaut, die mit und ohne Beteiligung von Mikroorganismen ausgelöst werden kann. Infektiöse, durch Mikroorganismen verursachte, Keratitiden können dabei durch verschiedene Erreger, wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten hervorgerufen werden und sehr stark in ihrer Ausprägung variieren. Schwere Keratitiden, die unter anderem an der Eindringtiefe des Erregers verifiziert werden, können dabei bis zum Verlust des Sehvermögens führen. In einzelnen Fällen beschränkt sich eine Hornhautentzündung nicht nur lokal auf dieses Organ, da die Mikroorganismen auch das umliegende Gewebe, wie z. B. Tränenwege oder Lider infiltrieren können. Die ersten sich beim Patienten bemerkbar machenden Symptome sind u. a. Schmerzen, Rötung und/oder Lichtphobie.

2.1.1 Anatomische Grundlagen

Die Hornhaut (Cornea) ist aus sechs Schichten aufgebaut, bestehend von außen nach innen aus dem Epithel, der Basalmembran, der Bowman-Membran (Lamina limitans anterior), dem Stroma (Substantia propria), der Descemet-Membran (Lamina limitans posterior) und dem Endothel. Die dickste Schicht (400 - 500 μm) bildet dabei das Stroma, das hauptsächlich aus parallel angeordneten Kollagenfibrillen (Typ 1 Kollagen) besteht. Aus diesem Grund ist die Cornea transparent. Weiterhin macht der speziell strukturierte Aufbau eine Gleichverteilung des Wassergehaltes möglich. Somit hat die Cornea im physiologischen Zustand eine konstante Brechkraft, die bei 43 Dioptrie liegt [2].

Da nur eine intakte Oberfläche in der Lage ist, den Körper optimal vor Infektionen zu schützen, bildet jede Verletzung oder Verminderung der physiologischen Abwehr des Auges, z. B. durch Kontaktlinsen hervorgerufene Mikrotraumen, mechanische Traumata oder eine Immuninkompetenz, sei diese erworben oder angeboren (HIV-Patienten, an Diabetes Mellitus erkrankte Personen oder immunsupprimierte Patienten), eine potentielle Eintrittspforte bzw. Erleichterung für Mikroorganismen, die Cornea eines Wirtes zu kolonisieren und nachfolgend eine Keratitis hervorzurufen.

2.1.2 Keratitiden einzelner Erreger

Abgesehen von den schon erwähnten Risikofaktoren gibt es bei den potentiellen Keratitis-Erregern geographische bzw. klimatische Unterschiede. Je tropischer das Klima, desto höher liegt die Inzidenz von Pilzinfektionen (bis 40 %). In europäischen Breiten hingegen herrschen Infektionen bakterieller Natur vor, wobei ca. 20 % der Keratitiden durch Gram-negative Bakterien verursacht werden, die insbesondere mit schweren Entzündungen der vorderen Augenkammer assoziiert sind. Isolate der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* bilden dabei den dominanten Keim (ca. 60 %), gefolgt von *Serratia* Spezies (ca. 30 %). Der weitaus größere Anteil, rund 80 %, wird jedoch durch Gram-positive Keime hervorgerufen. Als häufigste Erreger konnten hier Koagulase-negative Staphylokokken (ca. 74 %) identifiziert werden, gefolgt von *Staphylococcus aureus* (ca. 12 %) und *Streptococcus pneumoniae* (ca. 5 %). Bei Kontaktlinsen-Trägern hingegen waren beinahe alle Keratitiden (97 %) durch Gram-negative Bakterien, allen voran *Pseudomonas aeruginosa*, verursacht worden. Der Haupterreger bei Gram-positiven Keimen war hier *Staphylococcus epidermidis* [3, 4, 5].

2.1.3 Therapeutische Maßnahmen

2.1.3.1 Konventionelle, antibiotische Therapie

Als derzeitiger Behandlungsstandard einer bakteriell infektiösen Keratitis gilt eine topische Breitband-Antiinfektiva-Anwendung in Kombination mit einer Schmerzlinderung bei ambulanter Behandlung. Bei etwaigen Komplikationen tieferer Augenabschnitte kann bei bakteriellem Befall eine systemische Antibiotikaeinnahme, eine operative Infektsanierung oder auch eine Amnionmembrantransplantation notwendig werden. Ebenso steht es mit einer Pilzinfektion, die vorrangig durch topische bzw. systemische Gabe von Antimykotika behandelt wird [6].

Der merklich angestiegene Antibiotikaeinsatz in den vergangenen Jahren und die damit verbundene Resistenzentwicklung bei Bakterien erfordert jedoch eine kritische Betrachtung der antibiotischen Therapie. Insbesondere die Gruppe der Penicilline wird in Europa insgesamt am häufigsten verabreicht. Hieran schließen sich sowohl die Makrolide als auch die Tetracykline und im Bereich der Krankenhäuser die Cephalosporine und Chinolone an [7].

Nicht nur die Verabreichung von Einzelsubstanzen bzw. von einzelnen Antibiotika-Klassen ist derzeit schon problematisch. Die verstärkte Verabreichung verschiedener Antiinfektiva hat zur Entwicklung von Multiresistenzen, die als MDR („Multi-Drug Resistant“, Definition siehe unten), XDR („Extensive Drug Resistant“) und PDR („Pandrug Resistant“) bezeichnet werden, beigetragen. Daten, die aus verschiedenen Einrichtungen zusammengefasst werden konnten, belegen, dass vor allem die Multiresistenzen bei Gram-negativen Keimen rasant ansteigen, wobei Gram-positive Erreger eher

einen konstanten, nur langsam ansteigenden Trend hinsichtlich der Ausbildung neuer Antibiotikaresistenzen aufweisen [8, 9, 10]. Diese Anpassungsfähigkeit der Mikroorganismen gegenüber der Antibiotikabehandlung zieht therapeutische Konsequenzen nach sich. Um diese Herausforderung zu beherrschen, ist es notwendig, die bakteriellen Veränderungen, die eine Resistenz überhaupt ermöglicht, einzuteilen. Eine verbindliche, Erreger-übergreifende internationale Einteilung ist bisher jedoch noch nicht in Gebrauch. Deshalb gibt es eine unterschiedliche Einordnung von Antibiotikaresistenzen. Diese können je nach Fachrichtung klinisch oder nach ihren funktionellen Charakteristiken, die mit der molekularen Struktur korreliert, insbesondere den Aminosäuren der Enzyme, eingeteilt werden. Hierfür können β -Lactamasen mit der größten und vielseitigsten Gruppe der Carbapenemasen als Beispiel genannt werden [11, 12]. Ein in 2011 veröffentlichter Interimsvorschlag zur klinischen Standarddefinition schlägt folgende Resistenzbegriffe vor: MDR ist eine Resistenz gegenüber mindestens einer Substanz aus drei verschiedenen Antibiotikaklassen, XDR: Resistenzen gegenüber Vertretern fast aller aktuell verfügbaren Antibiotikaklassen; Keime dieser Kategorie sind nur noch gegen Substanzen aus maximal zwei Antibiotikaklassen empfindlich und letztlich noch PDR: Resistenzen gegenüber allen Vertretern aller Antibiotikaklassen [13].

Ähnlich zu der Situation pathogener Bakterien ist auch bei humanpathogenen Pilzen eine Zunahme an Resistenzen gegenüber antimykotisch wirksamen Therapeutika zu verzeichnen. Wurde früher, nach Einführung der antimykotischen Therapie, der Erfolg lediglich an der Gesundheit bzw. an der Genesung des Patienten gemessen, konnte nach Verbesserung der technischen Möglichkeiten, gleich den Bakterien, eine MHK Bestimmung eingeführt werden, die jedoch, je nach Verfahren, signifikante Unterschiede aufwies. Erst im Jahr 1992 hat das NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, heute CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute) Standards für die antimykotische Therapie eingeführt. Die zunehmende Verwendung dieser Therapeutika erhöht jedoch, ähnlich wie bei Bakterien und Antibiotika beobachtet, stetig den Anteil gegenüber diesen Antimykotika resistenter Pilze und fördert zudem auch die Effektivität dieser Resistenzmechanismen innerhalb der Mikroorganismen. Unter anderem können dabei ein vermehrter Efflux dieser Therapeutika, Modifikationen der Zielenzyme, die den hemmenden Einfluss der Antimykotika verringern, aber auch Veränderungen im Metabolismus der Pilze, was u. a. die Aufnahme, die Akkumulation und schlussendlich die Wirkung der Antimykotika auf diese Mikroorganismen beeinträchtigt, aufgezählt werden [14, 15].

2.1.3.1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Diese ubiquitär vorkommende und gerne als „Nasskeim“ bezeichnete Spezies ist eine der drei häufigsten Erreger von opportunistischen Infektionen des Menschen. Besonders immunsupprimierte Patienten mit erworbenen oder angeborenen Erkrankungen (Diabetes mellitus, HIV, rheumatoide

Arthritis, Cystische Fibrose [CF]) weisen eine hohe Gefährdung auf, sich mit dieser Bakterienart zu infizieren. Erkrankungen des Urogenitaltraktes, Bakteriämien oder im Krankenhaus erworbene Pneumonien stellen dabei eine Herausforderung für die Ärzteschaft dar [16, 17].

Steigende Resistenzen gegenüber antibiotischen Therapeutika machen es notwendig, Patientenkohorten zu bilden und hygienische Standards strikt einzuhalten. Als Beispiel seien CF Patienten, antibiotisch vorbehandelte Patienten oder Patienten der Intensivstationen herangezogen, deren Infektionen mit *P. aeruginosa* sich meist durch horizontale Übertragungen innerhalb dieser Patientengruppen ereignen [18, 19].

P. aeruginosa ist auch ein häufiger Verursacher von Keratitiden, vor allem bei Kontaktlinsen-Trägern, dessen Wirkung auf das Auge sowohl invasiv als auch zytotoxisch sein kann. Seine hohe Virulenz im Hinblick auf dieses Krankheitsbild wird unter anderem durch das feuchte Milieu auf der Augenoberfläche begünstigt. Außerdem haftet dieser Keim sehr gut an Plastik und besitzt eine Reihe intrinsischer Resistenzmechanismen gegenüber vielen gebräuchlichen Linsen-Desinfektionsmitteln [20, 21, 22].

Klinische Studien aus der jüngeren Vergangenheit beschreiben einen signifikanten Anstieg von durch Gram-negative Erreger ausgelöste Hornhaut-Infektionen und belegen zudem in diesen Erregern eine Zunahme an verschiedenen Resistenzdeterminanten gegenüber den in der Augenheilkunde üblicherweise verwendeten Antibiotika [23, 24, 25]. Diese alarmierenden Ergebnisse und die biologischen Fähigkeiten dieses Keimes, sich sowohl durch intrinsische Resistenzmechanismen als auch durch horizontale Aufnahme von Resistenzdeterminanten vor einer Vielzahl von im Klinikalltag gebräuchlicher Antibiotika schützen zu können, erfordern mittelfristig die Etablierung neuer Therapieformen [26].

2.1.3.1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken wurden erstmals Ende des 19. Jahrhunderts von dem Schotten Sir Alexander Ogston nachgewiesen [27]. Der klinisch relevanteste Vertreter dieses Genus ist *Staphylococcus aureus*. Dieser Gram-positive Keim ist fakultativ pathogen und als Teil der „Normalflora“ bevorzugt im Nasen-Rachenraum des Menschen zu finden. Insbesondere bei Schwächung des Immunsystems, unter anderem bei viralen Infektionen, Diabetes mellitus, COPD oder Traumata, kann dieser Erreger schwere bakterielle Infektionen wie Endokarditiden, Bakteriämien, Pneumonien und, je nach genetischem Repertoire, auch Toxin-vermittelte Erkrankungen wie das „Scaled Skin“- oder „Toxic Shock“-Syndrom auslösen [28]. *S. aureus* gilt auch als ein wichtiger Verursacher der infektiösen Keratitis [4, 5].

Ähnlich wie für *P. aeruginosa* ist auch für *S. aureus* eine Reihe multiresistenter Varianten bekannt. Die klinisch bedeutendsten Vertreter dieser Gruppe sind die Methicillin-resistenten *S. aurei* (MRSA), die durch die Akquisition eines mobilen genetischen Elements, des *SSCmec*, eine Resistenz gegenüber

allen β -Lactamantibiotika aufweisen. Ursächlich hierfür ist das durch *mecA* kodierte Penicillin-Bindeprotein 2a (auch Pbp2 genannt), das auch in Anwesenheit klinisch relevanter β -Lactamantibiotikaspiegel noch eine Quervernetzung der bakteriellen Zellwand katalysieren kann. Von therapeutischer Relevanz ist, dass die meisten dieser MRSA-Isolate, insbesondere im Krankenhausumfeld, noch weitere Resistenzdeterminanten aufweisen, die sie auch unempfindlich gegenüber vielen anderen Antibiotikaklassen werden lassen [29]. Wiewohl die Prävalenz für MRSA in der Normalbevölkerung in Deutschland noch auf vergleichsweise niedrigem Niveau liegt (1 - 2 %), so ist im Krankenhausumfeld mit 1,5 - 5,8 % ein deutlich höherer Anteil dieses Erregertyps zu verzeichnen [30]. Betrachtet man den Anteil an MRSA an allen untersuchten *S. aureus* Isolaten aus klinisch relevantem Untersuchungsmaterial in Deutschland, so ist gemäß Antimicrobial Resistance Interactive Database (EARS-Net) der Anteil mit 16,1 % für 2011, 12,7 % für 2013 und 11,2 % für 2015 noch deutlich höher anzusetzen, auch wenn hier erfreulicherweise über die letzten Jahre ein rückläufiger Trend zu verzeichnen ist (<http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>). Zur Prävalenz von MRSA in deutschen Augenkliniken kann derzeit nur eingeschränkt eine Aussage getroffen werden, da in den Jahren 2009 bis 2011 nur ein einziges MRSA-Isolat aus dem Bereich der Ophthalmologie an das Nationale Referenzzentrum für Staphylokokken und Enterokokken, Robert-Koch Institut, gesendet wurde [31]. In anderen Ländern (Brasilien, China, Griechenland und USA) erhobene Daten zur Prävalenz von MRSA in bakteriellen Augenisolaten lassen jedoch vermuten, dass der tatsächliche Anteil an MRSA auch in dieser klinischen Disziplin deutlich höher anzusetzen ist, da in diesen Studien in allen prospektiv gesammelten bakteriellen Augenisolaten zum einen *S. aureus* als einer der wichtigsten Erreger identifiziert wurde und zum anderen innerhalb des jeweiligen *S. aureus* Isolatpools MRSA-Raten von 8,4 % bis 44 % detektiert wurden [32, 33, 34, 35].

Eine Eindämmung der Ausbreitung von MRSA im Krankenhausbereich lässt sich nur mittels strenger Vorsichtsmaßnahmen, mitunter durch Patientenisolierung und Bildung von eigenen Patientengruppen, im Sinne einer Quarantäne, bis hin zur Bestätigung der Keimfreiheit realisieren. Finnland, Dänemark oder auch die Niederlande konnten so die MRSA-Prävalenz von bis zu 25 % auf 0,5 - 1 % senken [7, 36].

2.1.3.1.3 *Candida albicans*

Das humane Mikrobiom weist neben Bakterien auch Pilze, insbesondere Hefen, auf [37]. Diese meist harmlosen Kommensalen können unter bestimmten Umständen, sowohl bei immundefizienten als auch bei immunkompetenten Patienten, Infektionen hervorrufen, die systemisch und somit auch lebensgefährlich verlaufen können. Wichtige Kofaktoren für Pilzinfektionen können Infektionen (z. B. HIV mit der damit verbundenen Immunschwäche), Drogenabusus, Verabreichung einer Chemotherapie oder der Einsatz eines Blasenkatheters sein [38, 39, 40].

Einer der wichtigsten pilzlichen Keratitiserreger ist die Hefe *Candida albicans*. Diese auch der menschlichen Normalflora zuzuordnende Hefe ist ein häufiger Besiedler der Schleimhäute, insbesondere der Mundhöhle und/oder des Genitalbereichs [41, 42]. Aufgrund des stetig ansteigenden Gebrauchs von Antimykotika werden bereits seit geraumer Zeit *C. albicans* Isolate beschrieben, die eine erhöhte Toleranz gegenüber diesen Antiinfektiva aufweisen [43]. Die molekularbiologischen Ursachen dieser Resistenzen, vor allem für Azole, sind unter anderem bei Überexpression in den Genen *MDR1* und *CDR1/2* (kodieren für Efflux-Pumpen) und bei Punktmutationen in den Genen *ERG11* und *ERG16* (die je nach Mutation zu einer Überproduktion der Lanosterin-Demethylase bzw. zu Lanosterin-Demethylase-Varianten führen, deren katalytische Aktivität nicht mehr durch Azole inhibiert werden kann) zu finden [44, 45, 46]. Ebenso konnten Resistenz gegen Amphotericin B bei *C. albicans* beschrieben werden [47]. Jüngste Untersuchungen zeigen zudem, dass das Hitzeschockprotein Hsp-21 für die Resistenzbildung von *C. albicans* von Bedeutung ist [48].

Aktuelle Studien zur Resistenzsituation von klinischen *C. albicans* Isolaten in Deutschland zeigen derzeit noch eine insgesamt günstige Resistenzsituation bei invasiven *Candida* Isolaten gegenüber den zugelassenen Erstlinien-Antimykotika [49]. Jedoch belegen die Daten einer gemeinsam in Deutschland und Österreich durchgeführten Multicenter-Studie, dass auch hierzulande bereits 6,8 % und 15,7 % der in dieser Studie getesteten klinischen *C. albicans* Isolate eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Erstlinien-Antimykotika wie Amphotericin B und Flucanazol aufweisen. Erschwerend kommt hier hinzu, dass andere fakultativ humanpathogene *Candida* Arten wie *C. glabrata* und *C. tropicalis* mit 40,6 % und 62,3 % bereits deutlich höhere Resistenzraten gegenüber Flucanazol aufweisen [50]. Auch dieser Trend erfordert, ähnlich der bakteriellen Situation, die Entwicklung neuer Strategien, z. B. tolerante Mikroorganismen erfolgreich zu bekämpfen.

2.1.3.2 Alternative therapeutische Möglichkeiten

Als mögliche Alternative zur konventionellen Behandlung steht die Photodynamische Therapie zur Diskussion, in der photosensible Substanzen in Kombination mit Licht und Sauerstoff reaktive Sauerstoffspezies erzeugen. Eine Variante dieser Therapieform, der Einsatz von Riboflavin und UVA Strahlung (365 nm), wurde bei schweren Keratitiden bereits eingesetzt, ist im klinischen Alltag jedoch noch nicht etabliert. Diese Therapieform, auch als „Collagen Cross-Linking“ (CXL) bezeichnet, wurde ursprünglich in Dresden am Universitätsklinikum Carl-Gustav-Carus dazu entwickelt, durch Festigung der Hornhaut das Fortschreiten des Keratokonus zu vermindern [51]. Der molekularbiologische Ansatz dieser Therapieform ist die verbesserte Interaktion des Kollagens des Stromas der Cornea, welches hauptsächlich (ca. 90 %) aus Typ I Kollagen besteht. Die restlichen Anteile werden von Kollagen Typ III, IV und V gebildet [52]. Untersuchungen der jüngeren Vergangenheit zeigen nun, dass diese Therapie zumindest teilweise auch bei infektiösen Keratitiden wirksam sein kann [53].

Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit für Chlorin e6 und Rotlicht, wurden für CXL bereits erste in vitro Studien sowohl mit Gram-positiven als auch mit Gram-negativen Keimen und mit Hefen publiziert. Unter der Anwendung von Riboflavin und UVA ($\lambda = 365 \text{ nm}$) konnten in Hinblick auf die Abtötung von Bakterien befriedigende Ergebnisse erreicht werden. Die Effektivität gegenüber Hefen war jedoch vermindert bzw. gar nicht vorhanden. *C. albicans* Isolate konnten nur mit vorangegangener Amphotericin B Behandlung und anschließendem CXL abgetötet werden [54, 55].

In der klinischen Anwendung hat dieser Therapieansatz jedoch pikanterweise Komplikationen in Form von infektiösen Keratitiden und subepithelialen stromalen Eintrübungen mit sich gebracht [56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63]. Grund hierfür ist das Prozedere der Therapie, die einen Schwund des Epithels mit nachfolgendem Tragen einer Linse beinhaltet. Aufgrund des relativ geringen Einsatzes des CXL und der bis jetzt nicht ausreichenden Studien (bisher wurden nur einzelne Fallreporte oder Studien mit sehr kleinen Fallzahlen publiziert), bedarf es jedoch noch einiger weiterer Forschungen, Untersuchungen und Studien, um die Effektivität und Sicherheit dieser PDT-Variante nachzuweisen [64].

2.2 Grundlagen der Photodynamischen Therapie (PDT)

Der Ursprung der modernen photodynamischen Therapie geht auf die Jahrhundertwende des 20. Jahrhunderts zurück. Oscar Raab entdeckte als erster die zytotoxische Wirkung von Acridin und Licht auf das Pantoffeltierchen *Paramecium caudatum*. Niels Finnsen wurde 1903 für seine Arbeit im Bereich der photodynamischen Therapie mit Hauptaugenmerk auf das Krankheitsbild Lupus vulgaris mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Auch H. von Tapheimer und A. Jesionek sollen nicht unerwähnt bleiben. Sie haben bereits Anfang des 20. Jahrhunderts Hauttumoren mit Eosin und Licht behandelt und 1907 den Begriff „photodynamisch“ eingeführt [65]. Die physikalischen Grundlagen lieferte A. Jablonski, der dazu folgendes Vorstellungsmodell lieferte [66]:

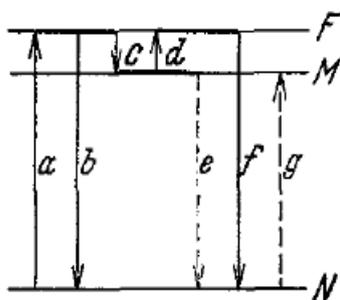


Fig. 1. Das einfachste typische Niveauschema eines phosphoreszenzfähigen Moleküls. *N* Grundniveau, *F* unstabiles, *M* metastabiles Niveau, *a* Absorption, *b* Fluoreszenz, *c* Übergang zum metastabilen Niveau *M*, *d* thermische Erregung, *e* und *f* Phosphoreszenz, *g* Absorption von sehr geringer Intensität.

Abb. 1.01: Jablonski-Diagramm nach [66]

Unter Berücksichtigung der Überlegungen Jablonskis wurde dieses Schema weiterentwickelt und erreichte das folgende vereinfachte Erklärungsmodell.

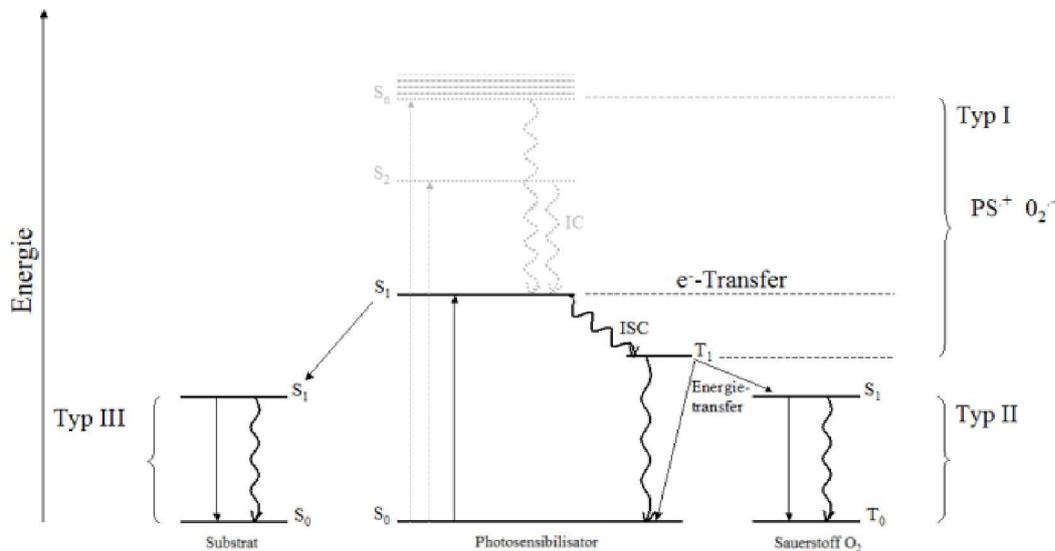


Abb. 1.02: Modifiziertes Jablonski-Diagramm nach Röder. Diese Abbildung zeigt die schematische Darstellung drei verschiedener physikalischer Prozesse bei der Bildung von ROS nach Energiezufuhr, modifiziert nach Röder [67].

Ausgehend vom Grundniveau wird mittels Energie in Form von Lichtphotonen ein Photosensibilisator (PS) auf ein höheres Energieniveau, den ersten angeregten Singulettzustand (S_1), gehoben. Dieser Schwingungszustand ist sehr kurzlebig und der PS fällt schon kurz nach der Anregung wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Hierbei kann die Energie in Form von Fluoreszenz direkt freigesetzt werden, oder über ICS („Intersystem Crossing“) auf einen niedrigeren, aber stabileren, Energiestatus (T_1), den sogenannten Triplet-Status, herabfallen. Das energiegebundene Zeitintervall von T_1 kann Mikro- bis Millisekunden betragen. In der Folge wird entweder durch eine strahlungslose Relaxation der Grundzustand erreicht, oder es findet ein Energietransfer auf molekularen Sauerstoff statt, wodurch hochreaktiver Singulett-Sauerstoff (1O_2) entsteht. Diese Reaktion wird als Typ II-Reaktion bezeichnet und ist maßgeblich von der Sauerstoffverfügbarkeit abhängig [68, 69]. Eine andere Möglichkeit stellt die Typ I-Reaktion dar, die durch direkten Energietransfer, zum Beispiel in Form von Elektronen oder Wasserstoffatomen, vom PS auf molekularen Sauerstoff gekennzeichnet ist und, wie die Typ II-Reaktion, von dessen Verfügbarkeit abhängig ist [70]. Typ III ist eine weitere Möglichkeit der Photoreaktion. Diese Radikalbildung erfolgt jedoch ohne Sauerstoff und hat daher für die PDT wie in dieser vorliegenden Arbeit angewandt keine Bedeutung [71]. 1O_2 und das ebenfalls durch diese Energietransferform entstehende Hydroxylradikal (HO) gehören zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, „Reactive Oxygen Species“) und stellen die eigentlichen Effektormoleküle der photodynamischen Therapie dar. ROS sind Oxidantien, die zum Beispiel mit Phospholipiden der Zellmembran, Nukleinsäuren oder Peptiden interagieren und diese oxidieren und so Zellen schädigen oder sogar deren Zelltod verursachen können [72].

2.3 Photosensibilisatoren

Die Aufgabe eines PS hinsichtlich der Photodynamischen Therapie besteht darin, Energie in Form von Licht aufzunehmen, in chemische Energie umzuwandeln und auf Sauerstoffmoleküle zu übertragen [73]. Die an diese speziellen Moleküle gestellten Ansprüche umfassen unter anderem eine niedrige Dunkeltoxizität aber hohe Phototoxizität, eine leichte Art der Applikation für Arzt und Patient und eine hohe Selektivität im Hinblick auf den zu schädigenden Zelltyp. Aufgrund der Fülle der sich auf dem Markt befindlichen Photosensibilisatoren ist eine Einteilung dieser sinnvoll. Sie können zum Beispiel nach Generationen oder nach ihrer Grundstruktur eingeteilt werden. Eine mögliche Einteilung nach der Entdeckung bzw. Entwicklung umfasst drei Generationen (Tab. 1.01).

Generation	Photosensibilisatoren
erste	Porfimer Natrium (Photofrin®)
zweite	Chlorin e6, Aminolävulinsäure (ALA)
dritte	PS gebunden an die Zielstruktur erkennende Moleküle

Tabelle 1.01: Einteilung von Photosensibilisatoren nach Generationen [74]

2.3.1 Chlorin e6

Der für diese Arbeit verwendete PS Chlorin e6 (Ce6) gehört zur Gruppe der Photosensibilisatoren der zweiten Generation. Es wird aus dem Chlorophyll a der Algenart *Spirulina platensis* synthetisiert. Das von der Firma ApoCare Pharma GmbH, Bielefeld, hergestellte Chlorin Ce6 liegt als Trinatriumsalz, mit einem Molekulargewicht von 662 g/mol vor, und zeichnet sich deshalb durch eine hohe Löslichkeit aus. Die Absorptionsmaxima von Ce6 liegen bei 405 nm (als absolutes Maximum) und 664 nm. Angeregt fluoresziert Ce6 mit einem Emissionsmaximum bei 667 nm in wässriger Lösung. Das zweite Absorptionsmaximum bei 664 nm ermöglicht die Nutzung von Rotlicht für die Aktivierung des PS und damit eine im Vergleich zu Riboflavin, welches bei 365 nm angeregt werden muss, deutlich größere Eindringtiefe ins Gewebe. Chemisch strukturell, vor allem ersichtlich am Tetrapyrrolring, hat Ce6 starke Ähnlichkeit zu Protoporphyrin IX, einer der wesentlichen Vorstufen der Häm-, Cytochrom c und Chlorophyllbiosynthese [74], das ebenfalls als PS Anwendung findet [75].

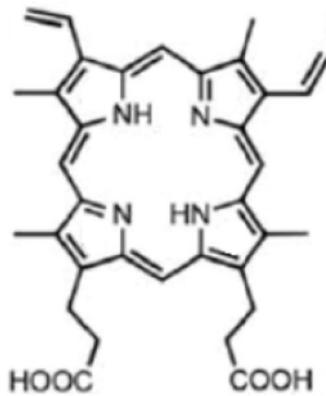


Abb. 1.03 A: Struktur des Protoporphyrins nach [76]

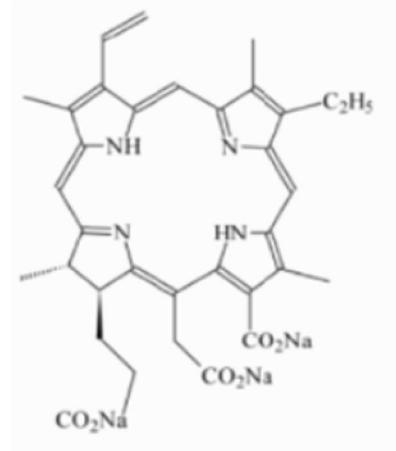


Abb. 1.03 B: Struktur des PS Chlorin e6, ApoCare Pharma GmbH, Bielefeld

2.4 Hämbiosynthese

Der erste Schritt der Hämbiosynthese ist die Synthese der δ -Aminolävulinsäure (ALA, Abb. 1.04).

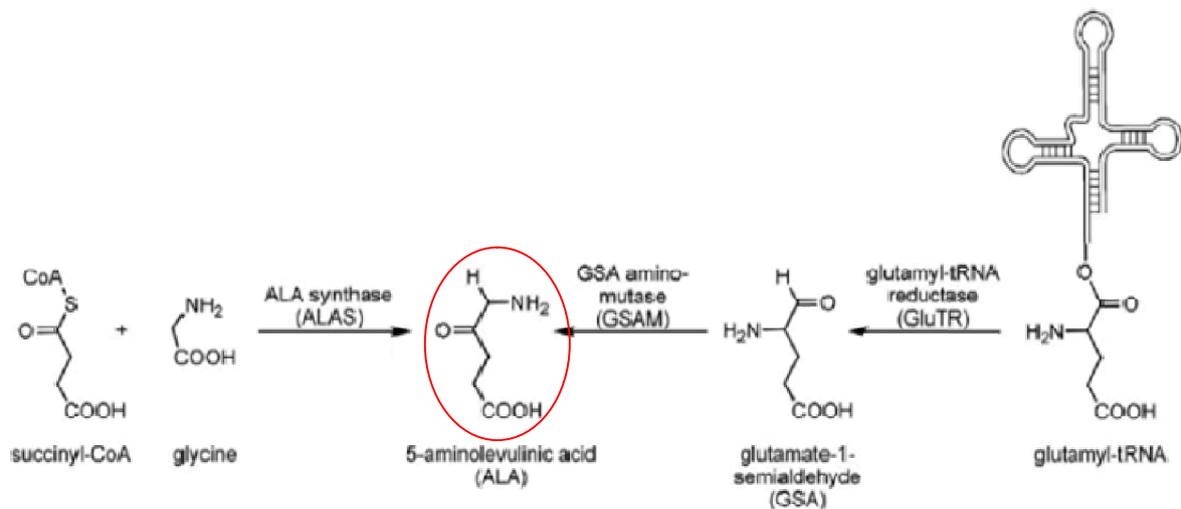


Abb. 1.04: Biosynthesewege von 5-Aminolävulinsäure aus [77]

In humanen Zellen und Pilzen entsteht diese durch Kondensation von Succinyl-CoA und Glycin. Dieser Schritt wird als Shemin-Syntheseweg bezeichnet. Alternativ dazu wird von einigen Bakterien, z. B. auch von *P. aeruginosa* oder von *S. aureus*, der C5- oder Beale-Syntheseweg zur Entstehung von ALA verwendet [78, 79]. Dieser unterscheidet sich vom Shemin-Weg im Wesentlichen durch die verwendeten Substrate, Glutamyl-tRNA und Glutamat-1-Semialdehyd. Als Enzyme für die in Bakterien vorzufindende ALA-Biosynthese werden entweder die ALA-Synthase oder die Glutamyl-tRNA-Reduktase verwendet. Die Biosynthese von ALA ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Entstehung von Häm. Als weitere wichtige Schritte der Hämbiosynthese sei noch die Entstehung von

Uroporphyrinogen III, als erster zyklischer Tetrapyrrolring, und das daraus hervorgehende Häm erwähnt [80, 81].

Das in Häm (Fe^{2+}) oder Hämin (Fe^{3+}) gebundene Eisen stellt eine wichtige Eisenquelle für Bakterien im Wirt dar. Da Häm für Bakterien in größeren Mengen jedoch toxisch wirkt, muss es frühzeitig im Bakterium neutralisiert bzw. eliminiert werden. Dies geschieht zum Beispiel über die Anbindung als Cofaktor an Häm-bindende Proteine, über enzymatischen Abbau, oder über den Export durch ABC-Transporter aus dem Organismus. Die molekularen Mechanismen der Toxizität von Häm sind nicht schlüssig aufgeklärt. Aktuell werden multifaktorielle Prozesse als auch eine direkte Schädigung der DNS favorisiert [82].

2.4.1 Hämaufnahme und -metabolismus in Bakterien und Hefen

Da frei verfügbares Eisen vor allem während der Infektion eines Wirtes nur in geringen Mengen verfügbar ist, verfügen pathogene Bakterien und Hefen in der Regel über komplexe und hocheffektive Systeme, ihrem Wirt Eisen zu entziehen. Beide Entitäten nutzen hierbei im Wesentlichen drei verschiedene Mechanismen, über Transferrin oder Ferritin, über Siederophore, oder über Häm-haltige Moleküle [83]. Da der letztgenannte Aufnahmeweg aufgrund der hohen Ähnlichkeit zwischen Ce6 und Häm für eventuelle Resistenzmechanismen von Bedeutung sein könnte, werden im Nachfolgenden die Mechanismen der Hämaufnahme für die drei im Rahmen dieser Studie untersuchten Arten kurz skizziert.

2.4.1.1 *Staphylococcus aureus*

Zellen der Spezies *S. aureus* sind in der Lage, mithilfe lytischer Enzyme, sogenannter Hämolytine, die Freisetzung von Hämoglobin aus Erythrozyten zu induzieren. Um sich die Eisenquelle Häm dann zu Nutzen machen zu können, hat diese Spezies weitere spezielle Proteine in ihrem Genom kodiert, die zusammenfassend als Isd-System („Iron-Responsive Surface Determinant System“) bezeichnet werden und für die Bindung, den Import und das Herauslösen der Eisenatome aus dem Häm benötigt werden. Ein wichtiger struktureller Bestandteil dieser Proteine ist die NEAT Domäne („Near Iron-Transport Domain“), an welche Hämoglobin bindet [84]. Diese Domäne ist in einer Reihe von intra- und extrazellulären *S. aureus* Proteinen vorzufinden. IsdA, IsdB, IsdC sind in der Zellwand lokalisiert. IsdH, ebenfalls ein in der Zellwand befindliches Protein, bindet mit einer von drei verschiedenen NEAT Domänen Hämoglobin. IsdB fungiert ebenso als Rezeptor [85, 86]. Der IsdDEF-Komplex ist dagegen in der Plasmamembran verankert. Dieser Komplex fungiert als Membrantransporter für die Internalisierung in das Cytoplasma [87]. Letztlich wird das Eisen durch zwei Proteine, IsdI und IsdG, in

Anwesenheit von NADPH und Cytochrom P450 Reduktase, herausgetrennt, sodass beide Bestandteile unabhängig voneinander genutzt werden können. Dieser Vorgang erfolgt intrazellulär [88].

2.4.1.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa verfügt über die Besonderheit, je nach Infektion (akut oder chronisch) über Enzyme die Eisenresorption zu adaptieren [89]. Aufgrund des unterschiedlichen Zellwandaufbaus im Vergleich zu Gram-positiven Bakterien stellt sich die Aufnahme von Häm in *P. aeruginosa* jedoch andersartig dar. Die äußere Lipidmembran macht Rezeptoren, der periplasmatische Raum Transportproteine und die innere Lipidmembran Transporter in das Cytoplasma notwendig. Häm kann in verschiedenen Formen, z. B. als Hämophor oder Siderophor, in das Bakterium gelangen [90]. Hier sollen aber nur die Proteine beschrieben werden, die für den Transport von Häm notwendig sind. In diesem Fall sind dies die *phu* (*P. aeruginosa* haem uptake-proteins)-Operon kodierten Proteine, bestehend aus PhuR, S, T, U, V und W. PhuR ist in der äußeren Lipidmembran lokalisiert und fungiert als Rezeptor, PhuS und T sind Häm-bindende Proteine, wobei sich PhuS im Zytoplasma und PhuT im periplasmatischen Raum befindet. Die drei letztgenannten Proteine, PhuU, V und W, wurden in der inneren Lipidmembran nachgewiesen und fungieren als ATP-abhängige Permeasen [91, 92]. PhuS ist ein Transportprotein, welches das Häm letztlich zu einer Häm-Oxygenase transferiert [93]. In der Literatur sind zwei verschiedene Häm-Oxygenasen, BhpO und PigA, beschrieben, deren wesentlicher Unterschied sich in einem Endprodukt, in der Struktur des Biliverdins (α , β und δ), zeigt [94].

2.4.1.3 *Candida albicans*

Auch *C. albicans* verfügt über die Möglichkeit, mithilfe sekretierter Proteine Erythrozyten zu lysieren und das dabei freigesetzte Hämoglobin als Eisenquelle zu nutzen [95]. Wie auch Bakterien hat diese Spezies eigens codierende Genabschnitte für eisenaufnehmende Proteine. RBT5 und RBT51 sind in der Zellmembran über GPI (Glycosylphosphatidylinositol) verankerte Rezeptoren mit Häm-bindenden Eigenschaften, wobei RBT5 eine sehr viel dominantere Rolle als RBT51 spielt [96]. Diese Rezeptoren sind sehr kurzlebig. Es wird vermutet, dass diese Rezeptoren mit Häm einen Komplex bilden und dieser in proximale plasmamembranständige Vesikel internalisiert und letztendlich zu einer Vakuole transportiert wird [97]. Abschließend trennt eine Hämoxygenase, CaHmx1 (*C. albicans* heme oxygenases), den internalisierten Liganden auf in Kohlenmonoxid, α -Biliverdin und Eisen. [98]. Es sei darauf hingewiesen, dass der Verlauf und die Funktion sämtlicher involvierter Proteine bei der Eisenaufnahme für diese Spezies noch nicht vollständig geklärt ist.

2.5 Anwendungen und Grenzen der PDT

Dass die PDT prinzipiell ein probates Mittel gegen Bakterien und Erkrankungen unterschiedlichster Art darstellt, konnte schon mehrfach dokumentiert werden. Anwendungsbeispiele *in vivo* sind unter anderem chronische Wundinfektionen und mannigfaltige Tumoren in der Dermatologie, Onkologie, Gynäkologie und in der HNO und nicht zuletzt bakterielle Infektionen in der Zahnheilkunde [99, 100, 101, 102, 103].

Leider hat dieser therapeutische Ansatz auch Nachteile, die einerseits den Patienten und andererseits die technischen Grenzen der PDT betreffen. Für den zu Behandelnden sind vor allem die Schmerzen zu nennen, die auch unter Umständen den Einsatz einer Vollnarkose nötig machen. Die größten technischen Herausforderungen liegen in einer Verminderung der Photosensitivität der PS nach Verabreichung und ein Erreichen von größeren Eindringtiefen des PS in das Gewebe. Um die Effektivität dieser Therapieform messen und solide beurteilen zu können, ist es ebenso noch von größter Wichtigkeit, derzeit noch fehlende internationale Standards festzulegen [104, 105, 106, 107].

Folgenden Problemen muss man sich bei dem Einsatz der PDT gegen Bakterien stellen: Die meisten bis dato durchgeführten PDT-Studien zeigen, dass die Abtötung Gram-positiver Keime per PDT weitestgehend - auch unter Anwendung unterschiedlichster PS - erfolgreich ist, während die Bekämpfung Gram-negativer Keime mit dieser Therapieform hingegen vielfach weniger effizient verläuft [108, 109]. Die Gründe hierfür liegen im strukturellen Aufbau der Zellwand, die bei Gram-negativen Bakterien zwei Biomembranen und damit zwei zu überwindende Barrieren umfasst. Weitergehend haben Efflux-Pumpen und die Fähigkeit der Biofilmproduktion seitens der Bakterien einen negativen Einfluss auf den Erfolg der PDT [110]. Die Biofilmsynthese steht unter anderem auch in Abhängigkeit von der Pigmentierung. Außerdem bietet die Pigmentierung der Mikroorganismen vielfach eine verbesserte Abwehr gegenüber oxidativem Stress und damit auch gegenüber den per PDT produzierten ROS [111].

Bei Gram-positiven Keimen zeigten Vergleiche mit nicht-pigmentierten Mutanten und dem Wildtyp bereits einen Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress zugunsten des pigmentierten Wildtyps auf. Zusätzlich dazu sind pigmentierte Varianten einer Bakterienart vielfach virulenter als ihre nicht-pigmentierten Vertreter [112]. Ein Zusammenhang von Pigmentierung und Bewältigung des oxidativen Stresses konnte auch bei Gram-negativen Mikroorganismen nachgewiesen werden [113].

2.6 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Photodynamische Therapie hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit bei bakteriellen und Pilz-bedingten Infektionen getestet werden. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf drei unterschiedlichen Mikroorganismen, *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *C. albicans*, die in unseren Breiten wichtigsten Erreger der bakteriellen bzw. fungoiden Keratitiden.

Im Speziellen soll im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob und wie der PS Ce6 an die verschiedenen Mikroorganismen bindet bzw. durch diese aufgenommen wird. Exemplarisch soll dabei mit einer Auswahl an Isolaten zuerst der Einfluss der Inkubationszeit bei der Anhaftung/Aufnahme des PS durch den jeweiligen Organismus untersucht werden.

Des Weiteren soll der Einfluss verschiedener Belichtungszeiten auf das photochemische Potential des PS auf diese Organismen ermittelt werden.

Die so identifizierte effizienteste Kombination aus Inkubations- und Bestrahlungszeit soll in der Folge an einem Set von je 20 klinischen Isolaten jeder Spezies getestet werden, um der Heterogenität innerhalb der einzelnen Arten Rechnung zu tragen.

Zusätzlich dazu soll im Falle der Bakterien der unterschiedlichen Pigmentierung der Keime Rechnung getragen werden, indem pigmentierte Organismen und deren dazugehörige nicht- bzw. weniger pigmentierte Mutanten getestet werden, um einen möglichen Einfluss der Pigmentierung auf die Effizienz dieser Therapieform zu identifizieren.

Abschließend soll für die einzelnen Arten untersucht werden, ob mithilfe der PDT mittels Ce6 und Rotlicht unter in vitro Bedingungen eine Reduktion der initialen Keimlast um 99,9 % erreicht werden kann.

3. Material und Methode

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platten durchsichtig	Greiner Bio-One GmbH, Germany, Frickenhausen
96-Well-Platten schwarz	Greiner Bio-One GmbH, Germany, Frickenhausen
Agarplatten-Blut (Sheepblood)	Becton Dickinson GmbH, Germany, Heidelberg
Agarplatten-Müller-Hinton	eigene Herstellung
Agarplatten-Sabouraud	eigene Herstellung
Bestrahlungskammer	Frau Carole Simon, Universität Kaiserslautern
Chlorin e6	Firma ApoCare
Centrifuge Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Germany, Frickenhausen
Fluoreszenzmessung, VICTOR	Perkin Elmer (LAS) Germany, Rodgau-Jügesheim
Inkubationsschrank	Kendro Laboratory Products GmbH, Germany
LED Scheinwerfer BL0307-50-45	Fa. King Bright Electronic Europe GmbH, Germany
McFarland-Messgerät	Bio Mérieux GmbH Germany, Nürtingen
Mueller-Hinton-II-Broth	BD Becton, Dickinson and Company, Sparks
PBS	eigene Herstellung
Pipetten	Socorex Isba S. A., Schweiz, Ecublens
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Germany, Frickenhausen
Leucosep Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Germany, Frickenhausen
Sabouraud Bouillon	eigene Herstellung
Software Acolyte	Synbiosis UK, United Kingdom, Cambridge
Sterilbank	Kendro Laboratory Products GmbH, Germany
Verdunkelungsstoffe	Firma Phototec GmbH, Hattingen
Zentrifuge	Eppendorf Deutschland GmbH, Germany, Wesseling-Berzdorf

3.2 LED Bestrahlungskammer

Im Zuge dieses Projektes wurde für die Bestrahlung der Mikroorganismen von der TU Kaiserslautern eine Bestrahlungseinheit entwickelt, gebaut und zur Verfügung gestellt. Dieser Bestrahlungskasten wurde von Frau Carole Simon hergestellt und auf seine Leistungsfähigkeit hin getestet und verbessert [114]. Der Bestrahlungsplatz durfte keine relevanten Temperaturschwankungen aufweisen und musste eine konstante Leistung erbringen. Dies wurde durch die Verwendung spezieller Materialien erreicht.

Ein Spectralonkasten, als diffus reflektierendes Material, war für eine höhere Leistungsdichte notwendig, ebenso wie sieben Hochleistungsdioden (LED 670-66-60) der Firma Roithner, Wien. Die Dioden haben eine Wellenlänge von 670 nm und befinden sich somit im roten Spektralbereich. Aufgrund einer relativen Temperaturkonstante konnte von Frau Simon festgestellt werden, dass es notwendig ist, durchsichtige 96-Well-Platten zu verwenden.

Zusammenfassend hat die TU Kaiserslautern, insbesondere Frau C. Simon, eine Bestrahlungseinheit mit sieben Hochleistungsdioden mit einer Leistungsdichte von $30,6 \text{ mW/cm}^2$ bei 20 Minuten zur Verfügung gestellt. Die Energiedosis berechnet sich aus Leistungsdichte der Dioden multipliziert mit der Bestrahlungsdauer der nach der Formel: $D = P \times t$.

Zusätzlich zur Bestrahlungseinheit wurde ein Spectralonkasten mit einem erhöhten Plexiglasaufbau zur Ablage der 96-Well-Platten mitgeliefert.

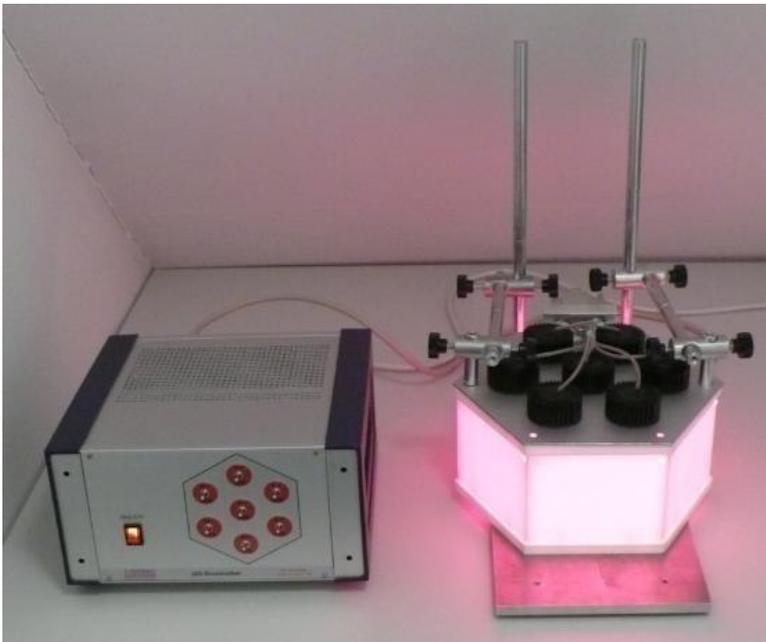


Abb. 3.01: Stromkasten mit Aluminiumplatte samt Leuchtdioden und Bestrahlungsbox aus Spectralon [114]

3.3 Mikroorganismen

Bezüglich der photodynamischen Inaktivierung wurden Mikroorganismen ausgewählt, die im klinischen Alltag, insbesondere auch als Auslöser einer infektiösen Keratitis, bei der es nach herkömmlichem Therapieschema häufig zu einem Therapieversagen kommt, eine entscheidende Rolle spielen.

3.3.1 Verwendete Stämme

Für die vorgelegte Arbeit wurden zur Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) zunächst Stämme der hauseigenen Sammlung verwendet, die folgende Mikroorganismen einschließt: 20 klinische *P. aeruginosa* Isolate, 20 klinische *S. aureus* Isolate und 20 klinische *C. albicans* Stämme. Die Pseudomonaden und Staphylokokken entstammen Patientenabstrichen, die im Rahmen der G.-T.E.S.T.- und T.E.S.T.-Studien am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (IMMH), Universitätsklinken des Saarlandes, gesammelt wurden. Die *C. albicans* Isolate wurden ebenfalls der Stammsammlung des IMMH entnommen und freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. M. Klotz zur Verfügung gestellt. Die Resistenzmuster der verwendeten bakteriellen Isolate sind in der unten stehenden Tabelle 3.01 zusammengefasst:

Spezies/Isolatnr.	Isoliert aus:	Resistenzen ¹
<i>P. aeruginosa</i> ²		
PA 51	Wundabstrich	AT, PM ¹ , TZ ¹
PA 52	Urin	PP
PA 53	Urin	AT ¹
PA 54	Wundabstrich	CI, FM, GMI, LE, NCI, NX
PA 55	Atemwegsmaterial	FM
PA 56	Wundabstrich	NX ¹
PA 57	Wundabstrich	CI, FM, LE, NX
PA 58	Atemwegsmaterial	AK, GM, IP ¹ , NC, PM, PP, PTC, TZ ¹
PA 59	Atemwegsmaterial	FM, GM, IP, MP ¹ , NC, TM
PA 60 ³	Wundabstrich	AT, PM, PP,
PA T16	Intraabdominelles Material	
PA T17	Wundabstrich	FM
PA T18	Atemwegsmaterial	AK, CI, FM, GM, IP, LE, MP, PM, TM
PA T19	Atemwegsmaterial	FM
PA T20	Wundabstrich	FM
PA T21	Atemwegsmaterial	FM, PM ¹
PA T22	Wundabstrich	CI, IP ¹ , LE, NX, TZ ¹
PA T23	Atemwegsmaterial	FM
PA T24	Wundabstrich	FM
PA T25	Intraabdominelles Material	FM
<i>S. aureus</i> ⁴		
MSSA 26 (t008)	Atemwegsmaterial	AM, LE, MX, PG
MSSA 27 (t267)	Wundabstrich	
MSSA 28 (t359)	Wundabstrich	
MSSA 29	Wundabstrich	AM, PG
MSSA 30 (t584)	Wundabstrich	AM, PG
MSSA 31 (txIA)	Wundabstrich	AM, PG
MSSA 32 (t1114)	Wundabstrich	
MSSA 33 (t213)	Wundabstrich	CM, EM, TC
MSSA 34 (t015)	Wundabstrich	AM, PG
MSSA 35 (t608)	Wundabstrich	AM, LE, MX, PG
MRSA 36 (t003)	Wundabstrich	CM, EM, LE, MX, TM
MRSA 37 (t003)	Urin	CM, EM, LE, MX, TM
MRSA 38 (t1079)	Atemwegsmaterial	CM, EM, LE, MX, TM
MRSA 39	Blutkultur	CM, EM, LE, MX, TM

MRSA 40 (t002)	Blutkultur	CI, CM, EM, FM, LE, MX, TC, TM
MRSA 41 (t003)	Wundabstrich	CM, EM, LE, MX, RI, TM
MRSA 42 (t003)	Blutkultur	CI, LE, MX, EM, CM, TM
MRSA 43 (t504)	Wundabstrich	CM, EM, LE, MX
MRSA 44 (t504)	Wundabstrich	CM, EM, LE, MX
MRSA 45 (t037)	Wundabstrich	CM, EM, GM, LE, MX, TC, TM

Tabelle 3.01 : Ursprung und Resistenzmuster der verwendeten Bakterienstämme

¹AB, Ampicillin/Sulbactam; AK, Amikacin; AM, Ampicillin; AT, Aztreonam; CF, Cefaclor; CI, Ciprofloxacin; CM, Clindamycin; CT, Cefotaxim; EM, Erythromycin; ETP, Ertapenem; FM, Fosfomycin; FX, Cefoxitin; GM, Gentamicin; IP, Imipenem, LE, Levofloxacin; MP, Meropenem; MX, Moxifloxacin; NC, Netilmicin; NI, Nitrofurantoin; NX, Norflaxacin; OX, Oxacillin; PG, Penicillin G; PM, Cefepim; PP, Piperacillin; RI, Rifampicin; SXT, Co-Trimoxacol; TC, Tetracyclin; TM, Tobramycin; TX, Ceftriaxon; TZ, Ceftazidim; XL, Amoxicillin/Clavulansäure; XM, Cefuroxim.

²Alle getesteten *P. aeruginosa* Isolate wiesen eine intrinsische Resistenz gegenüber AB, AM, CF, CT, ETP, FX, NI, SXT, TC, TX, XL und XM auf.

³Isolat empfindlich gegenüber AB, AM, CF, CTL, ETP, FX, NI, SXT, TC und XM.

⁴Alle getesteten MRSA Isolate wiesen eine Resistenz gegenüber den hier getesteten β -Laktamantibiotika AB, AM, CT, ETP, IP, MP, OX, PG, PM und XM auf. In Klammern sind die spa Typen der einzelnen Isolate angegeben.

Zur Bestimmung der Unterschiede hinsichtlich der Pigmentierung von Bakterien wurden folgende Stämme verwendet:

Spezies	Genotyp/Phänotyp	Referenz/Quelle
<i>P. aeruginosa</i>		
PA14	Laborstamm; starke Produktion der Pigmente Pyocyanin und Pyoverdin	[115]
PA14 $\Delta phzM$	PA14 <i>phzM</i> Deletionsmutante; keine Produktion von Pyocyanin	M. Schobert
PA14 $\Delta pvdA$	PA14 <i>pvdA</i> Deletionsmutante; keine Produktion von Pyoverdin	M. Schobert
<i>S. aureus</i>		
Newman	Laborstamm; durchschnittliche Pigmentierung	[116]
Newman $\Delta crtM$	Newman <i>crtM</i> Deletionsmutante; keine Pigmentierung	[117]
RN1HG	Laborstamm; starke Pigmentierung	[118]
RN1HG $\Delta sigB$	RN1HG <i>rsbUVW-sigB</i> Deletionsmutante; keine Pigmentierung, reduzierte Stressantwort	M. Bischoff

Tabelle 3.02: Übersicht der verwendeten Mikroorganismen, die in Hinblick auf die Pigmentierung untersucht wurden.

Mit freundlicher Unterstützung von Herrn PD Dr. Max Schobert (TU Braunschweig) ist es gelungen, unterschiedlich pigmentierte Pseudomonaden für die Arbeit zu verwenden. Ausgehend von PA14 (Wildtyp) wurden zwei dazugehörige Mutanten getestet, PA14 $\Delta pvdA$ und PA14 $\Delta phzM$. Diese zeichnen sich durch Mutationen in den für die L-Ornithin N5-Oxygenase (PvdA), bzw. die Phenazin-spezifischen Methyltransferase (PhzM) codierenden Gene aus, sodass von diesen Mutanten kein Pyoverdin bzw. Pyocyanin mehr gebildet werden kann. Pyoverdin gehört zu der Gruppe der Siderophore, die mit hoher Affinität Eisen Fe(III) binden [119, 120]. Phenazine sind redox-aktive

chemische Verbindungen, die unter anderem in der Lage sind, als Elektronen-Donatoren bzw. -Empfänger zu dienen, zur Synthese von Biofilmen beizutragen und als Signalmoleküle für die Genexpression zu fungieren. Durch die Eigenschaft der Synthese von Phenazinen können sich die produzierenden Mikroorganismen einen Vorteil verschaffen und so ihren Lebensraum sichern [121].

Hinsichtlich *S. aureus* konnten alle Stämme, außer die Mutante Newman $\Delta crtM$, die freundlicherweise von Prof. Dr. Andreas Peschel (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt wurde, vom eigenen Institut bezogen werden. Ursprünglich wurde der Stamm „Newman“ von einem Patienten isoliert, der an tuberkulöser Osteomyelitis litt [122]. Fortan wurde dieser Stamm aufgrund seiner hohen Koagulase-Aktivität weltweit in vielen Laboratorien als einer der *S. aureus* Forschungsstämme verwendet, sodass die heute in den Laboratorien Verwendung findende Abkömmlinge besser als Laborstamm beschrieben werden sollten. Der entscheidende Unterschied zwischen Newman und seiner $\Delta crtM$ -Mutante liegt in der Fähigkeit, das Carotenoid Staphyloxanthin zu synthetisieren. Aufgrund des Fehlens des Enzyms „Dehydrosqualene Synthase“, einem zentralen Schritt innerhalb der Staphyloxanthin-Biosynthese von *S. aureus*, ist für die $\Delta crtM$ -Mutante die Herstellung von Staphyloxanthin nicht möglich [123]. Untersuchungen haben gezeigt, dass Staphyloxanthin unter anderem eine protektive Funktion hinsichtlich ROS zeigt, ebenso steigert es die Virulenz der Bakterien [124].

Als weiteres Stammpaar dieser Spezies wurde der Laborstamm RN1HG und dessen $\Delta rsbUVW$ -*sigB*-Mutante für diese Arbeit verwendet. Letzterer Mutante fehlt die Fähigkeit, den alternativen Sigmafaktor σ^B zu produzieren, der sowohl die Stressantwort des Bakteriums als auch dessen Virulenz beeinflusst [125]. *S. aureus sigB* Mutanten weisen ein Defizit hinsichtlich der Pigmentierung auf, die wiederum von der Staphyloxanthin-Produktion abhängig ist [126]. Weitere Unterschiede zwischen Wildtyp und *sigB* Mutanten sind unter anderem bei der Hämolyseaktivität und der Biofilm-Produktion beobachtet worden [127]. Eine Deletion der codierenden Gene, sowohl bei Newman $\Delta crtM$ als auch bei RN1HG $\Delta rsbUVW$ -*sigB*, stellt einen biologischen Nachteil betreffend der Anpassungs- bzw. Überlebensfähigkeit dar.

3.3.2 Kultivierung

Sämtliche Mikroorganismen wurden von Glycerinkulturen oder von Einzelkolonien auf Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Für *C. albicans* wurde Sabouraud-Agar und für *P. aeruginosa* als auch für *S. aureus* wurden Blut-Agarplatten verwendet. Zur dauerhaften Lagerung der Mikroorganismen wurden Kolonien von den Agarplatten geerntet und in 20%iger Glycerin/Mediumlösung in Kryo-Tubes bei -70 °C eingefroren.

3.4 Photodynamische Inaktivierung von Bakterien

3.4.1 Probenvorbereitung

Für die verschiedenen Organismen wurden unterschiedliche Medien verwendet. Bei *S. aureus* wurde mit PBS, bei *P. aeruginosa* wurde mit Müller-Hinton-Bouillon und im Falle von *C. albicans* wurde mit Sabouraud-Bouillon gearbeitet. Mit den Mikroorganismen und dem jeweiligen Medium wurde eine Suspension mit einer Keimdichte von McFarland 2 hergestellt. Dies ergibt in etwa eine Bakterienanzahl von 6×10^8 Kolonie-bildenden Einheiten (KBE)/ml [128]. Alle Schritte, die mit gelöstem Ce6 erfolgten, wurden unter Gelblight ($\lambda = 596 \text{ nm}$) bzw. im Dunkeln durchgeführt, um eine Aktivierung/Bleichung des PS zu verhindern. Für die Erstellung der Ce6 Stammlösung wurden 15 mg Ce6 in 750 μl 0,9%igem NaCl gelöst. Von dieser Suspension wurden 204,8 μl in 2795,2 μl des jeweiligen Mediums gelöst. Hieraus ergab sich eine 30 mM Ce6 Emulsion, von der eine Verdünnungsreihe von 1024 bis 2 μM zu je 600 μl hergestellt wurde. Jeweils 100 μl wurden davon für die Fluoreszenzmessung abgenommen. Zu den verbleibenden 500 μl der Emulsion wurden 500 μl der Mikroorganismensuspension hinzugefügt. Durch die Beimengung der Bakterien bzw. der Hefen halbierte sich die ursprünglich hergestellte Verdünnung nochmals (Abb. 3.03).

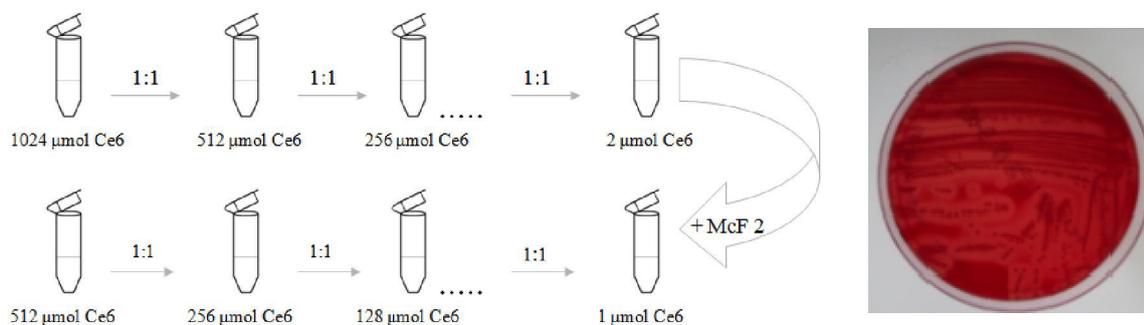


Abb. 3.03: Darstellung der Versuchsanordnung; Herstellung von Verdünnungsreihen von Ce6 mit der Beimengung der Mikroorganismen

Somit ergab sich insgesamt ein Inhalt von 1 ml für jede Konzentration. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (Tab. 3.03) im Dunkeln wurden die Proben zweimalig mit dem jeweiligen Medium gewaschen (Zentrifugation bei 13.600 g für 2 Minuten). Um das Pellet nicht zu verletzen, wurden lediglich 950 μl vom Überstand abgenommen und das Pellet mit der gleichen Menge des jeweiligen Mediums resuspendiert.

Stamm	Inkubationszeiten (in Minuten)	Bestrahlungszeit (in Minuten)	Konzentration
<i>P. aeruginosa</i>			
PA51	30	10	alle
PA53	30	10	alle
PA54	5, 15 und 30	1, 5 und 10	alle
PA52, 55-60 und 16-25	30	10	128 µM
<i>P. aeruginosa</i> (continued)			
PA14	30	5, 10, 20 und 2 x 10	alle
PA14 Δ pvdA	30	10	alle
PA14 Δ phzM	30	10	alle
KI01	30	10	alle
KI10	30	10	alle
<i>C. albicans</i>			
CA11	5, 15 und 30	1, 5 und 10	alle
CA12	30	10	alle
CA13	30	10	alle
CA14 – 30	30	10	32 µM
<i>S. aureus</i>			
RN1HG	30	10	alle
RN1HG Δ sigB	30	10	alle
Newman T.F.	30	10	alle
Newman crtM	30	10	alle
<i>S. aureus</i> (continued)			
MRSA44	5, 15 und 30	1, 5, 10 und 2 x 10	alle
MRSA36	30	10	alle
MSSA26	30	10	alle

Tabelle 3.03: Auflistung der Inkubations- und Bestrahlungszeiten, mit denen die jeweiligen Isolate getestet wurden.

3.4.2 Versuchsaufbau

Der gesamte Versuch inklusive der Probenvorbereitung erfolgte im abgedunkelten Raum mit lediglich zwei LED-Scheinwerfern ($\lambda = 596 \text{ nm}$) mit einer Lichtstärke von 15.000 mcd. Die Durchführung des Versuches erfolgte in einem abgedunkelten Raum ohne direkte Beleuchtung des Arbeitsplatzes.

Von den oben beschriebenen Proben (3.4.1) wurden jeweils 100 µl in zwei durchsichtige 96-Well-Platten pipettiert. Eine der Platten wurde in der Bestrahlungskammer belichtet, die andere wurde für die gleiche Zeitspanne im Dunkeln belassen. In jeder der zwei 96-Well-Platten wurde eine Negativkontrolle ohne Ce6 mitgeführt, die ansonsten gleich behandelt wurde. Die Bestrahlungszeit variierte zwischen einer, fünf, zehn und 20 Minuten. Somit änderte sich auch nach gegebener Formel die Energiedosis ($D = P \times t$) folgendermaßen (Tab. 3.04):

Bestrahlungsdauer	Energiedosis
1 Minute	1,86 J/cm ²
5 Minuten	9,30 J/cm ²
10 Minuten	18,60 J/cm ²
20 Minuten	37,20 J/cm ²

Tabelle 3.04: Energiedosis bei unterschiedlichen Bestrahlungszeiten

Nach der Bestrahlung wurden wiederum Verdünnungsreihen, je nach Mikroorganismus zwischen 10^{-3} bis 10^{-6} , mit jeweils 15 μl der jeweiligen Konzentration und 135 μl Puffer/Medium hergestellt. Davon wurden 100 μl auf Agarplatten per Hand ausplattiert. Folgende Platten wurden verwendet: *S. aureus* - Blut-Agar, *P. aeruginosa* - Müller-Hinton-Agar und *C. albicans* - Sabouraud-Agar. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C für 12 (*S. aureus* Stämme), 24 (*P. aeruginosa* Stämme) oder 36 (*C. albicans*) Stunden.

3.4.3 Bestimmung der Überlebensrate

Nach der Inkubation wurden zur Bestimmung der KBE die Platten mittels des Kolonienzählers „aCOLyte“ (Symbiosis) maschinell ausgezählt. Die Messungen von drei Zählungen pro Platte wurden gemittelt. Durch die Bildung eines Quotienten aus der KBE der jeweiligen Konzentration X geteilt durch die KBE der Ce6-freien Negativkontrolle X_0 für die bestrahlten Proben wurde die relative Überlebensrate bestimmt (X/X_0). Mittels Multiplikation mit dem Faktor 100 erfolgte die Darstellung der relativen Überlebensrate in Prozent im Vergleich zur PS-freien Kontrolle.

3.5 Fluoreszenzspektroskopische Messverfahren

3.5.1 Chlorin e6 Detektion

Um indirekt die Aufnahme bzw. Akkumulation des Ce6 an/in die Zelle zu bestimmen, wurden die Bakterienlösungen nach der Inkubation mit dem PS abzentrifugiert. Von dem dadurch entstandenen Überstand wurden für jede Konzentration 100 μl abgenommen und in eine schwarze, undurchsichtige 96-Well-Platte pipettiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimalig mit jeweils 900 μl des entsprechenden Mediums durchgeführt, wobei der Überstand nach dem zweiten Waschvorgang komplett verworfen wurde. Nach letztmaliger Resuspension wurden ebenfalls 100 μl für die Fluoreszenzmessung abgenommen.

Für die Nullkontrolle wurde ausschließlich das Medium gemessen. Dieser Wert wurde von den Werten der jeweiligen Ce6 Probe subtrahiert.

Somit ergaben sich für die Fluoreszenzmessung insgesamt 3 Messungen (siehe Abbildung 3.04). Die Messungen erfolgten mit dem Microtiterplattenleser VICTOR² bei 642 nm für 0,1 s nach Anregung mittels Blaulicht ($\lambda = 405 \text{ nm}$).

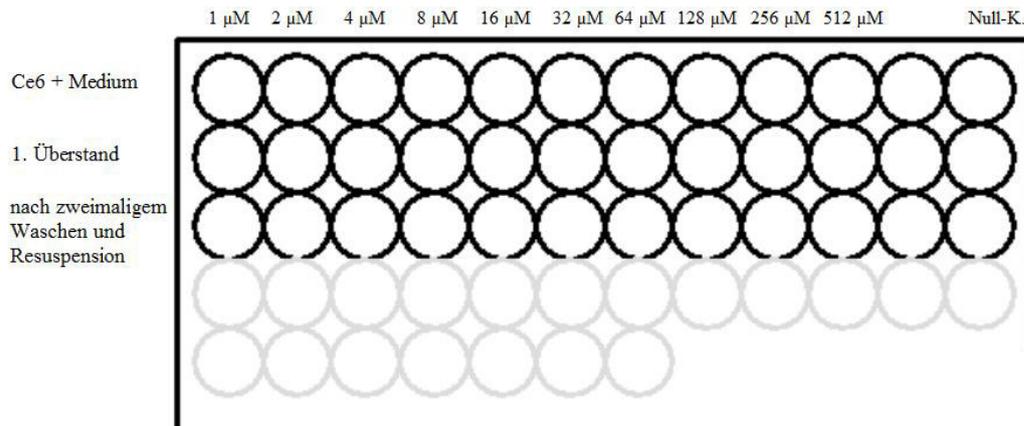


Abb. 3.04: Pipettierschema zur Bestimmung des Ce6-Gehalts in/an den Bakterien und den Überständen per Fluoreszenzmessung

3.6 Statistische Auswertung der Daten

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe des GraphPad Software Pakets Prism (Version 6.01) durchgeführt. Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Vergleiche zwischen drei und mehr Gruppen wurden per zweiseitigem ANOVA (Analysis of Variance), gefolgt von einem Holm-Sidak Post-hoc Test, analysiert. *P*-Werte < 0,05 wurden als signifikant eingestuft.

4. Ergebnisse

4.1 Korrelation des McFarland mit der Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE)

Die Verwendung von optischen Dichtemessungen ist in der Mikrobiologie eine gebräuchliche Vorgehensweise, mit einem relativ geringen Aufwand Zellsuspension mit vergleichbaren Zellzahlen herzustellen. Eine Variante ist hierbei die Nutzung eines McFarland Trübungsstandards (McF). Ein McF von 2 entspricht hierbei für das Bakterium *Escherichia coli* einer Zellzahl von 6×10^8 KBE/ml [129]. Da für die hier getesteten Mikroorganismen jedoch keine verlässlichen Daten zur Korrelation von McF 2 und der tatsächlichen Anzahl an KBE/ml existieren, wurde in einem ersten Schritt die KBE/ml Raten für McF 2 Lösungen nach Durchlaufen des PDT Prozederes für *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *C. albicans* bestimmt (Abb. 4.01).

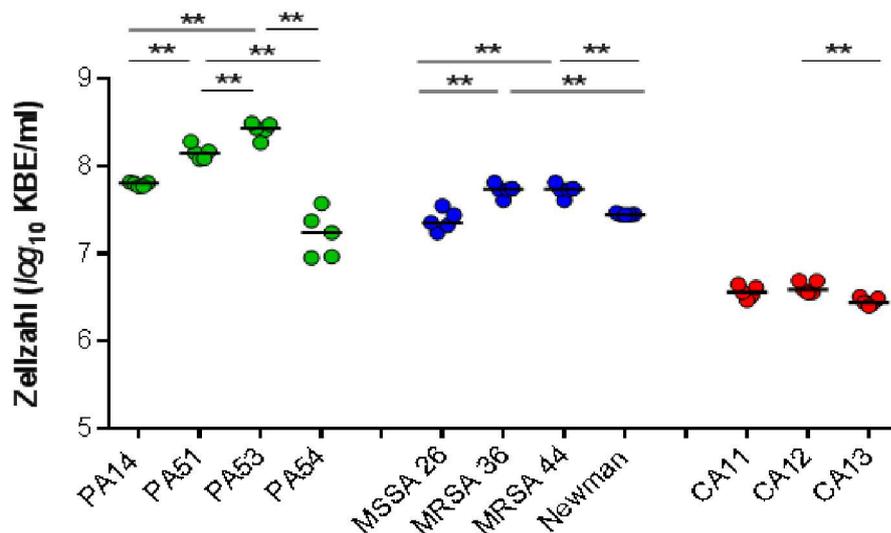


Abb.4.01: Korrelation der McF 2 Lösungen mit der Anzahl der KBE/ml. McF 2 Zellsuspensionen von *P. aeruginosa* (grün), *S. aureus* (blau) und *C. albicans* (rot) wurden 1:1 mit Medium gemischt und nachfolgend für 30 min im Dunklen inkubiert. Die Bakterien- bzw. Hefezellsuspensionen wurden im Anschluss 2 x gewaschen, seriell mit Medium bzw. Puffer verdünnt und auf geeignete Agarplatten ausgestrichen, die für 12 - 36 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Dargestellt sind die Messwerte der einzelnen Isolate aus fünf unabhängigen Versuchen. Die Mediane der entsprechenden Isolate sind als horizontale Balken eingezeichnet. **, $P < 0.01$ (ANOVA).

Überraschenderweise zeigten sich hier sowohl zwischen den Arten als auch innerhalb einer Art zum Teil signifikante Unterschiede. So wurde für *P. aeruginosa* im Mittel aus einer McF 2 Lösung nach Durchlaufen des PDT Prozederes (30 Minuten Inkubation im Dunkeln plus 2 x Waschen der Bakterien mit Medium) $1,1 \times 10^8 \pm 9,4 \times 10^7$ KBE/ml identifiziert. Innerhalb der Art variierten die KBE Werte jedoch markant. So zeigte das Isolat PA54 mit $1,9 \times 10^7 \pm 1,2 \times 10^7$ KBE/ml die niedrigsten KBE Werte der hier getesteten *P. aeruginosa* Isolate, während PA53 mit $1,5 \times 10^8 \pm 9,7 \times 10^7$ KBE/ml die höchsten KBE Werte aufwies. Bei *S. aureus* McF 2 Lösungen wurden bei gleichem Prozedere im Mittel nur $3,1 \times$

$10^7 \pm 1,6 \times 10^6$ KBE/ml vorgefunden. Auch hier variierten die KBE Werte zum Teil signifikant zwischen den einzelnen Isolaten. So zeigte das Isolat MRSA 36 mit $1,8 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$ KBE/ml im Mittel die niedrigsten KBE Raten, während für MRSA 44 mit $5,4 \times 10^7 \pm 8,6 \times 10^6$ KBE/ml die höchsten KBE Werte ermittelt wurden. McF 2 Lösungen der Hefe *C. albicans* wiederum wiesen im Vergleich der Arten untereinander die geringsten KBE Werte auf, die nach Durchlaufen des PDT Prozederes bei $3,6 \times 10^6 \pm 7,6 \times 10^5$ KBE/ml lagen. Innerhalb der Art zeigte sich zwischen CA12 und CA13 ebenfalls ein signifikanter Unterschied in den KBE Raten. Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass McF 2 Lösungen sowohl zwischen verschiedenen Arten als auch innerhalb einer Art markante Unterschiede in der Anzahl an KBE/ml aufweisen können.

4.2 Dunkeltoxizität

Ziel dieser Untersuchungen war es, herauszufinden, ob der PS Ce6 auch ohne Verbindung mit Lichtenergie antimikrobiell wirkt. Um dies zu testen, wurden pro Art je drei Isolate über sämtliche getesteten Konzentrationen für 30 Minuten mit Ce6 inkubiert, aber nicht belichtet (Abb. 4.02).

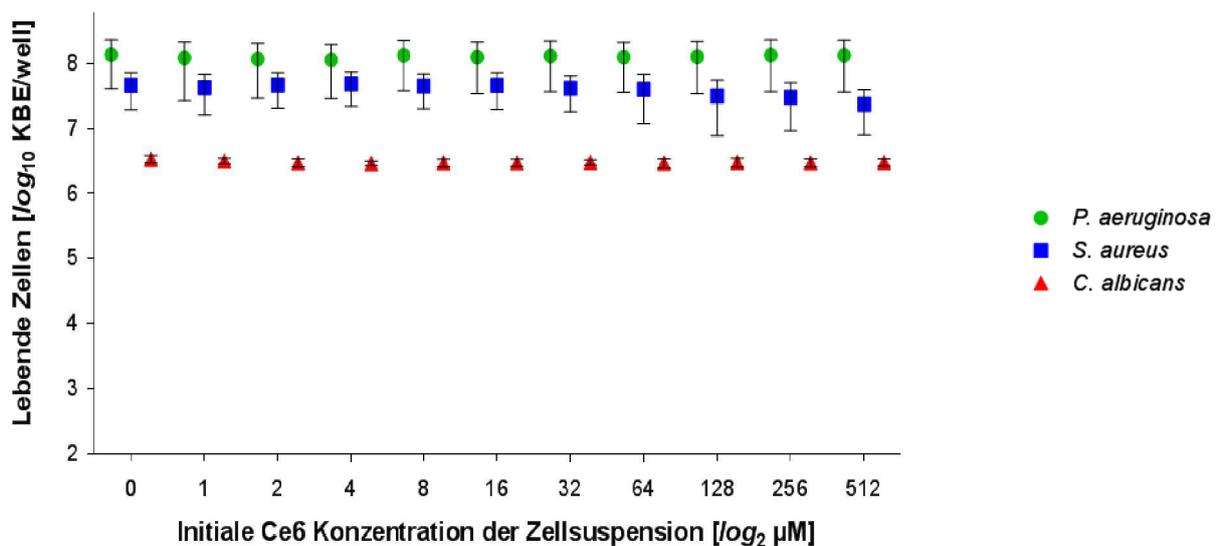


Abb. 4.02: Dunkeltoxizität des PS Ce6 auf *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *C. albicans*. McF 2 Zellsuspensionen von je drei *P. aeruginosa* (grün), *S. aureus* (blau) und *C. albicans* (rot) Isolaten wurden 1:1 mit Ce6 Lösungen (2 - 1024 μM) gemischt und nachfolgend für 30 min im Dunklen inkubiert. Die Bakterien- bzw. Hefezellsuspensionen wurden im Anschluss seriell mit Medium bzw. Puffer verdünnt und auf geeignete Agarplatten ausgestrichen, die für 12 - 36 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Bei keiner der getesteten Konzentrationen und Inkubationszeiten konnte eine signifikante Abnahme an lebenden Zellen beobachtet werden, auch wenn für *S. aureus* bei den höchsten Ce6 Konzentrationen (256 und 512 μM) im Mittel Reduktionen der KBE Raten um $45 \pm 29 \%$ und $56 \pm 33 \%$ zu beobachten waren. Daraus kann gefolgert werden, dass Ce6 in Abwesenheit von aktivierendem

Licht in den hier getesteten Konzentrationen (1 - 512 μM) in keinem therapeutisch relevanten Maße toxisch auf diese Mikroorganismen wirkt.

4.3 Einfluss der Belichtung auf die Lebendkeimzahl der Proben

Um etwaige cytotoxische Effekte der Lichtdosen feststellen zu können, mit denen die Mikroorganismen im Rahmen dieser Arbeit bestrahlt wurden, wurden sowohl bei den belichteten als auch bei den unbelichteten Proben je eine Nullkontrolle ohne Ce6 mitgeführt und die Nullkontrollen der beiden Proben miteinander verglichen (Abb. 4.03).

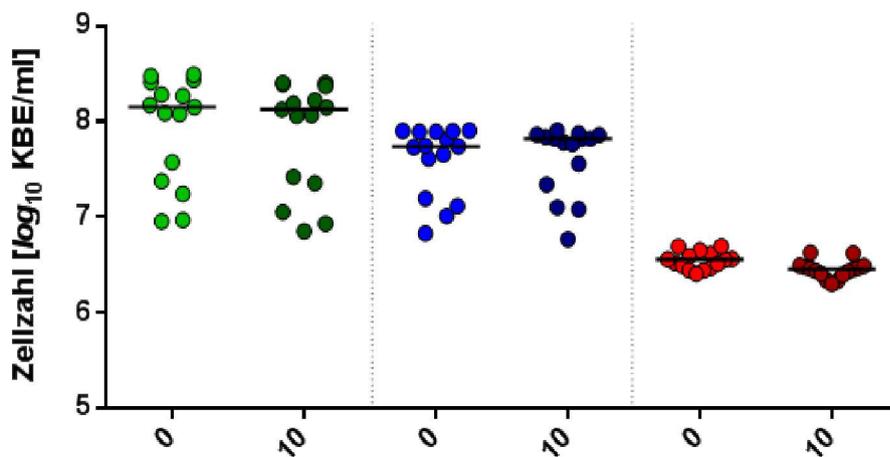


Abb. 4.03: Toxizität der verwendeten Lichtdosen auf *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *C. albicans*. McF 2 Zellsuspensionen von je drei *P. aeruginosa* (grün), *S. aureus* (blau) und *C. albicans* (rot) Isolaten wurden 1:1 mit Puffer oder Medium gemischt und nachfolgend für 30 min im Dunklen inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellsuspensionen entweder für 10 min im Dunklen gehalten (0) oder für 10 min mit Rotlicht der Wellenlänge 670 nm (10) bestrahlt. Die Bakterien- bzw. Hefezellsuspensionen wurden nachfolgend seriell mit Medium bzw. Puffer verdünnt und auf geeignete Agarplatten ausgestrichen, die für 12 - 36 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Dargestellt sind die Messwerte der einzelnen Isolate aus fünf unabhängigen Versuchen. Die Mediane der entsprechenden Gruppen sind als horizontale Balken eingezeichnet.

Bei keiner der hier getesteten Bakterien- bzw. Pilzisolat konnte ein signifikanter Unterschied in den Lebendkeimzahlen zwischen unbelichteter und belichteter Probe bei der höchsten hier verwendeten Lichtdosis (18,60 J/cm^2) ermittelt werden, sodass ebenfalls davon ausgegangen werden darf, dass die hier getesteten Lichtdosen, ebenso wie Ce6 alleine, keinen relevanten Einfluss auf die Vitalität der Isolate ausübten.

4.4 Fluoreszenzmessungen

Um zu eruieren, wieviel Ce6 nach der Inkubation durch die Bakterien und Hefezellen adsorbiert bzw. aufgenommen wurde, wurden Fluoreszenzmessungen mit einem Microplate Reader, VICTOR² der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Da uns eine direkte Messung der angeregten Photonen nicht möglich war, wurde der Ce6 Gehalt anhand des Fluoreszenzsignals bei 642 nm nach Anregung mit einer

Wellenlänge von 405 nm als relative Lichteinheiten (rlu; Relative Light Units) ermittelt. Hierfür wurde zum einen das Fluoreszenzsignal des Ce6-haltigen Mediums vor Inkubation bestimmt, zweitens der erste Überstand nach der ersten Zentrifugation analysiert und drittens das Fluoreszenzsignal des Zellpellets nach zweimaliger Resuspension in Puffer bzw. Medium ermittelt. Die so erhaltenen Fluoreszenzkurven werden beispielhaft nur für das *S. aureus* Isolat MSSA 26 gezeigt (Abb. 4.04).

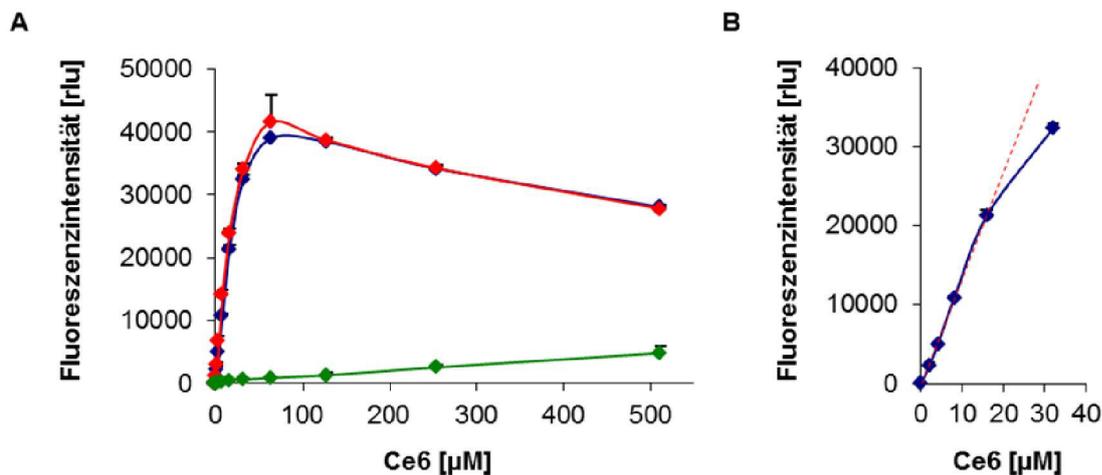


Abb. 4.04: Fluoreszenzsignale der Ce6-haltigen Lösungen nach Anregung bei 405 nm **A)** 100 µl des Ce6 haltigen Mediums (0 - 512 µM Ce6) vor Zugabe der McF 2 Lösung des *S. aureus* Isolates MSSA 26 (blaue Linie), des Überstandes nach Inkubation mit den Bakterien für 30 min (rote Linie) sowie der Ce6-behandelten Bakterienlösung nach zweimaligem Waschen mit Medium (grüne Linie) wurden in eine schwarze Mikrotiterplatte mit durchsichtigem Boden pipettiert und das Fluoreszenzsignal der Proben nach Anregung bei 405 nm bei einer Wellenlänge von 642 nm für 0,1 s ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Lichtsignale als relative Lichteinheiten (rlu) von fünf biologisch unabhängigen Wiederholungen \pm Standardabweichungen. **B)** Fluoreszenzsignale der Ce6 haltigen Arbeitslösungen von 0-32 µM. Die Trendlinie ist als rot gestichelte Linie eingezeichnet.

Aus Abbildung 4.04 ist zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal der Ce6 Arbeitslösungen (blaue Linie) und des ersten Überstandes nach Inkubation mit den Mikroorganismen (rote Linie) in den unteren Konzentrationsstufen bis zu einem Ce6 Gehalt von 64 µM stetig zunimmt, um dann bei Konzentrationen ≥ 128 µM wieder leicht abzunehmen. Die beobachtete Abnahme an rlu bei den höheren Konzentrationsstufen ist dabei sehr wahrscheinlich auf einen Abschattungseffekt zurückzuführen, der möglicherweise noch durch limitierende Mengen an Sauerstoff verstärkt wird. Anhand der in Abbildung 4.04B dargestellten höheren Auflösung der niedrigen Ce6 Arbeitslösungen ist jedoch zu erkennen, dass der Anstieg des Fluoreszenzsignals nur in den unteren Ce6 Konzentrationsstufen (1 - 16 µM) weitestgehend linear verläuft. Bei den mit Ce6 inkubierten Bakterienzellen (grüne Linie) hingegen ist über den gesamten Konzentrationsbereich eine stetige Zunahme der Fluoreszenzsignale zu verzeichnen (Abb. 4.04A).

Bei allen drei Spezies zeigte sich zudem, dass bei den ersten Überständen leicht, aber reproduzierbar höhere Werte ermittelt wurden als bei den Ce6-haltigen Medien, obwohl diese mehr Ce6 enthalten sollten als die Überstände. Die Gründe dafür konnten nicht eingehend untersucht werden. Ursächlich

könnte jedoch zum einen der Sauerstoffgehalt in den Proben sein, da davon ausgegangen werden darf, dass aufgrund der unterschiedlichen Inkubations-/Arbeitsschritte verschiedene Mengen an Sauerstoff in den drei Probenarten für den Photosensitizer verfügbar sind und der Sauerstoffgehalt einen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal ausübt [130]. Des Weiteren ist für hohe PS-Konzentrationen bekannt, dass es zu Abschattungseffekten kommen kann, die dazu führen, dass in der Summe weniger PS angeregt wird.

Bei den getesteten Bakterien konnte zudem beobachtet werden, dass über alle Konzentrationen hinweg nur ein vergleichsweise geringer Anteil des Ce6 aufgenommen bzw. adsorbiert werden konnte. Die erhaltenen Werte der tatsächlichen Aufnahme/Adsorption an der Zellwand von Ce6 der jeweiligen Mikroorganismen bei entsprechender Konzentration wurden, nach Substraktion der Fluoreszenzwerte der Nullkontrolle, rechnerisch in Relation zur Kalibrierungsgrade der Fluoreszenzintensität der entsprechenden Ce6 Lösungen ermittelt. Dies ist exemplarisch in Abb. 4.05 für das *P. aeruginosa* Isolat PA54 dargestellt.

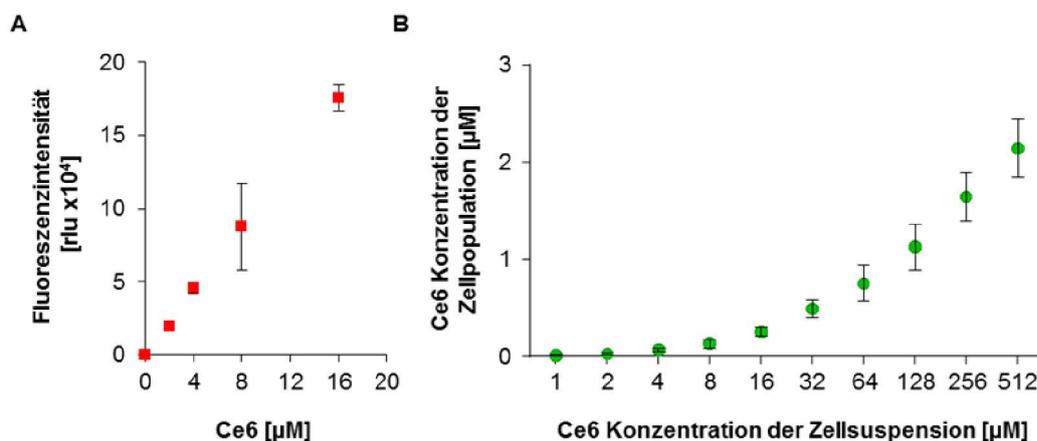


Abb. 4.05: Aufnahme/Bindung von Ce6 an/in *P. aeruginosa* des Isolates PA54 in Abhängigkeit der Ce6 Konzentration. A) Fluoreszenzsignale der seriell verdünnten Ce6 Lösungen nach Anregung mit Blaulicht ($\lambda = 405 \text{ nm}$). **B)** McF 1 Lösungen wurden für 30 min mit den eingezeichneten Ce6 Konzentrationen inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden im Anschluss 2 x mit Medium gewaschen, um ungebundenes Ce6 zu entfernen und im Anschluss der Ce6 Gehalt der Proben per Fluoreszenzmessung in Relation zur dargestellten Kalibrierungskurve (A) ermittelt. Die Messungen repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchsreihen.

4.4.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Um etwaige Unterschiede in der Ce6 Adsorption/Aufnahme in *P. aeruginosa* Isolaten zu identifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch für die klinischen *P. aeruginosa* Isolate PA51, PA53 und PA54 die zuvor beschriebenen Fluoreszenzmessungen durchgeführt (Abb. 4.06).

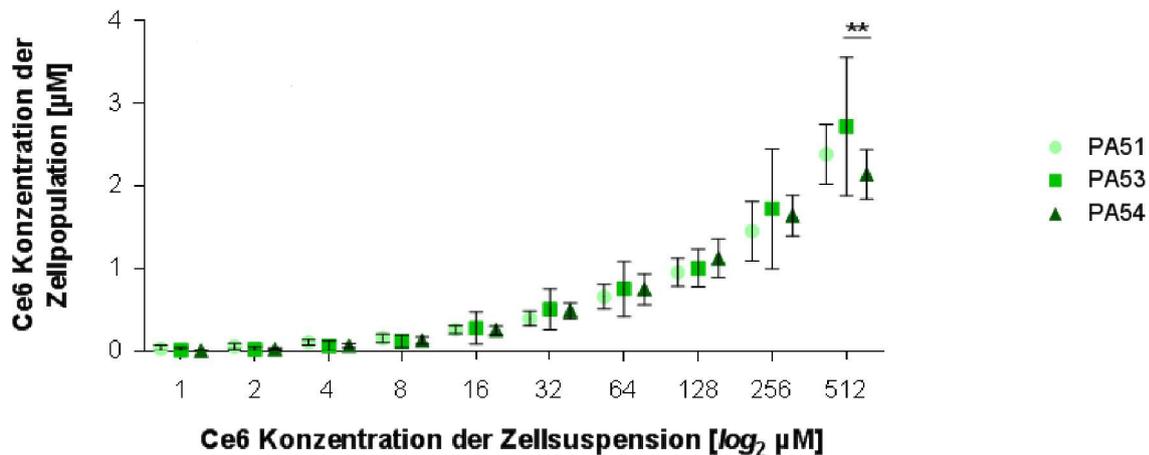


Abb. 4.06: Aufnahme/Bindung von Ce6 an/in *P. aeruginosa* in Abhängigkeit der Ce6 Konzentration. McF 2 Lösungen der *P. aeruginosa* Isolate PA51 (hellgrün), PA53 (mittelgrün) und PA54 (dunkelgrün) wurden 1:1 mit den Ce6 haltigen Arbeitslösungen (2 - 1024 μM) gemischt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden im Anschluss 2 x mit Medium gewaschen, um ungebundenes Ce6 zu entfernen und in einem gleichen Volumen an Medium resuspendiert. Der Ce6 Gehalt der Proben wurde nachfolgend anhand der Fluoreszenzsignale in Relation zur Kalibrierungskurve zu dieser Versuchsreihe ermittelt. Die Messungen repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchsreihen. **, $P < 0.01$ (ANOVA)

Hier zeigten sich bei nahezu allen getesteten Ce6 Konzentrationen (1 - 256 μM) für die drei *P. aeruginosa* Isolate ähnlich hohe Ce6 Akkumulationsraten. Einzig bei der höchsten hier getesteten Ce6 Konzentration (512 μM) wies das *P. aeruginosa* Isolat PA53 eine signifikant höhere Ce6 Akkumulationsrate als PA54 auf, die aber bei dieser Konzentration im Vergleich zu der Ce6 Akkumulationsrate von PA51 nicht signifikant war. Dies lässt vermuten, dass klinische *P. aeruginosa* Isolate keine größeren stammspezifischen Unterschiede bei der Ce6 Aufnahme/Bindung aufweisen.

4.4.1.1 Differierende Inkubationszeiten

Da die Stoffaufnahme unter anderem von dessen Kontaktzeit und der Konzentration abhängig sein kann, wurde in einem zweiten Schritt der Einfluss der Inkubationszeit auf die Aufnahme/Bindung von Ce6 an PA54 untersucht (Abb. 4.07). Überraschenderweise zeigte sich hier, abhängig von der Ce6 Konzentration, ein zweigeteiltes Bild. Während bei den niedrigen Ce6 Konzentrationen ($\leq 32 \mu\text{M}$) keine wesentlichen Unterschiede in den Ce6-Akkumulationsraten an/in PA54 in Abhängigkeit der Inkubationszeit beobachtet wurden, so war dies bei höheren Ce6 Konzentrationen (64 - 256 μM) nicht der Fall. Bei diesen Konzentrationen wurden bei den bakteriellen Zellsuspensionen, die für 30 Minuten mit dem PS inkubiert wurden, signifikant höhere Fluoreszenzsignale erhalten als bei den Zellsuspensionen, die für fünf bzw. 15 Minuten mit dem PS in Verbindung gebracht wurden. Bemerkenswerterweise setzte sich dieser Trend aber nicht bei der höchsten hier getesteten Ce6 Konzentrationen (512 μM) fort, in der für alle Inkubationszeiten wieder ähnlich hohe Lichtemissionsraten detektiert wurden. Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass die Ce6

Akkumulationsfähigkeit von *P. aeruginosa* ab einem gewissen PS Schwellenwert über die Zeit steigerbar ist.

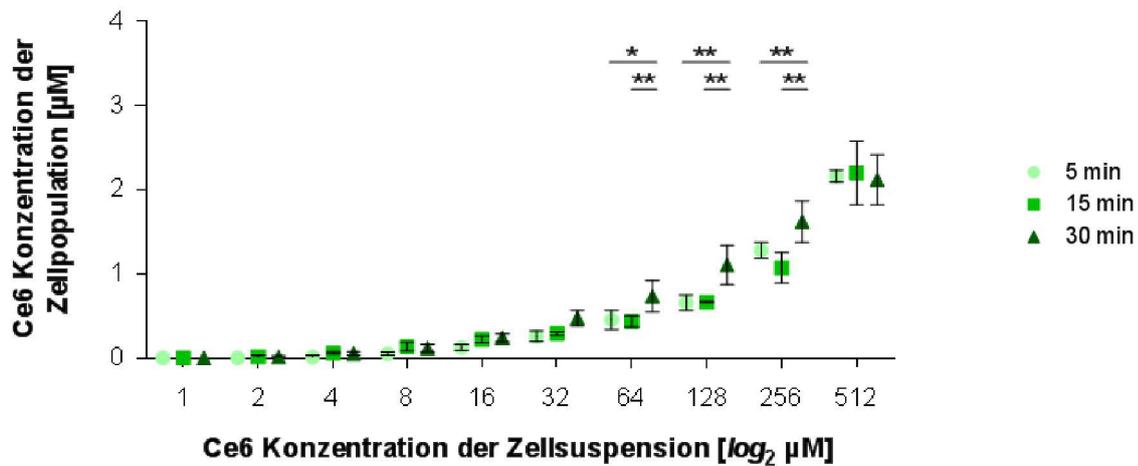


Abb. 4.07: Einfluss der Inkubationszeit auf die Aufnahme/Bindung von Ce6 an/in *P. aeruginosa* in Abhängigkeit der Ce6 Konzentration. McF 2 Zellsuspensionen des *P. aeruginosa* Isolats PA54 wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen (2 - 1024 μM) gemischt und für fünf (hellgrün), 15 (mittelgrün) oder 30 min (dunkelgrün) im Dunklen inkubiert. Die Zelllösungen wurden im Anschluss 2 x mit Medium gewaschen, um ungebundenes Ce6 zu entfernen und im Anschluss der Ce6 Gehalt der Proben per Fluoreszenzmessung in Relation zur jeweiligen Kalibrierungsgrade ermittelt. Die Messungen repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchsreihen. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (ANOVA)

4.4.2 *Staphylococcus aureus*

Wie zuvor für *P. aeruginosa* beschrieben, wurde ebenfalls für *S. aureus*, exemplarisch an den Isolaten MSSA26, MRSA36 und MRSA44, die speziesspezifische Anbindung von Ce6 an die Bakterienzelle in Abhängigkeit der Ce6 Konzentration getestet (Abb. 4.08).

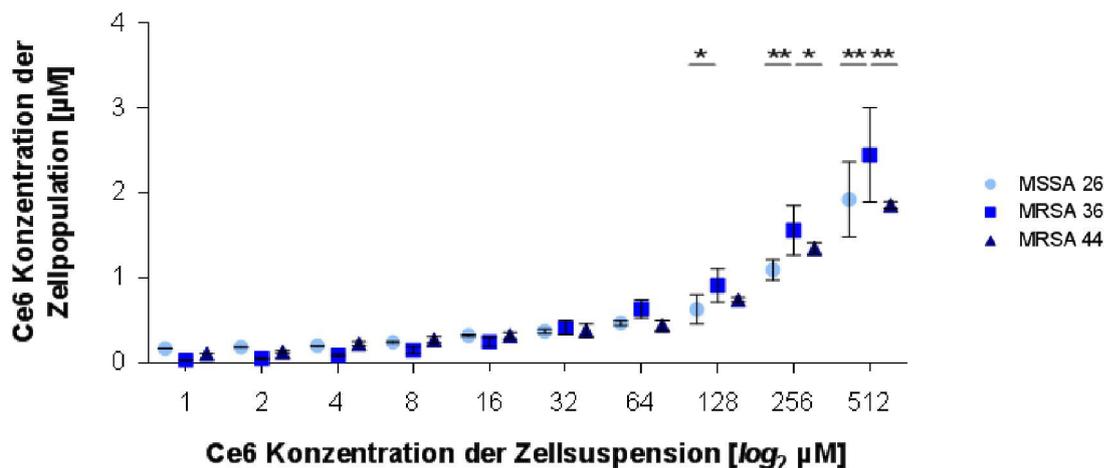


Abb. 4.08: Aufnahme/Bindung von Ce6 an/in *S. aureus* in Abhängigkeit der Ce6 Konzentration. McF 2 Zellsuspensionen der *S. aureus* Isolate MSSA26 (hellblau), MRSA36 (mittelblau) und MRSA44 (dunkelblau) wurden 1:1 mit den Ce6 haltigen Arbeitslösungen (2 - 1024 μM) gemischt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Zelllösungen wurden im Anschluss 2 x mit PBS gewaschen, um ungebundenes Ce6 zu entfernen und in einem gleichen Volumen an Puffer resuspendiert. Der Ce6 Gehalt der Proben wurde nachfolgend anhand der Fluoreszenzsignale eine Relation zur Kalibrierungskurve zu dieser Versuchsreihe ermittelt. Die Messungen repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchsreihen. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (ANOVA).

Die dabei erhaltenen Kurvenverläufe sind prinzipiell denen der *P. aeruginosa* Isolate sehr ähnlich. Ebenso wie für *P. aeruginosa* wurde bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten weder eine Linearität noch ein Plateau im Sinne einer Sättigung beobachtet. Auch in Hinblick auf die Ce6 Akkumulationsraten zeigten die klinischen *S. aureus* Isolate eine ähnlich hohe Ce6 Akkumulation wie *P. aeruginosa*. Allerdings zeigten sich bei *S. aureus* ab einer Ce6 Konzentration von 128 μM zum Teil signifikante Unterschiede in der Ce6 Akkumulation zwischen den einzelnen Isolaten, die auf eine stammspezifische Ce6 Akkumulationsrate für diese Spezies hinweisen.

4.4.2.1 Differierende Inkubationszeiten

Um den Einfluss der Inkubationszeit auf die Aufnahme/Bindung von Ce6 an *S. aureus* zu untersuchen, wurde für das *S. aureus* Isolat MRSA44 zusätzlich die Ce6 Akkumulation nach fünf und 15 Minuten Inkubation mit dem PS ermittelt (Abb. 4.09).

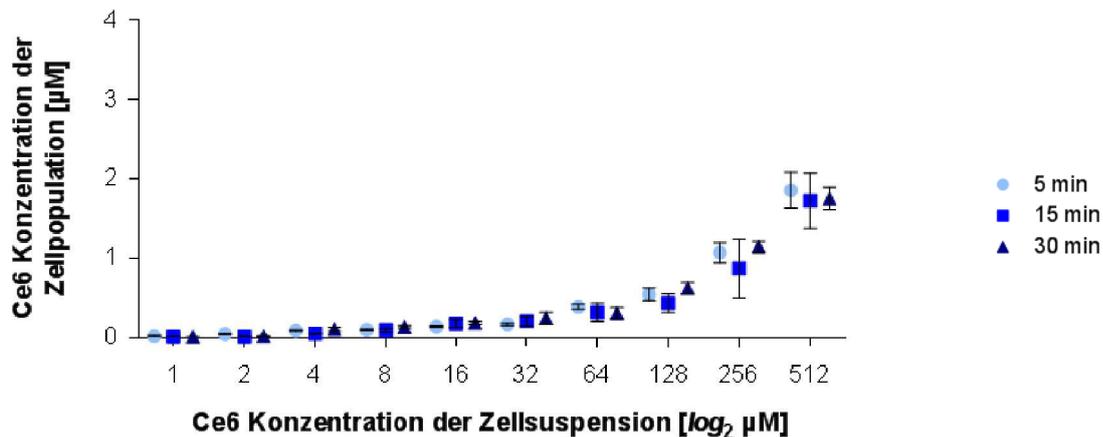


Abb. 4.09: Einfluss der Inkubationszeit auf die Aufnahme/Bindung von Ce6 an/in *S. aureus* in Abhängigkeit der Ce6 Konzentration. McF 2 Zellsuspensionen des *S. aureus* Isolats MRSA44 wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen (2 - 1024 μM) gemischt und für fünf (hellblau), 15 (mittelblau) oder 30 min (dunkelblau) im Dunkeln inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden im Anschluss 2 x mit PBS gewaschen, um ungebundenes Ce6 zu entfernen und im Anschluss der Ce6 Gehalt der Proben per Fluoreszenzmessung in Relation zur Kalibrierungskurve ermittelt. Die Messungen repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchsreihen.

Anders als zuvor für *P. aeruginosa* beobachtet, zeigte sich in Hinblick auf die Inkubationszeit bei MRSA 44 keine klaren Unterschiede in den Ce6 Akkumulationsraten. So wurden über alle Konzentrationsbereiche hinweg für die drei Inkubationszeiten jeweils ähnliche Fluoreszenzwerte ermittelt. Dies lässt vermuten, dass bei *S. aureus* schon nach kurzer Inkubationszeit eine Sättigung der PS Aufnahme/Bindung erfolgt.

4.4.3 *Candida albicans*

Als dritte in Hinblick auf die infektiöse Keratitis relevante Art wurde im Rahmen dieser Arbeit klinische Isolate der Hefe *Candida albicans* wie zuvor beschrieben untersucht. Anders als bei den zuvor beschriebenen Bakterienarten zeigte sich für *C. albicans* eine unterschiedliche Ce6 Akkumulationskinetik in Abhängigkeit der PS Konzentration (Abb. 4.10).

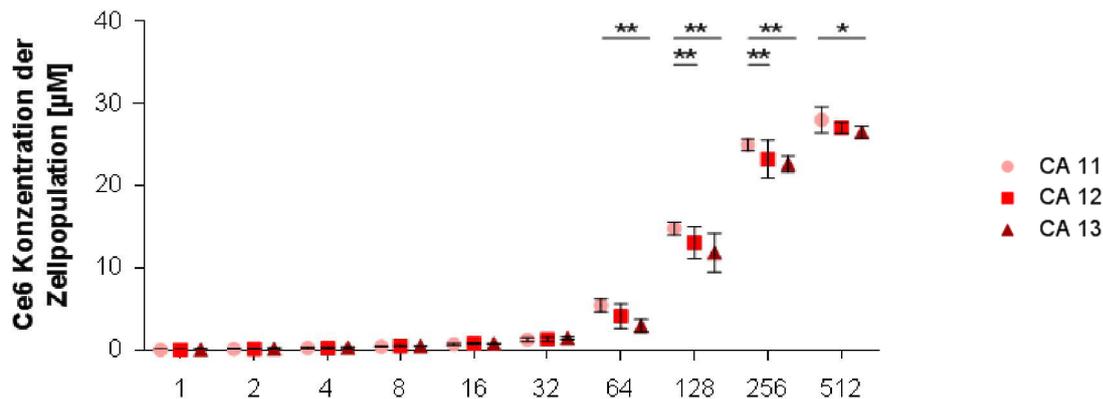


Abb. 4.10: Aufnahme/Bindung von Ce6 an/in *C. albicans* in Abhängigkeit der Ce6 Konzentration. McF 2 Zellsuspensionen der *C. albicans* Isolate CA11 (hellrot), CA12 (rot) und CA13 (dunkelrot) wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen (2 - 1024 µM) gemischt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Zelllösungen wurden im Anschluss 2 x mit Medium gewaschen, um ungebundenes Ce6 zu entfernen und im Anschluss der Ce6 Gehalt der Proben per Fluoreszenzmessung in Relation zur Kalibrierungskurve zu dieser Versuchsreihe ermittelt. Die Messungen repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchsreihen. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (ANOVA).

In Anwesenheit geringer Ce6 Konzentrationen (1 - 32 µM) zeigten die getesteten *C. albicans* Isolate eine nur geringe, aber weitestgehend linear steigende Lichtemission im Fluoreszenzassay. Ab einer Ce6 Konzentration von 64 µM stieg die Lichtemission markant an, um erst ab einer Ce6 Konzentration von 512 µM wieder etwas abzuflachen. Dies lässt vermuten, dass *C. albicans* ab einem Schwellenwert von > 32 µM Ce6 verstärkt den PS in sich aufnimmt und erst bei sehr hohen Ce6 Werten (≥ 512 µM) eine Sättigung dieses Prozesses eintritt. In Hinblick auf die Intraspeziesvariabilität zeigte sich, wie zuvor schon bei *S. aureus* beobachtet, ab einer Ce6 Konzentration von 64 µM zum Teil signifikante Unterschiede in der Ce6 Akkumulation zwischen den einzelnen *C. albicans* Isolaten. So konnten für das *C. albicans* Isolat CA11 ab einer Ce6 Konzentration ≥ 64 µM im Vergleich zu CA13 signifikant erhöhte Fluoreszenzsignale beobachtet werden, die auch für diese Spezies auf eine stammspezifische Ce6 Akkumulationsrate schließen lassen.

4.4.3.1 Differierende Inkubationszeiten

Analog zu *P. aeruginosa* und *S. aureus* wurde auch für *C. albicans* exemplarisch an Isolate CA11 der Einfluss der Inkubationszeit auf die PS Bindung/Aufnahme bestimmt (Abb. 4.11).

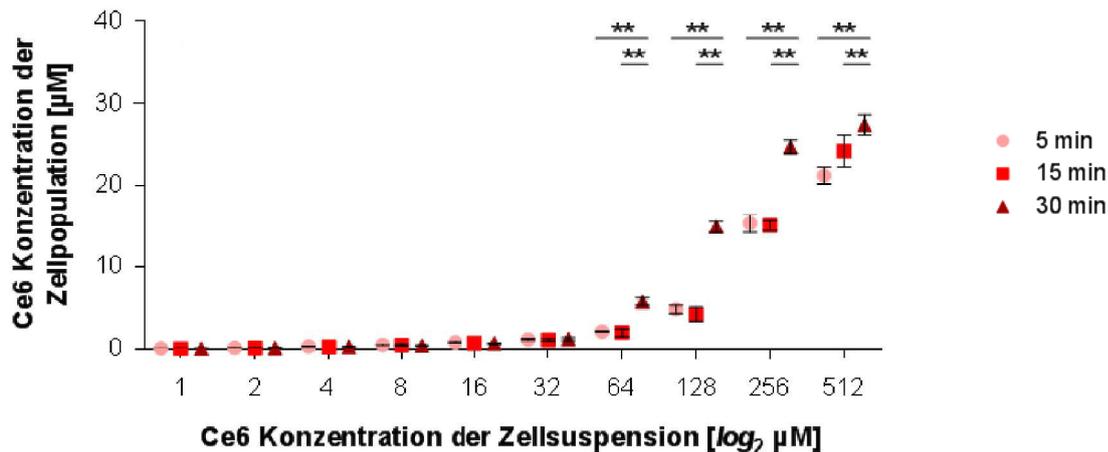


Abb. 4.11. Einfluss der Inkubationszeit auf die Aufnahme/Bindung von Ce6 an/in *C. albicans* in Abhängigkeit der Ce6 Konzentration. McF 2 Zellsuspensionen des *C. albicans* Isolats CA11 wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen gemischt und für fünf (grün), 15 (blau) oder 30 min (rot) im Dunkeln inkubiert. Die Zelllösungen wurden im Anschluss 2 x mit Medium gewaschen, um ungebundenes Ce6 zu entfernen und im Anschluss der Ce6 Gehalt der Proben per Fluoreszenzmessung in Relation zur Kalibrierungskurve ermittelt. Die Messungen repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchsreihen. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (ANOVA).

Wie zuvor schon für die Dosisabhängigkeit beobachtet, so zeigte sich auch in Hinblick auf die Inkubationszeit ein zweigeteiltes Bild. Ähnlich wie für die bakteriellen Isolate beobachtet, konnte bei *C. albicans* bei niedrigen Ce6 Konzentrationen ($\leq 32 \mu\text{M}$) keine klaren Unterschiede in den Ce6 Akkumulationsraten in Abhängigkeit der Inkubationszeiten beobachtet werden. Bei den höheren Ce6 Konzentrationen ($\geq 64 \mu\text{M}$) hingegen zeigten sich für die CA11 Zellsuspensionen, die für 30 Minuten mit dem PS koinkubiert wurden, im Vergleich zu den fünf und 15 Minuten koinkubierten Zellsuspensionen, signifikant erhöhte Fluoreszenzsignale, während zwischen den fünf und 15 Minuten mit Ce6 koinkubierten Zellsuspensionen keine solchen Unterschiede vorgefunden wurden. Dies lässt darauf schließen, dass in *C. albicans* die Adsorption bzw. Aufnahme des PS über die Zeit steigerbar ist, aber auch ein gewisser Schwellenwert überschritten werden muss, um diesen Effekt hervorzurufen.

4.5 Bakterien mit veränderter Pigmentproduktion

Da von Bakterien in die Zellwand eingelagerte oder in das umgebende Medium abgegebene Pigmente vielfach einen protektiven Einfluss gegen ROS aufweisen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Pigmentierung von Bakterien gelegt, da sowohl für *S. aureus* als auch *P. aeruginosa* bekannt ist, dass klinische Isolate dieser beiden Arten in der Regel Pigmente produzieren [131, 132, 133, 134]. Die entsprechenden Gram-negative und Gram-positive Stammpaare wurden nach dem beschriebenen PDT-Schema vorbereitet und die Ce6 Aufnahme/Bindung wie zuvor beschrieben per Fluoreszenzassay bestimmt.

4.5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Um den Einfluss der *P. aeruginosa* Pigmente Pyoverdin und Pyocyanin auf die Ce6 Akkumulationsfähigkeit hin zu testen, wurde der Laborstamm PA14 und dessen isogene $\Delta pvdA$ und $\Delta phzM$ Derivate im Fluoreszenzassay untersucht (Abb. 4.12).

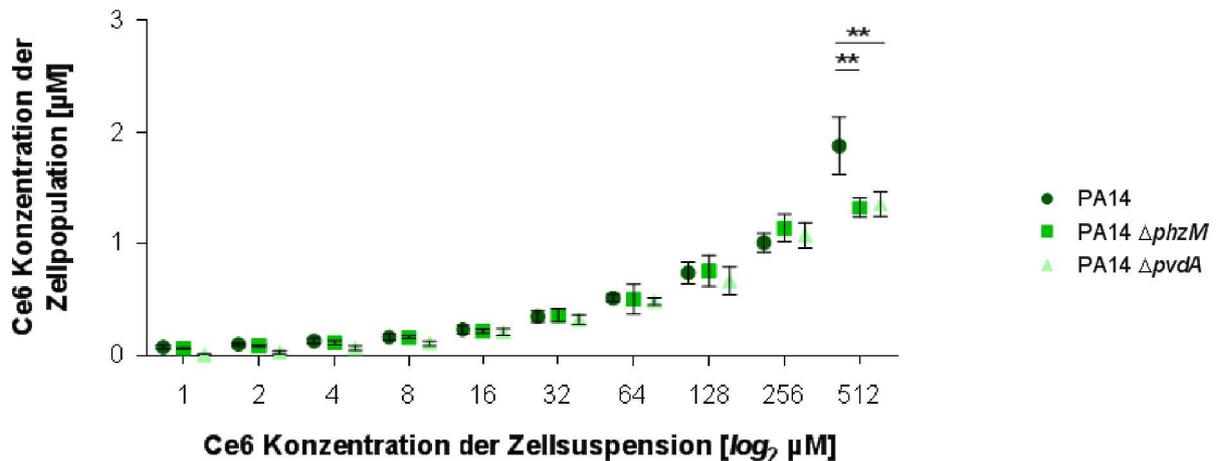


Abb. 4.12: Einfluss der Pigmentproduktion auf die Aufnahme/Bindung von Ce6 an/in PA14 in Abhängigkeit der Ce6 Konzentration. McF 2 Zellsuspensionen der *P. aeruginosa* Isolate PA14 (dunkelgrün), PA14 $\Delta phzM$ (mittelgrün) und PA14 $\Delta pvdA$ (hellgrün) wurden 1:1 mit den Ce6 haltigen Arbeitslösungen (2 - 1024 μM) gemischt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden im Anschluss 2 x mit Medium gewaschen, um ungebundenes Ce6 zu entfernen und im Anschluss der Ce6 Gehalt der Proben per Fluoreszenzmessung in Relation zur Kalibrierungskurve zu dieser Versuchsreihe ermittelt. Die Messungen repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchsreihen. **, $P < 0.01$ (ANOVA)

Ähnlich wie beim Vergleich der klinischen *P. aeruginosa* Isolate beobachtet (Abb. 4.06), zeigten sich bei nahezu allen getesteten Ce6 Konzentrationen (1 - 256 μM) für PA14 und dessen isogene Pigmentmutanten ähnlich hohe Ce6 Akkumulationsraten. Einzig bei der höchsten hier getesteten Ce6 Konzentration (512 μM) wies der Ausgangsstamm PA14 eine signifikant höhere Ce6 Akkumulationsrate als PA14 $\Delta phzM$ und PA14 $\Delta pvdA$ auf. Interessanterweise wies der Laborstamm PA14, wenn mit den klinischen *P. aeruginosa* Isolate verglichen, bei hohen Ce6 Konzentrationen ($\geq 126 \mu\text{M}$) signifikant niedrigere Ce6 Akkumulationsraten als diese auf.

4.5.2 *Staphylococcus aureus*

Da auch für *S. aureus* bekannt ist, dass klinische SA Isolate in der Regel pigmentiert sind und das von *S. aureus* produzierte Pigment Staphyloxanthin einen protektiven Effekt gegenüber ROS aufweist, wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls isogene *S. aureus* Stammpaare analysiert, die sich in Hinblick auf ihre Pigmentproduktion unterscheiden [135].

Wie zuvor bei PA14 beobachtet, so zeigte sich auch bei dem Pigment-produzierenden Isolat Newman im Vergleich zur isogenen Pigmentmutante Newman $\Delta crtM$ nur bei der höchsten hier getesteten Ce6

Konzentration (512 μM) eine signifikant erhöhte Lichtemission, während bei den niedrigeren Ce6 Konzentrationen ähnlich hohe Ce6 Akkumulationsraten beobachtet wurden (Abb. 4.13).

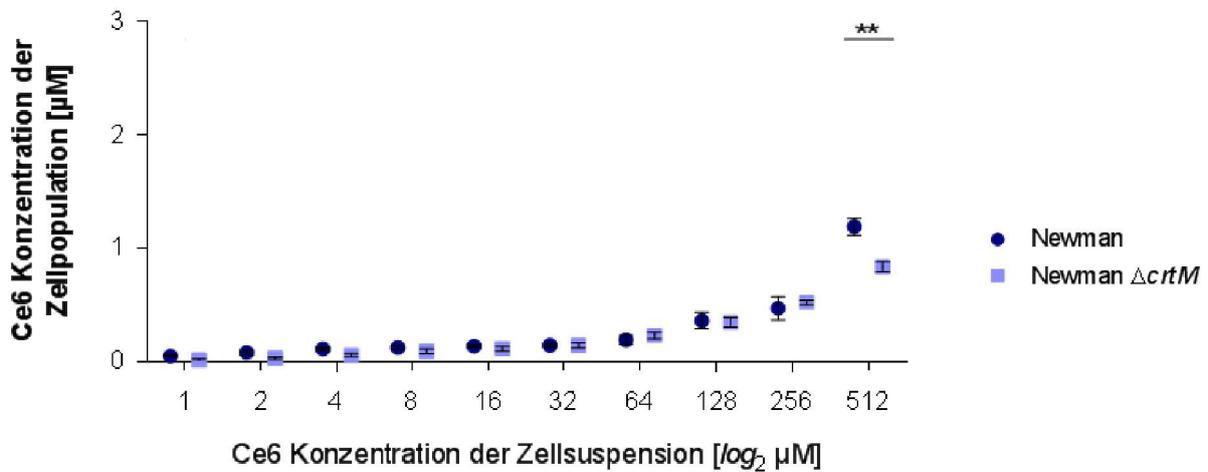


Abb. 4.13: Einfluss der Pigmentproduktion auf die Aufnahme/Bindung von Ce6 an/in *S. aureus* in Abhängigkeit der Ce6 Konzentration. McF 2 Zellsuspensionen der *S. aureus* Isolate Newman (dunkelblau) und Newman ΔcrtM (hellblau) wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen gemischt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden im Anschluss 2 x mit PBS gewaschen, um ungebundenes Ce6 zu entfernen und im Anschluss der Ce6 Gehalt der Proben per Fluoreszenzmessung in Relation zur Kalibrierungskurve zu dieser Versuchsreihe ermittelt. Die Messungen repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchsreihen. **, $P < 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test)

Bei dem zweiten in diesem Zusammenhang getesteten *S. aureus* Isolatsset, RN1HG/RN1HG $\Delta\text{rsbUVW-sigB}$, hingegen konnten signifikante Unterschiede in der Ce6 Akkumulation über mehrere Konzentrationen hinweg beobachtet werden (Abb. 4.14).

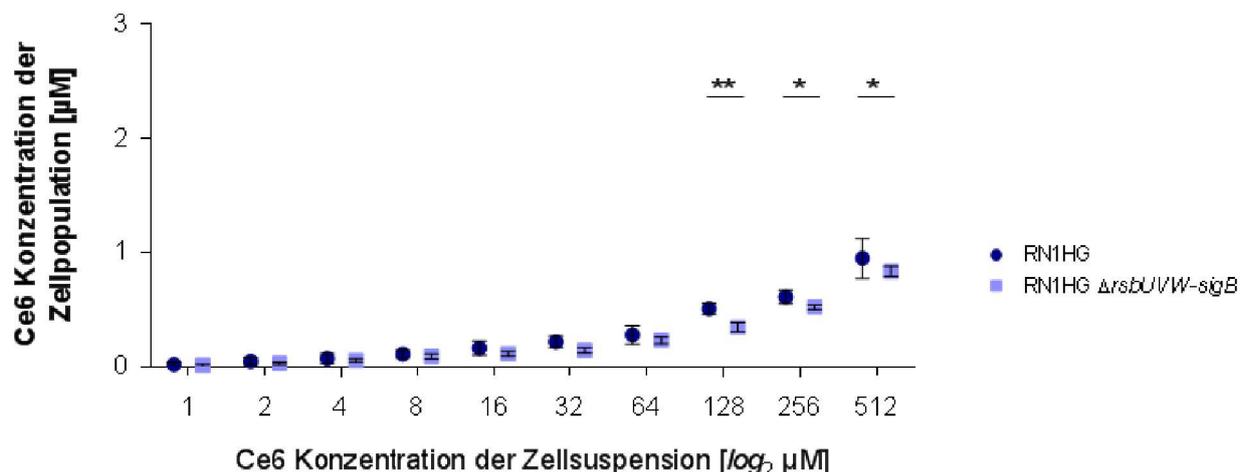


Abb. 4.14: Einfluss der Pigmentproduktion auf die Aufnahme/Bindung von Ce6 an/in *S. aureus* RN1HG in Abhängigkeit der Ce6 Konzentration. McF 2 Zellsuspensionen der *S. aureus* Isolate RN1HG (dunkelblau) und RN1HG $\Delta\text{rsbUVW-sigB}$ (hellblau) wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen (2 - 1024 μM) gemischt und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Die Zellsuspensionen wurden im Anschluss 2 x mit PBS gewaschen um ungebundenes Ce6 zu entfernen und im Anschluss der Ce6 Gehalt der Proben per Fluoreszenzmessung in Relation zur Kalibrierungskurve zu dieser Versuchsreihe ermittelt. Die Messungen repräsentieren die Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchsreihen. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test)

Hier wiesen die Zellen des Pigment produzierenden Ausgangsstammes RN1HG bereits nach Inkubation mit Ce6 Konzentrationen $\geq 128 \mu\text{M}$ signifikant höhere Lichtemissionsraten als die Zellen der isogenen *sigB* Deletionsmutante, die kein Pigment mehr bilden kann, auf. Dieser Effekt ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass bei der *sigB* Deletionsmutante nicht nur die Staphyloxanthin Biosynthese unterbrochen ist, sondern auch die Expression und Aktivität ROS modifizierender Enzymen wie Superoxiddismutasen beeinflusst wird [136]. Interessanterweise zeigten beide Laborstämme, ähnlich wie zuvor schon bei *P. aeruginosa* beobachtet, ab einer Ce6 Konzentration $\geq 128 \mu\text{M}$ signifikant niedrigere Ce6 Akkumulationsraten als die klinischen *S. aureus* Isolate, was als Hinweis darauf gewertet werden könnte, dass Laborstämme über die Speziesebene hinweg eine geringere Adsorptions- bzw. Aufnahmefähigkeit von Ce6 haben als ihre klinischen Vertreter.

4.6 Bestimmung des antimikrobiellen Effektes der PDT

Zur Bestimmung der effektivsten PDT Bedingung wurden neben der Konzentration des Photosensibilisators auch die Inkubationszeiten von Ce6 mit den Mikroorganismen und die Belichtungszeiten variiert. Die Bestrahlungszeiten wurden dabei aufsteigend von einer, über fünf bis zu zehn Minuten gewählt. Danach wurden Testreihen mit der ermittelten effektivsten Bestrahlungszeit und unterschiedlichen Inkubationszeiten (fünf, 15 und 30 Minuten) durchgeführt. Dabei wurden die Testreihen unabhängig voneinander für jedes Isolat durchgeführt, jeweils für die Inkubations- und für die Illuminationszeit. Somit ist eine gewisse Vergleichbarkeit, erstens durch die Verwendung desselben Isolates und zweitens, durch die Berechnung der Werte unter Berücksichtigung der jeweiligen Nullkontrolle, sichergestellt. Dies ist unerlässlich, da zwar jede Probe mit einem McFarland 2 angesetzt wurde, dies aber nicht zwingend mit einer identischen Zellzahl lebender Bakterien/Pilze korreliert. Bei ansteigender Bestrahlungsdauer bis zu zehn Minuten ergaben sich hinsichtlich der Energiedosen folgende Werte:

Illumination	Energiedosis
1 Minute	1,86 J/cm ²
5 Minuten	9,30 J/cm ²
10 Minuten	18,60 J/cm ²

Tabelle 4.01: Angaben der unterschiedlichen Energiedosen in J/cm² für die jeweilige Belichtungsdauer mit Licht der Wellenlänge 670 nm

Da gemäß der Norm DIN EN 60825-4 VDE 0837-4 (Sicherheit von Lasereinrichtungen, Teil 4: Laserschutzwände) Hornhäute nur mit einer maximalen Energiedosis von 24 J bestrahlt werden sollen, wurde in dieser Arbeit versucht, wenn möglich, unter dieser Strahlendosis zu bleiben.

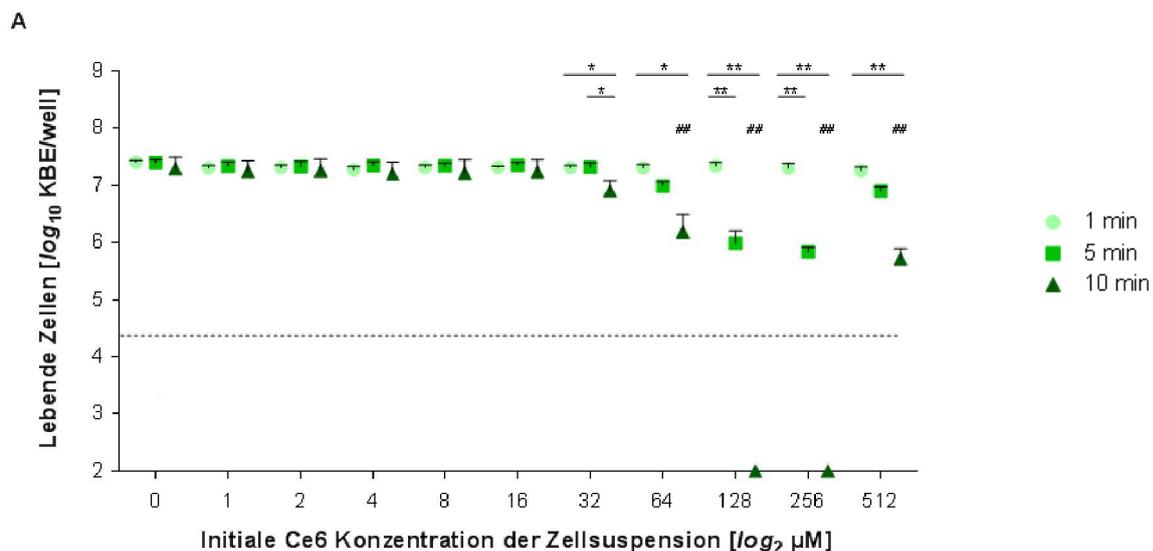
Nachfolgend werden die Ergebnisse der differierenden Illuminations- und Inkubationszeiten für alle drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Spezies beschrieben. Veränderungen hinsichtlich der Bindung und/oder der Aufnahme des Photosensibilisators bei unterschiedlicher Inkubationszeit werden in weiterer Folge (Kapitel 4.5) erläutert.

4.6.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Da *P. aeruginosa* für seine hohe genetische Variabilität bekannt ist, wurden insgesamt 20 über einen Zeitraum von einem Jahr am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (IMMH) der Universitätskliniken des Saarlandes gesammelten Stämme dieser Gram-negativen Spezies getestet, um ein aussagekräftiges Bild über die Effektivität der PDT bei dieser Bakterienart zu erhalten [137, 138]. Hierzu wurde zuerst ein Stamm, das Isolat PA54, mit dem zuvor genannten Ausgangswert für die Inkubationszeit und ansteigenden Bestrahlungszeiten getestet. Im Anschluss daran wurden Testreihen mit der effektivsten Bestrahlungszeit mit Veränderung der Inkubationszeit im Sinne einer Verkürzung durchgeführt. Nachfolgend wurden dann zwei weitere Stämme mit den für das Isolat PA54 ermittelten optimalen Inkubations- und Bestrahlungszeiten ebenfalls über mehrere Konzentrationen (1 - 512 μM) gemessen. Die dabei ermittelte niedrigste Ce6 Dosis, die nach durchgeführter PDT eine Reduktion der Lebendkeimzahl der behandelten Probe von mindestens drei logarithmischen Stufen, entsprechend einer Abtötungsrate von > 99,9 %, hervorrief, wurde für die verbleibenden Stämme eingesetzt.

Isolat PA54

Die Testung des Einflusses von Inkubations- und Belichtungszeit sowie der Ce6 Konzentration auf die Effektivität der PDT für das Isolat PA54 erbrachte folgende, in Abb. 4.15 dargestellte Ergebnisse.



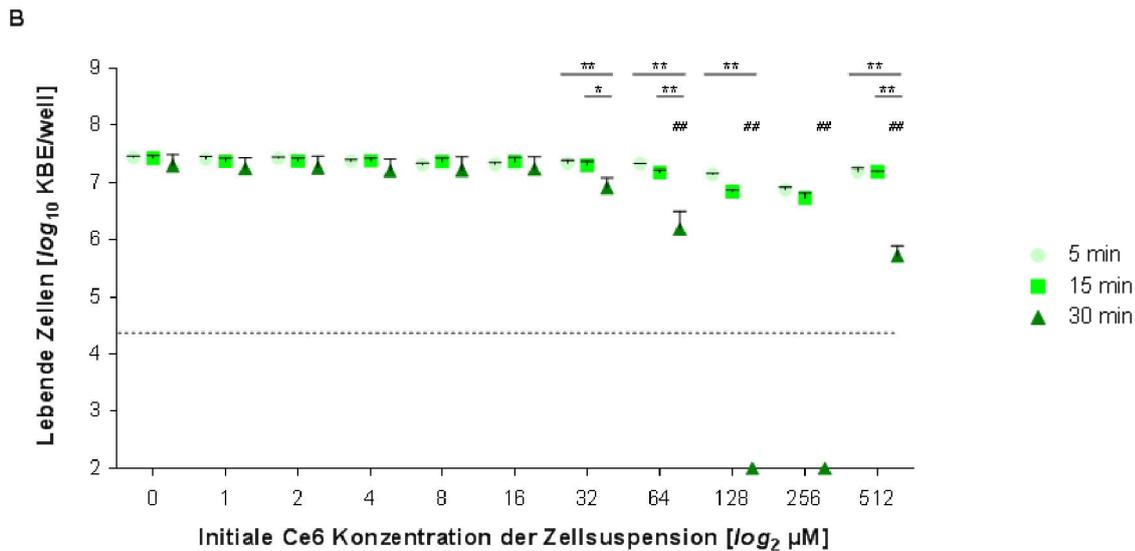


Abb. 4.15: Effekte der unterschiedlichen Inkubations- und Belichtungszeiten auf die Abtötungseffektivität der PDT mittels Ce6 und Rotlicht auf *P. aeruginosa*. McF 2 Lösungen des *P. aeruginosa* Isolates PA54 wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen (2 - 1024 μM) gemischt, für 30 min im Dunklen inkubiert und im Anschluss für eine, fünf oder zehn min mit Licht der Wellenlänge 670 nm belichtet (A), bzw. für fünf, 15 oder 30 min im Dunklen inkubiert und im Anschluss für zehn min mit 670 nm belichtet (B). Die PDT-behandelten Bakterienzellsuspensionen wurden im Anschluss seriell mit Medium verdünnt und auf Müller-Hinton-Agarplatten ausgestrichen, die für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die gestrichelte Linie zeigt eine Abtötungsrate von 99,9 % an. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen den verschiedenen Belichtungs- bzw. Inkubationszeiten bei gegebener PS Konzentration; ANOVA). #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen der jeweiligen PS-freien Kontrolle und den PS-behandelten Proben; Mann-Whitney-U-Test).

Ab einer Ce6 Konzentration von 64 μM konnte eine signifikante Abnahme der Lebendkeimzahl der belichteten Probe im Vergleich zur Ce6 freien Kontrolle beobachtet werden ($P = 0.008$), wenn eine Inkubationszeit von 30 Minuten und eine Belichtungszeit von zehn Minuten genutzt wurde. Eine Reduktion der Lebendkeimzahl um mehr als 99,9 % war aber erst bei Photosensibilisatorkonzentrationen von 128 und 256 μM unter diesen Bedingungen zu verzeichnen. Sowohl die Verkürzung der Inkubationszeit, als auch die der Belichtungszeit verringerte die Effizienz der PDT maßgeblich, so dass bei keiner der untersuchten Ce6 Konzentrationen eine Abtötung von mehr als drei \log -Stufen beobachtbar war. Insbesondere bei höheren Ce6 Konzentrationen ($\geq 32 \mu\text{M}$) führte sowohl die Verkürzung der Inkubationszeiten, als auch die Reduktion der Belichtungszeiten zu den in Abb. 4.15 dargestellten signifikanten Verminderungen der Abtötungsraten.

Überraschenderweise führte auch der Einsatz der höchsten hier getesteten Ce6 Konzentrationen (512 μM) zu einer markanten Verringerung der Effektivität der PDT, die selbst bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten mit anschließender 10-minütiger Illumination mit $96,8 \pm 1,8 \%$ wieder unterhalb der gewünschten Abtötungsrate von $\geq 99,9 \%$ verblieb. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass eine Inkubationszeit von 30 Minuten mit anschließender 10-minütiger Illumination das Optimum der hier getesteten Bedingungen ist, um dieses *P. aeruginosa* Isolat zu eradizieren.

Isolate PA51 und PA53

Um etwaige Unterschiede innerhalb der Art *P. aeruginosa* zu identifizieren, wurde in einem zweiten Schritt das PDT Protokoll 30 Minuten Ce6 Inkubation plus 10 Minuten Rotlicht mit verschiedenen Ce6 Konzentrationen an den klinischen Isolaten PA51 und PA53 getestet (Abb. 4.16).

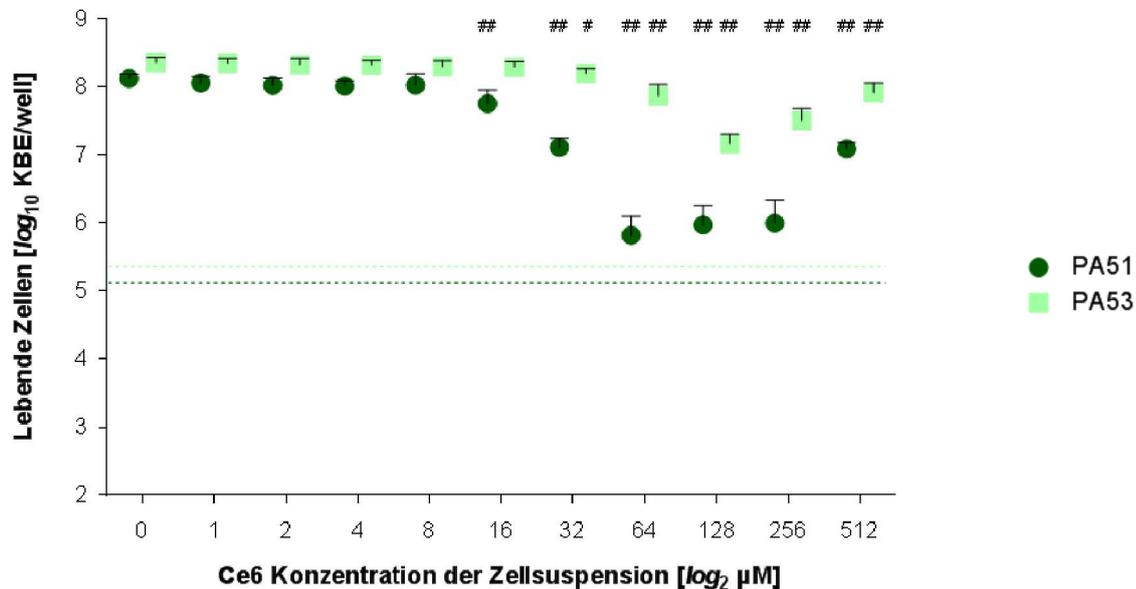


Abb. 4.16: Einfluss des Stammhintergrundes auf die Abtötungseffektivität der PDT mittels Ce6 und Rotlicht gegenüber *P. aeruginosa*. McF 2 Zellsuspensionen der Isolate PA51 (dunkelgrün) und PA53 (hellgrün) wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen (2 - 1024 μM) gemischt und für 30 min im Dunklen inkubiert, 2 x mit Medium gewaschen und im Anschluss für zehn min mit Rotlicht ($\lambda = 670 \text{ nm}$) bestrahlt. Die belichteten Bakterienzellsuspensionen wurden im Anschluss seriell mit Medium verdünnt und auf Müller-Hinton-Agarplatten ausgestrichen, die für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchen. Die gestrichelten Linien zeigen die Abtötungsraten von 99.9 % der jeweiligen Isolate an. #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen der jeweiligen PS-freien Kontrolle und den PS-behandelten Proben; Mann-Whitney-U-Test)

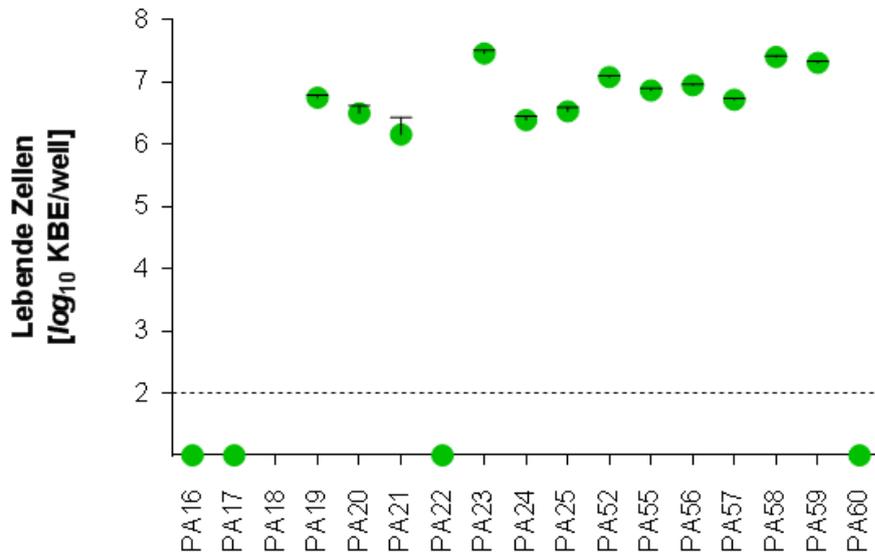
Anders als bei Isolat PA54 konnte sowohl bei PA51 als auch bei PA53 bei keiner der getesteten Bedingungen eine Abtötungsrate von $> 99,9 \%$ erreicht werden. Zwar führten Ce6 Konzentrationen $\geq 16 \mu\text{M}$ (PA51) bzw. $\geq 32 \mu\text{M}$ (PA53) nach einer 30-minütigen Inkubationszeit und 10-minütigen Belichtung auch zu einer signifikanten Abnahme der Lebendkeimzahlen beider Isolate, die jedoch immer unterhalb der gewünschten Abtötungsrate von mehr als drei \log -Stufen verblieben (Abb. 4.16). Auch bei diesen Isolaten war eine klare Verschlechterung der Effektivität der PDT zu verzeichnen, wenn die Bakterien mit der höchsten Ce6 Konzentration (512 μM) inkubiert wurden.

Testung 17 klinischer *P. aeruginosa* Isolate mit einer Ce6 Konzentration von 128 μM

Da für die Isolate PA51, PA53 und PA54 jeweils der größte photobakterizide Effekt bei einem PDT-Setup von 128 μM Ce6 in Kombination mit einer Inkubationszeit von 30 Minuten und einer

Belichtungszeit von 10 Minuten beobachtet wurde, wurden im Anschluss 17 weitere klinische *P. aeruginosa* Isolate mit diesem PDT-Protokoll getestet (Abb. 4.17).

A



B

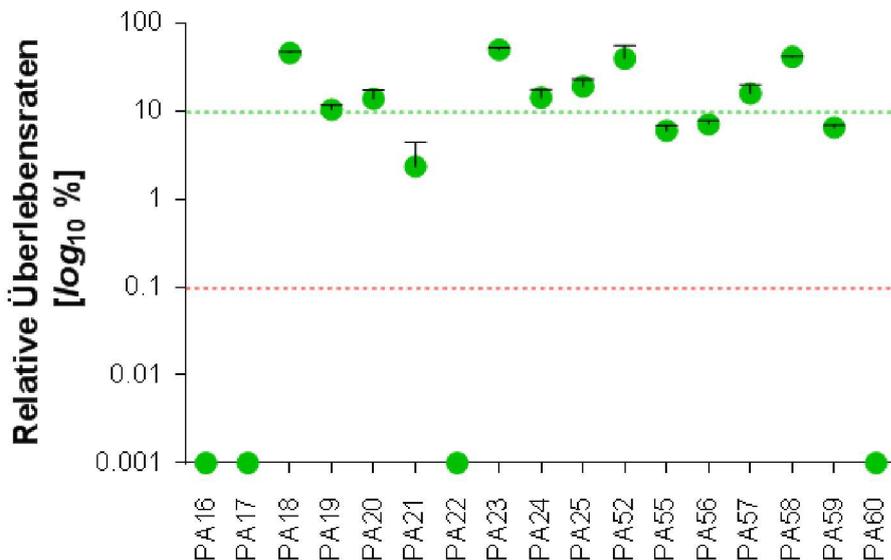


Abb. 4.17: Photobakterizider Effekt von Ce6/Rotlicht auf 17 klinische *P. aeruginosa* Stämme. **A)** McF 2 Zellsuspensionen der oben angegebenen *P. aeruginosa* Isolate wurden 1:1 mit einer 128 μ M Ce6 Arbeitslösung gemischt und für 30 min im Dunklen inkubiert, im Anschluss 2 x mit Medium gewaschen und nachfolgend für zehn min mit Rotlicht ($\lambda = 670$ nm) bestrahlt. Die bestrahlten Bakteriensuspensionen wurden im Anschluss seriell in Medium verdünnt und auf Müller-Hinton Agarplatten ausgestrichen, die für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. **B)** Überlebensraten der PDT-behandelten Bakterien in Relation zur PS-freien Kontrolle (100 %). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. Die horizontale, grün gestrichelte Linie zeigt eine Abtötungsrate von 90 % an, die rot gestrichelte Linie eine Abtötungsrate von 99,9 % an. Die Nachweisgrenze des Assays lag bei 100 KBE/well (schwarze gestrichelte Linie).

Diese Untersuchungen ergaben nur für vier Isolate eine Abtötungsrate von > 99,9 %. Der überwiegende Teil der klinischen *P. aeruginosa* Isolate hingegen zeigte unter diesen PDT-Bedingungen

eine Abtötungsrate < 99 %, wobei einzelne Isolate sogar eine Überlebensrate > 40 % aufwiesen. Somit konnte von 20 *P. aeruginosa* Isolaten mit diesem Therapieschema lediglich ein Viertel der getesteten Isolate effektiv bekämpft werden, was als klarer Hinweis darauf gewertet werden kann, dass durch diese Gram-negative Bakterienart ausgelöste Keratitiden sehr wahrscheinlich nur eingeschränkt mittels Ce6/Rotlicht PDT erfolgreich behandelt werden können.

4.6.2 *Staphylococcus aureus*

Die Ergebnisse dieses Abschnittes wurden von Katharina Bleses und Melanie Finke produziert. Ähnlich wie *P. aeruginosa* weisen auch *S. aureus* Isolate ein vergleichsweise hohes Maß an genetischer Variabilität auf, sodass auch hier ein Set von 20 über einen Zeitraum von einem Jahr am IMMH gesammelter klinischer *S. aureus* Isolate getestet wurde, um ein aussagekräftiges Bild über die Effektivität der PDT bei dieser Gram-positiven Bakterienart zu erhalten [139]. Wie zuvor für *P. aeruginosa* beschrieben, wurden hierfür zunächst drei klinische *S. aureus* Isolate (MSSA 26, MRSA36 und MRSA 44) über ein breites Ce6 Konzentrationsspektrum mit verschiedenen Inkubations- und Belichtungszeiten auf ihre Empfindlichkeit gegenüber diesem Photosensibilisator hin getestet. Weitere 17 Isolate wurden nachfolgend mit der in den Vorversuchen als am effektivsten wirkenden Ce6 Konzentration/Inkubationszeit/Belichtungszeit getestet.

Isolat MRSA 44

In Einklang mit der Literatur konnte beim MRSA Isolat 44 im Vergleich zu den *P. aeruginosa* Isolaten eine höhere Empfindlichkeit gegenüber der PDT mittels Chlorin e6 und Rotlicht detektiert werden (Abb. 4.18) [140]. Bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten und einer Belichtungszeit von zehn Minuten zeigte sich schon bei einer Ce6 Konzentration von 4 µM eine signifikante Abnahme in der Überlebensrate ($P = 0.016$), auch wenn eine Abtötungsrate > 99,9 % erst bei Ce6-Konzentrationen ≥ 128 µM mit diesem Therapieschema erreicht werden konnten. Die Verkürzung von Inkubations- und/oder Belichtungszeit führte, wie schon bei *P. aeruginosa* beobachtet, zu einer markanten Abnahme des PDT Effektes. Anders als die *P. aeruginosa* Isolate zeigte MRSA 44 jedoch auch bei der höchsten hier getesteten Ce6 Konzentrationen (512 µM) eine Abtötungsrate > 99,9 %, sodass hier keine Verminderung des PDT Effektes bei hohen PS-Konzentrationen beobachtet wurde.

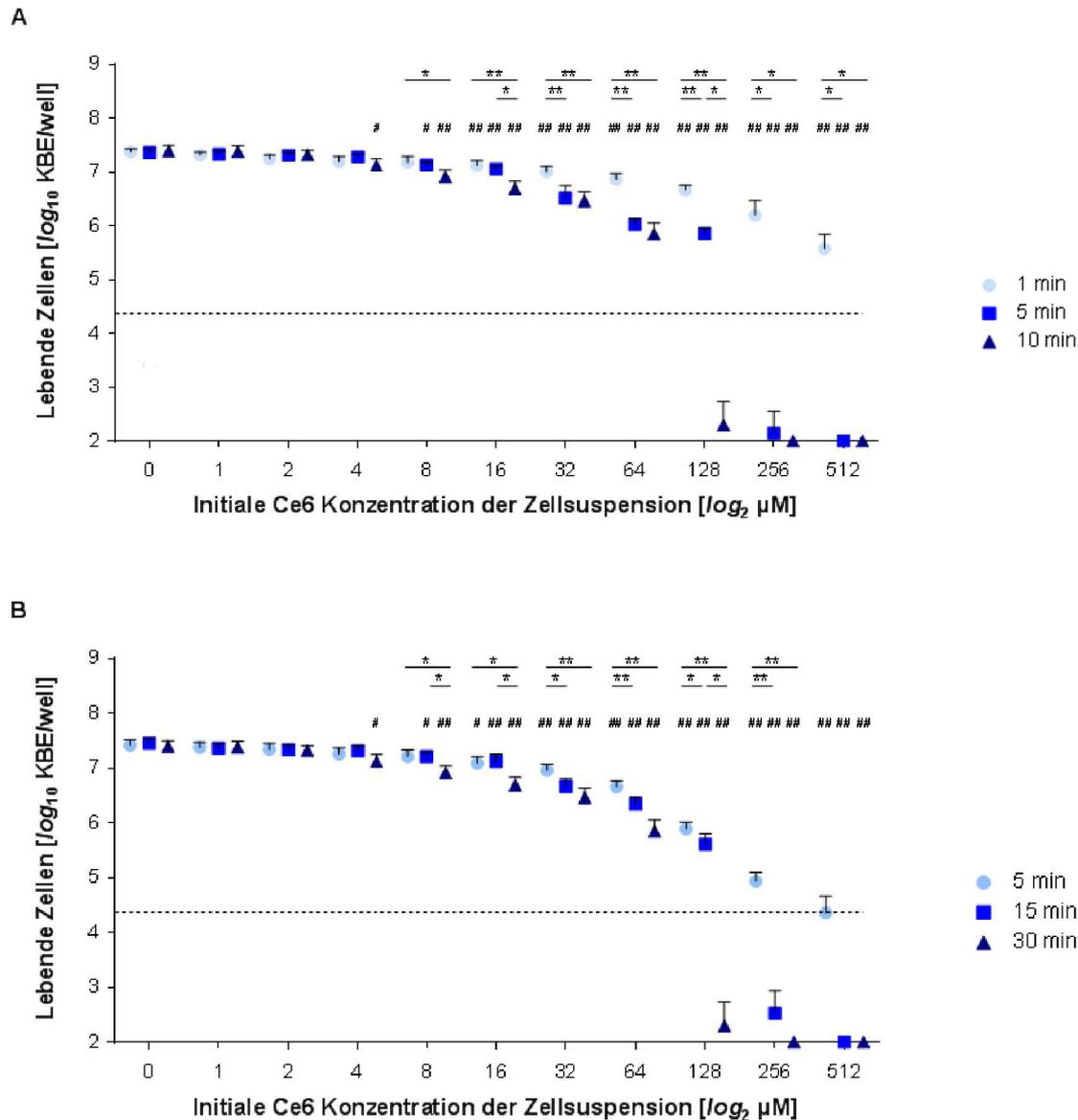


Abb. 4.18: Effekte der unterschiedlichen Inkubations- und Belichtungszeiten auf die Abtötungseffektivität der PDT mittels Ce6 und Rotlicht auf *S. aureus*. McF 2 Lösungen des *S. aureus* Isolates MRSA 44 wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen (2 - 1024 μM) gemischt, für 30 min im Dunklen inkubiert und im Anschluss für eine, fünf oder zehn min mit Licht der Wellenlänge 670 nm belichtet (A), bzw. für fünf, 15 oder 30 min im Dunklen inkubiert und im Anschluss für zehn min mit 670 nm belichtet (B). Die PDT-behandelten Bakterienzellsuspensionen wurden im Anschluss seriell mit Puffer verdünnt und auf Blut-Agarplatten ausgestrichen, die für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchen. Die gestrichelten Linien zeigen eine Abtötungsrate von 99,9 % an. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen den verschiedenen Belichtungs- bzw. Inkubationszeiten bei gegebener PS Konzentration; ANOVA). #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen der jeweiligen PS-freien Kontrolle und den PS-behandelten Proben; Mann-Whitney-U-Test)

Um den Einfluss einer PDT Wiederholung auf die Überlebensfähigkeit von *S. aureus* zu testen, wurde zusätzlich zu den vorangegangenen beschriebenen Messreihen bei diesem Isolat das PDT-Schema (30 Minuten Inkubation, zehn Minuten Belichtung) doppelt durchlaufen und mit den schon zuvor beschriebenen Ergebnissen verglichen. Hierfür wurden die Keime in üblicher Weise vorbereitet,

inkubiert und bestrahlt, danach erfolgte eine weitere Inkubation mit anschließender Belichtung. Verglichen mit den Ergebnissen des einfachen Prozedere mit einmaliger Inkubation konnte nach zweimaligem Durchlaufen des PDT-Schemas schon bei Ce6 Konzentrationen von 16 μM eine Abtötung von > 99,9 % hervorgerufen werden (Abb. 4.19).

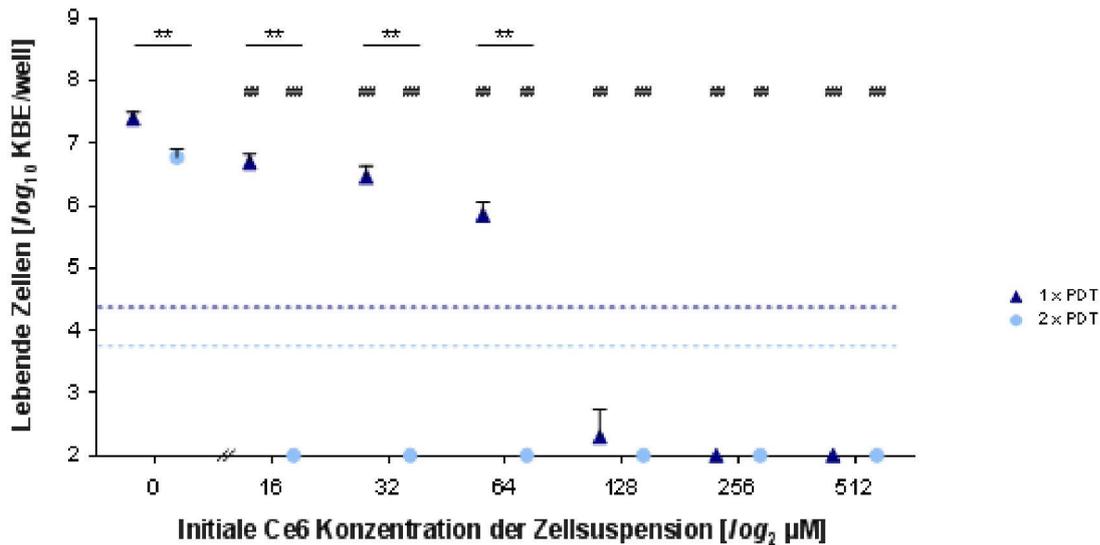


Abb. 4.19: Einfluss der Wiederholung des PDT-Schemas auf die Überlebensfähigkeit von *MRSA 44*. Bakterielle Zellen wurden 1- bzw. 2-mal mit dem PDT-Schema (30 min Inkubation/10 min Belichtung) behandelt. Die Überlebensraten der PDT-behandelten Bakterien wurden in Relation zur Dunkelkontrolle (100 %) ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchen. Statistische Unterschiede zwischen den einmal per PDT-Schema und zweimal per PDT-Schema behandelten Proben wurden mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests ermittelt. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$

Isolate MSSA 26 und MRSA 36

Bei den klinischen *S. aureus* Isolaten MSSA 26 und MRSA 36 wurden die unterschiedlichen Ce6 Konzentrationen nur mit dem Therapieschema 30 Minuten Inkubation/10 Minuten Belichtung getestet (Abb. 4.20).

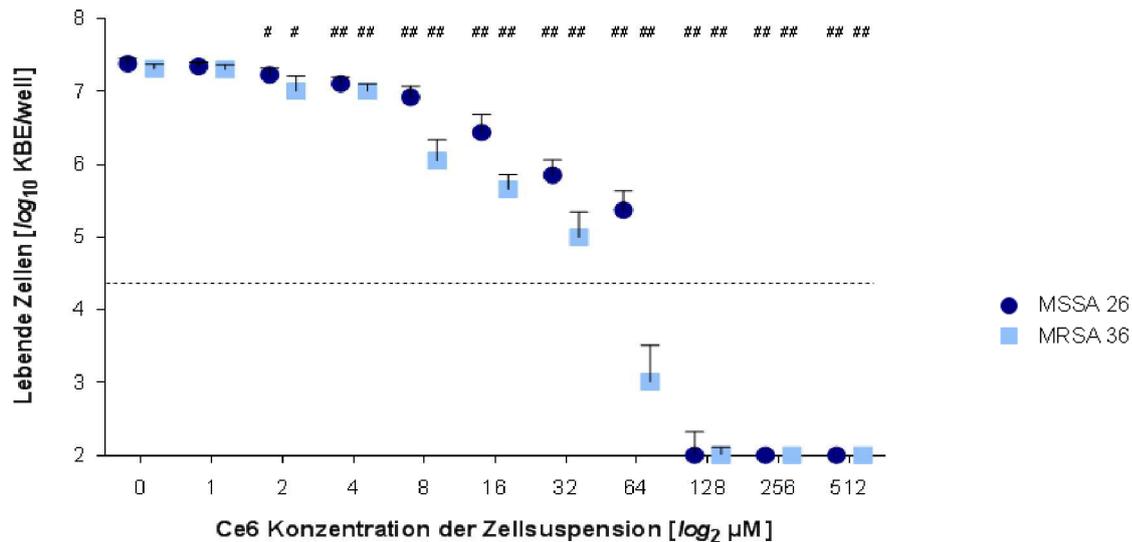


Abb. 4.20: Einfluss des genetischen Hintergrundes auf den photobakteriziden Effekt von Ce6/Rotlicht auf *S. aureus*. McF 2 Zellsuspensionen der *S. aureus* Isolate MSSA 26 (dunkelblau) und MRSA 36 (hellblau) wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen gemischt und für 30 min im Dunklen inkubiert, 2 x mit PBS gewaschen und im Anschluss für zehn mit Rotlicht ($\lambda = 670 \text{ nm}$) bestrahlt. Die bestrahlten Bakteriensuspensionen wurden im Anschluss seriell in Puffer verdünnt und auf Blut-Agarplatten ausgestrichen, die für 12 Stunden bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchen. Die horizontale Linie weist eine Abtötungsrate von 99,9 % auf. #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen der jeweiligen PS-freien Kontrolle und den PS-behandelten Proben; Mann-Whitney-U-Test)

Etwas früher als bei MRSA44 beobachtet, zeigte sich bei beiden Isolaten bereits bei einer Ce6 Konzentration von $2 \mu\text{M}$ eine signifikante Abnahme an lebenden Zellen. In gleicher Weise wie bei MRSA 44 konnte bei MRSA 36 bei einer Ce6 Konzentration von $\geq 128 \mu\text{M}$ Abtötungsraten $> 99.9 \%$ erreicht werden. Für MSSA 26 wurde dieser Schwellenwert bereits ab einer PS Konzentration von $64 \mu\text{M}$ unterschritten. Ähnlich wie zuvor für MRSA 44 wurde bei beiden *S. aureus* Isolaten kein Anstieg der Überlebensraten bei höheren Konzentrationen beobachtet.

Testung 17 weiterer klinischer *S. aureus* Isolate mit einer Ce6 Konzentration von $128 \mu\text{M}$

Aufgrund der mit den Isolaten MSSA 26, MRSA 36 und MRSA 44 ermittelten Hemmkonzentrationen wurden die weiteren 17 klinischen *S. aureus* Isolate bei einer Konzentration von $128 \mu\text{M}$ getestet (Abb. 4.21).

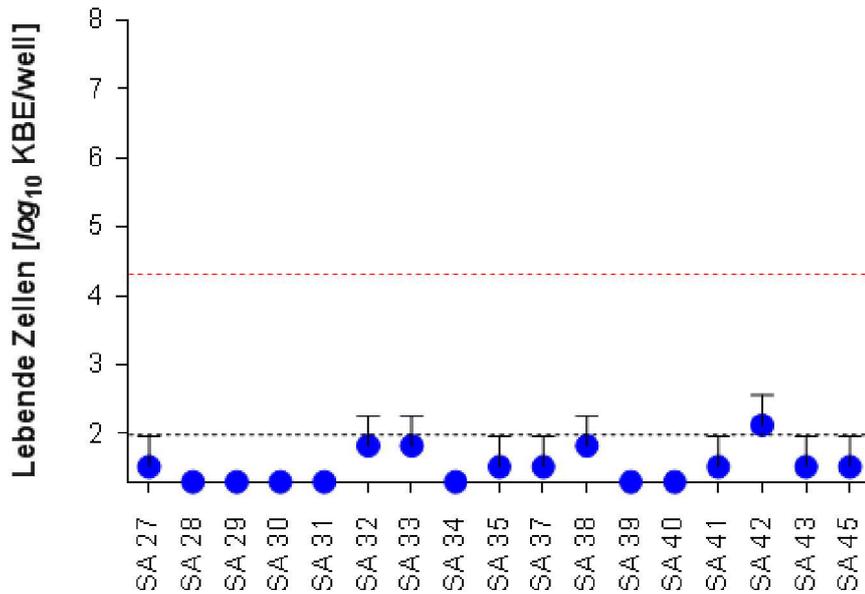


Abb. 4.21: **Photobakterizider Effekt von Ce6/Rotlicht auf 17 klinische *S. aureus* Stämme.** McF 2 Zellsuspensionen der oben angegebenen *S. aureus* Isolate wurden 1:1 mit einer 256 μM Ce6 Arbeitslösung gemischt und für 30 min im Dunklen koinkubiert, im Anschluss 2 x mit Puffer gewaschen und nachfolgend für zehn min mit Rotlicht ($\lambda = 670 \text{ nm}$) bestrahlt. Die bestrahlten Bakteriensuspensionen wurden im Anschluss seriell in Puffer verdünnt und auf Blut-Agarplatten ausgestrichen, die für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. Die horizontale, rot gestrichelte Linie weist eine Abtötungsrate von 99,9 % auf. Die Nachweisgrenze des Assays lag bei 100 KBE/well (schwarze gestrichelte Linie).

Diese Probendurchläufe ergaben für alle *S. aureus* Isolate eine Reduktion der Keimzahl von über fünf \log_{10} Stufen, was als klarer Hinweis darauf gewertet werden kann, dass *S. aureus*, ungeachtet seiner genetischen Variabilität, mittels Ce6/Rotlicht PDT behandelt werden könnte.

4.6.3 *Candida albicans*

Analog zur Vorgehensweise bei den beiden Bakterienspezies wurde in einem ersten Schritt ein klinisches *C. albicans* Isolat über ein breites Ce6 Konzentrationsspektrum mit verschiedenen Inkubations- und Belichtungszeiten auf seine Empfindlichkeit gegenüber diesem PS hin getestet. Nachfolgend wurden zwei weitere Isolate mit der effektivsten Inkubations- und Belichtungszeit über ein breites Ce6 Spektrum getestet und weitere 17 Isolate nachfolgend mit der in den Vorversuchen als am effektivsten wirkenden Ce6 Konzentration/Inkubationszeit/Belichtungszeit beprobt.

Isolat CA11

Bei dem *C. albicans* Isolat CA11 konnte, ebenso wie für zuvor für *S. aureus* beobachtet, bereits bei einer Ce6 Konzentration von 4 μM bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten und einer Belichtungszeit von zehn Minuten eine signifikante Abnahme lebender Zellen nach PDT detektiert werden ($P = 0.007$). Anders als bei *S. aureus* beobachtet, führten Ce6 Konzentrationen zwischen 16 und 64 μM bei diesem Hefe Isolat aber bereits zu einer Abtötungsrate von mindestens drei \log_{10} Stufen, während höhere Ce6

Konzentrationen (128 - 512 μM), ähnlich wie schon bei *P. aeruginosa* beobachtet, bei gleichbleibendem PDT-Schema eine signifikant verminderte Effektivität zeigten und unterhalb der gewünschten Abtötungsrate von 99,9 % verblieben (Abb. 4.21).

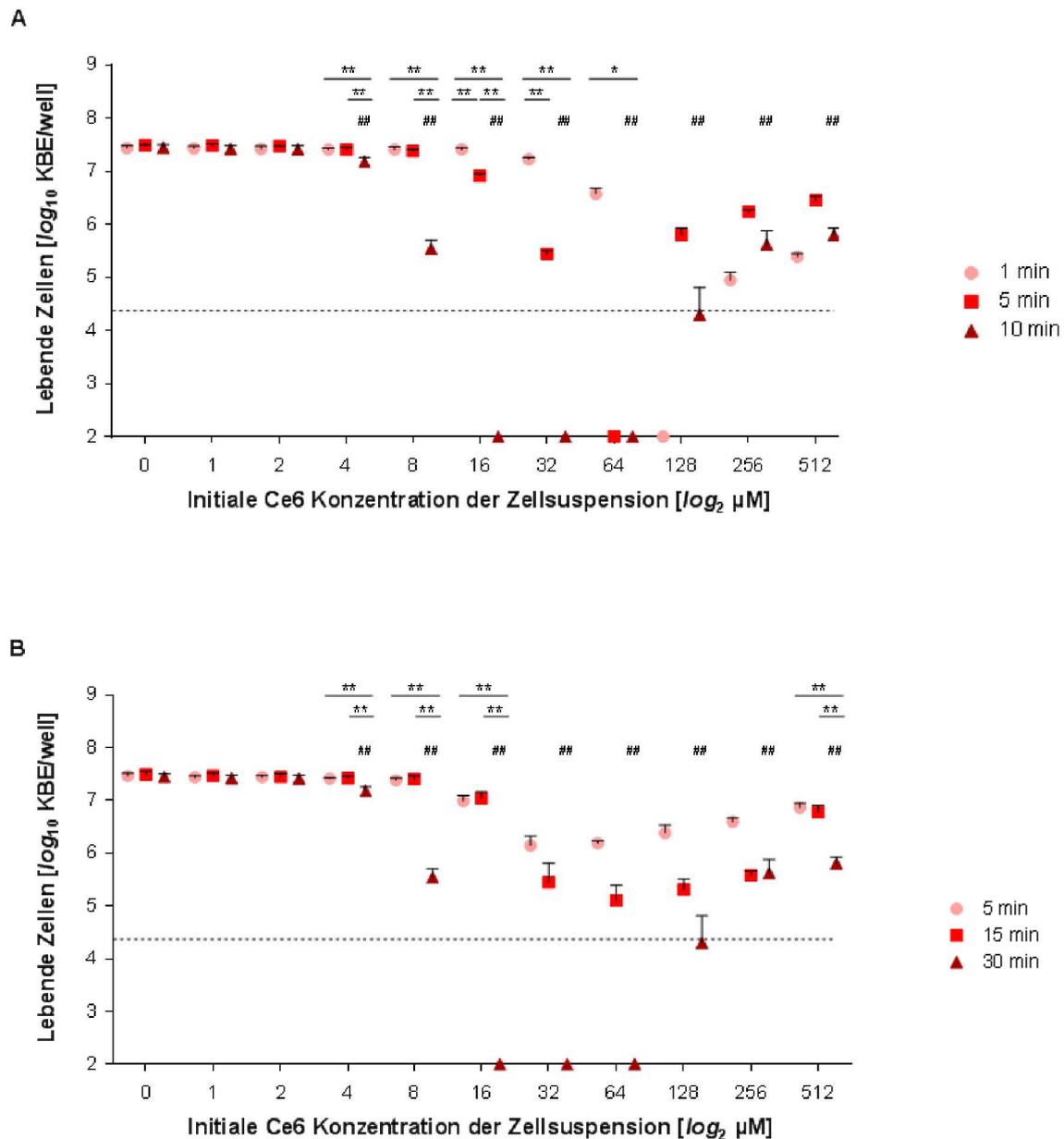


Abb. 4.22: Effekte der unterschiedlichen Inkubations- und Belichtungszeiten auf die Abtötungseffektivität der PDT mittels Ce6 und Rotlicht auf *C. albicans*. McF 2 Zellsuspensionen des *C. albicans* Isolates CA11 wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen gemischt und für 30 min im Dunklen inkubiert und im Anschluss für eins, fünf oder zehn min mit Licht der Wellenlänge 670 nm belichtet (A), bzw. für fünf, 15 oder 30 min im Dunklen inkubiert und im Anschluss für zehn min mit 670 nm belichtet (B). Die PDT-behandelten Hefezellsuspensionen wurden im Anschluss seriell mit Medium verdünnt und auf Sabouraud-Agarplatten ausgestrichen, die für 36 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die gestrichelten Linien zeigen eine Abtötungsrate von 99,9 % an. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen den verschiedenen Belichtungs- bzw. Inkubationszeiten bei gegebener PS Konzentration; ANOVA). #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen der jeweiligen PS-freien Kontrolle und den PS-behandelten Proben; Mann-Whitney-U-Test)

Die Verkürzung der Illuminations- bzw. Inkubationszeiten ergab, ebenso wie zuvor schon für die beiden Bakterienarten beobachtet, auch bei CA11 eine Rechtsverschiebung auf der Abszisse. So konnte bei Verkürzung der Belichtungszeiten von zehn auf fünf bzw. einer Minuten erst bei Ce6 Konzentrationen von 64 bzw. 128 μM eine Abnahme an lebenden Zellen um > 99,9 % beobachtet werden (Abb. 4.22A). Die Verkürzung der Inkubationszeiten von 30 auf 15 bzw. fünf Minuten bei gleichbleibender Belichtungszeit (zehn Minuten) führte sogar bei allen hier getesteten PS Konzentrationen zu einer Abtötungseffizienz < 99,9 % (Abb. 4.22B). Dies lässt darauf schließen, dass insbesondere bei *C. albicans* die Zeit, mit der das Pathogen mit dem PS in Kontakt ist, von besonderer Bedeutung ist.

Isolate CA12 und CA13

Die *C. albicans* Isolate CA12 und CA13 zeigten ein sehr ähnliches Ansprechverhalten auf die verschiedenen Ce6 Konzentrationen, das im Vergleich zu CA11 jedoch leicht vermindert war (Abb. 4.23).

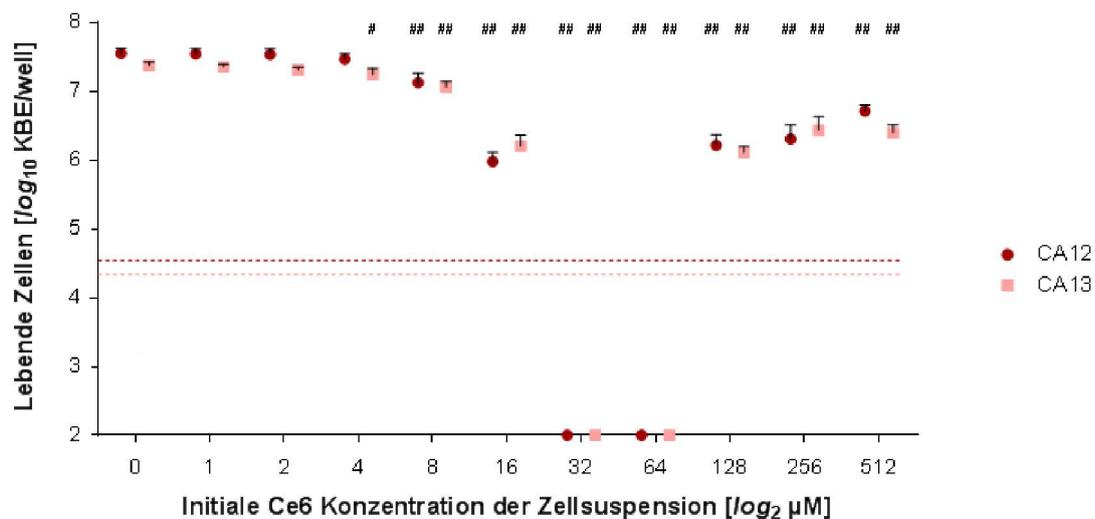


Abb. 4.23: Einfluss des genetischen Hintergrunds auf den photobakteriziden Effekt von Ce6/Rotlicht auf *C. albicans*. McF 2 Zellsuspensionen der *C. albicans* Isolate CA12 (dunkelrot) und CA13 (hellrot) wurden 1:1 mit den Ce6 Arbeitslösungen (2 - 1024 μM) gemischt, für 30 min im Dunklen inkubiert und im Anschluss für zehn min mit Licht der Wellenlänge 670 nm belichtet. Die PDT-behandelten Zellsuspensionen wurden im Anschluss seriell mit Medium verdünnt und auf Sabouraud-Agarplatten ausgestrichen, die für 36 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchen. Die gestrichelten Linien zeigen die Abtötungsraten von 99,9 % der jeweiligen Isolate an. #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen der jeweiligen PS-freien Kontrolle und den PS-behandelten Proben; Mann-Whitney-U-Test)

Auch bei diesen beiden Hefeisolaten konnte bei Ce6 Konzentrationen von 32 und 64 μM eine Abnahme der lebenden Zellen um mehr als fünf \log_{10} Stufen in der Zellsuspension nach 30 Minuten Inkubationszeit und zehn Minuten Belichtungszeit erreicht werden, während höhere Ce6 Konzentrationen wieder zu einer markanten Abnahme der Abtötungseffektivität führten, sodass auch hier ein klares Konzentrationsoptimum des PS identifiziert werden konnte.

Testung 17 weiterer klinischer *C. albicans* Isolate mit einer Ce6 Konzentration von 32 μM :

Eine verbesserte Aussagekraft über das angewendete PDT-Protokoll lieferten weitere 17 *C. albicans* Stämme. Diese wurden dem PDT-Schema 30 Minuten PS Inkubation/10 Minuten Belichtung bei einer Ce6 Konzentration von 32 μM unterzogen (Abb. 4.24).

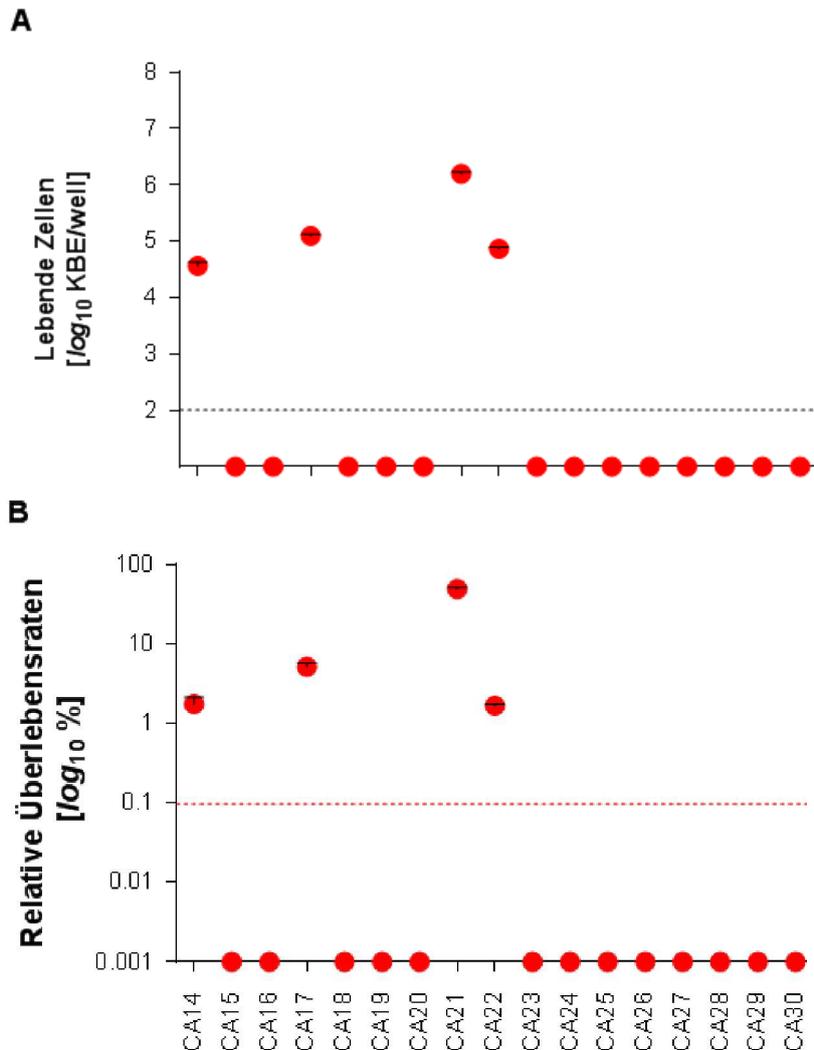


Abb. 4.24: **Photobakterizider Effekt von Ce6/Rotlicht auf 17 klinische *C. albicans* Stämme.** McF 2 Zellsuspensionen der oben angegebenen *C. albicans* Isolate wurden mit einer 64 μM Ce6 Arbeitslösung 1:1 gemischt und für 30 min im Dunklen koinkubiert, im Anschluss 2 x mit Medium gewaschen und nachfolgend für zehn min mit Rotlicht ($\lambda = 670 \text{ nm}$) bestrahlt. Die PDT-behandelten Zellsuspensionen wurden im Anschluss seriell mit Medium verdünnt und auf Sabouraud-Agarplatten ausgestrichen, die für 36 Stunden bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. Die horizontale, gestrichelte Linie weist eine Abtötungsrate von 99,9 % auf. Die Nachweisgrenze des Assays lag bei 100 KBE/well.

Während bei 13 Isolaten eine Abtötung $\geq 99,9 \%$ mit dieser Ce6 Konzentration beobachtet werden konnte, zeigten vier *C. albicans* Isolate eine markant verminderte Empfindlichkeit gegenüber diesem Therapieschema, wobei ein Isolat, CA21 bei der getesteten Ce6 Konzentration von 32 μM mit einer Überlebensrate von $49,9 \pm 2,6 \%$ nur eine geringfügige Empfindlichkeit gegenüber dieser Therapieform

aufwies. Die Ursache für die überdurchschnittlich hohe Unempfindlichkeit gegenüber dieser Therapieform konnte nicht identifiziert werden.

4.7 Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration der PDT bei ausgewählten Isolaten

Einen Aspekt dieser Arbeit stellten die unterschiedlichen Eigenschaften der Mikroorganismen, vor allem deren Eigenschaft der Pigmentierung, dar (Material und Methoden, Kapitel 3.3.1). Hierfür wurde das effektivste PDT-Schema mit 30 Minuten Inkubation und zehn-minütiger Illumination mit einer Energiedosis von 18,60 J/cm² herangezogen.

4.7.1 *Pseudomonas aeruginosa* Pigmentmutanten

P. aeruginosa Isolate bilden in der Regel eine Reihe an Pigmenten, die je nach Belichtungssituation produziert und in das umgebende Milieu abgegeben werden [141]. Insbesondere das fluoreszierende und leicht in biologische Membranen penetrierende zwitterionische Pigment Pyocyanin (PCN) scheint dabei für die Virulenz von *P. aeruginosa* von besonderer Bedeutung zu sein [142]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Einfluss der Pigmente PCN und Pyoverdin anhand verschiedener, von PD Dr. M. Schobert zur Verfügung gestellter Mutanten, auf die Photoinaktivierbarkeit von *P. aeruginosa* per PDT mittels Ce6 und Rotlicht untersucht werden. Für diese Art erfolgte dabei die Charakterisierung des PDI Effekts auf das auf dem Isolat PA14 beruhenden Stammtriplets, bei dem neben dem Wildtyp auch eine $\Delta pvdA$ Mutante, in der das für die Pyoverdin Biosynthese benötigte Enzym L-Ornithin N5-Oxygenase kodierende Gen deletiert wurde und eine $\Delta phzM$ Mutante, bei der die für die PCN-Biosynthese benötigte N-Methyltransferase PhzM deletiert wurde, per zuvor beschriebenem PDT Schema behandelt wurden (Abb. 4.25).

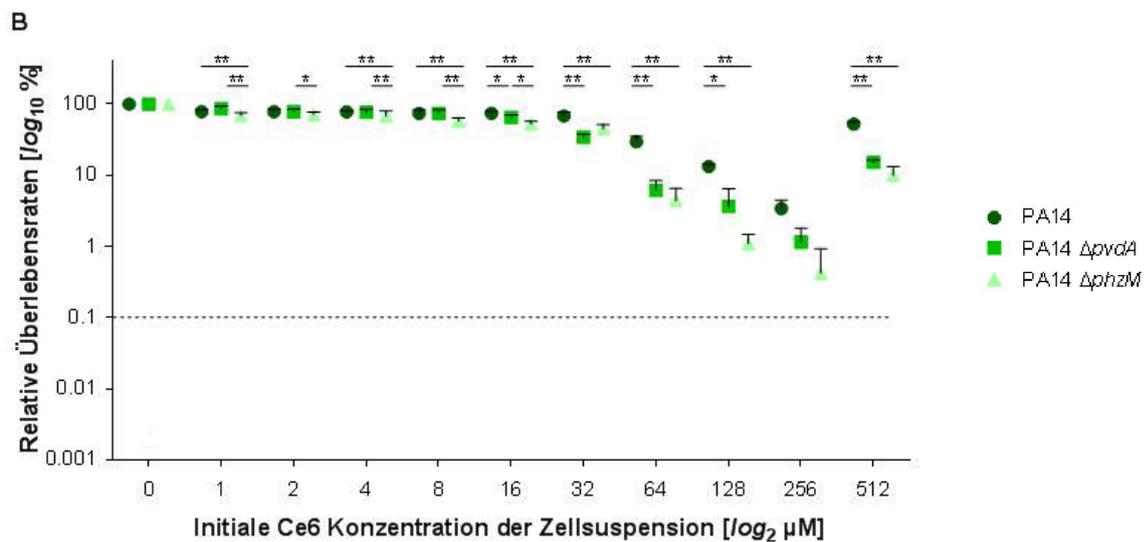
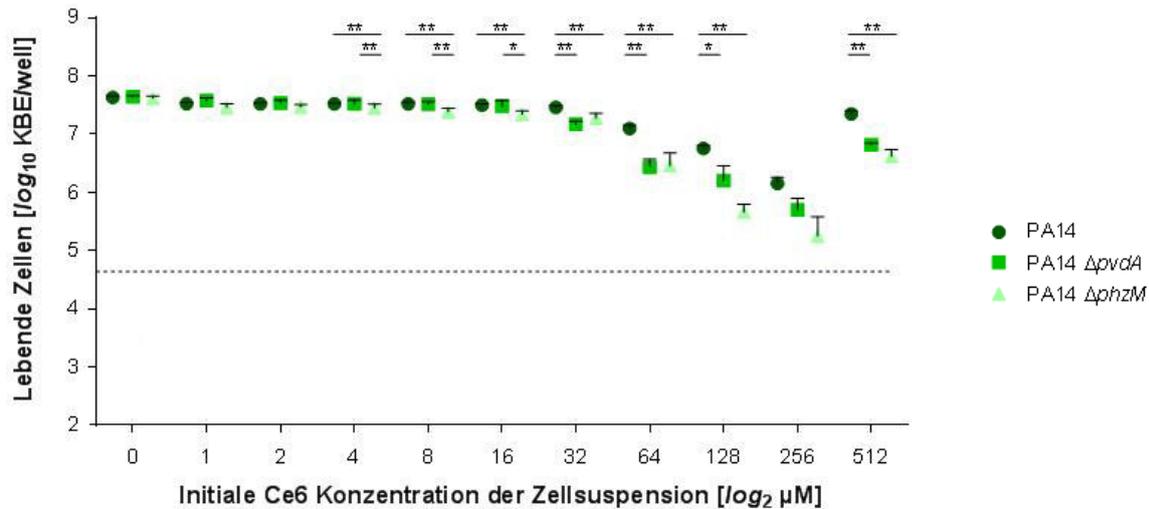


Abb. 4.25: Einfluss der Pigmentierung auf die Abtötungseffektivität der PDT mittels Ce6 und Rotlicht gegenüber *P. aeruginosa*. **A)** McF 2 Zellsuspensionen der Isolate PA14 (dunkelgrün), PA14 $\Delta pvdA$ (grün) und PA14 $\Delta phzM$ (hellgrün) wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen (2 - 1024 μM) gemischt und für 30 min im Dunklen inkubiert, 2 x mit Medium gewaschen und im Anschluss für zehn min mit Rotlicht ($\lambda = 670 \text{ nm}$) bestrahlt. Die PDT-behandelten Bakterienzellsuspensionen wurden im Anschluss seriell mit Medium verdünnt und auf Müller-Hinton-Agarplatten ausgestrichen, die für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. **B)** Überlebensraten der PDT-behandelten Bakterien in Relation zur PS-freien Kontrolle (100 %). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchen. Die gestrichelten Linien zeigen eine Abtötungsrate von 99,9 % an. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen den verschiedenen PA14 Derivaten bei gegebener PS Konzentration; ANOVA). #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen der jeweiligen PS-freien Kontrolle und den PS-behandelten Proben; Mann-Whitney-U-Test)

Überraschenderweise zeigte sich sowohl für den Wildtyp als auch für die isogenen Pigmentmutanten schon ab einer Ce6 Konzentration von 1 μM eine signifikante Abnahme der KBE/ml im Vergleich zur jeweiligen PS-freien Kontrolle (Abb. 4.25A). Ebenso konnte bei nahezu jeder der hier getesteten Ce6 Konzentrationen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen beobachtet werden. Da jedoch auch schon zwischen den PS-freien Kontrollen von PA14 und der isogenen $\Delta phzM$ Mutante ein signifikanter Unterschied in den KBE/ml vorzufinden war, wurden in Abb. 4.25 B zusätzlich die

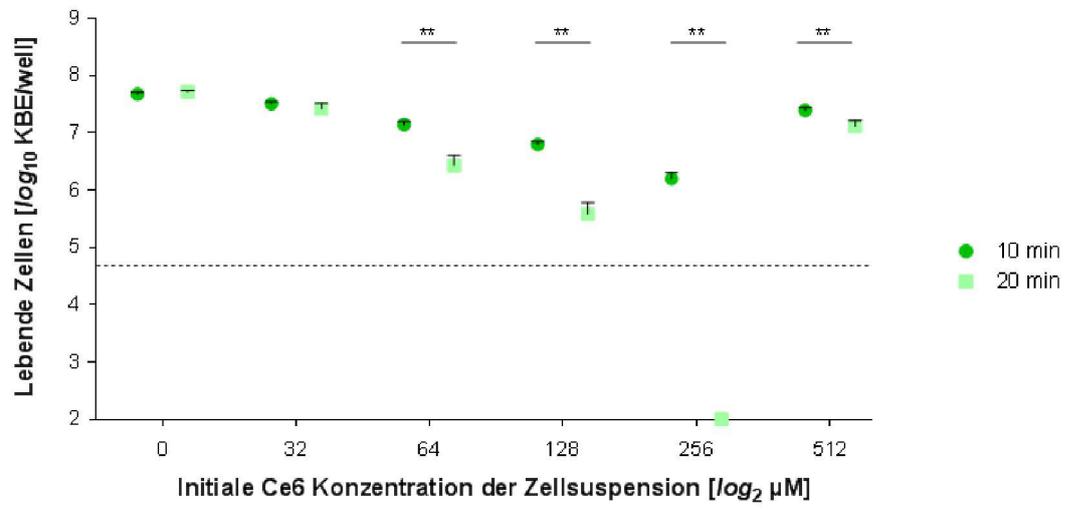
relativen Überlebensraten, normiert auf die jeweilige PS-freien Kontrolle, miteinander verglichen. Hier konnte gezeigt werden, dass Zellen beider Mutanten bei Ce6 Konzentrationen von 16 - 128 μM sowie bei 512 μM signifikant empfindlicher auf das PDT Schema reagierten als Zellen des Wildtyps. Die PCN-defiziente Mutante PA14 ΔphzM wies dabei die niedrigsten Überlebensraten auf, gefolgt von der Pyoverdin-defizienten Mutante PA14 ΔpvdA , während der Wildtyp PA14 sich in diesem Stammtriolet als gegenüber dieser Therapieform resistenterer Vertreter erwies. Ähnlich wie zuvor schon für die Mehrzahl der klinischen *P. aeruginosa* Isolate beobachtet, konnte auch bei keinem Vertreter dieses Stammtriolets mithilfe des PDT Schemas bei den hier getesteten Ce6 Konzentrationen eine Inaktivierung von mehr als 99,9 % erreicht werden, auch wenn bei der PCN-defizienten Mutante PA14 ΔphzM bei einer Ce6 Konzentration von 256 μM eine mittlere Abtötungsrate von $99,58 \pm 0,48 \%$ erreicht werden konnte. Ebenso zeigte sich bei allen drei Derivaten, wie zuvor bei den klinischen PA Isolaten beobachtet, wieder eine deutliche Abnahme der PDI Effizienz bei der höchsten Ce6 Konzentration von 512 μM . Ungeachtet dessen weisen diese Ergebnisse jedoch darauf hin, dass sowohl PCN als auch Pyoverdin für die hohe Unempfindlichkeit von *P. aeruginosa* gegenüber der PDI mit Ce6 und Rotlicht von Bedeutung sein könnten.

4.7.1.1 Differierende Bestrahlungszeiten

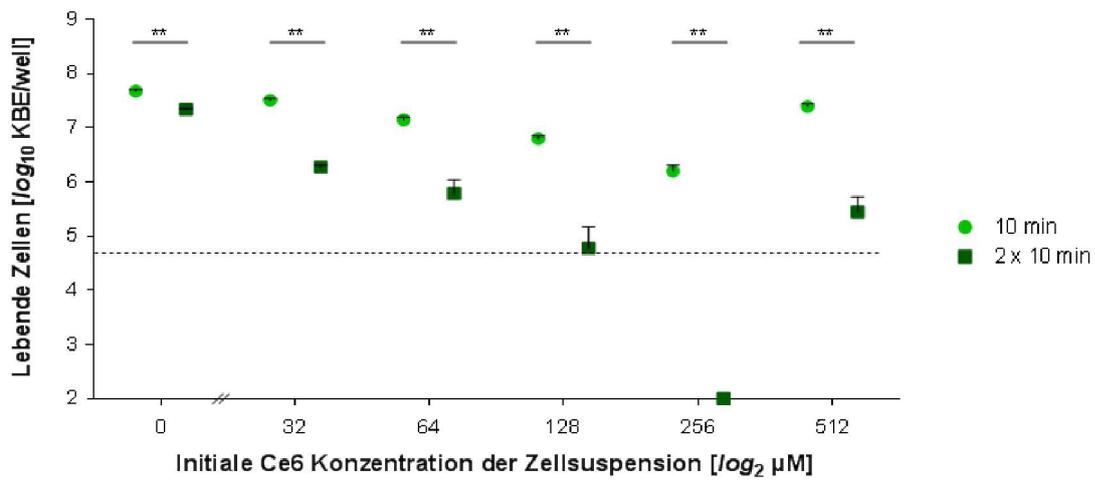
Mit einer mittleren Abtötungsrate von $96,6 \pm 1,1 \%$ bei einer Ce6 Konzentration von 256 μM kann PA14 als relativ unempfindlicher Keim gegenüber diesem Therapieschema angesehen werden. Daher wurde das Isolat PA14, wie zuvor schon für das *S. aureus* Isolat MRSA 44 beschrieben (Abb. 4.19), mit längeren Bestrahlungszeiten getestet, um zu eruieren, ob mit einer höheren Energiedosis auch bei dieser Spezies eine verbesserte Abtötungsrate zu erhalten ist.

Hierzu wurden Zellen des Isolats PA14 für 30 Minuten mit den Ce6 Konzentrationen 32 - 512 μM im Dunkeln inkubiert, im Anschluss 2 x mit Medium gewaschen und für 10 bzw. 20 Minuten mit Rotlicht inkubiert. Des Weiteren wurde ein Protokoll genutzt, in dem das PDT Schema 30 Minuten Inkubation/10 Minuten Belichtung zweimal durchlaufen wurde (2 x 10 Minuten). In dieser Versuchsserie konnte sowohl mit der 20-minütigen Belichtung, als auch mit der Wiederholung des 30 Minuten Inkubation/10 Minuten Belichtungsprotokolls bei einer Ce6 Konzentration von 256 μM eine Reduktion der Keimlast um $> 99,9 \%$ erreicht werden (Abb. 4.27). Auch mit den geringeren Ce6 Konzentrationen (32 - 128 μM) zeigte sich im Vergleich zum einfachen 10-minütigen Belichtungsprotokoll eine signifikante Abnahme in der Überlebensfähigkeit bei der 20-minütigen Belichtungszeit, auch wenn unter diesen Bedingungen keine Abtötungsraten $> 99,9 \%$ erreicht werden konnten (Abb. 4.27A).

A



B



C

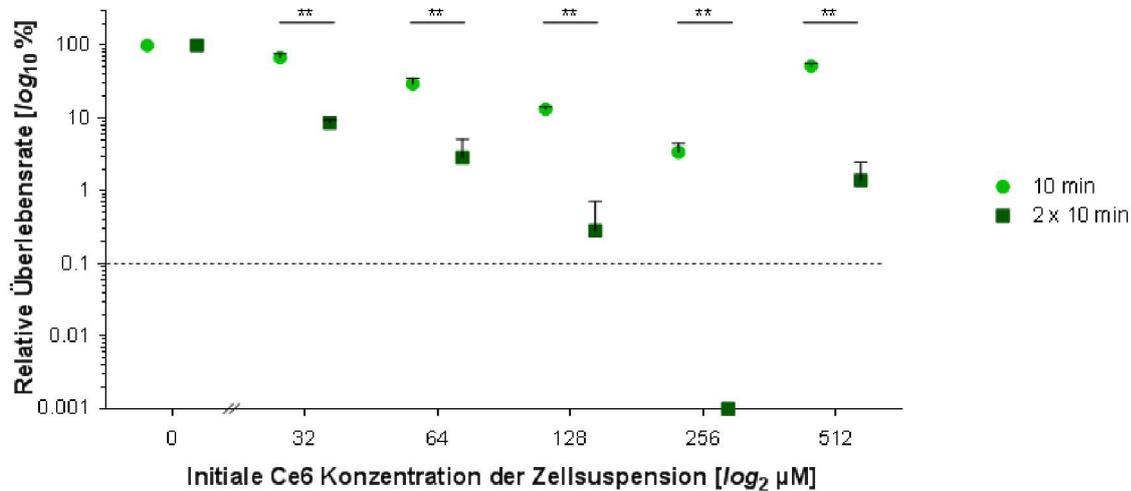


Abb. 4.27: Photobakterizider Effekt von Ce6 und Rotlicht (670 nm) gegen PA14 mit unterschiedlichen Belichtungs- und Inkubationszeiten. **A)** McF 2 Lösungen des *P. aeruginosa* Isolates PA14 wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen (64 - 1024 μM) gemischt, für 30 min im Dunklen inkubiert und im Anschluss für zehn (grün) bzw. 20 min (hellgrün) mit Licht der Wellenlänge 670 nm belichtet. Die PDT-behandelten Bakterienzellsuspensionen wurden im Anschluss seriell mit Medium verdünnt und auf Müller-Hinton-Agarplatten ausgestrichen, die für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. **B)** Die PA14 Zellsuspensionen wurden wie unter A) beschrieben behandelt und 1 x (grün) bzw. 2 x (dunkelgrün) dem Inkubations-/Belichtungsschema unterzogen. **C)** Überlebensraten der PDT-behandelten Bakterien in Relation zur PS-freien Kontrolle (100 %). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchen. Die gestrichelte Linie zeigt eine Abtötungsrate von 99,9 % an. **, $P < 0.01$ (Mann-Whitney-U-Test).

Die zweimalige Durchführung des PDT Schemas hingegen führte bereits bei der PS-freien Kontrolle zu einer signifikanten Abnahme an KBE (10 Minuten = $4,73 \times 10^7 \pm 3,1 \times 10^6$ KBE/ml; 2 x 10 Minuten = $2,18 \times 10^7 \pm 8,3 \times 10^5$ KBE/ml). Dies ist vermutlich der Tatsache geschuldet, dass durch die mehrfachen Resuspendierungs- und Waschschrte etwas mehr als die Hälfte der KBE der Lösung bereits verloren gingen (Abb. 4.27B). Nach Normalisierung der KBE Werte auf die PS-freie Kontrolle (= 100 %) zeigte sich aber auch hier bei den geringeren Ce6 Konzentrationen (32 - 128 μM) im Vergleich zum einfachen 10-minütigen Belichtungsprotokoll eine signifikante Abnahme in der Überlebensfähigkeit bei der 2 x 10-minütigen Belichtungszeit (Abb. 4.27C).

Auch nach Verlängerung der Belichtungszeit konnte bei der höchsten Ce6 Konzentration im Vergleich zu der darunter liegenden Verdünnungsstufe wieder eine verminderte Abtötung der PA14 Zellen beobachtet werden, sodass auch bei diesen beiden Therapieschemata die richtige Dosis des PS von essentieller Bedeutung ist.

4.7.2 *Staphylococcus aureus*

Ähnlich wie bei *P. aeruginosa* sind auch die meisten Isolate der Spezies *Staphylococcus aureus* pigmentiert. Anders als bei *P. aeruginosa* produziert *S. aureus* jedoch nur ein Pigment, das Carotenoid Staphyloxanthin, das größtenteils in der Zellmembran der Bakterien verbleibt und, je nach Expressionsaktivität, für die gelbe bis orange Farbe von *S. aureus* Kolonien ursächlich ist (Pelz et al., 2005). Das gelb-orange Pigment gilt als einer der Virulenzfaktoren dieses Pathogens und bildet einen der wichtigsten Schutzmechanismen dieses Organismus gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies [143, 144]. Die transkriptionelle Kontrolle der für die Staphyloxanthin-Biosynthese benötigten Maschinerie unterliegt unter anderem dem alternativen Sigmafaktor σ^B [145].

Der nachfolgend untersuchte *S. aureus* Stamm Newman (Duthie and Lorenz, Microbiology, February 1952 vol. 6 no. 1-2 95-107) gehört zwar zu den tendenziell weniger stark Pigment produzierenden *S. aureus* Isolaten, dessen Kolonien unter *in vitro* Kultivierungsbedingungen nur eine schwach gelbliche Färbung zeigen, wurde aber im Rahmen dieser Arbeit dennoch genutzt, da in diesem genetischen Hintergrund eine *crtM* Deletionsmutante (Newman $\Delta crtM$), in der das für die Staphyloxanthin-Biosynthese essentielle Enzym Dehydrosqualene Synthase deletiert ist, zur Verfügung stand (Abb. 4.28).

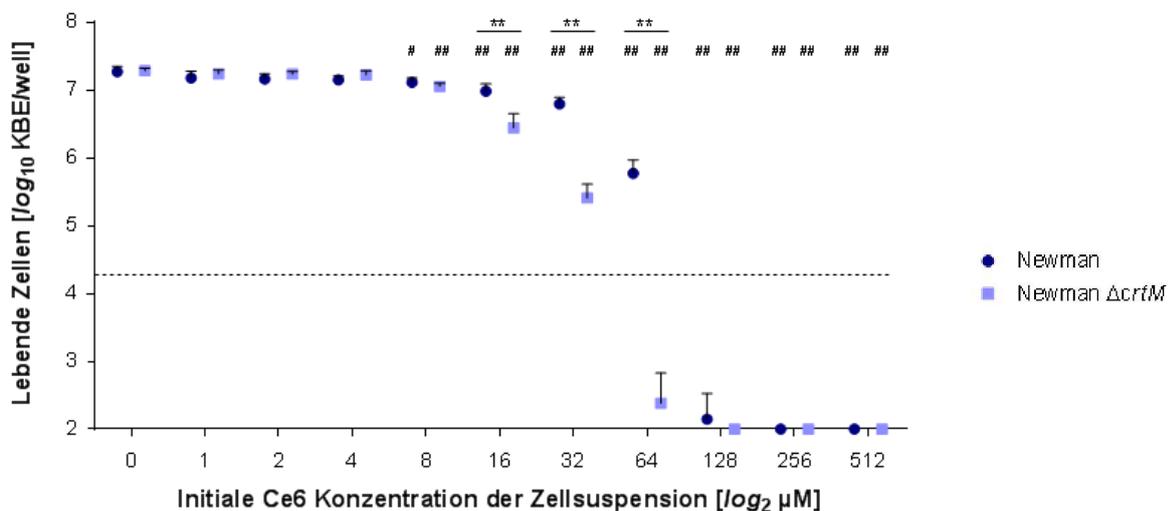


Abb. 4.28 Einfluss der Pigmentierung auf die Abtötungseffektivität der PDT mittels Ce6 und Rotlicht gegenüber *S. aureus*. McF 2 Zellsuspensionen des *S. aureus* Stammpaares Newman (dunkelblau) und Newman *crtM* (hellblau) wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen (2 - 1024 μM) gemischt und für 30 min im Dunklen inkubiert, 2 x mit Puffer gewaschen und im Anschluss für zehn min mit Rotlicht ($\lambda = 670 \text{ nm}$) bestrahlt. Die PDT-behandelten Bakterienzellsuspensionen wurden im Anschluss seriell mit Puffer verdünnt und auf Blut-Agarplatten ausgestrichen, die für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchen. Die gestrichelte Linie zeigt eine Abtötungsrate von 99,9 % an. **, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante bei gegebener PS Konzentration; Mann-Whitney-U-Test). #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen der jeweiligen PS-freien Kontrolle und den PS-behandelten Proben; Mann-Whitney-U-Test)

Weiterhin wurde das stark Staphyloxanthin produzierende *S. aureus* Derivat RN1HG und eine isogene *rsbUVW-sigB* Deletionsmutante, in der ein Großteil des *sigB*-Operons inklusive des für σ^B kodierenden Gens *sigB* deletiert wurde, untersucht, um den Einfluss dieses alternativen Sigmafaktors im PDT Prozess näher zu charakterisieren (Abb. 4.29).

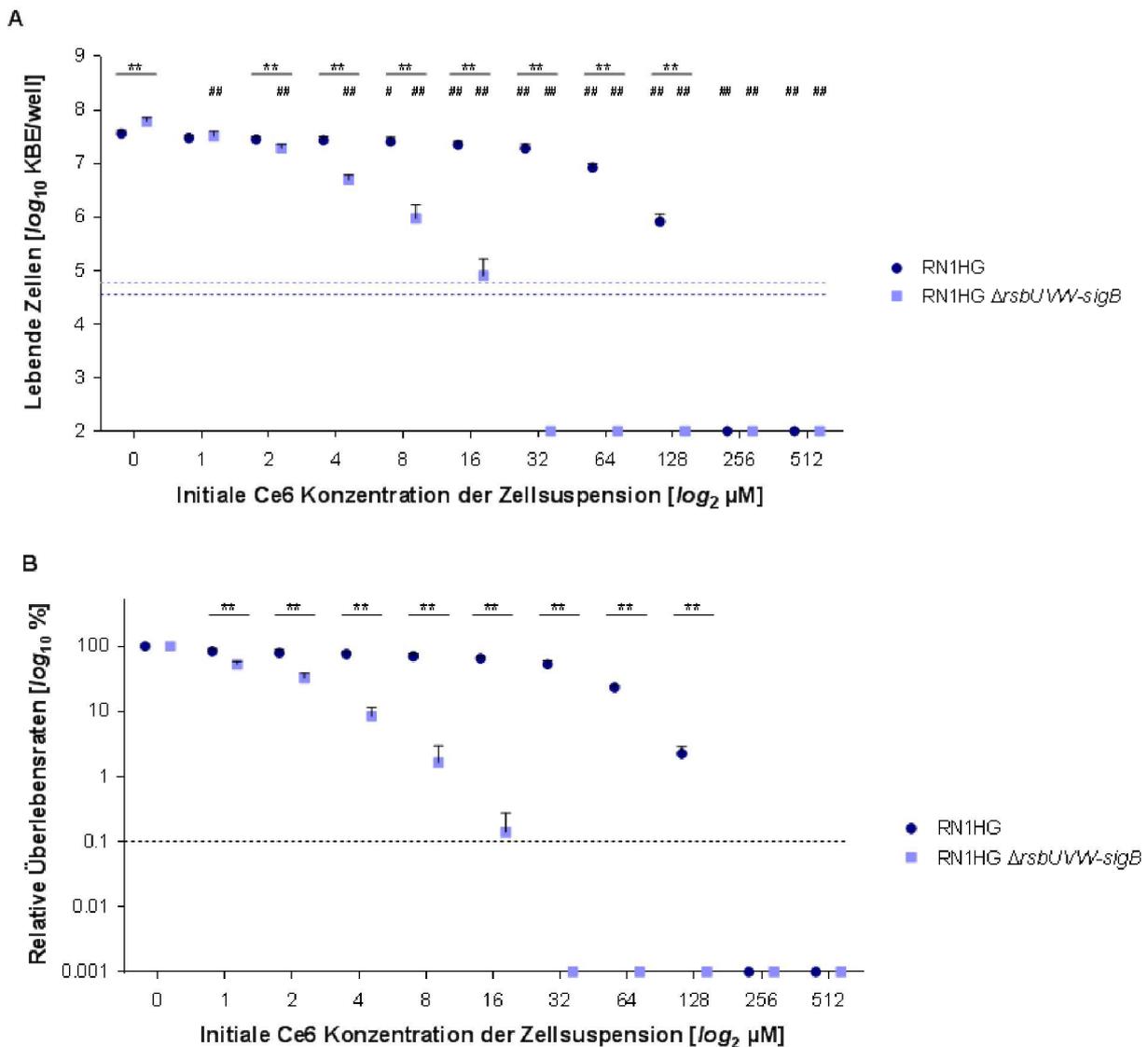


Abb. 4.29: Einfluss des *sigB*-Operons auf die Abtötungseffektivität der PDT mittels Ce6 und Rotlicht gegenüber *S. aureus*. **A**) McF 2 Zellsuspensionen des *S. aureus* Stammpaares RN1HG (dunkelblau) und RN1HG Δ rsbUVW-sigB (hellblau) wurden 1:1 mit den Ce6-haltigen Arbeitslösungen (2 - 1024 μM) gemischt und für 30 min im Dunklen inkubiert, 2 x mit Puffer gewaschen und im Anschluss für zehn min mit Rotlicht ($\lambda = 670 \text{ nm}$) bestrahlt. Die PDT-behandelten Bakterienzellsuspensionen wurden nachfolgend seriell mit Puffer verdünnt und auf Blut-Agarplatten ausgestrichen, die für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert wurden. **B**) Überlebensraten der PDT-behandelten Bakterien in Relation zur PS-freien Kontrolle (100 %). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Versuchen. Die gestrichelten Linien zeigen eine Abtötungsrate von 99,9 % an. **, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante bei gegebener PS Konzentration; Mann-Whitney-U-Test). #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ (Unterschiede zwischen der jeweiligen PS-freien Kontrolle und den PS-behandelten Proben; Mann-Whitney-U-Test)

Interessanterweise zeigten beide Laborstämme, Newman und RN1HG, gegenüber der PDT mittels Ce6 und Rotlicht eine um eine Konzentrationsstufe verminderte Empfindlichkeit als die 20 zuvor getesteten

klinischen *S. aureus* Isolate (Kap. 4.5.2), die alle bei einer Ce6 Konzentration von 128 μM nahezu vollständig abgetötet wurden (Reduktion der KBE/ml um mindestens fünf \log_{10} Stufen). Diese Abtötungsrate konnte bei den beiden Laborstämmen erst bei einer Ce6 Konzentration von 256 μM erreicht werden. Beide Mutanten zeigten im Vergleich zu ihren Wildtypen eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der PDI mittels Ce6 und Rotlicht. So konnte bei der *crtM* Mutante schon bei einer Ce6 Konzentration von 16 μM eine im Vergleich zum Wildtyp signifikante Abnahme der Lebendkeimzahl detektiert werden und bei einer Ce6 Konzentration von 128 μM eine vollständige Abtötung der Zellen beobachtet werden (Abb. 4.28).

Noch größer erwies sich jedoch der Effekt der *rsbUVW-sigB* Deletion auf die Überlebensfähigkeit von *S. aureus* nach PDI. Hier zeigte schon die *rsbUVW-sigB* Mutante bei einer Ce6 Konzentration von 1 μM eine signifikante Abnahme an lebenden Zellen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.29A). Ebenso konnte bei der Δ *rsbUVW-sigB* Mutante schon bei dieser PS Konzentration verglichen zum Wildtyp eine signifikante Abnahme der Lebendkeimzahl detektiert werden (Abb. 4.29B). Bei dieser Mutante konnte schon ab einer Ce6 Konzentration von 32 μM eine Reduktion der KBE/ml um mehr als fünf \log_{10} Stufen hervorgerufen werden.

Alle vier Derivate zeigten, wie zuvor schon für die klinischen *S. aureus* Isolate beobachtet, auch bei höheren Ce6 Konzentrationen keine verminderte Effektivität der PDI, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine Überdosierung mit dem Photosensibilisator bei dieser Spezies wahrscheinlich zu keinem Therapieversagen führt.

5. Diskussion

Der Einsatz der PDT bei mikrobiell induzierten Keratitiden, insbesondere wenn diese durch multiresistente Keime hervorgerufen wurden, wird schon seit geraumer Zeit als eine vielversprechende Behandlungsoption diskutiert [146]. Dieses Krankheitsbild wird in Nordeuropa vor allem durch Bakterien wie *S. aureus* und *P. aeruginosa*, aber auch durch Hefen wie *C. albicans* ausgelöst [147, 148]. Als potentieller PS wird hierbei das Porphyrinderivat Ce6 diskutiert, da dieses über Rotlicht aktivierbar ist, welches aufgrund der im Vergleich zu UV- und Blaulicht geringeren Energiedichte bei der Bestrahlung von lichtsensiblen Organen wie dem Auge, zu bevorzugen ist. Allerdings fehlen derzeit für diesen PS vielfach noch vergleichende Daten zur Effektivität dieser Therapieform gegenüber klinischen Isolaten. Die hier vorliegende Dissertation zielte darauf ab, diese Lücke zu schließen.

5.1 Dunkeltoxizität von Chlorin e6

Pathogene Bakterien sind u. a. dazu in der Lage, metallhaltige Porphyrinstrukturen wie Häm zu binden und aufzunehmen, um ihren Eisenbedarf im Infektionsgeschehen decken zu können. Hohe Konzentrationen dieser metallhaltigen Porphyrine wiederum zeigen eine toxische Wirkung auf viele Bakterienarten wie *S. aureus* und *P. aeruginosa* [149]. In Hinblick auf die strukturelle Verwandtschaft von Ce6 zu Häm war es daher von Interesse, initial die potentielle Dunkeltoxizität dieses PS zu überprüfen. Mit keiner der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Ce6 Konzentrationen (1 - 512 μM) konnte nach 30-minütiger Koinkubation der bakteriellen bzw. pilzlichen Zellsuspensionen in Dunkelheit eine signifikante Abnahme der Kolonie bildenden Einheiten (KBE) beobachtet werden (siehe Abb. 4.02). Daher kann davon ausgegangen werden, dass Ce6 in Konzentrationen bis 512 μM keine therapeutisch relevante Dunkeltoxizität aufweist. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den Befunden von Chin und Kollegen, die für Ce6 bei einer Konzentration von 100 μM nach 30-minütiger Koinkubation im Dunkeln ebenfalls bei Lymphozyten und Tumorzellen keine signifikante Zytotoxizität des PS beobachten konnten [150].

5.2 Lichttoxizität

Zusätzlich zur Dunkeltoxizität des PS muss auch eine mögliche Toxizität des Lichtes, insbesondere als kurzwelliges Licht verwendet wird ($\leq 450 \text{ nm}$), in Betracht gezogen werden. Im Gegensatz zu dem für die Behandlung infektiöser Keratitiden bereits experimentell eingesetzten PS Riboflavin, der Licht im UV- bis Blaubereich ($\lambda = 350 - 450 \text{ nm}$) für seine Aktivierung benötigt, bietet Ce6, ebenso wie die strukturverwandten PS Porfimir (Handelsname Photofrin) und 5-Aminolävulinsäure (ALA) den Vorteil, auch mit Rotlicht ($\lambda = 630 - 670 \text{ nm}$) aktiviert werden zu können. Dies bietet sowohl in Hinblick auf die

Eindringtiefe in das Gewebe (langwelligeres Licht vermag tiefer in Gewebe vorzudringen) als auch in puncto Lichttoxizität (kurzwelliges Licht hat zwar im Vergleich zu langwelligerem Licht eine erhöhte antimikrobielle Wirkung, aber ebenso eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, ebenfalls nicht infiziertes Gewebe zu schädigen) Vorteile für die Therapie.

Mikroorganismen, die ausschließlich Rotlicht ($\lambda = 670 \text{ nm}$) mit einer maximalen Energiedosis von $18,6 \text{ J/cm}^2$ ausgesetzt waren, zeigten gegenüber den entsprechenden Dunkelkontrollen keine relevanten Veränderungen (Abb. 4.03). Damit darf davon ausgegangen werden, dass die hier getesteten Lichtdosen, ebenso wie Ce6 alleine, keinen relevanten Einfluss auf die Vitalität der Isolate ausüben. Diese Beobachtungen decken sich mit Befunden anderer Autoren. So konnten Schastak et al. für Licht der Wellenlänge 760 nm eine Lichttoxizität sowohl bei *S. aureus* (MSSA und MRSA) als auch bei *P. aeruginosa* mit einer verwendeten Energiedosis von bis zu 100 J/cm^2 ausschließen [151]. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von Bliss et. al. publiziert, die die Wirkung der PDT mittels Photofrin und Lichtenergie bei einer Leistungsdichte von 9 J/cm^2 auf Hefen testeten [152]. Eine gegenteilige Beobachtung hingegen konnte Maclean et. al. für kurzwelligeres Licht ($\lambda = 405 \text{ nm}$) machen [153]. Bereits bei einer Energiedosis von 31 J/cm^2 konnte bei dieser Wellenlänge für *S. aureus* Zellpopulationen eine Keimlastreduktion von drei \log_{10} Stufen beobachtet werden. *P. aeruginosa* Kulturen hingegen benötigten bei Licht dieser Wellenlänge eine Energiedosis von 180 J/cm^2 , um eine ähnliche Abtötungsrate hervorzurufen. Da die vorliegende Arbeit im Hinblick auf die Behandlung von Keratitiden zu sehen ist, wären die zuvor in der Studie von Maclean und Kollegen angeführten Energiedosen nach DIN EN 60 825-1 (VDE 0837 Teil 1): 2001-11 jedoch entschieden zu hoch.

5.3 Bestimmung des antimikrobiellen Effektes der PDT mittels Ce6 und Rotlicht gegen *Pseudomonas aeruginosa*

Als Gram-negativer Keim wurde *P. aeruginosa* ausgewählt, der als häufiger Erreger von Keratitiden gilt. Verglichen mit Gram-positiven Keimen und Hefen benötigen Pseudomonaden relativ hohe PS-Konzentrationen, die bei dieser Arbeit weit über $100 \mu\text{M}$ lagen, um in Kombination mit Licht (670 nm ; $18,6 \text{ J/cm}^2$) und Sauerstoff eine Reduktion der Lebendkeimzahl um mehr als 90 % (t_{90}) auszulösen. Für die drei klinischen Isolate (PA51, 53 und 54) wurde diese Abtötungsrate bei einer Ce6 Konzentration von $128 \mu\text{M}$ beobachtet, wenn die Zellsuspensionen für 30 Minuten mit dem PS koinkubiert wurden und nachfolgend für 10 Minuten mit Rotlicht bestrahlt wurden (Abb. 4.15 - 4.16). Für das Laborisolat PA14 hingegen stellte sich eine t_{90} erst bei einer Ce6 Konzentration von $256 \mu\text{M}$ ein (Abb. 4.25). Eine aus therapeutischer Sicht angestrebte Reduktion der Keimlast um $\geq 99,9 \%$ konnte mit Hilfe dieses PDT Protokolls jedoch nur für das Isolat PA54 beobachtet werden. Ebenso zeigte die Mehrzahl der mit einer Ce6 Konzentration von $128 \mu\text{M}$ behandelten klinischen *P. aeruginosa* Isolate eine vergleichsweise

geringe Suszeptibilität gegenüber diesem PDT Schema, bei der nur vier der 17 getesteten Isolate eine Reduktion der KBE/ml von $\geq 99,9$ % aufwiesen (Abb. 4.17B). Für einen relevanten Anteil dieser Versuchsgruppe (9/17) musste hingegen sogar eine relative Überlebensrate von ≥ 10 % verzeichnet werden.

Bei allen vier über ein breites Spektrum an Ce6 getesteten *P. aeruginosa* Isolaten konnte übereinstimmend ein Anstieg der Überlebensrate bei der höchsten hier getesteten Ce6 Konzentration (512 μ M) beobachtet werden. Dieses als „Eagle Effect“ bezeichnete Phänomen ist nicht untypisch für die Aktivität von Antibiotika und konnte auch schon in Hinblick auf die Effektivität der PDT beobachtet werden [154, 155].

Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass *P. aeruginosa* im Allgemeinen eine heterogene Empfindlichkeit gegenüber dieser Therapieform aufweist. Es darf vermutet werden, dass viele klinische Isolate bei einer Verwendung dieses PDT Protokolls nicht in einem therapeutisch erforderlichen Maße abgetötet werden. Ebenso ist mit Schwierigkeiten bei der Dosisfindung für diesen PS zu rechnen, da es bei Ce6 zu einer Überdosierung kommen kann, die zu einer verminderten therapeutischen Effektivität führt.

Die zuvor beschriebenen Beobachtungen decken sich mehrheitlich mit der verfügbaren Literatur zu diesem Themenkomplex. Im Allgemeinen wird in der Literatur die Meinung vertreten, dass Gram-negative Bakterien eine verminderte Sensitivität gegenüber der PDT zeigen. Die Mehrzahl der Autoren ist sich dabei einig, dass die erhöhte Resistenz Gram-negativer Bakterien, im Vergleich zu Hefen oder zu Gram-positiven Bakterien, ihre Erklärung in der Struktur der Bakterien, um genauer zu sein, in der äußeren Membran, hat. Eine Vorbehandlung dieser, z. B. mit EDTA oder PMNP, erhöht die Abtötungsraten nach PDT wesentlich, da die äußere Zellmembran permeabler für die verwendeten PS wird [156]. Dass Gram-negative Bakterien im Vergleich zu Gram-positiven Bakterien eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber einer PDT mittels Protoporphyrin-Derivaten und Rotlicht aufweisen, wurde experimentell sowohl von Schastak et. al. als auch Drulis-Kawa und Kollegen bei der Testung der Aktivität des Ce6 Derivats Photolon gegenüber *P. aeruginosa* und *S. aureus* belegt [157, 158]. Ebenso stellten Huang et. al. fest, dass *P. aeruginosa* im Vergleich zu *S. aureus* auch deutlich schwieriger per PDT mittels Methylenblau und Rotlicht zu inaktivieren ist. Darüber hinaus beobachteten Huang und Kollegen für *P. aeruginosa*, dass zu hohe Konzentrationen des PS Methylenblau im Zusammenspiel mit Rotlicht zu verminderten Abtötungsergebnissen führen können. Dies wurde von den Autoren mit einem optischen Schatten erklärt, der die mit PS geladenen Zellen schützt, indem das applizierte Licht adsorbiert wird. Im Unterschied zu den hier vorliegenden Ergebnissen wurde von Huang et. al. jedoch die Zellpopulation mit Rotlicht aktiviert, ohne zuvor das nicht an die Bakterienzellen gebundene/aufgenommene Ce6 aus der Zellsuspension zu entfernen. Damit lagen in letzterer Studie deutlich höhere PS-Konzentrationen in der Zellsuspension vor, die, wie auch hier in Abb. 4.04 für die

zellfreien Ce6 Suspensionen gezeigt, eine verminderte Aktivierung des PS bewirken [159]. Eine vergleichsweise starke Reduktion der Keimlast (> 95 %) nach PDT mittels Ce6 und Rotlicht bei relativ niedrigen Ce6 Konzentrationen (20 μM) und einer Energiedosis von 20 J/cm^2 wurde hingegen für *P. aeruginosa* von Park und Kollegen [140] publiziert. Hier gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass im Rahmen letzterer Studie mit dem Stamm KCTC2004 nur ein *P. aeruginosa* Isolat getestet wurde, welches, ähnlich wie im Rahmen der hier vorliegenden Dissertation das Isolat PA54, möglicherweise eine für diese Spezies eher ungewöhnlich hohe Empfindlichkeit gegenüber dieser Therapieform aufweist. Diese Hypothese wird auch durch die von Park et. al. mit anderen Gram-negativen Bakterienarten wie *Escherichia coli* und *Salmonella* Typhimurium gemachten Beobachtungen unterstützt, die mit dieser Ce6 Konzentration/Energiedosis nur vergleichsweise schwache Abtötungsraten (< 80 %) zeigten [140]. Im Hinblick auf das effektivste PDT Regime zeigte sich, dass sowohl die Inkubationszeit des PS mit den Bakterienzellen, als auch die Belichtungszeit der PS-behandelten Bakterien einen kritischen Einfluss auf die Abtötungseffizienz der PDT ausüben. So zeigte die Kombination einer 30-minütigen Inkubation der Bakterienzellen mit dem PS mit nachfolgender Belichtung von 10 Minuten Rotlicht, entsprechend einer Energiedosis von 18,6 J/cm^2 , bei dem *P. aeruginosa* Isolat PA54 die beste Abtötungseffizienz aller im Rahmen dieser Arbeit mit diesem Isolat getesteten Inkubations-/Belichtungszeit-Kombinationen (Abb. 4.15). Die Verkürzung der PS-Inkubationszeiten bei gleichbleibender Belichtungszeit hingegen führte zu einer markanten Abnahme der Abtötungseffizienz. Interessanterweise zeigte sich bei höheren Ce6 Konzentrationen (64 - 256 μM), im Vergleich zu den kürzeren PS-Inkubationszeiten (fünf und 15 Minuten), nach 30-minütiger PS-Inkubation auch eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzsignale der PS-behandelten Bakterienzellen nach Anregung mittels Blaulicht, während dies für die niedrigeren Ce6 Konzentrationen nicht der Fall war (Abb. 4.07B). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Ce6 Akkumulationsfähigkeit von *P. aeruginosa* ab einem gewissen PS Schwellenwert über die Zeit steigerbar ist. Dass in diesem PS-Konzentrationsfenster auch die höchsten Abtötungsraten nach Durchlaufen des PDT-Schemas beobachtet wurden (Abb. 4.15), kann weiterhin als Hinweis darauf gewertet werden, dass bei längeren PS-Koinkubationszeiten (> 15 Minuten) auch qualitative Veränderungen in der Akkumulation bzw. Aufnahme des PS durch die Bakterienzelle erfolgen, die zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber dieser Therapieform führen. Letztere Hypothese wird dadurch gestützt, dass bei PA54 nach Inkubation der Zellen mit 256 μM Ce6 für 15 Minuten nach Blaulichtaktivierung eine ähnliche hohe Fluoreszenz beobachtet wurde wie nach einer Inkubation der Zellen mit 128 μM Ce6 für 30 Minuten (Abb. 4.07 B). Im Hinblick auf die Abtötungsraten nach 10-minütiger Belichtung mit Rotlicht konnte bei der für 15 Minuten mit 256 μM Ce6 koinkubierten Zellpopulationen aber nur eine Reduktion der KBE/ml von weniger als einer \log_{10} Stufe beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte für die für 30 Minuten mit 128 μM Ce6 koinkubierten Zellpopulationen unter diesen Belichtungsbedingungen eine Reduktion der

KBE/ml von mehr als fünf \log_{10} Stufen verzeichnet werden (Abb. 4.15B). Ähnliche Beobachtungen wurden ebenfalls von Drulis-Kawa et. al. publiziert. Diese Autoren beobachteten für *P. aeruginosa* bei der Verwendung von Photolon und Rotlicht ebenfalls eher moderate Abtötungsraten, die etwa bei zwei \log_{10} Stufen lagen. Ebenso bemerkten sie eine inverse Korrelation zwischen PS-Konzentration und PS-Inkubationszeit. So führten niedrigere Ce6 Konzentrationen bei längeren Inkubationszeiten zu einer effizienteren Abtötung der Bakterienpopulation als höhere Ce6 Konzentrationen bei kürzeren Inkubationszeiten. Die Autoren führten dies auf ein geringeres Level des Porins OprD zurück, welches für den Influx von Ce6 in das Gram-negative Bakterium verantwortlich sein soll. Ob die in der hier vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede der Abtötungseffizienz in Bezug auf die PS-Konzentration und PS-Inkubationszeit, wie von Drulis-Kawa et. al. im Rahmen ihrer Studie postuliert, auch auf eine Modulation der OprD Expression zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht geklärt werden, bietet aber einen vielversprechenden Erweiterungsansatz für diese Arbeit [158].

Analog zur Verkürzung der PS-Inkubationszeiten führte auch die Reduktion der Belichtungszeiten bei gleichbleibender PS-Inkubationszeit zu einer markanten Reduktion in der Abtötungseffizienz der PDT (Ab. 4.15A). So konnte bei Verringerung der Belichtungszeit von zehn auf fünf bzw. einer Minuten bei keiner der hier eingesetzten Ce6 Konzentrationen eine Abtötungsrate $> 99,9\%$ erreicht werden. Diese Beobachtungen decken sich mit den von Valduga et al. publizierten Befunden, in denen eine Verkürzung der Bestrahlungszeit (von sieben auf eine Minute in einminütigen Schritten) bei gleichbleibender PS-Konzentration für Gram-negative (*E. coli*) wie Gram-positive (*Streptococcus faecium*) Bakterienzellpopulationen ebenfalls zu einer klaren Abnahme der Abtötungsraten führte [160]. Dass nach Verkürzung der Belichtungszeit von zehn auf fünf bzw. eine Minute bei keiner der hier eingesetzten Ce6 Konzentrationen eine Abtötungsrate $> 99,9\%$ erreicht werden konnte (Abb. 4.15A), ist ebenfalls als ein klarer Hinweis darauf zu werten, dass eine Verkürzung der Bestrahlungsdauer nur eingeschränkt durch eine Erhöhung der PS Konzentration kompensiert werden kann. Dass eine Bestrahlungszeit von zehn Minuten bei einer PS-Inkubationszeit von 30 Minuten noch nicht das Optimum des PDT Regimes im Hinblick auf die in vitro Abtötungseffizienz darstellt, belegen wiederum die in Abb. 4.27 dargestellten Ergebnisse. So konnte für das für diese Therapieform vergleichsweise unempfindliche *P. aeruginosa* Isolat PA14 eine Verdopplung der Belichtungszeit von zehn auf 20 Minuten eine signifikante Verbesserung der Abtötungseffizienz nach 30-minütiger Inkubationszeit des PS mit den Bakterienzellen hervorrufen (Abb. 4.27A). Ebenso führte die Wiederholung des PDT Regimes 30 Minuten Inkubation/10 Minuten Belichtung bei PA14 im Vergleich zur einmaligen Durchführung dieses PDT Schemas zu einer signifikanten Verbesserung der Abtötungsraten (Abb. 4.27B, C). Für beide Therapieprotokolle gilt jedoch einschränkend darauf hinzuweisen, dass mit Energiedosen von $37,2 \text{ J/cm}^2$ die von der DIN-Norm DIN EN 60825-4 VDE 0837-4 für Hornhäute

festgelegte maximale Energiedosis von 24 J/cm² bereits überschritten wurden und damit mögliche lichttoxische Effekte auf nicht befallene Hornhautareale in Kauf genommen werden müssten.

Die Bakterienart *P. aeruginosa* zeichnet sich unter anderem dadurch aus, dass viele, aber nicht alle, Isolate dieser Spezies eine Reihe an Pigmenten produzieren und diese in das umgebende Milieu abgeben [161]. Manche dieser Pigmente, wie Pyocyanin (PCN) und Pyoverdin, gelten als wichtige Virulenzfaktoren für diesen Organismus, die dem Erreger eine erhöhte Pathogenität verleihen [162]. Für PCN ist zudem bekannt, dass es den Erreger im Infektionsgeschehen schützt, indem es Licht absorbiert und bakterizide Stoffe, wie Sauerstoffradikale, eliminiert [163]. Im Einklang mit diesen Studien konnte im Rahmen dieser Dissertation ein relevanter Einfluss der Pigmentierung von *P. aeruginosa* im Hinblick auf dessen Empfindlichkeit gegenüber der PDT mittels Ce6 und Rotlicht beobachtet werden. So zeigten die isogenen $\Delta pvdA$ und $\Delta phzM$ Mutanten, in denen das für die Pyoverdin Biosynthese benötigte Enzym L-Ornithin N5-Oxygenase kodierende Gen bzw. die für die PCN-Biosynthese benötigte N-Methyltransferase PhzM deletiert wurden, im Vergleich zum Wildtyp PA14 eine signifikant höhere Empfindlichkeit gegenüber der Ce6/Rotlichtbehandlung (Abb. 4.25). Dies ist umso bemerkenswerter, da im Rahmen des hier verwendeten PDT Protokolls die bakteriellen Zellsuspensionen vor der Rotlicht-Bestrahlung mit Medium gewaschen wurden und somit alle Pigmente, die in das umgebende Milieu abgegeben wurden, aus dem Versuchsansatz entfernt worden sein sollten. Ungeachtet dessen weisen diese Befunde klar darauf hin, dass zumindest PCN und Pyoverdin einen gewissen Schutz vor der Inaktivierung per PDT für *P. aeruginosa* liefern können. Stammspezifische Unterschiede in der Produktion dieser Pigmente könnte auch eine Erklärung dafür liefern, warum besonders bei dieser Spezies zwischen den Isolaten zum Teil markante Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber dieser Therapieform zu verzeichnen waren (Abb. 4.17). Inwiefern die Empfindlichkeit von *P. aeruginosa* gegenüber der PDT mittels Ce6 und Rotlicht tatsächlich mit der Pigmentproduktion der jeweiligen Isolate korreliert, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht adressiert werden, bietet aber erneut einen vielversprechenden Ansatz für weiterführende Untersuchungen.

Quantitative und/oder qualitative Unterschiede in den Eisenaufnahmesystemen könnten ebenfalls eine mögliche Erklärung dafür liefern, warum bei *P. aeruginosa* zwischen den Isolaten zum Teil markante Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber der PDT mittels Ce6 und Rotlicht zu verzeichnen waren. Wie in der Einleitung bereits beschrieben, verfügt *P. aeruginosa* über verschiedene Transporter und Enzyme, die eine Aufnahme und Metabolisierung von Häm oder Häm-enthaltenden Proteinen aus dem umgebenden Milieu gestatten [89-92]. Weiterhin ist bekannt, dass auch andere Protoporphyrin Strukturen wie Protoporphyrin IX effektiv über diese Transportwege aufgenommen werden können [164]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Ce6 mit Protoporphyrin IX (Abb. 1.03A, B) könnten auch diese Aufnahmesysteme bei der Bindung bzw. dem Import des PS an/in die Gram-negative Bakterienzelle beteiligt sein. Etwaige Unterschiede in der Expression dieser Häm-

Aufnahmefaktoren könnten dann mitverantwortlich dafür sein, dass bestimmte *P. aeruginosa* Isolate eine höhere Empfindlichkeit gegenüber dieser Therapieform zeigen. Allerdings zeigten die drei klinischen *P. aeruginosa* Isolate, PA51, PA52 und PA53, über nahezu den gesamten Ce6 Konzentrationsbereich ähnliche PS-Akkumulationsraten (Abb. 4.06), aber sehr unterschiedliche Abtötungsraten (Abb. 4.15, 4.16). Ebenso wiesen die PA14 Pigmentmutanten im Vergleich zum Wildtyp signifikant erniedrigte Ce6 Akkumulationsraten, aber erhöhte Abtötungsraten auf (Abb. 4.25). Diese Beobachtungen lassen eher vermuten, dass die Ce6 Akkumulationsraten nicht mit der Empfindlichkeit der jeweiligen Isolate gegenüber dieser Therapieform korrelieren.

5.4 Bestimmung des antimikrobiellen Effektes der PDT mittels Ce6 und Rotlicht gegen *Staphylococcus aureus*

Wie in der Einleitung bereits dargelegt, stellt das Bakterium *S. aureus* vielerorts einen der wichtigsten Verursacher bakterieller Keratitiden dar (Kapitel 2.1.2). Insbesondere multiresistente Varianten dieser Spezies, sogenannte MDR-SA (diese sind gegenüber mindestens einer Substanz aus drei verschiedenen Antibiotikaklassen resistent) stellen dabei für das Gesundheitssystem eine zunehmende Herausforderung dar, da sie häufig nicht mehr erfolgreich mit der konventionellen Antibiotikatherapie behandelbar sind. Da Gram-positive Bakterien aufgrund ihres im Vergleich zu Gram-negativen Bakterien vergleichsweise einfachen Zellwandaufbaus in der Regel empfindlicher auf eine PDT reagieren, stellt diese Therapieform insbesondere für MDR-SA eine vielversprechende Therapieoption dar [165]. Vergleichende Untersuchungen an klinischen *S. aureus* Isolaten für den PS Ce6, die auch der genetischen Heterogenität dieser Spezies Rechnung tragen, lagen zum Zeitpunkt der experimentellen Phase dieser Dissertation jedoch noch nicht vor.

Wie schon für einzelne *S. aureus* Isolate zuvor gezeigt, erwiesen sich alle im Rahmen dieser Arbeit getesteten klinischen *S. aureus* Isolate empfindlich gegenüber einer PDT mittels Ce6 und Rotlicht [166, 167, 168]. Bei einer PS-Inkubationszeit von 30 Minuten und einer Belichtungszeit von zehn Minuten konnten die Zellsuspensionen sämtlicher hier getesteter klinischer Isolate mit einer Ce6 Konzentration $\geq 128 \mu\text{M}$ in ihrer Viabilität um einen Faktor von mindestens fünf \log_{10} Stufen reduziert werden (Abb. 4.18 - 4.20). Anders als bei *P. aeruginosa* und *C. albicans* beobachtet, führten die höchsten hier getesteten Ce6 Konzentrationen bei *S. aureus* nicht zu verminderten Abtötungsraten, so dass für diese Spezies vermutlich nicht mit einer Überdosierung des PS gerechnet werden muss. Verkürzungen der PS-Inkubationszeit oder der Belichtungszeit führten, ähnlich wie für *P. aeruginosa* beobachtet, zu einer signifikanten Reduktion der Abtötungseffizienz dieser Methode (Abb. 4.18). Fluoreszenzmessungen der Ce6-behandelten Zellsuspensionen weisen darauf hin, dass *S. aureus*, insbesondere bei höheren Ce6 Konzentrationen ($\geq 128 \mu\text{M}$) stammspezifische Unterschiede in der PS-Akkumulationsfähigkeit

aufweisen (Abb. 4.08). Interessanterweise wies hierbei das *S. aureus* Isolat mit der höchsten Ce6-Akkumulationsfähigkeit, MRSA 36, zeitgleich auch die höchste Empfindlichkeit gegen über der PDT mittels Ce6 und Rotlicht auf. Zellsuspensionen dieses Isolates konnten bereits bei einer Ce6 Konzentration von 64 μM in ihrer Viabilität um einen Faktor von mindestens drei \log_{10} Stufen reduziert werden, während dies für die anderen, über ein breites Ce6 Spektrum getesteten, klinischen *S. aureus* Isolate erst ab einer Ce6 Konzentration von 128 μM der Fall war. Andererseits wiesen die beiden im Rahmen dieser Studie untersuchten Laborstämme Newman und RN1HG im Vergleich zu ihren isogenen Pigmentmutanten bei höheren PS Konzentrationen signifikant höhere Ce6-Akkumulationsraten auf (Abb. 4.13, 4.14), zeigten aber in Hinblick auf ihre Empfindlichkeit gegenüber der PDT mittels Ce6 und Rotlicht im Vergleich zu ihren Mutanten jeweils signifikant verminderte Abtötungsraten (Abb. 4.28, 4.29). In der Summe deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass keine Korrelation zwischen PS-Akkumulation und Abtötungseffizienz der PDT bei *S. aureus* gegeben ist. Diese Hypothese steht in Einklang mit den Beobachtungen von Gad et. al., die für verschiedene Ce6-Derivate ebenfalls keine Korrelation zwischen PS-Akkumulation und PDT-Abtötungseffizienz bei *S. aureus* detektierten [169].

Anders als für *P. aeruginosa* beobachtet, wurde bei *S. aureus* im Hinblick auf den Einfluss der Ce6-Inkubationszeit auf die PS-Akkumulationsraten keine Zunahme der Ce6-Akkumulationsfähigkeit mit zunehmender PS-Inkubationszeit detektiert (Abb. 4.09). Dies legt in Anbetracht der Beobachtungen, dass eine Verkürzung der PS-Inkubationszeiten zu einer signifikanten Verminderung der Abtötungseffizienz dieser Methode führt, den Schluss nahe, dass es bei längeren Ce6-Inkubationszeiten (> 15 Minuten) zu einer qualitativen Veränderung der PS Adsorption/Aufnahme an/in die Gram-positive Bakterienzelle kommt, die eine Auswirkung auf die Empfindlichkeit der Bakterienzelle gegenüber dieser Therapieform ausübt.

Da die meisten klinischen *S. aureus* Isolate eine Pigmentierung aufweisen und für das von *S. aureus* hauptsächlich produzierte Pigment Staphyloxanthin bekannt ist, das es die Empfindlichkeit von *S. aureus* gegenüber ROS beeinflusst, wurde im Rahmen dieser Dissertation mithilfe einer geeigneten Mutante auch der Einfluss dieses Pigments auf die PDT Suszeptibilität adressiert [170]. Des Weiteren wurde mit einer *S. aureus* $\Delta\text{rsbUVW-sigB}$ Mutante zusätzlich ein *S. aureus* Derivat analysiert, das neben der fehlenden Pigmentierung zusätzlich noch Einschränkungen in der globalen Stressantwort aufweist. Für beide isogenen Stammpaare konnten im Hinblick auf die Empfindlichkeit gegenüber der PDT mittels Ce6 und Rotlicht bei den Mutanten ab Ce6 Konzentrationen von 8 bzw. 2 μM signifikant erhöhte Abtötungsraten beobachtet werden (Abb. 4.28, 4.29). Interessanterweise erwies sich die Empfindlichkeitszunahme bei der isogenen $\Delta\text{rsbUVW-sigB}$ Mutante dabei noch als deutlich höher als bei der ausschließlich die Staphyloxanthin-Biosynthese betreffenden ΔcrtM Mutante. So führte die Deletion von *crtM* im Laborstamm Newman bei einer Ce6 Konzentration von 64 μM zu einer Abtötung

von $\geq 99,9$ % der Zellen, während dies beim Wildtyp erst ab einer PS Konzentration $\geq 128 \mu\text{M}$ zu beobachten war (Abb. 4.28). Für das Stammpaar RN1HG/RN1HG $\Delta\text{rsbUVW-sigB}$ hingegen konnte eine Abtötungsrate $\geq 99,9$ % bereits ab einer Ce6 Konzentration von $32 \mu\text{M}$ beobachtet werden, während der Wildtyp erst ab einer PS Konzentration $\geq 256 \mu\text{M}$ eine solche Abtötungsrate zeigte (Abb. 4.29). Interessanterweise weist der Laborstamm RN1HG (syn. HG001) im Vergleich zu Newman eine stärkere Pigmentierung auf, was die Vermutung zulässt, dass die Unterschiede in der Empfindlichkeitszunahme zwischen den beiden Stammpaaren möglicherweise auf die unterschiedliche Pigmentierung der Wildtypisolate zurückführbar ist [171]. Da bei der RN1HG $\Delta\text{rsbUVW-sigB}$ Mutante neben der fehlenden Pigmentierung auch Einschränkungen in der globalen Stressantwort vorzufinden sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zunahme der PDT Empfindlichkeit in dieser Mutante maßgeblich auf der veränderten Stressantwort beruht. Ungeachtet dessen unterstreichen beide Befunde, dass die Pigmentierung von *S. aureus* einen Faktor bei der PDT mittels Ce6 und Rotlicht gegenüber diesem Pathogen darstellen könnte. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass die Inhibierung der Staphyloxanthinbiosynthese auch einen unmittelbaren Einfluss auf die Pathogenität von *S. aureus* ausübt. So konnte die verminderte Virulenz einer *S. aureus crtM* Mutante bereits in einem murinen Abszessmodell nachgewiesen werden [172]. Basierend auf diesen Beobachtungen wurden bereits erste Inhibitoren identifiziert, die die Staphyloxanthinsynthese zu inhibieren vermögen, um so die Virulenz des Erregers zu senken [173, 174]. Eine Kombination dieser Substanzen mit Ce6 könnte ein Lösungsmodell sein, um in Zukunft relativ hohe Konzentrationen des PS zu verringern und so PDT-bedingte Kollateralschäden an nicht befallenen Organteilen zu reduzieren.

5.5 Bestimmung des antimikrobiellen Effektes der PDT mittels Ce6 und Rotlicht gegen *Candida albicans*

Insbesondere in subtropischen und tropischen Regionen, aber auch in gemäßigten Klimazonen wie Europa sind Pilze regelmäßige Verursacher von infektiösen Keratitiden [175]. Während in den feucht-warmen Klimazonen filamentöse Pilzgenera wie *Fusarium* und *Aspergillus* als Verursacher pilzlicher Keratitiden im Vordergrund stehen, so werden in gemäßigten Klimaregionen vor allem durch Hefen wie *C. albicans* hervorgerufene Keratitiden beobachtet [176]. Diese durch Hefen hervorgerufenen Keratitiden werden häufig initial nicht korrekt diagnostiziert, was dazu führt, dass diese Infektionen vielfach verspätet therapiert werden [177]. In der Folge kommt es bei mykotischen Keratitiden 5 - 6 x häufiger zu Perforationen der Cornea als bei bakteriell verursachten Keratitiden [178]. Auch wenn die Prognose für die topische Behandlung von durch *C. albicans* verursachte Keratitiden mittels Antimykotika wie Amphotericin B 0,15 %, entweder alleine oder in Kombination mit Azolen als gut gilt, so sind alternative Behandlungsformen, insbesondere als sie die mikrobielle Last im infizierten Organ

zu reduzieren vermögen, von besonderem Interesse. Grund dafür ist die Tatsache, dass die meisten der derzeit zugelassenen Antimykotika zwar eine wachstumshemmende, aber keine fungizide Wirkung haben [179]. In der Folge sehen ein Großteil der Behandlungspläne in der Regel über mehrere Tage hinweg eine stündlich sich rund um die Uhr mit diesen Antimykotika wiederholende Behandlung vor [180].

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten klinischen *C. albicans* Isolate erwiesen sich mehrheitlich als sehr empfindlich gegenüber der photodynamischen Therapie. Für die drei über ein breites Spektrum an Ce6 getesteten klinischen Isolate konnte eine Abtötung der Organismen um mindestens 99,9 % bereits bei PS Konzentrationen von 16 bzw. 32 μM beobachtet werden (Abb. 4.22 und 4.23). Weitergehend zeigten 13 der 17 mit einer Ce6 Konzentration von 32 μM behandelten *C. albicans* Isolate nach 30-minütiger Koinkubation mit dem PS und zehn-minütiger Belichtung mit Rotlicht eine Reduktion der Keimlast um 99,9 % (Abb. 4.24). Gleichzeitig wiesen aber vier der mit diesem Therapieschema behandelten Isolate Überlebensraten von zehn Prozent auf. Diese Befunde weisen darauf hin, dass innerhalb der Art *C. albicans* stammspezifische Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber dieser Therapieform existieren, auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass letztere *C. albicans* Isolate nach Koinkubation mit einer höheren Ce6 Konzentration geringere Überlebensraten zeigen. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen mag in Unterschieden in der Azolresistenz der Isolate liegen. Für die hier untersuchten *C. albicans* Isolate lagen, anders als für die bakteriellen Isolate, leider keine detaillierten Resistenzinformationen vor. Es ist aber bekannt, dass *C. albicans* auf verschiedenen Wegen, unter anderem durch Überexpression von MFS (Major Facilitator Superfamily) und ABC (ATP Binding Cassette) Transportern, unempfindlich gegenüber Azolen werden kann [181]. Diese Transporter wiederum sind bekannt dafür, eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren aus dem Cytosol in das umgebende Milieu transportieren zu können [182]. Aufgrund der hier beobachteten stammspezifischen Unterschiede in der PDT Toleranz wäre es denkbar, dass *C. albicans* Isolate, die eine auf der Überexpression von MFS bzw. ABC Transportern beruhende Azolresistenz aufweisen, auch eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber der PDT mittels Ce6 und Rotlicht aufweisen. Möglicherweise wird der PS von diesen Isolaten über diese Effluxpumpen verstärkt aus dem Cytosol der Hefezellen transportiert. Diese Hypothese könnte unter anderem über eine Untersuchung des Azolresistenzniveaus der hier untersuchten *C. albicans* Isolate erhärtet werden.

Alternativ könnten stammspezifische Unterschiede in der *sod* Genaustattung an der Produktion von Superoxyd-Dismutasen für die geringere Empfindlichkeit der vier *C. albicans* Isolate gegenüber dieser Therapieform ursächlich sein. Das Genom von *C. albicans* kodiert für bis zu sechs *sod* Gene, von denen drei (*sod4-sod6*) für die Bildung von an der Zelloberfläche lokalisierten Superoxyd-Dismutasen verantwortlich sind. Von letzteren ist bekannt, dass sie für die Entgiftung der vom Wirt während des Infektionsprozesses genierten ROS von zentraler Bedeutung sind [183]. So konnte für *C. albicans*

Isolate, bei denen die *sod* Gene *sod4* und *sod5* deletiert wurden, eine signifikante Reduktion der Überlebensfähigkeit in Anwesenheit von ROS generierenden humanen Makrophagen beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass Unterschiede in der *sod4-sod6* Genaustattung und/oder in den Expressionsraten dieser *sod* Gene auch einen relevanten Einfluss auf die Abtötungseffizienz der PDT ausüben.

Im Hinblick auf die Adsorption bzw. Aufnahme von Ce6 an/durch die Hefezellen zeigte sich, abhängig von der PS Konzentration, ein biphasischer Verlauf. Während die *C. albicans* Zellpopulationen in Anwesenheit geringer Ce6 Konzentrationen (1 - 32 μM) eine nur geringe, aber weitestgehend linear steigende Lichtemission im Fluoreszenzassay zeigten, so stieg diese ab einer Ce6 Konzentration von 64 μM markant an, um erst ab einer Ce6 Konzentration von 512 μM wieder etwas abzuflachen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass *C. albicans* ab einem Schwellenwert von $> 32 \mu\text{M}$ Ce6 verstärkt den PS in sich aufnimmt und erst bei sehr hohen Ce6 Werten ($\geq 512 \mu\text{M}$) eine Sättigung dieses Prozesses eintritt. Im Hinblick auf die Intraspeziesvariabilität zeigte sich, wie zuvor schon bei *S. aureus* beobachtet, ab einer Ce6 Konzentration von 64 μM zum Teil signifikante Unterschiede in der Ce6 Akkumulation zwischen den einzelnen *C. albicans* Isolaten (Abb. 4.10). Die im Rahmen dieser Dissertation für *C. albicans* beobachteten hohen PS Akkumulationsraten stehen im Widerspruch zur Literatur, in der für diesen PS für Hefen eine eher geringe Ce6 Aufnahme beschrieben wird. So beobachteten Coleman et al für das von der Firma Frontiers Scientific vertriebene Ce6 bei einer PS Konzentration von 100 μM über einen Koinkubationszeitraum von 24 h für *C. albicans* nahezu keine Aufnahme von Ce6 in die Hefezelle [184]. Eine Koinkubation der Hefezellen mit Ce6 und einem porenformenden pflanzlichen Saponin, A16, führte hingegen zu einer um den Faktor 10 gesteigerten PS Aufnahme durch *C. albicans*, was den Schluss zulässt, dass zumindest die von der Firma Frontiers Scientific vertriebene Ce6 Präparation effizient von der pilzlichen Zellmembran zurückgehalten werden kann. Bemerkenswerterweise führte die Koinkubation der *C. albicans* Zellsuspensionen mit Ce6 und A16 nach Belichtung mit Rotlicht auch zu signifikant verbesserten Abtötungsraten, sodass eine Kombination dieser beiden Substanzen eine interessante Option zur Behandlung von durch *C. albicans* induzierter Keratitiden darstellen könnte. Warum die von der Firma Frontiers Scientific vertriebene Ce6 Präparation im Vergleich zu der im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Ce6 Präparation der Firma ApoCare offensichtlich schlechter von *C. albicans* gebunden/aufgenommen wird, konnte im Rahmen dieser Dissertation nicht experimentell adressiert werden.

Aus therapeutischer Sicht beunruhigend ist, dass sich bei allen drei über ein weites PS Konzentrationsspektrum untersuchten *C. albicans* Isolaten bei höheren Ce6 Konzentrationen ($\geq 128 \mu\text{M}$) eine deutlich verminderte Abtötungseffizienz zeigte, die weit unterhalb der angestrebten Reduktion von drei \log_{10} Stufen blieb. Dieser auch bei *P. aeruginosa* in Zusammenhang mit diesem PDT Prozedere beobachtete „Eagle Effect“ ist als ein klarer Hinweis darauf zu werten, dass auch bei der

Behandlung von *C. albicans* induzierten Keratitiden per PDT mittels Ce6 und Rotlicht mit PS Dosierungsproblemen zu rechnen ist, die bei einer Überdosierung des PS zu einer verminderten Abtötungseffizienz führen könnte. Interessanterweise korreliert bei *C. albicans* der sprunghafte Anstieg der PS Akkumulation durch die Hefezellsuspension weitestgehend mit der bei höheren Ce6 Konzentrationen beobachteten verminderten Abtötungseffizienz, was vermuten lässt, dass die gesteigerte Adsorption/Aufnahme des PS eher einen protektiven Effekt auf die Hefezellen ausübt.

Die zuvor beschriebenen Effekte der PDT mittels Ce6 und Rotlicht decken sich weitestgehend mit Befunden, die von anderen Forschungsgruppen mit ähnlichen PS wie 5-ALA und Photophrin bzw. Methylenblau und Toluidinblau gemacht wurden. Diese unterscheiden sich aber zum Teil erheblich im Hinblick auf die PS Konzentrationen, die für eine Abtötung $\geq 99,9\%$ benötigt wurden. So beobachteten Monfecola und Kollegen für den PS 5-ALA eine Abtötung der *C. albicans* Zellsuspension um \geq drei \log_{10} Stufen erst bei einer PS Konzentration von 600 mg/ml (dies entspricht ein 5-ALA Konzentration von 4,6 M) und einer Koinkubationszeit von drei Stunden, wenn diese mit einer Wolframlampe ($\lambda = 400 - 700$ nm) mit einer Energiedosis von 40 J/cm^2 belichtet wurde [185]. Hier gilt aber darauf zu verweisen, dass diese Autoren in ihrer Studie den ungebundenen PS vor der Belichtung nicht aus der Zellsuspension entfernt haben, so dass hier mit massiven Abschattungseffekten zu rechnen ist, die möglicherweise dazu beigetragen haben, dass im Vergleich zu Ce6 eine über hundertmal größere PS Konzentration zur effizienten Abtötung der Hefezellen benötigt wurde. Eine therapeutisch relevante Aktivität der PDT gegenüber *C. albicans* mit deutlich geringeren PS Konzentrationen wurden hingegen von Mang et al bei der Verwendung des PS Photophrin (Handelsname Porfimer) beobachtet. Diese Autoren konnten nach Koinkubation der *C. albicans* Zellsuspensionen mit einer 25 mg/ml Photofrin Lösung (dies entspricht einer PS Konzentration von $41,2 \mu\text{M}$) eine Abtötungsrate von $\geq 99,9\%$ beobachten, wenn die Hefezellen nach der PS Koinkubation mit Rotlicht ($\lambda = 630$ nm) mit einer Energiedosis von mindestens 90 J/cm^2 bestrahlt wurden. Eine Halbierung der Energiedosis hingegen reduzierte die Abtötungseffizienz der PDT bereits markant, sodass unter diesen Bedingungen bereits Überlebensraten $> 10\%$ zu verzeichnen waren. Im Hinblick auf die Anwendbarkeit dieses PDT Protokolls zur Behandlung pilzlich induzierter Keratitiden gilt ebenfalls zu berücksichtigen, dass die von Mang und Kollegen verwendeten Energiedosen für die Bestrahlung von Hornhäuten gemäß DIN-Norm DIN EN 60825-4 VDE 0837-4 weit über der maximal zulässigen Energiedosis liegen würde [186]. Giroldo et al wiederum beobachteten für den PS Methylenblau in Kombination mit Rotlicht ($\lambda = 684$ nm) eine dosisabhängige Abtötungskinetik bei *C. albicans*. Die Autoren konnten mit diesem PS bei einer Belichtung der Hefezellsuspension mit einer Energiedosis von 28 J/cm^2 bei keiner der in dieser Studie eingesetzten Methylenblau Konzentrationen (10 - 500 $\mu\text{g/ml}$; dies entspricht einer PS Konzentrationen von $31,3 \mu\text{M}$ bis 1,56 mM) eine Abtötungsrate $\geq 99,9\%$ erreichen. Die effektivste Abtötungsrate dieser PS/Lichtkombination wurde im Rahmen dieser Studie aber bereits bei einer

Methylenblau Konzentration von 50 µg/ml beobachtet, während eine Erhöhung der PS Konzentration wieder zu einer progressiven Zunahme der Überlebensraten führte [187]. Betânia Maria Soares und Kollegen konnten für den PS Toluidinblau in Kombination mit Rotlicht ($\lambda = 630 \text{ nm}$) eine *C. albicans* Abtötungsrate $\geq 99.9 \%$ bei einer PS Konzentration von 25 µM beobachten. Hierzu wurde allerdings eine Energiedosis von 180 J/cm² benötigt, während geringere Energiedosen ($\leq 108 \text{ J/cm}^2$) verminderte Abtötungsraten hervorriefen. Die im Rahmen der Studie von Soares et al maximal eingesetzten PS- und Lichtmengen zeigten alleine genommen, ebenso wie in dieser Dissertation beobachtet, keine signifikanten Auswirkungen auf die Lebensfähigkeit der *C. albicans* Isolate [188].

5.6 Zukunft der PDT mittels Ce6 und Rotlicht bei mikrobiell induzierten Keratitiden

Die antimikrobiell und antifungizid wirkende PDT ist ein guter Ansatzpunkt für die Bekämpfung von Infektionen bei immer steigenden Resistenzen gegenüber Antibiotika und Antifungiziden [189]. Weiterhin gibt es vielversprechende Ansätze, die PDT mit antibakteriellen Stoffen, wie z. B. Chitosan, oder herkömmlichen Behandlungsmethoden, z. B. im Bereich der Zahnmedizin, zu kombinieren, um den Behandlungseffekt zu maximieren [190, 191]. In der Dermatologie ist die Anwendung der PDT schon weit verbreitet, vor allem bei der Behandlung der Aktinischen Keratose, einer Präkanzerose des spinözellulären Karzinoms und bei Akne vulgaris. Im Hinblick auf die Karzinombehandlung wird diese Therapie unter anderem auch in der Urologie getestet. Zusätzlich gibt es Ansätze zur Behandlung von *Helicobacter pylori* Infektionen in der Inneren Medizin [192, 193, 194, 195]. In der Augenheilkunde sei auch auf die schon beschriebene CXL-Therapie in Kapitel 2.1.3.2 hingewiesen.

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde unterstreichen das Potential, dass die PDT mittels Ce6 und Rotlicht auf die Behandlung von durch mikrobielle Erreger hervorgerufene Keratitiden haben könnte. Insbesondere für durch *S. aureus* hervorgerufene Hornhautinfektionen könnte diese Therapieform schon in naher Zukunft ein probates Mittel werden. Um die Effizienz dieser Methode im realen Infektionsgeschehen jedoch adäquat beurteilen zu können, bedarf es weiterer Versuche, die an in vivo Situation angepasst sind. Erstrebenswert sind die komplexen strukturellen Gegebenheiten sowie zellulären und biochemischen Prozesse am Ort des Infektionsgeschehens so gut wie möglich widerzuspiegeln. So spielt zum Beispiel die Penetration und Verteilung des PS in das infizierte Gewebe eine ebenso entscheidende Rolle für den antimikrobiellen Erfolg dieser Methode wie die Verfügbarkeit von Sauerstoff und die Eindringtiefe der aktivierenden Lichtquelle. In diesem Zusammenhang konnte in Kooperation mit der AG Foth (Universität Kaiserslautern) bereits gezeigt werden, dass topisch appliziertes Ce6 nur unzureichend in das Stroma einzudringen vermag, wenn die äußere epitheliale Schicht der Cornea noch intakt ist. Nach mechanischer Entfernung dieser äußeren epithelialen Barriere hingegen konnte der PS bereits nach 15 Minuten bis zu einem Millimeter tief in das Stroma in therapeutisch relevanten Konzentrationen ($\geq 1 \text{ µM}$) eindringen [196]. Leider war es im Rahmen der

zuletzt genannten Untersuchungen nicht möglich, auch Informationen darüber zu gewinnen, ob und mit welcher Präferenz die Bakterienzellen den PS im infizierten Gewebe zu adsorbieren vermögen. Aus der PDT-basierten Tumorthherapie ist hierzu bekannt, dass die stoffwechselaktiveren Tumorzellen den PS in der Regel in einem höheren Maße in sich aufnehmen als das umgebende Gewebe. Diese Unterschiede in der PS Akkumulation wiederum spielen eine entscheidende Rolle dabei, ob und wie stark auch das umgebende Gewebe durch die Lichtaktivierung des PS geschädigt wird. Im Hinblick auf die mikrobiell induzierte Keratitis wäre es von großem wissenschaftlichem Interesse herauszufinden, ob die jeweiligen Pathogene den topisch applizierten und in das Gewebe diffundierenden PS im Vergleich zum Wirtsgewebe in ähnlicher Weise bevorzugt aufnehmen, wie dies bei einem Tumor zu beobachten ist. Andernfalls wäre zu befürchten, dass nach Lichtapplikation bevorzugt das Wirtsgewebe geschädigt wird. Aus Zellkulturexperimenten ist diesbezüglich bereits bekannt, dass humane Keratozyten mittels PDT per Ce6 und Rotlicht bereits bei PS Konzentrationen von ≥ 100 nM signifikant in ihrer Viabilität beeinflusst werden und damit eine wesentlich höhere Empfindlichkeit gegenüber dieser Therapieform aufweisen als die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten mikrobiellen Erreger [197]. Damit gilt zu befürchten, dass bei einer PDT Behandlung einer mikrobiell induzierten Keratitis mit PS Konzentrationen, die auch die mikrobiellen Erreger abzutöten vermögen, auch in einem relevanten Maße mit einer Schädigung des bestrahlten Wirtsgewebes zu rechnen ist. Letztendlich aber geben hierzu nur Tierversuche eine verlässliche Aussage darüber, ob ein solches PDT Regime auch in vivo dazu in der Lage ist, im infizierten Gewebe eine ausreichend hohe ROS Bildung hervorzurufen, um den Infektionserreger in einem ausreichend hohen Maße abzutöten, sodass die Infektion vom Immunsystem des Wirtes kontrolliert und geklärt werden kann. Diesbezüglich gelang es den AG Seitz und Bischoff (Universität des Saarlandes) bereits zu zeigen, dass die Erregerlast in *P. aeruginosa* ausgelösten Keratitiden mithilfe einer einmaligen PDT mittels Ce6 und Rotlicht zwar signifikant reduziert werden kann, aber nicht in einem solchen Maße erniedrigt wird, dass die Infektion durch das Immunsystem des Tiers kontrolliert werden konnte [198]. Im Hinblick auf das Infektionsgeschehen selbst konnte aber bei den *P. aeruginosa* infizierten und nur einmalig per PDT-behandelten Tieren eine signifikante Verbesserung sowohl bei der Schichtdicke der infizierten Corneae als auch bei dem Schweregrad des durch die Infektion hervorgerufenen Hypopyons beobachtet werden [199]. Beide Befunde weisen darauf hin, dass selbst ein per PDT in vitro vergleichsweise schwierig abzutötender Erreger mithilfe dieser Therapieform auch im realen Infektionsgeschehen angreifbar ist. Berücksichtigt man zudem noch, dass diese Therapieform mehrfach hintereinander durchgeführt werden kann, so gibt es auf der Grundlage meiner Dissertation Anlass zur Zuversicht, dass die PDT mittels Ce6 und Rotlicht in nicht allzu ferner Zukunft als eine Therapieoption von Keratitiden, die mit einer antimikrobiellen Therapie nicht behandelbar sind, eingesetzt werden kann.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Rachwalik D, Pleyer U (2015) Bakterielle Keratitis. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 232: 738-744
- [2] Welsch U (ed) (2006) *Lehrbuch Histologie*. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag
- [3] Liesegang TJ, Forster RK (1980) Spectrum of microbial keratitis in South Florida. *American Journal of Ophthalmology* 90: 48-47
- [4] Gopinathan U, Sharma S, Garg P, Rao GN (2009) Review of epidemiological features, microbiological diagnosis and treatment outcome of microbial keratitis: Experience of over a decade. *Indian Journal of Ophthalmology* 57: 273-279
- [5] Bourcier T, Thomas F, Borderie V, Chaumeil C, Laroche L (2003) Bacterial keratitis: pre-disposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. *British Journal of Ophthalmology* 87: 834-838
- [6] Leitlinien der DOG (Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft e. V.) und der BAV (Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e. V.) Stand: 17.08.2011
- [7] ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) Surveillance Report, Surveillance of antimicrobial consumption in Europe, 2012 [2014] Stockholm: ECDC
- [8] Robert-Koch-Institut, *Epidemiologisches Bulletin* 2011
- [9] Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008
- [10] Pop-Vicas AE, D'Agata EM: The rising influx of multidrug-resistant gram-negative bacilli into a tertiary care hospital. *Clin Infect Dis* 2005; 15; 40: 1792–1798
- [11] Bush K, Jacoby GA: Updated Functional Classification of β -lactamases. *Antimicrobial and Agents Chemotherapy* 2010; 54: 969 – 976
- [12] Queenan AM, Bush K: Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical and Microbiology Reviews* 2007; 20: 440–458

- [13] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL: Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2011; in press; doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- [14] Anderson JB (2005) Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nature Reviews, Microbiology*, 3: 547-556
- [15] Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, Monk BC (2007) *Candida albicans* drug resistance – another way to cope with stress. *Microbiology*, 153: 3211-3217
- [16] Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkam FSL, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Graber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GKS, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock REW, Lory S, Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964
- [17] Harrison F (2007) Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology*, 153: 917-923
- [18] Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007) Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *American Journal of Infection Control*, 35: 165-193
- [19] Kidd TJ, Ritchie SR, Ramsay KA, Grimwood K, Bell SC, Rainey PB (2012) *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Frequent Recombination, but Only a Limited Association between Genotype and Ecological Setting. *PLOS ONE*, 7: 1-14
- [20] Marquart ME, O'Callaghan RJ (2013) Infectious Keratitis: Secreted Bacterial Proteins That Mediate Corneal Damage. *Journal of Ophthalmology*, 2013: 9 pages
- [21] Ramirez JC, Fleiszig SMJ, Sullivan AB, Tam C, Roya Borazjani R, Evans DJ (2012) Traversal of Multilayered Corneal Epithelia by Cytotoxic *Pseudomonas aeruginosa* Requires the Phospholipase Domain of ExoU. *Immunology and Microbiology*, 53: 448-453

- [22] Lakkis C, Fleiszig SMJ (2001) Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Hydrogel Contact Lens Disinfection Correlates with Cytotoxic Activity. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 1477-1486
- [23] Shalchi Z, Gurbaxani A, Baker M, Nash J (2011) Antibiotic resistance in microbial keratitis: ten-year experience of corneal scrapes in the United Kingdom. *Ophthalmology*, 118: 2161-2165
- [24] Ray KJ, Prajna L, Srinivasan M, Geetha M, Karpagam R, Glidden D, Oldenburg CE, Sun CQ, McLeod SD, Acharya NR, Lietman TM (2013) Fluoroquinolone treatment and susceptibility of isolates from bacterial keratitis. *JAMA Ophthalmology*, 131: 1-9
- [25] Grzybowski A, Brona P, Kim SJ (2017) Microbial flora and resistance in ophthalmology: a review. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. May;255(5):851-862.
- [26] *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. Tanya Strateva and Daniel Yordanov *Journal of Medical Microbiology* (2009), 58, 1133–1148
- [27] Galloway DB (2010) The Aberdeen Medico-Chirurgical Society 1789 to the present day: some leaders on medicine. *Journal of Pediatric Surgery*, 46: 284-288
- [28] Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H (1997) Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. *Clinical Microbiology Reviews*, 10: 505-520
- [29] *Epidemiologisches Bulletin RKI*, 2013; Nr. 21
- [30] *Bundesgesundheitsbl* 2014, 57:696–732
- [31] *Bundesgesundheitsbl* 2012, 55:1377–1386
- [32] Asbell PA, Colby KA, Deng S, McDonnell P, Meisler DM, Raizman MB, Sheppard JD Jr, Sahm DF (2008) Ocular TRUST: nationwide antimicrobial susceptibility patterns in ocular isolates. *Am J Ophthalmol*. Jun;145(6):951-958. doi: 10.1016/j.ajo.2008.01.025. Epub 2008 Mar 28.

- [33] Mantadakis E, Maraki S, Michailidis L, Gitti Z, Pallikaris IG, Samonis G. (2013) Antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from patients with conjunctivitis and keratitis in Crete, Greece. *J Microbiol Immunol Infect.* Feb;46(1):41-7. doi: 10.1016/j.jmii.2011.12.025. Epub 2011 Dec 30.
- [34] Ong SJ, Huang YC, Tan HY, Ma DH, Lin HC, Yeh LK, Chen PY, Chen HC, Chuang CC, Chang CJ, Hsiao CH (2013) Staphylococcus aureus keratitis: a review of hospital cases. *PLoS One.* Nov 11;8(11):e80119. doi: 10.1371/journal.pone.0080119. eCollection 2013.
- [35] Vola ME, Moriyama AS, Lisboa R, Vola MM, Hirai FE, Bispo PJ, Höfling-Lima AL (2013) Prevalence and antibiotic susceptibility of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in ocular infections. *Arq Bras Oftalmol.* Nov-Dec;76(6):350-3.
- [36] Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, Farr BM (2003) SHEA Guideline for Preventing Nosocomial Transmission of Multidrug-Resistant Strains of Staphylococcus aureus and Enterococcus. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, May 2003: 362-386
- [37] Huffnagle GB, Noverr MC (2013) The emerging world of the fungal microbiome. *Trends Microbiol.* Jul; 21(7): 334-41.
- [38] Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013) Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4: 119-128
- [39] Harriott MM, Noverr MC (2011) Importance of Candida-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends in Microbiology*, 19: 557-563
- [40] Mishra NN, Prasad T, Sharma N, Payasi A, Prasad R, Gupta DK, Singh R (2007) Pathogenicity and drug resistance in candida albicans and other yeast species. *Acta Micorbiologica et Immunologica Hungarica*, 54: 201-235
- [41] Akinbiyi AA, Watson R, Feyi-Waboso P. (2008) Prevalence of Candida albicans and bacterial vaginosis in asymptomatic pregnant women in South Yorkshire, United Kingdom. Outcome of a prospective study. *Arch Gynecol Obstet* Nov;278(5):463-6.
- [42] Mun et al (2016) Oral candidal carriage in asymptomatic patients. *Aust Dent J.* Jun;61(2):190-5.

[43] Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* 2002; 359: 1135-44

[44] White TC (1997) Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 1482-1487

[45] White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA (2002) Resistance Mechanisms in Clinical Isolates of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 1704-1713

[46] White TC, Marr KA, Bowden RA (1998) Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 382-402

[47] TR Sterling, WG Merz (1998) Resistance to amphotericin B: emerging clinical and microbiological patterns. *Drug Resistance Update*, 1: 161-165

[48] Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013) Hsp 21 Potentiates Antifungal Drug Tolerance in *Candida albicans*. *PLOS ONE*, 8: 1-8

[49] Kresken M., Groll A. H., Lass-Flörl C., Körber-Irrgang B. für die Studiengruppe Epidemiologie und Resistenzsituation bei *Candida*-Isolaten aus Blut und anderen primär sterilen Körperregionen gegenüber Antimykotika. Bericht über die Ergebnisse einer multizentrischen Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. aus dem Jahre 2010. *Antiinfectives Intelligence*, Rheinbach, 2013.

[50] Schmalreck AF, Willinger B, Haase G, Blum G, Lass-Flörl C, Fegeler W, Becker K; (2012) Species and susceptibility distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study. *Antifungal Susceptibility Testing-AFST Study Group. Mycoses*. May;55(3):e124-37.doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02165.x. Epub 2012 Jan 11.

[51] Spörl E, Huhle M, Kasper M, Seiler T (1997) Increased rigidity of the cornea caused by intrastromal cross-linking. *Der Ophthalmologe* 94: 902-906

[52] Tomkins O, Garzosi HJ (2008) Collagen cross-linking: Strengthening the unstable cornea. *Clinical Ophthalmology*, 2: 863-867

- [53] Makdoui K, Mortensen J, Crafoord S (2010) Infectious keratitis treated with corneal crosslinking. *Cornea*, 12: 1353 – 1358
- [54] Sauer A, Letscher-Bru V, Speeg-Schatz C, Touboul D, Colin J, Candolfi E, Bourcier T (2010) In vitro Efficacy of Antifungal Treatment Using Riboflavin/UV-A (365 nm) Combination and Amphotericin B. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51: 3950-3953
- [55] Martins SAR, Castro Combs J, Noguera G, Camacho W, Wittmann P, Walther R, Cano M, Dick J, Behrens A (2008) Antimicrobial Efficacy of Riboflavin/UVA Combination (365 nm) In Vitro for Bacterial and Fungal Isolates: A Potential New Treatment for Infectious Keratitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49: 3402-3408
- [56] Pollhammer, M. & Cursiefen, C. (2009) Bacterial keratitis early after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A. *J Cataract Refract Surg* 35, 588–589, doi: 10.1016/j.jcrs.2008.09.029
- [57] Rama P., Di Matteo F., Matuska S., Paganoni G, Spinelli A. (2009) Acanthamoeba keratitis with perforation after corneal crosslinking and bandage contact lens use. *J Cataract Refr Surg* 35, 788–791, doi: 10.1016/j.jcrs.2008.09.035
- [58] Perez-Santonja JJ, Artola A, Javaloy J, Alio JL, Abad JL (2009) Microbial keratitis after corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refr Surg* 35, 1138–1140, doi: 10.1016/j.jcrs.2009.01.036
- [59] Sharma N, Maharana P, Singh G, Titiyal JS (2010) Pseudomonas keratitis after collagen crosslinking for keratoconus: Case report and review of literature. *J Cataract Refr Surg* 36, 517–520, doi: 10.1016/j.jcrs.2009.08.041
- [60] Gautam Jhanji V, Satpathy G, Khokhar S, Agarwal T (2013) Microsporidial keratitis after collagen cross-linking. *Ocul Immunol Inflamm* 21, 495–497, doi: 10.3109/09273948.2013.824105
- [61] Rana M, Lau A, Aralikatti A, Shah S (2015) Severe microbial keratitis and associated perforation after corneal crosslinking for keratoconus. *Cont Lens Anterior Eye* 38, 134–137, doi: 10.1016/j.clae.2014.10.004

- [62] Cagil N, Sarac O, Cakmak HB, Can G, Can E (2015) Mechanical epithelial removal followed by corneal collagen crosslinking in progressive keratoconus: short-term complications. *J Cataract Refract Surg* 41, 1730–1737, doi: 10.1016/j.jcrs.2014.12.058
- [63] Kodavoor SK, Sarwate NJ, Ramamurhy D (2015) Microbial keratitis following accelerated corneal collagen cross-linking. *Oman J Ophthalmol* 8, 111–113, doi: 10.4103/0974-620X.159259
- [64] Hovakimyan M, Guthoff RF, Stachs O (2012) Collagen Cross-Linking: Current Status and Future Directions. *Journal of Ophthalmology* 2012: 1-1
- [65] Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK (2003) Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews* 3: 380-387
- [66] Jablonski A (1935) Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Zeitschrift für Physik* 94: 38-46
- [67] Röder B (1999) Einführung in die molekulare Photobiophysik. Teubner Taschenbücher: Angewandte Physik, Auflage 1, Stuttgart, Leipzig
- [68] MacDonald IJ, Dougherty TJ (2001) *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 5: 105-129
- [69] Sterenberg HJCM, Rovers JP, Robinson DR (2010) Photodynamic therapy – basic principles. *European Journal of Hospital Practice* 16: 58-60
- [70] Wiedmann MW, Caca K (2004) General Principles of Photodynamic Therapy (PDT) and Gastrointestinal Applications. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 5: 397-408
- [71] Laustriat G (1986) Molekular mechanisms of photosensitization. *Biochemie* 68:771-778
- [72] Wainwright M (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42: 13-28
- [73] Zheng Huang PhD (2005) A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment* 4: 283-293

[74] personal communication: Firma ApoCare GmbH, Bielefeld (2012)

[75] Ormond, Freeman (2013) Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy Materials (Basel). Mar 6;6(3):817-840.

[76] Roeder B, Wabnitz H (1987) Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy of Hematoporphyrin, Mesoporphyrin, Pheophorbide a and Chlorin e6 in Ethanol and Aqueous Solution. Journal of Photochemistry and Photobiology 1: 103-113

[77] Hungerer C, Troup B, Römling U, Jahn D (1995) Regulation of the hemA Gene during 5-Aminolevulinic Acid Formation in Pseudomonas aeruginosa. Journal of Bacteriology 177: 1435-1443

[78] Panek H, O'Brian M (2002) A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. Microbiology 148: 2273-2282

[79] Layer G, Heinz DW, Jahn D, Reichelt J (2010) Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. Protein Science 19: 1137-1161

[80] Löffler G, Heinrich PC, Petrides PE (eds) (2006) Biochemie und Pathobiochemie. Springer Medizin Verlag Heidelberg

[81] Reniere ML, Skaar EP, Torres VJ (2007) Intracellular metalloporphyrin metabolism in Staphylococcus aureus. Biometals 20: 333-345

[82] Anzaldi LL, Skaar EP (2010) Overcoming the Heme Paradox: Heme Toxicity and Tolerance in Bacterial Pathogens. Infection and Immunity 78: 4977-4989

[83] Choby EJ, Skaar EP (2016) Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens. J Mol Biol 428, 3408–3428

[84] Grigg JC, Gaudin CFM, Murphy MEP, Ukpabi G (2010) Structural biology of heme binding in the Staphylococcus aureus Isd system. Journal of Inorganic Biochemistry 104: 341-348

- [85] Mazmanian SK, Skaar EP, Gaspar AH, Humanyun M, Gornicki P, Jelenska J, Joachimiak A, Missiakas DM, Schneewind O (2003) Passage of Heme-Iron Across the Envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* 299: 906-909
- [86] Pilpa RM, Robson SA, Villareal VA, Wong ML, Phillips M, Clubb TR (2009) Functionally Distinct NEAT (NEAr Transporter) Domains within the *Staphylococcus aureus* IsdH/HarA Protein Extract Heme from Methemoglobin. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 1166-1176
- [87] Pishchany G, Dickey SE, Skaar EP (2009) Subcellular Localization of the *Staphylococcus aureus* Heme Iron Transport Components IsdA and IsdB. *Infection and Immunity* 77: 2624-2634
- [88] Skaar EP, Gaspar AH, Schneewind O (2004) IsdG and IsdI, heme-degrading Enzymes in the Cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 436-443
- [89] Cornelis P, Dingemans J (2013) *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol*. Nov 14;3:75
- [90] Wandersman C, Stojiljkovic I (2000) Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Current Opinion in Microbiology* 3: 215-220
- [91] Ochsner UA, Johnson Z, Vasil ML (2000) Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 146: 185-198
- [92] Ho WH, Eakanunkul S, Gou M, Li H, Poulos TL, Tong Y, Wilks A (2007) Holo- and Apo-bound Structures of Bacterial Periplasmic Heme-binding Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 35796-35802
- [93] Lansky IB, Block D, Lukat-Rodgers GS, Ratliff M, Rodgers KR, Wilks A (2006) The Cytoplasmic Heme-binding Protein (PhuS) from the Heme Uptake System of *Pseudomonas aeruginosa* Is an Intracellular Heme-trafficking Protein to the δ -Regioselective Heme Oxygenase. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 13652-13662
- [94] Wegele R, Frankenberg-Dinkel N, Rivera M, Tasler R, Zeng Y (2004) The Heme Oxygenase(s)-Phytochrome System of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 45791-45802

- [95] Almeida RS, Wilson D, Hube B (2009) *Candida albicans* iron acquisition within the host. *FEMS Yeast Research* 9: 1000-1012
- [96] Weissman Z, Kornitzer D (2004) A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. *Molecular Microbiology* 53: 1209-1220
- [97] Weissman Z, Shemer R, Conibear E, Kornitzer D (2008) An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* 69: 201-217
- [98] Pendrak ML, Chao MP, Yan SS, Roberts DD (2004) Heme Oxygenase in *Candida albicans* Is Regulated by Hemoglobin and Is Necessary for Metabolism of Exogenous Heme and Hemoglobin to α -Biliverdin. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 3426-3433
- [99] Kharkwal GB, Sulbha KS, Huang YY, Dai T, Hamblin MR (2011) Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers in Surgery and Medicine* 43: 755-767
- [100] Sunar U (2013) Monitoring photodynamic therapy of head and neck malignancies with optical spectroscopies. *World Journal of Clinical Cases* 16: 96-105
- [101] Winters U, Daayana S, Lear JT, Tomlinson AE, Elkord E, Stern PL, Kitchener HC (2008) Clinical and immunologic results of a phase II trial of sequential imiquimod and photodynamic therapy for vulval intraepithelial neoplasia. *Clinical Cancer Research* 15: 5292-5299
- [102] Chondros P, Nikolidakis D, Christodoulides N, Rössler R, Gutknecht N, Sculean A (2009) Photodynamic therapy as adjunct to non-surgical periodontal treatment in patients on periodontal maintenance: a randomized controlled clinical trial. *Lasers in Medical Science* 24: 681-688
- [103] Mima EG, Vergani CE, Machado AL, Massucato EM, Colombo AL, Bagnato VS, Pavarina AC (2012) Comparison of Photodynamic Therapy versus conventional antifungal therapy for the treatment of denture stomatitis: a randomized clinical trial. *Clinical Microbiology and Infection* 18: 380-388
- [104] Stender IM, Borgbjerg FM, Villumsen J, Lock-Andersen J, Wulf HC (2006) Pain induced by photodynamic therapy of warts. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine* 22: 304-30

- [105] Gitika B. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR (2011) Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers in Surgery and Medicine* 43, 755-767
- [106] Li X, Wang X, Gu J, Ma Y, Liu Z, Shi Y (2013) Needle-free injection of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy for the treatment of condylomata acuminata. *Experimental and Therapeutic Medicine* 6: 236-240
- [107] Farhi D, Bedane C, Savary J, Basset-Seguín N (2013) The France-PDT study: a national prospective observational cohort survey on the use of methyl-aminolevulinic acid photodynamic therapy in France, with up to 6-month follow-up. *European Journal of Dermatology* 23: 68-76
- [108] Hanaková A, Bogdanová K, Tomanková K, Bindera S, Bajgara R, Langová K, Kolar M, Mosinger J, Kolarová H (2012) Study of photodynamic effects on NIH 3T3 cell line and bacteria. *Biomedical Papers*, 156: 1-8
- [109] Sperandio FF, Huang YY, Hamblin MR (2013) Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 8(2):108-20.
- [110] Tegós GP, Michael R, Hamblin MR (2006) Phenothiazinium Antimicrobial Photosensitizers Are Substrates of Bacterial Multidrug Resistance Pumps. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 50:196–203
- [111] Savage VJ, Chopra I, O’Neil AJ (2013) Population Diversification in *Staphylococcus aureus* Biofilms May Promote Dissemination and Persistence. *Plos One*, 8: 1-7
- [112] Liu GY, Essex A, Buchanan JT, Datta V, Hoffman HM, Bastian JF, Fierer J, Nizet V (2005) *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *Journal of Experimental Medicine*, 202: 209-215
- [113] Lan L, Murray TS, Kazmierczak BI, Chuan He C1 (2010) *Pseudomonas aeruginosa* OspR is an oxidative stress sensing regulator that affects pigment production, antibiotic resistance and dissemination during infection. *Molecular Microbiology*, 75: 76-91

- [114] Carole Simon (2011) Aufbau und Spezifizierung eines LED-Bestrahlungsplatzes für die photodynamische Therapie; Vorbereitung zur Behandlung von Keratitis. Diplomarbeit in Experimentalphysik
- [115] Rahme, L. G., E. J. Stevens, S. F. Wolfort, J. Shao, R. G. Tompkins, and F. M. Ausubel (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, 268:1899-1902.
- [116] Duthie ES, Lorenz LL (1952) Staphylococcal Coagulase: Mode of Action and Antigenicity. *Microbiology*, 6: 95-107
- [117] Clauditz A, Resch A, Wieland KP, Peschel A, Götz F (2006) Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. *Infect Immun.* Aug;74(8):4950-3.
- [118] Pohl K, Francois P, Stenz L, Schlink F, Geiger T, Herbert S, Goerke C, Schrenzel J, Wol9 C (2009) CodY in *Staphylococcus aureus*: a regulatory link between metabolism and virulence gene expression. *J Bacteriol.* May;191(9):2953-63. doi: 10.1128/JB.01492-08. Epub 2009 Feb 27.
- [119] Wang Y, Wilks JC, Danhorn T, Ramos I, Croal L, Newman DK (2011) Phenazine-1-Carboxylic Acid Promotes Bacterial Biofilm Development via Ferrous Iron Acquisition. *Journal of Bacteriology* 193: 3606-3617
- [120] Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS (2001) Functional Analysis of Genes for Biosynthesis of Pyocyanin and Phenazine-1-Carbocamide from *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Journal of Bacteriology* 183:6454-6465
- [121] Pierson III LS, Pierson EA (2010) Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1659-1670
- [122] Duthie ES, Lorenz LL (1952) Staphylococcal Coagulase: Mode of Action and Antigenicity. *Microbiology* 6: 95-107

- [123] Mishra NN, Liu GY, Yeaman MR, Nast CC, Proctor AR, McKinnell J, Bayer AS (2011) Carotenoid-Related Alteration of Cell Membrane Fluidity Impacts *Staphylococcus aureus* Susceptibility to Host Defense Peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* Feb; 55(2): 526–531.
- [124] Gao P, Davies J, Yi Tsun Kao R (2017) Dehydrosqualene Desaturase as a Novel Target for Anti-Virulence Therapy against *Staphylococcus aureus*. *mBio* 8:e01224-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01224-17>
- [125] Kossakowska-Zwierucho M, Kaźmierkiewicz R, Bielawski KP, Nakonieczna J (2016) Factors Determining *Staphylococcus aureus* Susceptibility to Photoantimicrobial Chemotherapy: RsbU Activity, Staphyloxanthin Level, and Membrane Fluidity. *Front Microbiol.* 7: 1141.
- [126] Kullik I, Giachino P, Fuchs T (1998) Deletion of the Alternative Sigma Factor σ_B in *Staphylococcus aureus* Reveals Its Function as a Global Regulator of Virulence Genes. *Journal of Bacteriology* 180: 4818-4820
- [127] Herbert S, Ziebandt AK, Ohlsen K, Schäfer T, Hecker M, Albrecht D, Novick R, Götz F (2010) Repair of Global Regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and Comparative Analysis with Other Clinical Isolates. *Infection and Immunity* 78: 2877-2889
- [128] Sutton, Scott (2011) Measurement of Microbial Cells by Optical Density. *Journal of Validation Technology.* Volume 17:46-49
- [129] National Committee for Clinical Laboratory Standards Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved standard M7-A5 (2012) 2000 Wayne, Pennsylvania. National Committee for Clinical Laboratory Standards
- [130] Kunz L, MacRobert AJ (2002) Intracellular photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) chlorin (Foscan) exhibits a complex dependence on oxygen level and fluence rate. *Photochem Photobiol.* Jan;75(1) :28-35
- [131] G. Y. Liu, V. Nizet (2009) Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends of Microbiol.* 17(9): 406–413.

- [132] Goerke C, Gressinger M, Endler K, Breitkopf C, Wardecki K, Stern M, Wolz C, Kahl BC (2007) High phenotypic diversity in infecting but not in colonizing *Staphylococcus aureus* populations. *Environ Microbiol.* Dec;9(12):3134-42.
- [133] Lee, AM and MS Bergdoll (1985) Spontaneous occurrence of *Staphylococcus aureus* mutants with different pigmentation and ability to produce toxic shock syndrome toxin 1. *J. Clin. Microbiol.* 22:308-309.
- [134] Reyes EA, Bale MJ, Cannon WH, Matsen JM (1981) Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocyanin production on Techagar. *J Clin Microbiol.* Mar;13(3):456-8.
- [135] Hall JW, Yang J, Guo H, Ji Y (2017) The *Staphylococcus aureus* AirSR Two-Component System Mediates Reactive Oxygen Species Resistance via Transcriptional Regulation of Staphyloxanthin Production. *Infect Immun.* 85(2): e00838-16.
- [136] Karavolos MH, Horsburgh MJ, Ingham E, Foster SJ (2003) Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* Oct;149(Pt 10):2749-58.
- [137] Raymond CK, Sims EH, Kas A, Spencer DH, Kuttyavin TV, Ivey RG, Zhou Y, Kaul R, Clendenning JB, Olson MV (2002) Genetic variation at the O-antigen biosynthetic locus in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 184:3614-22;
- [138] van Mansfeld R, Jongerden I, Bootsma M, Buiting A, Bonten M, Willems R. (2010) The Population Genetics of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Different Patient Populations Exhibits High-Level Host Specificity. *PLoS ONE* 5:e13482
- [139] Fitzgerald JR, Sturdevant DE, Mackie SM, Gill SR, Musser JM. (2001) Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*: insights into the origin of methicillin-resistant strains and the toxic shock syndrome epidemic. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98:8821–26
- [140] Park JH, Moon YH, Band IS, Kim YC, Ahn SG, Yoon JH (2010) Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6. *Lasers in Medical Science* 25: 705-710

- [141] Propst C, Lubin L. (1979) Light-mediated changes in pigmentation of *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J Gen Microbiol.* Aug;113(2):261-6.
- [142] Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med.* 2004 Dec;10(12):599-606
- [143] Liu CI, Liu GY, Song Y, Yin F, Hensler ME, Jeng WY, Nizet V, Wang AH, Oldfield (2008) A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *E. Science.* Mar 7;319(5868):1391-4.
- [144] Gao P, Davies J, Yi Tsun Kao R (2017) Dehydrosqualene Desaturase as a Novel Target for Anti-Virulence Therapy against *Staphylococcus aureus*. *mBio.* Sep-Oct; 8(5): e01224-17.
- [145] Kullik I, Giachino P, Fuchs T (1998) Deletion of the alternative sigma factor sigmaB in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *Journal of Bacteriology.* Sep;180(18):4814-20
- [146] St. Denis TG ,T Dai T, Izikson L, Astrakas C, Anderson RR, Hamblin MR, Tegos GP (2011) All you need is light. Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease (2011) *Virulence.* Nov-Dec; 2(6): 509–520. Published online Nov 1. doi: 10.4161/viru.2.6.17889
- [147] Stapleton F, Naduvilath T, Keay L, Radford C, Dart J, Edwards K, Carnt N, Minassian D, Holden B (2017) Risk factors and causative organisms in microbial keratitis in daily disposable contact lens wear. *PLoS One.* 2017; 12(8): e0181343. Published online Aug 16. doi: 10.1371/journal.pone.0181343
- [148] Nielsen SE, Nielsen E, Julian HO, Lindegaard J, Højgaard K, Ivarsen A, Hjortdal J, Heegaard S. (2015) Incidence and clinical characteristics of fungal keratitis in a Danish population from 2000 to 2013. *Acta Ophthalmol.* 2015 Feb;93(1):54-8. doi: 10.1111/aos.12440. Epub May 19.
- [149] Choby JE, Skaar EP (2016) Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens. *J Mol Biol.* Aug 28; 428(17): 3408–3428. Published online Mar 24. doi: 10.1016/j.jmb.2016.03.018
- [150] Chin WWL, Heng PWS, Thong PSP, Bhuvaneshwari R, Hirt W, Kuenzel S, Soo KC, Olivo M (2008) *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69: 1083-1093

- [151] Schastak S, Ziganshyna S, Gitter B, Wiedemann P, Claudepierre T (2010) Efficient Photodynamic Therapy against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Using THPTS, a Cationic Photosensitizer Excited by Infrared Wavelength. *PLoS ONE* 5(7): 1-8
- [152] Bliss JM, Bigelow CE, Foster TH, Haidaris CG (2004) Susceptibility of *Candida* Species to Photodynamic Effects of Photofrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 2000-2006
- [153] Maclean M, MacGregor SJ, Anderson JA, Woolsey G (2009) Inactivation of Bacterial Pathogens following Exposure to Light from a 405-Nanometer Light-Emitting Diode Array. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 1932-1937
- [154] Eagle H, Musselman AD (July 1948). "The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms". *The Journal of Experimental Medicine*. 88 (1): 99–131.
- [155] Stevens DL, Gibbons AE, Bergstrom R, Winn V (1988). "The Eagle effect revisited: efficacy of clindamycin, erythromycin, and penicillin in the treatment of streptococcal myositis". *The Journal of Infectious Diseases*. 158 (1): 23–8
- [156] Malik Z, Hanania J, Nitzan Y (1990) New trends in photobiology (invited review) Bactericidal effects of photoactivated porphyrins- an alternative approach to antimicrobial drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 5: 281-293
- [157] Schastak S, Gitter B, Handzel R, Hermann R, Wiedemann P (2008) Improved Photoinactivation of Gram-Negative and Gram-Positive Methicillin-Resistant Bacterial Strains Using a New Near-Infrared Absorbing Meso-Tetrahydroporphyrin: A Comparative Study with a Chlorine e6 Photosensitizer "Photolon". *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology* 29: 1-5
- [158] Drulis-Kawa Z, Bednarkiewicz A, Bugla G, Strek W, Doroszkiewicz W (2006) Bactericidal Effects of the Fotolon (Chlorin e6) on Gram-Negative and Gram-Positive Strains Isolated from Wound Infections. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 15: 279 – 283
- [159] Huang L, Dai T, Hamblin MR (2010) Antimicrobial Photodynamic Inactivation and Photodynamic Therapy for Infections. *Methods in Molecular Biology* 635: 155-173

- [160] Valduga G, Bertoloni G, Reddi E, Jori G (1993) Effect of extracellularly generated singlet oxygen on Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 21: 81-86
- [161] Reyes EA, Bale MJ, Cannon WH, Matsen JM (1981) Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocyanin production on Tech agar. *J Clin Microbiol.* Mar;13(3):456-8.
- [162] Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA (1996) Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* Feb; 64(2): 518–523. PMID: PMC173795
- [163] Hall S, McDermott C, Anoopkumar-Dukie S, McFarland AJ, Forbes A, Perkins AV, Davey AK, Chess-Williams R, Kiefel MJ, Arora D, Grant GD (2016) Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins (Basel).* Aug 9;8(8). pii: E236. doi: 10.3390/toxins8080236.
- [164] Stojiljkovic I1, Evavold BD, Kumar V (2001) Antimicrobial properties of porphyrins. *Expert Opin Investig Drugs.* Feb;10(2):309-20.
- [165] Malik Z, Ladan H, Nitzan Y (1992) Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 14: 262-266
- [166] Hamblin MR, Gad F, Anderson RR, Hasan T (2004) Photons for Therapy: Targeted Photodynamic Therapy for Infected and Contaminated Wounds. *RTO-MP-HFM-109:* 1-14
- [167] Tang HM, Hamblin MR, Yow CMN (2007) A comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogens. *Journal of Infection Chemotherapy* 13: 87-91
- [168] Dai T, Tegos GP, Zhiyentayev T, Eleftherios M, Hamblin MR (2010) Photodynamic Therapy for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection in a Mouse Skin Abrasion Model. *Lasers in Surgery and Medicine* 42: 1-14
- [169] Gad F, Zahra T, Hasan T, Hamblin MR (2004) Effects of Growth Phase and Extracellular Slime on Photodynamic Inactivation of Gram-Positive Pathogenic Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48 :2173-2178
- [170] Gaupp R, Ledala N, Somerville GA (2012) Staphylococcal response to oxidative stress. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2 33.

- [171] Herbert S, Ziebandt AK, Ohlsen K, Schäfer T, Hecker M, Albrecht D, Novick R, Götz F (2010) Repair of global regulators in *Staphylococcus aureus* 8325 and comparative analysis with other clinical isolates. *Infect Immun.* Jun;78(6):2877-89.
- [172] Grinholc M, Szramka B, Kurlenda J, Graczyk A, Bielawski KP (2008) Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain-dependent. *Journal of Photochemistry and Photobiology, Biology* 90: 57-63
- [173] Grinholc M, Zawacka-Pankau J, Gwizdek-Wisniewska A, Bielawski KP (2010) Evaluation of the Role of the Pharmacological Inhibition of *Staphylococcus aureus* Multidrug Resistance Pumps and the Variable Levels of the Uptake of the Sensitizer in the Strain-Dependent Response of *Staphylococcus aureus* to PPA_g2-Based Photodynamic Inactivation. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 86: 1118-1126
- [174] Lambrechts SAG, Aalders MCG, Verbraak FD, Lagerberg JWM, Dankert JB, Schuitmaker JJ (2004) Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. *Journal of Photochemistry and Photobiology, Biology* 79: 51-57
- [175] Thomas PA, Kaliyamurthy J (2013) Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect* 19: 210–220.
- [176] Tuft SJ, Tullo AB (2009): Fungal keratitis in the United Kingdom 2003-2005. *Eye (Lond)* 23: 1308–1313.
- [177] Sun RL, Jones DB, Wilhelmus KR (2007) Clinical Characteristics and Outcome of Candida Keratitis. *Am J Ophthalmol.* Jun; 143(6): 1043–1045; doi: 10.1016/j.ajo.2007.02.016
- [178] Wong TY, Ng TP, Fong KS, Tan DT (1997) Risk factors and clinical outcomes between fungal and bacterial keratitis: a comparative study. *CLAO J* 23: 275–281.
- [179] Thomas PA (2003) Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev*; 16: 730–797.
- [180] Thomas PA, Kaliyamurthy J (2013) Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect.* Mar;19(3):210-20. doi: 10.1111/1469-0691.12126. Epub 2013 Feb 9.

- [181] Morschhäuser J (2016) The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* - an example of microevolution of a fungal pathogen. *J Microbiol. Mar*;54(3):192-201. doi: 10.1007/s12275-016-5628-4. Epub 2016 Feb 27.
- [182] Prasad R, Gaur NA, Gaur M, Komath SS (2006) Efflux pumps in drug resistance of *Candida*. *Infect Disord Drug Targets*. Jun;6(2):69-83.
- [183] Frohner IE, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O, Kuchler K (2009) *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol*. Jan; 71(1): 240–252.
- [184] Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP, Holson EB, Wagner FF, Hamblin MR, Mylonakis E (2010) Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chem Biol*. Mar 19;5(3):321-32.
- [185] Monfecola G, Procaccini EM, Bevilacqua M, Manco A, Calabrò G, Santoianni P (2004) In vitro effect of 5-aminolaevulinic acid plus visible light on *Candida albicans*. *Photochemical and Photobiology Science* 3: 419-422
- [186] Mang TS, Mikulski L, Hall RE (2010) Photodynamic inactivation of normal and antifungal resistant *Candida* species. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2010 Jun;7(2):98-105. doi: 10.1016/j.pdpdt.2010.03.001. Epub Apr 8.
- [187] Giroldo LM, Felipe MP, de Oliveira MA, Munin E, Alves LP, Costa MS (2009) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) with methylene blue increases membrane permeability in *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2009 Jan;24(1):109-12. Epub 2007 Dec 22.
- [188] J Soares BM, da Silva DL, Sousa GR, Amorim JC, de Resende MA, Pinotti M, Cisalpino PS (2009) In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *Photochem Photobiol B*. Jan 9;94(1):65-70.
- [189] Bodmann KF, Grabein B und die Expertenkommission der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. (2010) Empfehlung zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen – Update 2010

- [190] Tsai T, Chien HF, Wang TH, Huang CT, Ker YB, Chen CT (2011) Chitosan Augments Photodynamic Inactivation of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55: 1883-1890
- [191] Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nùnez SC, Jorge AOC, Hamblin MR (2007) Antimicrobial Photodynamic Therapy Combined With Conventional Endodontic Treatment to Eliminate Root Canal Biofilm Infection. *Lasers in Surgery and Medicine* 39: 59-66
- [192] Ferrandiz F, Ruiz-de-Casas A, Trakatelli M, de Vries E, Ulrich M, Aquilina S, Saksela O, Majewski S, Ranki A, Proby C, Magnoni C, Pitkänen S, Kalokasidis K, Siskou S, Hinrichs B, Altsitsiadis E, Stockfleth E, Moreno-Ramirez D (2012) Assessing physicians' preferences on skin cancer treatment in Europe. *British Journal of Dermatology* 167: 29-35
- [193] Itoh Y, Ninomiya Y, Tajima S, Ishibashi A (2001) Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical δ -aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients. *British Journal of Dermatology* 144: 575-579
- [194] Bozzini G, Colin P, Betrouni N, Nevoux P, Ouzzane A, Puech P, Villers A, Mordon S (2012) Photodynamic therapy in urology: What can we do now and where are we heading? *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 9: 261-273
- [195] Choi SS, Lee HK, Chae HS (2012) Comparison of in vitro photodynamic antimicrobial activity of protoporphyrin IX between endoscopic white light and newly developed narrowband endoscopic light against *Helicobacter pylori* 26695. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 117: 55-60
- [196] Winkler K, Simon C, Finke M, Bleses K, Birke M, Szentmáry N, Hüttenberger D, Eppig T, Stachon T, Langenbacher A, Foth HJ, Herrmann M, Seitz B, Bischoff M (2016) Photodynamic inactivation of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by chlorin e6 and red light ($\lambda = 670\text{nm}$) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 162, September, Pages 340-347
- [197] Wang J, Stachon T, Eppig T, Langenbacher A, Seitz B, Szentmáry N (2013) Impact of photodynamic inactivation (PDI) using the photosensitizer chlorin e6 on viability, apoptosis, and proliferation of human keratocytes in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Dec;251(12):2725-31. doi: 10.1007/s00417-013-2470-9. Epub 2013 Oct 2.

[198] Wu MF, Deichelbohrer M, Tschernig T, Laschke MW, Szentmáry N, Hüttenberger D, Foth HJ, Seitz B, Bischoff M. (2017) Chlorin e6 mediated photodynamic inactivation for multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice in vivo. *Sci Rep.* Mar 15;7:44537. doi: 10.1038/srep44537.

[199] Deichelbohrer M, Wu MF, Seitz B, Hüttenberger D, Laschke MW4, Foth HJ, Wonnemberg B, Wagenpfeil S, Meier C, Bischoff M, Tschernig T (2017) Bacterial keratitis: Photodynamic inactivation reduced experimental inflammation. *Exp Ther Med.* Nov;14(5):4509-4514. doi: 10.3892/etm.2017.5109. Epub 2017 Sep 5.

7. Publikationen/Danksagungen

7.1 Publikationen

Winkler K, Simon C, Finke M, Bleses K, Birke M, Szentmáry N, Hüttenberger D, Eppig T, Stachon T, Langenbacher A, Foth HJ, Herrmann M, Seitz B, Bischoff M (2016) Photodynamic inactivation of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by chlorin e6 and red light ($\lambda = 670\text{nm}$) *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 162, September, Pages 340-347

7.2 Danksagungen

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Mathias Herrmann für die Überlassung des interessanten Themas sowie seine großzügige Unterstützung danken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Markus Bischoff bedanken, der durch sein stets offenes Ohr, seine ständige Hilfsbereitschaft sowie persönliches Engagement ganz wesentlich das Voranschreiten dieser Arbeit unterstützt hat. Gemeinsame Diskussionen haben mir hilfreiche Ansätze zur inhaltlichen und methodischen Gestaltung dieser Arbeit geliefert.

Ein außerordentlicher Dank gilt Frau Carole Simon und der AG Foth (TU Kaiserslautern), ohne deren Bereitstellung der Strahlungskammer diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt Frau Katharina Bleses und Frau Melanie Finke, die durch ihre fachliche Kompetenz, Geduld, stetige Hilfsbereitschaft und durch ihre freundliche Art einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Im Zuge dessen möchte ich mich beim gesamten Team und allen Mitarbeitern der Mikrobiologie und der Forschungsgruppe PD Dr. Bischoff dafür bedanken, dass ich herzlich und freundschaftlich aufgenommen wurde.

Bei Herrn Dr. Michael Klotz und Herrn PD Dr. Max Schobert möchte ich mich recht herzlich für die Bereitstellung diverser Mikroorganismen bedanken.

Die Substanz Chlorin e6 wurde mir freundlicherweise von der Firma ApoCare Pharma GmbH kostenlos zur Verfügung gestellt.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie einschließlich Frau Claudia Mößlacher und meiner Freundin Frau Katharina Pöppinghaus, die mir die letzten Jahre fest zur Seite gestanden haben.

8. Lebenslauf

Name	Katrin Winkler
Anschrift	Simon-Meister-Straße 28 50733 Köln
Geburtsdatum	18.02.1980
Geburtsort	Lienz/Österreich
Staatsangehörigkeit	Österreich
Familienstand	ledig
Schul-/Ausbildung	
1986 - 1990	Volksschule Weissensee
1990 - 1994	Hauptschule Greifenburg
1994 - 1999	Handelsakademie Lienz/Osttirol
2000 - 2003	Timmermeister-Schule, Münster
2007 - 2013	Studium der Humanmedizin, Universität des Saarlandes
Beruflicher Werdegang	
04/1999 – 03/2000	Osttiroler Bote; Büroangestellte
07/2003 – 09/2007	Krankenhaus der BB, Wien; Physiotherapeutin
05/2014 – 07/2015	Klinikum Bad Bramstedt
seit 08/2015	St. Katharinen Hospital Frechen
Fremdsprachenkenntnisse	
	Englisch, Schulkenntnisse, 9 Jahre
	Italienisch, Schulkenntnisse, 5 Jahre

Köln, den 21.06.2018