

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

***Einfluss einer IPL-Blitzlichtlampe auf die photodynamische
Inaktivierung von Bakterien und Wirkung des
Hitzeschockproteins DnaK auf die photodynamische
Suszeptibilität von E. coli in vitro***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Franz R. Spannberger

2014

MEINEN ELTERN

*Ein verständiger Mensch erweitert sein Wissen,
spitzt die Ohren und lernt stets dazu.*

(Spr 18,15)

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

**Einfluss einer IPL-Blitzlichtlampe auf die photodynamische
Inaktivierung von Bakterien und Wirkung des Hitzeschockproteins
DnaK auf die photodynamische Suszeptibilität von *E. coli in vitro***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Franz R. Spannberger

2014

Die vorliegende Arbeit entstand von Januar 2011 bis Juli 2014 an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Regensburg.

Dekan: **Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert**

1. Berichterstatter: PD Dr. Tim Maisch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Ritter

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Oktober 2014

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	4
2 Fragestellung	23
3 Materialien	24
3.1 Bakterienstämme	24
3.2 Bakterienkulturmedien	24
3.2.1 Müller-Hinton-Bouillon	24
3.2.2 Müller-Hinton-Agar	24
3.3 Lösungen	24
3.3.1 PBS-Puffer	24
3.3.2 Lysis-Puffer	24
3.3.3 BCA-Analyse-Kit	24
3.4 Photosensibilisator	25
3.5 Western-Blot	25
3.5.1 Gele	25
3.5.2 Pufferlösungen	26
3.5.3 Proteine und Antikörper	27
3.5.4 Entwicklung	27
3.6 Technische Geräte	28
3.6.1 Zentrifugen	28
3.6.2 Spektrophotometer	28
3.6.3 Blitzlichtlampe	28
3.6.4 Waldmannlampe	28
3.6.5 Wasserbad	29
3.6.6 Microplate Reader	29
3.6.7 Entwickler	29
4 Methoden	30
4.1 Bakterienkultur- und -gewinnungsverfahren	30
4.1.1 Toxizitätstests mit IPL	30
4.1.2 Heatshockinduktionstests	30

4.2 Bestrahlungsparameter	31
4.3 Bakterielle Phototoxizitätsmessung	32
4.3.1 Toxizitätstests mit IPL	32
4.3.2 Hitzeschock-Induktionstest	33
4.4 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten.....	33
4.5 Probengewinnung für Western-Blot.....	34
4.5.1 Photodynamischer Prozess	34
4.5.2 Zellyse.....	35
4.5.3 BCA-Analyse.....	35
4.6 SDS-PAGE und Western-Blot	38
4.6.1 Elektrophorese und Blotten.....	38
4.6.2 Kontrolle: Anti-DnaK-Antikörperfunktionalität.....	39
4.6.3 Kontrolle: DnaK-Induktion durch Hitzeschock.....	40
4.6.4 DnaK-Induktion durch PIB	42
4.7 Auswertung der Blots	42
5 Ergebnisse	45
5.1 Phototoxizitätstests mit IPL und TMPyP	45
5.1.1 Photodynamische Wirkung von TMPyP gegenüber <i>E. coli</i>	46
5.1.2 Photodynamische Wirkung von TMPyP gegenüber <i>S. aureus</i>	48
5.1.3 Photodynamische Wirkung von TMPyP gegenüber MRSA	50
5.1.4 Photodynamische Wirkung von TMPyP gegenüber <i>B. atrophaeus</i>	54
5.2 Gegenüberstellung der Effekte PIB – Hitzeschock (50 °C).....	57
5.2.1 Kontrollversuche	57
5.2.2 Toxizität von Hitzeschock und PIB im Vergleich	63
5.2.3 PIB-induzierte DnaK-Expression.....	65
6 Diskussion	68
6.1 Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung unter PIB	68
6.2 TEIL 1 – Blitzlichtverfahren mit IPL.....	70
6.2.1 Reduktion der Expositionszeiten.....	70
6.2.2 Interpretation der graphischen Ergebnisse	71
6.3 TEIL 2 – DnaK-Induktion	73
6.3.1 DnaK-Induktion durch Hitzeschock.....	73

6.3.2 DnaK-Induktion durch PIB	74
6.4 Verbesserungsvorschläge	79
7 Zusammenfassung.....	81
7.1 Blitzlichtverfahren mit IPL	81
7.2 Heatshock-Antwort	82
8 Ausblick	83
Abkürzungsverzeichnis	IV
Literaturverzeichnis	VII
Präsentationen und Publikationen.....	XV
Lebenslauf.....	XVI
Danksagung	XVII
Eidesstattliche Erklärung.....	XVIII
Anhang	XIX

1 EINLEITUNG

Bakterielle Resistenzen gegen Antibiotika

Europaweit nehmen die bakteriellen Resistenzen gegen Antibiotika zu. **Abb. 1** zeigt die Prävalenz von MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) in Europa. Die aktuellen Zahlen der ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) zeigen für 2011 eine Resistenzrate von 16,2 % der untersuchten MRSA-Isolate in deutschen Kliniken [1]. Zwar stabilisieren sich die Raten, wenngleich auch auf hohem Niveau. Dies ist jedoch kein Grund zur Entwarnung, da durch MRSA verursachte Infektionen verlängerte Krankenhausaufenthalte und höhere Mortalitätsraten zur Folge haben. Abgesehen davon ruft schon die Methicillin-sensible Form des *S. aureus* in suszeptiblen Personen (Immunschwäche, etc.) Krankheiten hervor, was die medizinische Bedeutung dieses Keims noch verstärkt [2]. MRSA ist die wichtigste Ursache für Infektionen durch resistente Bakterien weltweit [3].

S. aureus ist ein grampositives, kokkoides Bakterium, den ca. 30 % aller Menschen in ihrem kutanen Biofilm tragen. Weitere 30 % der Bevölkerung weisen eine passagere Besiedelung auf [2].

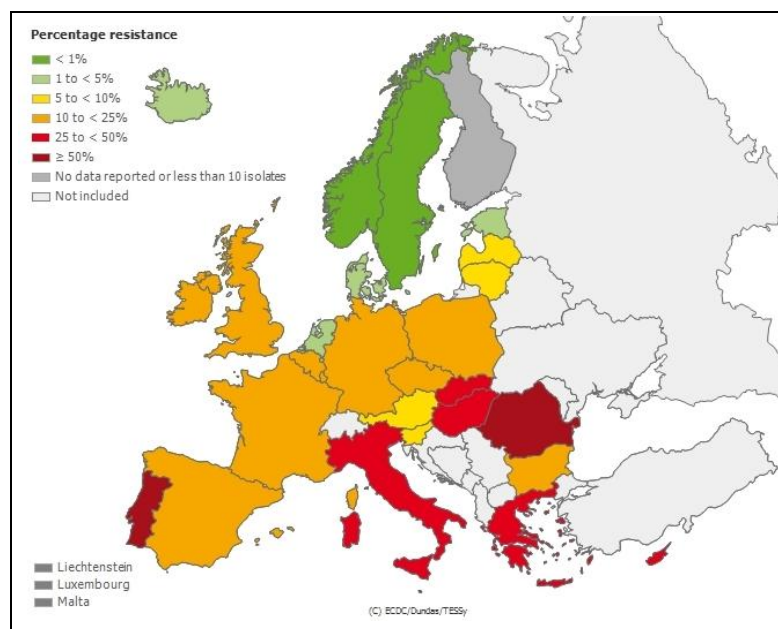


Abb. 1: Resistenz von *S. aureus* gegen Methicillin/Oxacillin, „MRSA“ 2011 [1]

Ein anderer ubiquitärer Keim ist *Escherichia coli*. Dieses gramnegative Bakterium gehört ebenso wie *S. aureus* zur normalen Flora des Menschen, ist im Gegensatz zu

Letztgenanntem jedoch im Darm und nicht auf der Haut zu finden. Von *E. coli* existieren einige pathogene Formen, die sich durch besondere Pathogenitätsfaktoren auszeichnen. So ist z. B. der STEC (Shiga-like toxin produzierende *E. coli*) in der Lage, ein hämolytisches und nekrotisierendes Toxin zu produzieren, das dem Toxin von *Shigella dysenteriae* ähnelt. Auch der in letzter Zeit häufig in den Medien erwähnte EHEC (enterohämorrhagischer *E. coli*) zeichnet sich durch eine erhöhte Pathogenität gegenüber dem Wildtyp *E. coli* aus [2].

Im klinischen Bereich wird *E. coli* als häufigster der gramnegativen Erreger aus Blutkulturen isoliert. Das Spektrum der von ihm verursachten Krankheiten ist breit: die häufigste Ursache für Bakteriämie und Harnwegsinfektionen werden durch *E. coli* verursacht, er ist mit spontaner und postoperativer Peritonitis assoziiert und er wird bei Weichteilinfektionen gefunden. Darüber hinaus ruft er Meningitis bei Neugeborenen hervor und ist global gesehen der Lebensmittelkeim schlechthin [3].

Die ECDC weist in ihrem Bericht für das Jahr 2011 erschreckende Zahlen für Deutschland aus: Die Resistenzraten von *E. coli* gegenüber Aminoglykosiden (wie z. B. Gentamicin oder Tobramycin) liegen bei 7,6 %, gegenüber Fluorochinolonen (z. B. Ciprofloxacin, Moxifloxacin) bei 23,7 % und selbst gegen die relativ neuen Cephalosporin-Antibiotika der dritten Generation weisen schon 8,0 % der *E. coli* Resistenzen auf. Nicht zu reden von den schon seit den 50er-Jahren verwendeten Penicillinen. Mehr als die Hälfte (52,3 %) aller untersuchten *E. coli*-Isolate zeigten sich widerstandsfähig gegen Aminopenicilline (z. B. Amoxicillin) [1]. Die Rate von kombinierten Resistenzen gegen Medikamente aus zwei oder mehr der bereits genannten Wirkstoffklassen liegt bei 3,2 %, Tendenz steigend [3] (vgl. **Abb. 2**).

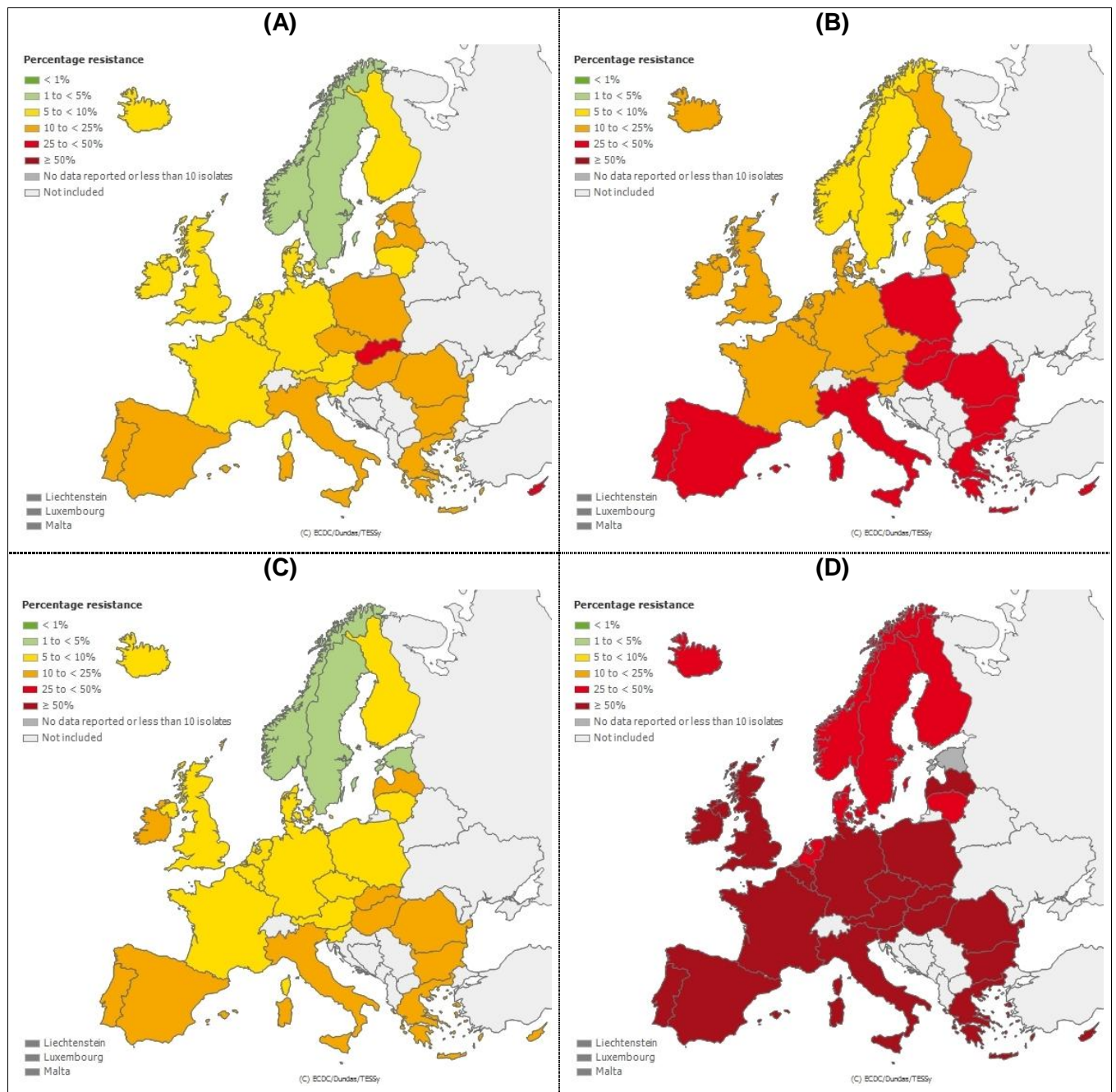


Abb. 2: Resistenz von *E. coli* ggü. (A) Drittgeneration-Cephalosporine, (B) Fluorochinolone, (C) Aminoglykoside, (D) Aminopenicilline; für das Jahr 2011 [1]

Wenn man sich die Datenlage am Universitätsklinikum Regensburg (UKR) vor Augen führt, stellt man eine weitestgehende Übereinstimmung zu den Daten der ECDC fest. **Tabelle 1** zeigt eine exemplarische Übersicht über ausgewählte Keime am UKR und deren Resistenzmuster gegenüber einigen Antibiotika.

	n	Anteil *)	Ampicillin	Augmentan	Oxacillin	1° Cephalosporin	2° Cephalosporin	3° Cephalosporin	Ceftazidim	Meropenem	Imipenem	Ciprofloxacin	Cotrimoxazol	Gentamicin
<i>S. aureus</i>	824	18%	73	18	18	18				18	18	24	0	2
koag.neg. Staph.	772	17%	83	63	63	63				63	63	38	33	29
Enterokokken	356	8%	40	40	100	100				40	40	56	53	100
<i>E. coli</i>	309	7%	55	12		18	15	12	4	0	0	24	35	8
<i>Pseudomonas</i> spp.	253	6%	100	98		100	98	37	6	13	12	8	69	5

*) Anteil an den Erstisolaten, $n_{\text{(gesamt)}} = 4553$

Farbkodierung: 0 - 5 % 6 - 20% >20%

Aminopenicillin
3.Gen.Ceph.
Fluorochinolon
Aminoglykosid

Tabelle 1: Resistenzraten bei ausgewählten Keimen am UKR,
Erhebungszeitraum 31.12.2010–30.09.2011, aus [4]

Eine vergleichende Gegenüberstellung der jeweiligen Daten der im ECDC-Bericht auftauchenden Erreger mit denen des UKR zeigt **Abb. 3**. Die aktuelle ECDC-Database enthält die Werte von 2011, der Erhebungszeitraum des UKR war vom 31.12.2010–30.09.2011.

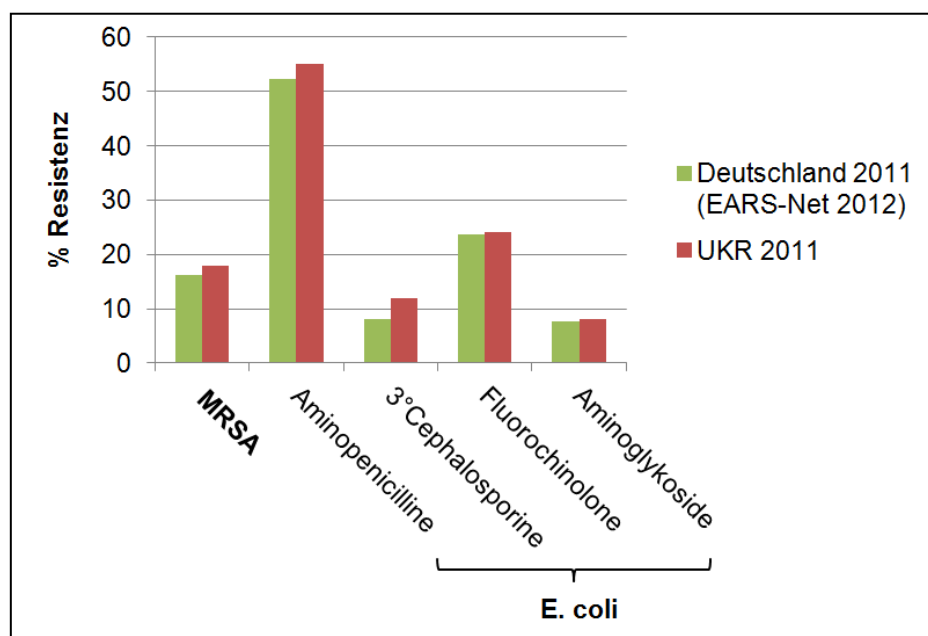


Abb. 3: Vergleich der Resistenzraten von Deutschland und dem UKR.
(Werte: ECDC [1], Tabelle 1 [4])

Erklärungsansätze zur Zunahme der Resistenzen

Die Ursachen für die steigende Prävalenz gegen Antibiotika resistenter Keime sind vielfältig. Vielfach propagiert ist der Gebrauch von Antibiotika in der Tierzucht. Der alljährlich erscheinende Bericht des DANMAP (Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme) weist den Antibiotikagebrauch retrospektiv bis in die 1990er Jahre aus, wie in **Abb. 4** zu sehen. Seitdem im Jahr 1996 eine freiwillige Selbstverpflichtung in Kraft trat, Antibiotika als Wachstumsbeschleuniger in der Viehzucht sukzessive nicht mehr einzusetzen, ging die Verwendung ebendieser drastisch zurück (violette Balken) [5].

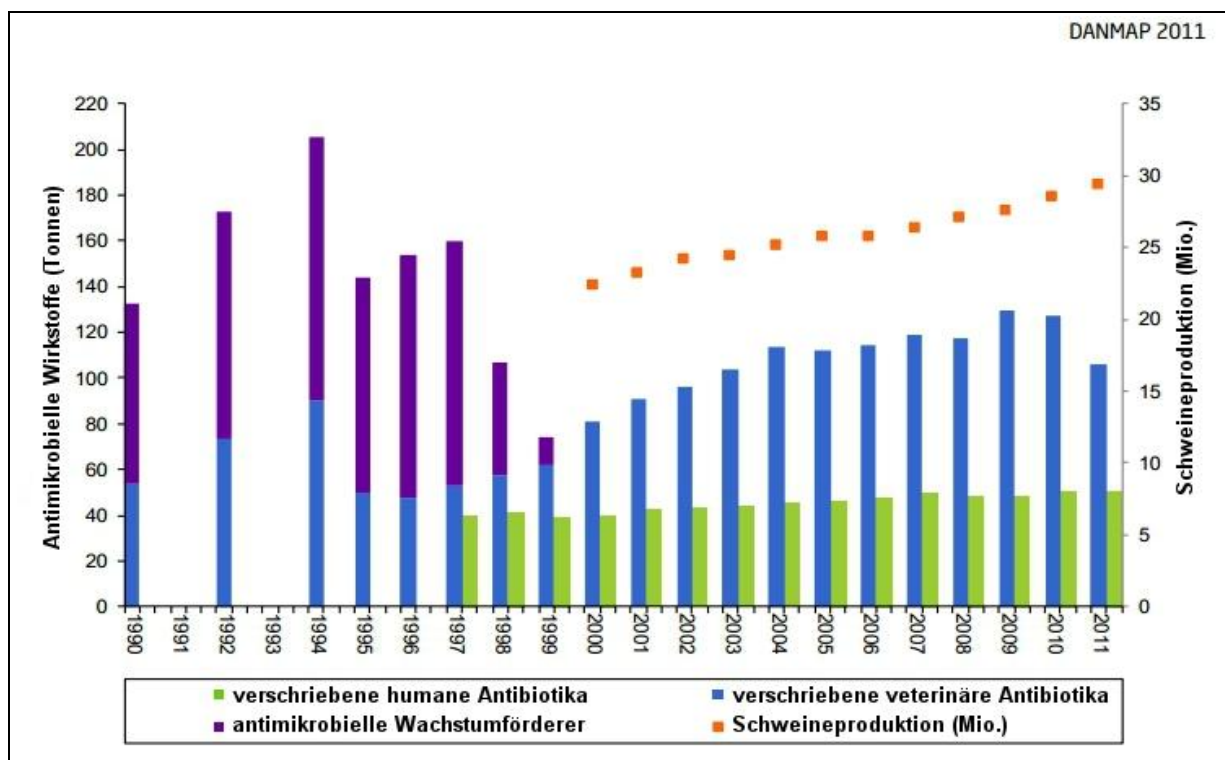


Abb. 4: Im Balkendiagramm werden vergleichend die in der Tierzucht und in der Humanmedizin eingesetzten Mengen an Antibiotika veranschaulicht [5]; Interpretation siehe Text.

Zu Spitzenzeiten wurden über 200 Tonnen Antibiotika in der Viehzucht eingesetzt, weniger als 50 % davon waren veterinärmedizinisch indiziert. Im ersten Jahr nach Inkrafttreten der Selbstverpflichtung stellte sich die Situation wie folgt dar: ca. 160 t Antibiotikaverbrauch in der Viehzucht, davon ~30 % (~55 t) zu therapeutischen Zwecken. Im Vergleich dazu wirken die für humanmedizinische Indikationen eingesetzten Medikamentenmengen von ca. 40 Tonnen erstaunlich gering. In den

Folgejahren stieg diese Menge auf 50 Tonnen, was einem Zuwachs von 25 % entspricht. Parallel dazu stieg auch der Verbrauch in der Viehzucht, allerdings um zeitweise mehr als 100 % (2009: 130 t), im Jahr 2011 waren es ~105 t. Selbst wenn keine Antibiotika zur Wachstumsförderung mehr verwendet wurden, ist der deutliche Anstieg der verabreichten Menge auffällig. Die Zunahme der therapeutischen Applikation mag einerseits an der steigenden Tierpopulation liegen, doch kann vermutet werden, dass bei der Indikationsstellung zur medikamentösen Therapie nun nicht mehr so strenge Maßstäbe angesetzt werden, wie dies zuvor wahrscheinlich der Fall war.

Der gewünschte Effekt, dass die Resistenzraten bei Mensch und Tier dadurch zurückgingen, wurde allerdings nur zum Teil erreicht. Im Zeitraum von 1997 bis 2009 konnte bei Tieren und Tierprodukten wie Schweine- und Geflügelfleisch zwar ein Rückgang beobachtet werden, jedoch war ein Resistenzanstieg bei Erregern zu sehen, die bei Menschen nachgewiesen wurden.

Von 1997 bis 2004 stieg der Anteil Ciprofloxacin-resistenter *E. coli* bei Schweinen auf 3 %, um in den Folgejahren bis 2009 auf unter 1 % abzufallen. Parallel dazu stieg die Rate bei menschlichen Keimen auf bis 4,3 %, ohne einen ähnlichen Abfall zu zeigen. Dieser Anstieg lässt sich mit dem verstärkten Einsatz von Fluorochinolonen in der Allgemeinversorgung und in Krankenhäusern erklären, ist jedoch konträr zum reduzierten Antibiotikagebrauch bei Zuchtvieh [6].

Das Risiko, dass ein Makrolid-resistenter *Campylobacter* aus der Geflügelzucht beim Menschen eine unbehandelbare und damit letale Infektion hervorruft, liegt bei 1:14 Millionen. Das entspricht ungefähr der Chance auf sechs Richtige im Lotto. Im Vergleich dazu: durch einen Blitzschlag zu sterben hat ein Risiko von 1:550.000, Tod durch Erstickten 1:200.000 [7].

Darin den Beweis zu sehen, dass veterinärer Antibiotikaeinsatz nichts mit den Resistenzen von humanpathogenen Keimen beim Menschen zu tun habe, ist allerdings von zweifelhafter Stringenz. Die WHO deklariert ganz klar, welchen Einfluss die Verwendung solcher Medikamente in der Tierzucht hat [8].

Aufrüttelnd ist auch die Nachricht, dass MRSA von Tieren auf den Menschen überspringen kann. Im konkreten Fall, der sich 2010 in den Niederlanden ereignete, war das Wirtstier ein Schwein, von dem aus die Übertragung stattfand [9].

Ein anderer Erklärungsansatz für die steigende Widerstandsfähigkeit von Bakterien wird von Birosova *et al.* diskutiert. Deren Untersuchungen zeigen, dass durch

verschiedene Substanzen, die in der Lebensmittelverarbeitung verwendet werden oder entstehen, Bakterien erhöhte unspezifische Resistenzen ausbilden können. Beispielhaft hierfür werden das Konservierungsmittel Furfurylformid und 2-Nitrofluoren, ein Nebenprodukt bei Verbrennungsprozessen, genannt [10].

Neben diesen Punkten spielt natürlich die mangelnde Compliance von mit Antibiotika behandelten Patienten eine sehr große Rolle [11-13]. Werden die Medikamente nicht über den vorgeschriebenen Mindestzeitraum oder in insuffizienter Dosierung eingenommen, können die Wirkspiegel nicht ausreichend lange auf einem effektiven Niveau bleiben, um der Infektion wirkungsvoll zu begegnen. Diese unterschwelligen Reize triggern Resistenzmechanismen, durch die derart selektionierte Keime gegen eine zukünftige Behandlung mit demselben Antibiotikum unempfindlich sind [2, 14]. Es liegt auf der Hand, dass hierunter auch der unsachgemäße Einsatz von Antibiotika bei viralen Infektionen fällt, ebenso wie der Gebrauch von Breitspektrumantibiotika in Fällen, bei denen das Erregerspektrum bekannt ist und die Medikation fokussiert werden könnte [13].

Einen vergleichbaren, Resistenz induzierenden Effekt haben auch über längere Zeiträume eingenommene Antibiotika. Cottagnoud *et al.* konnten zeigen, dass eine Präinkubation von Pneumokokken mit Cephalosporinen die Widerstandsfähigkeit gegenüber Levofloxacin erhöht [15]. Die sog. „mutant selection window“ (MSW)-Hypothese beschreibt das Zustandekommen von Resistenzen durch Antibiotikaexposition. Solche Keime, die aufgrund einer genetischen Variation oder einer sonstigen Ursache sozusagen von Haus aus resistent sind, haben in einer antibiotikahaltigen Umgebung einen selektiven Vorteil gegenüber ihren Artgenossen. Diese so bevorteilten Stämme vermehren sich unter antibiotischer Behandlung ungehindert und treten somit verstärkt zu Tage. Diese Theorie wurde u. a. von Firsov *et al.* an *S. aureus* bzgl. Daptomycin und Vancomycin nachgewiesen [16].

In einer Metaanalyse bekräftigen Epstein *et al.* die Plausibilität der MSW-Theorie und betonen, dass nicht nur die Dauer, sondern auch die ausreichende Dosierung von entscheidender Bedeutung ist [17].

Zusätzlich zeigte sich in den letzten beiden Dekaden, dass der Zuwachs an Unempfindlichkeiten gegenüber Antibiotika erheblich größer ist, als die Anzahl an Neuentwicklungen und -zulassungen von ebendiesen. **Abb. 5** veranschaulicht

gegenüberstellend die gegensätzliche Entwicklung von Antibiotikaresistenzen und den neu auf den Markt gekommenen Antibiotika im Zeitraum von 1990 bis 2011.

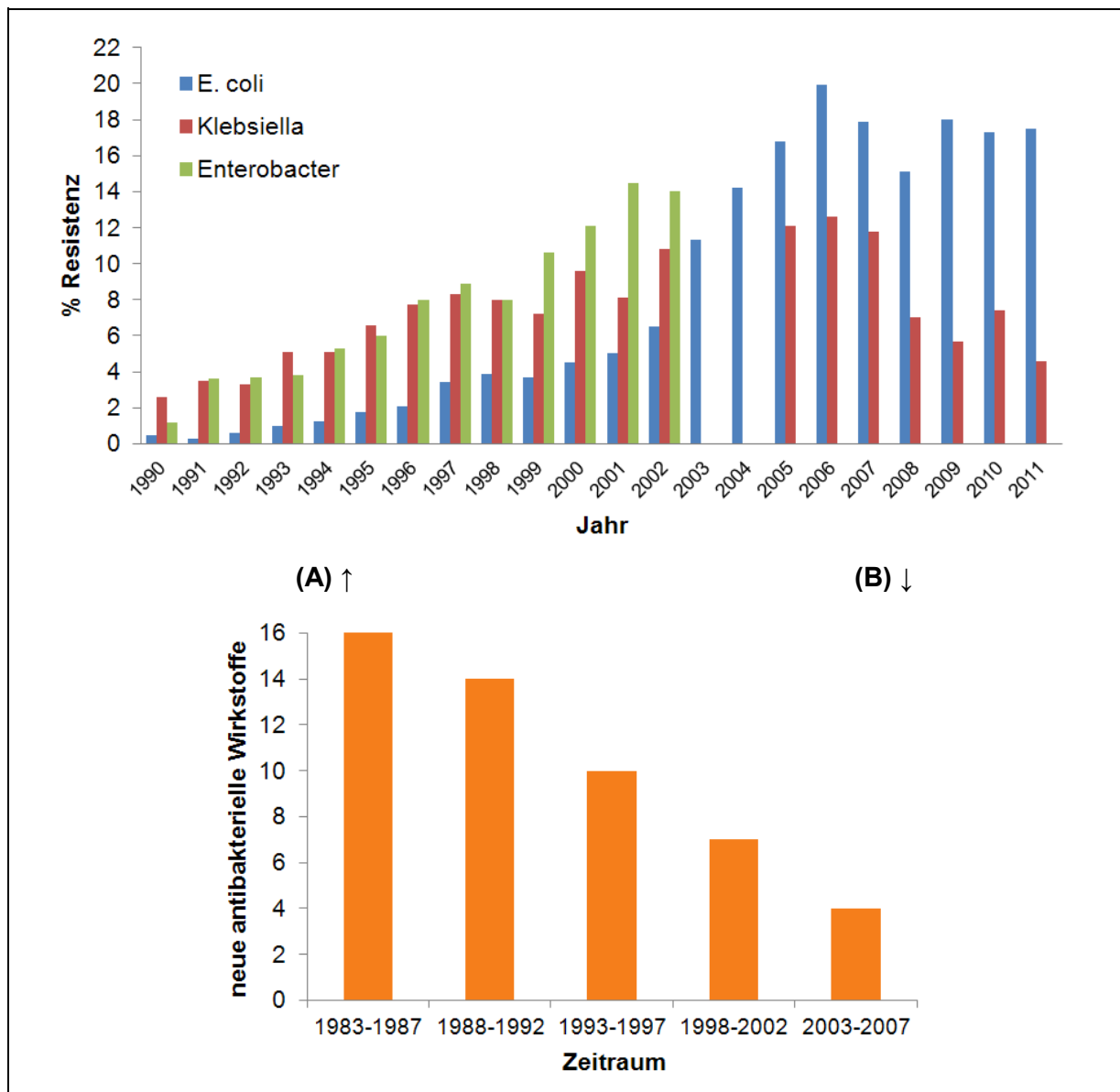


Abb. 5: (A) Resistenzentwicklung von verschiedenen Keimen gegen das Fluorochinolon „Ciprofloxacin“ in UK (nach [18] (1990-2002) und [1] (2003-2011)).
(B) Tendenz der Entwicklung neuer Antibiotika (nach [19] nach den Daten aus [20]).

Erschwerend kommt hinzu, dass von den neu entwickelten Medikamenten der Großteil nur Modifikationen von bereits bestehenden Wirkstoffen sind. Besteht gegen so ein schon in Verwendung befindliches Medikament eine Resistenz, ist es umso wahrscheinlicher, dass auch die abgewandelte Form bald unwirksam sein wird.

Von den 20 seit 2000 neu auf den Markt gekommenen Antibiotika repräsentieren nur drei eine neue Wirkstoffklasse: Linezolid als bisher einziges Oxazolidinon (2000),

Daptomycin aus der Klasse der Lipopeptide (2003) und Retapamulin, ein Pleuromutilin (2007). Die Pleuromutiline an sich sind dabei nicht neu, die Wirkstoffklasse fand bisher in der Veterinärmedizin Verwendung. Retapamulin ist der erste Vertreter, der nun auch Eingang in die Humanmedizin fand [21].

Erste Berichte über Resistenzen gegenüber Linezolid wurden allerdings schon nach einem Jahr publiziert [22-24], und nach nur sieben Jahren wirkte auch Daptomycin nicht mehr uneingeschränkt [25].

Und mit dem Welthandel und den durch die Globalisierung immer enger verzahnten und zusammenwachsenden Weltmärkten können resistente Erreger nahezu jede Grenze binnen Kurzem überwinden [26].

Die Photodynamik – ein wiederentdecktes Verfahren

Es ist nur zu ersichtlich, dass man dringend neue Ansätze braucht, um den immer widerstandsfähigeren Bakterien entgegenzutreten. Nicht neu, aber lange vergessen, bzw. in den Hintergrund gedrängt, ist das sogenannte Photodynamische Prinzip.

Dieses Prinzip ist schon seit über 100 Jahren bekannt, seitdem es der Münchner Medizinstudent Oskar Raab in den Jahren 1897/98 erstmals beobachtete. Er bemerkte, dass die von ihm mit dem Farbstoff Acridin versetzten Pantoffeltierchen (*Paramecium caudatum*) zwar starben, jedoch variierten die nötigen Expositionszeiten bei gleicher Farbstoffkonzentration erheblich. Er stellte den Zusammenhang zwischen deren Letalität und der Tageszeit, bzw. der Beleuchtung der Proben her. Raab konnte ausschließen, dass der tödliche Effekt allein auf den Farbstoff oder nur die Belichtung zurückzuführen war [27]. Er stieß somit auf das Prinzip, das Raabs Doktorvater Hermann von Tappeiner (**Abb. 6**) als Abgrenzung zu fotografischen Phänomenen als „photodynamisch“ bezeichnete [28].



Abb. 6: Prof. Hermann v. Tappeiner, der Mentor Oskar Raabs [29]

In den Folgejahren wurde dieses neu entdeckte Prinzip auf seine Anwendbarkeit in unterschiedlichen Gebieten hin untersucht: experimenteller klinischer Einsatz [30], Tierversuche [31], und auch von Selbstversuchen wird berichtet, wie z. B. von Dr. Friedrich Meyer-Betz, der sich 200 mg des körpereigenen Farbstoffes Hämatoporphyrin spritzte. Die nachfolgende bewusste Exposition gegenüber Sonnenlicht hatte eine schwere, wenngleich reversible Schädigung der Haut zur Folge [32].

Mit der Erkenntnis, dass Tumorgewebe endogene Pigmente, v. a. Porphyrine, anreichern, Sonnenlicht absorbieren und sogar Fluoreszenz zeigen, war der Zusammenhang zwischen fluoreszierenden Stoffen und neoplastischem Gewebe erbracht. Viel mehr noch konnte in einigen Fällen sogar ein Rückgang der tumorösen Geschwulst als Konsequenz der Lichtabsorption beobachtet werden [33].

Es zeigte sich, dass sich die photodynamische Therapie (PDT) gut bei karzinomatösen Veränderungen einsetzen lässt, nicht nur kurativ [34], sondern auch diagnostisch [35]. Das Feld der Krebstherapie ist nach wie vor das Haupteinsatzgebiet der PDT in der modernen Medizin. Verwendung findet sie auch in der Dermatologie zur Behandlung topischer Befunde, z. B. bei Aktinischer Keratose (AK) oder auch dem Basalzellkarzinom (BCC). Der Photosensibilisator Psoralen kommt bei der sog. PUVA-Therapie (**P**soralen + **UVA**-Licht) zum Einsatz, ein Verfahren, das 1974 entwickelt wurde [36].

Funktionsprinzip der photodynamischen Behandlung

Das Funktionsprinzip der PDT beruht darauf, dass ein an sich nicht-toxisches (i. S. e. Dunkeltoxizität) Molekül, der sogenannte Photosensibilisator (PS), durch Bestrahlung mit Licht aktiviert wird. Der PS befindet sich dabei in unmittelbarer Nähe, am besten sogar innerhalb der Zielzelle. Durch die Aktivierung ist der PS in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies (ROS: „*reactive oxygen species*“) zu erzeugen, die dann ihrerseits durch diverse oxidative Prozesse an und in der Zelle eine toxische Wirkung entfalten. Das detaillierte Funktionsprinzip der PDT ist hinlänglich bekannt und bereits an anderer Stelle *in extenso* beschrieben [37-40].

Bisher wurde die PDT vor allem zur Behandlung maligner Tumoren und prämaligener Gewebeveränderungen eingesetzt. Wie in mittlerweile vielen Versuchen eindrücklich gezeigt werden konnte, hat die PDT – entsprechend angewandt – eine nicht zu verachtende antimikrobielle Wirkung. Zur klaren Abgrenzung gegenüber der in der Tumorthherapie eingesetzten PDT wird der Einsatz im antimikrobiellen, bzw. antibakteriellen Bereich als aPDT bezeichnet. Synonym verwendet werden auch die Begriffe „photodynamische Inaktivierung von Bakterien“ (PIB), bzw. auch einfach nur „photodynamische Inaktivierung“ (PDI), oder „photodynamische antimikrobielle Chemotherapie“ (PAC).

Abb. 7 legt den zu Grunde liegenden Mechanismus schematisch dar.

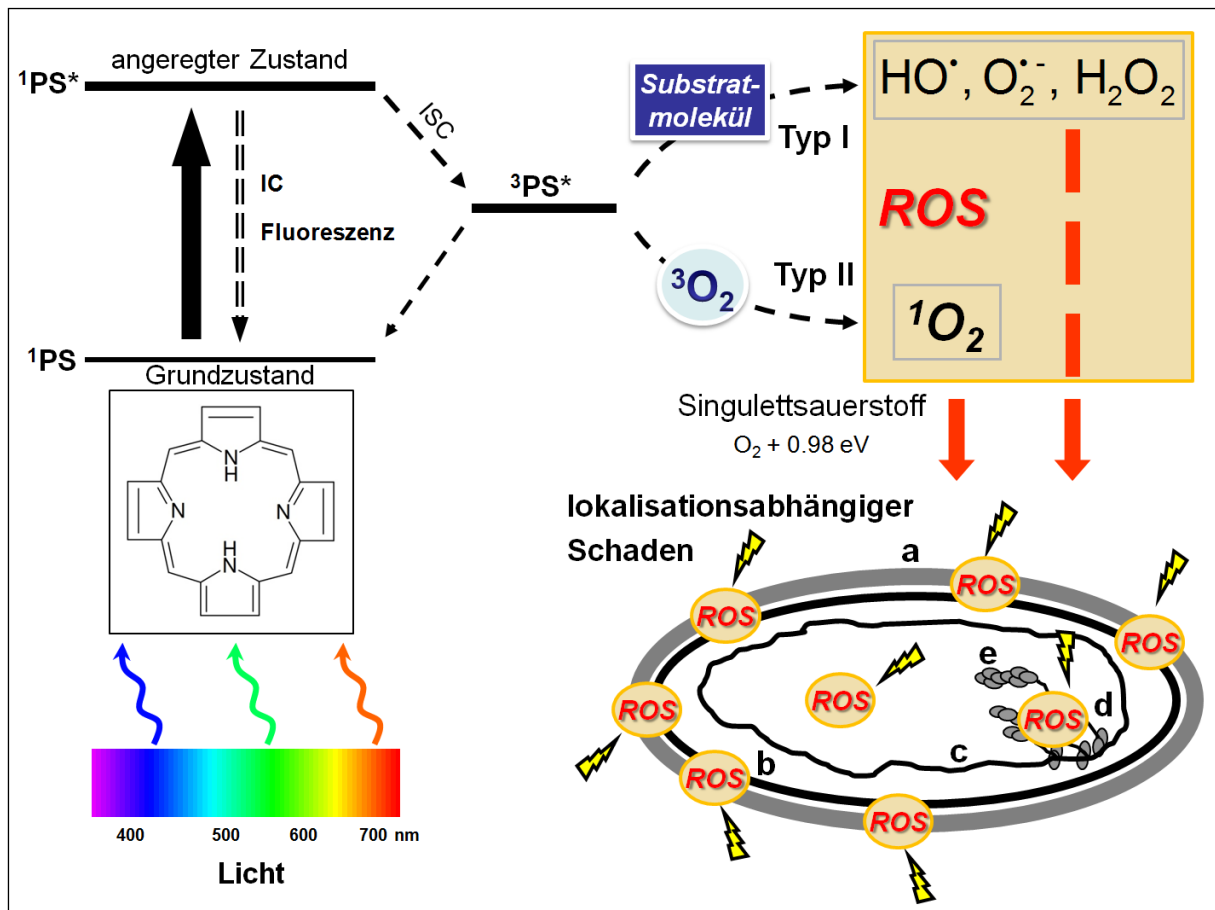


Abb. 7: schematischer Mechanismus der PIB:

Der Photosensibilisator PS (hier beispielhaft ein unsubstituiertes Porphyrin) wird durch Belichtung aus seinem Singulett-Grundzustand 1PS in den angeregten Singulettzustand $^1PS^*$ überführt. Von dort kehrt er entweder über Energieabgabe durch strahlungslose internal conversion (IC) (z. B. Wärme) oder strahlende Fluoreszenz in den Grundzustand zurück. Oder er tritt durch intersystem crossing (ISC) in den (angeregten) Triplettzustand $^3PS^*$ über. Dieser agiert als Mediator für die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies ROS in Typ I- und Typ II-Photosensibilisierungsprozessen.

Typ I: durch Ladungsübertragung auf ein Substratmolekül werden Radikale oder Radikationen wie Hydroxylradikal (HO^\bullet), Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$) oder Sekundärprodukte wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) erzeugt.

Typ II: durch Energieübertrag auf den Triplettgrundzustand des Sauerstoffs 3O_2 erfolgt die Bildung des hochreaktiven Singulett-Sauerstoffs 1O_2 .

Die ROS wirken in ihrer unmittelbaren Umgebung oxidierend auf die bakteriellen Strukturen und Prozesse ein, z. B. (a) äußere Zellwand, (b) Zytoplasmamembran, (c) DNS-Replikation, (d) Transkription oder (e) Translation.

(modifiziert nach [41, 42])

Der Vorteil der aPDT liegt auf der Hand: sie ist im Vergleich zu Antibiotika in ihrer Wirkungsweise unspezifisch und deswegen breit wirksam (vgl. **Abb. 8**).

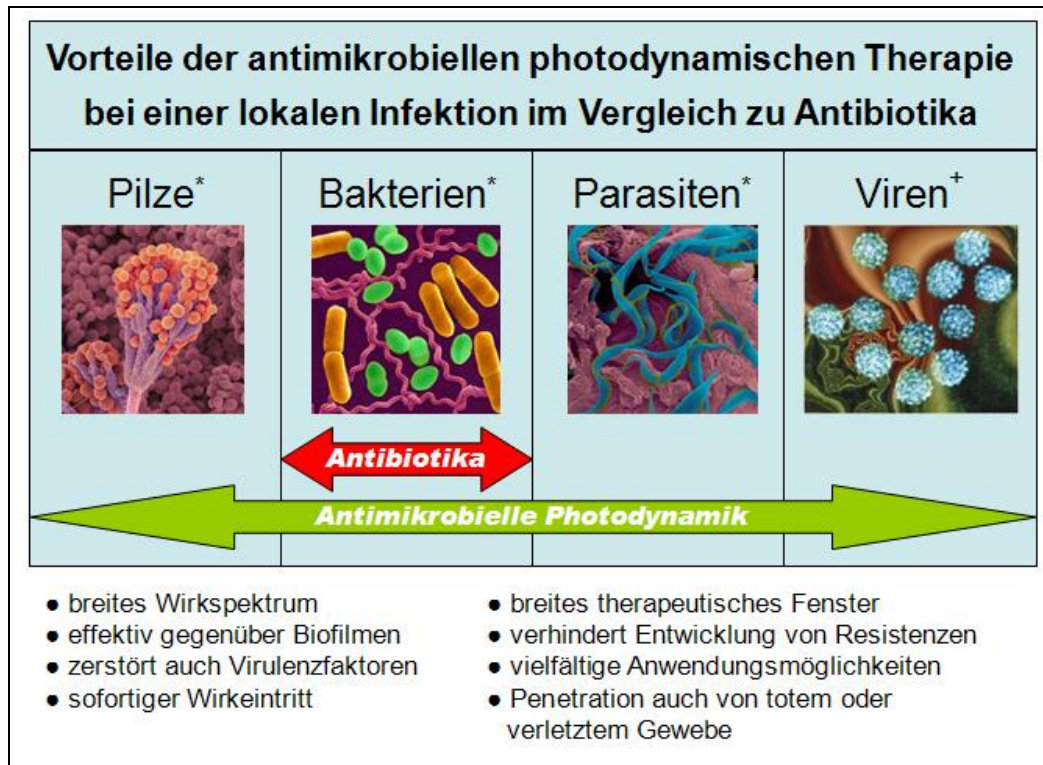


Abb. 8: schematischer Vergleich des Einsatzbereiches von Antibiotika und der aPDT (modifiziert nach [43], Bildnachweis: *Dennis Kunkel Microscopy, Inc. / *Dr. Linda Stannard, UCT/Science Photo Library)

Der toxische Effekt der beiden Reaktionstypen (Typ I und Typ II) begründet sich hauptsächlich in der Photooxidation von spezifischen Biomolekülen durch die ROS, insbesondere von Lipiden und Proteinen [44].

Welcher Reaktionstyp bevorzugt abläuft, hängt einerseits vom verwendeten PS und dessen photophysikalischen Eigenschaften sowie seiner subzellulären Lokalisation ab, andererseits auch vom Substrat- und Sauerstoffangebot in der direkten Umgebung des bestrahlten PS [45-47].

Die photophysikalischen und -chemischen Anforderungen an den PS ergeben sich aus seiner Wirkungs- und Einsatzweise:

- Wasserlöslichkeit → Aufnahme in biologische Systeme
- kleines Molekulargewicht → erleichterte Penetration der Zellwand
- hohe lokalspezifische Wirkungsentfaltung → Schonung des umgebenden (humanen) Gewebes

- große Eindringtiefe → Schäden im Inneren des Pathogens
- keine Dunkeltoxizität → ohne Belichtung keine schädigende Wirkung
- kurze Inkubationszeit → frühzeitiger Behandlungsbeginn

Weitere wichtige Kriterien für einen guten PS sind [48]:

- im Falle überwiegender Typ II-Reaktion: hohe $^3\text{O}_2$ -Quantenausbeute → hohe $^1\text{O}_2$ -Erzeugungsrate
- im Falle überwiegender für Typ I-Reaktion: hohes Redox-Potential der angeregten Zustände $^1\text{PS}_{\text{red}}^* / ^3\text{PS}_{\text{red}}^*$
- positive Ladung → elektrostatische Bindung an negative geladene Bereiche der Bakterienwand
- generelle Lipophilie
- molekularer Extinktionskoeffizient ε bei einer gegebenen Wellenlänge λ

sowie [49]

- Selektivität für Pathogene durch entsprechende Seitenkettenmodifikationen → Schonung humaner Zellen
- hohe Photostabilität → keine chemische Veränderung während Belichtung.

Die antimikrobielle photodynamische Therapie „PIB“ ist ein vielversprechender Ansatz, den aus antibiotischer Sicht immer widerstandsfähiger werdenden Bakterien sowie anderen Krankheitserregern und Pathogenen zu begegnen. Aufgabe der aktuellen Forschung muss es sein, neue Herangehensweisen zu etablieren, die schon bekannten Prinzipien weiterzuentwickeln, zu perfektionieren und für den klinischen oder industriellen Einsatz tauglich zu machen.

Übersicht über die eingesetzten Photosensibilisatoren

Aktuell werden Photosensibilisatoren aus unterschiedlichen chemischen Gruppen verwendet.

Die ersten synthetischen Farbstoffe, die eine phototoxische Wirkung zeigten, waren Phenothiazinderivate wie z. B. Metylenblau oder Toluidinblau O (**Abb. 9**) [50, 51]. Durch Hinzufügen oder Modifikationen von Seitenketten konnten Wainwright *et al.* Phenothiazine mit verbesserter photobakterizider Aktivität erlangen, die gegen grampositive Bakterien wie *S. aureus*, *B. cereus* oder *E. faecalis*, aber auch gegen gramnegative Stämme wie *E. coli* oder *P. aeruginosa* wirkten [52].

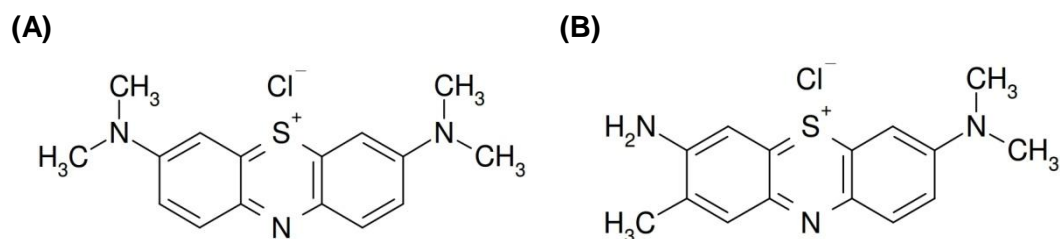


Abb. 9: Die Phenothiazinderivate Metylenblau (A) und Toluidinblau O (B).

Eine weitere Molekülgruppe, deren Effektivität zur PIB nachgewiesen wurde, waren die makrozyklischen Moleküle wie Porphyrine und Phthalocyanine (**Abb. 10**). Mit ihren großen konjugierten π -Systemen erfüllen diese Moleküle eine wichtige Voraussetzung für die energetische Transformation des einfallenden Lichts und die resultierende Entstehung von ROS.

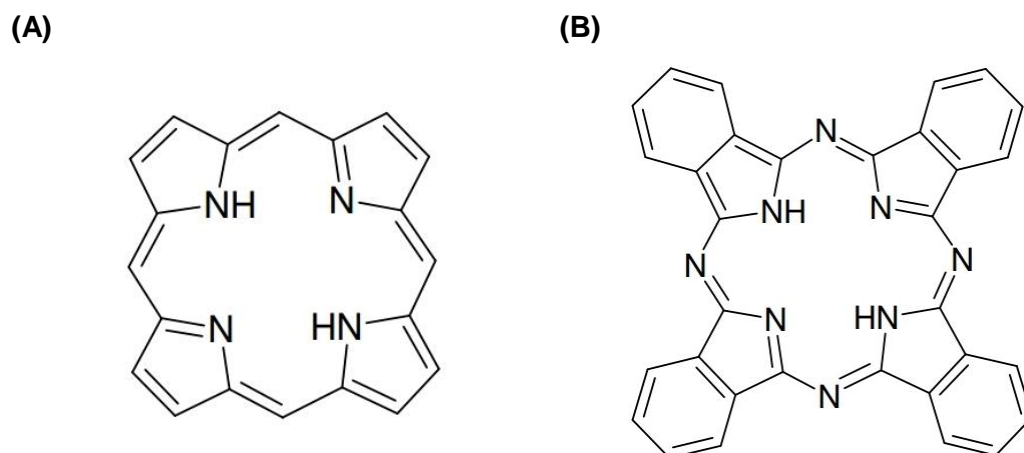


Abb. 10: Grundstruktur von Porphyrinen (A) und Phthalocyaninen (B).

Abb. 11 zeigt den Standardvertreter der Porphyrinphotosensibilisatoren, TMPyP (5,10,15,20-Tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin), das bereits erfolgreich für die PIB herangezogen wurde [53-56]. Die Arbeitsgruppe um Maisch *et al.* konnte mit neuen Porphyrinderivaten zeigen, dass Methicillin-resistente Staphylokokken-Stämme (*S. aureus* und *S. epidermidis*) *in vitro* um $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen reduziert werden konnten, ohne zu einer Schädigung von eukaryotischen Zellen zu führen [57].

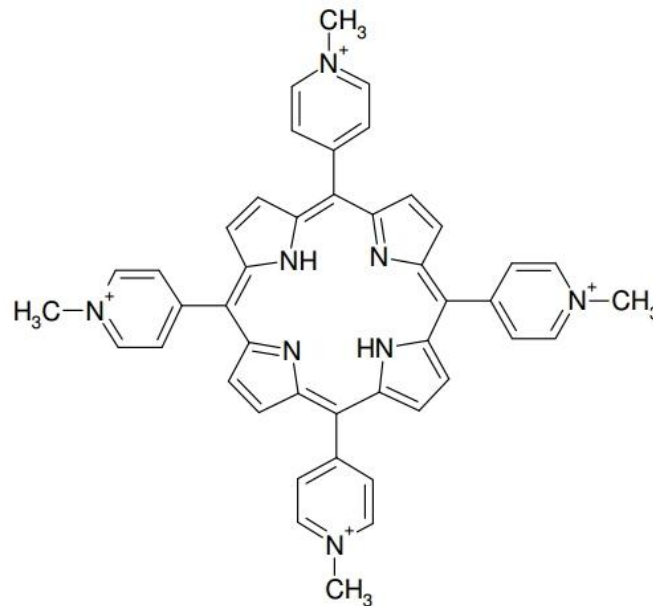
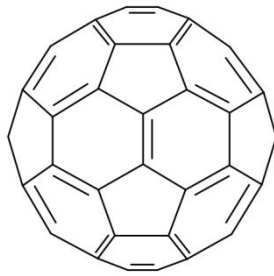


Abb. 11: Strukturformel von TMPyP

Eine neue Gruppe von PS wird durch die Fullerene dargestellt. Diese von Osawa 1970 vorhergesagten und von Kroto *et al.* 1985 nachgewiesenen Moleküle sind komplex-aromatische Verbindungen [58, 59]. Typisch für diese Molekülgruppe, die neben Diamant und Graphit eine dritte elementare Modifikation des Kohlenstoffs darstellt, ist ihre fußballähnliche Struktur (vgl. **Abb. 12A**). Die Arbeitsgruppe um Tegos zeigte 2005, dass sich mittels Fulleren-basierter kationischer Photosensibilisatoren (vgl. **Abb. 12B**) Bakterien effektiv zerstören lassen [60].

(A)



(B)

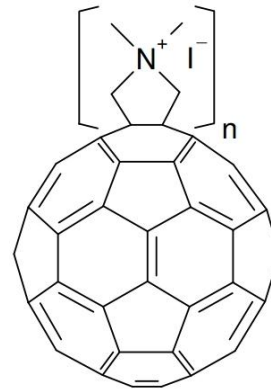
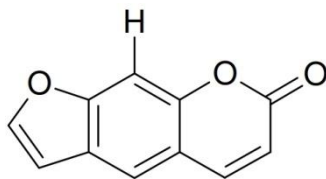


Abb. 12: Fulleren mit 60 C-Atomen, C_{60} , [60]Fulleren: Grundgerüst (A) und substituiert mit ein, zwei oder drei quartären Pyrrolidiniumgruppen ($n=1-3$) (B).

Die vierte große Gruppe sind Farbstoffe aus den Reihen der Furanocumarine. Vertreter dieser Stoffklasse werden typischerweise von Pflanzen synthetisiert, wie z.B. *Psoralea corylifolia*, auch Babchi genannt, die für den wohl bekanntesten Wirkstoff dieser Klasse namensgebend ist, das Psoralen. Psoralen ist dabei zugleich das Grundgerüst der linearen Furanocumarine (vgl. **Abb. 13**). Die Besonderheit der Furanocumarine liegt im Vergleich zu den anderen Photosensibilisatoren darin, dass sie bevorzugt mit der DNA in Wechselwirkung treten und sich ihr anlagern. Darüber hinaus absorbieren sie vor allem im UV-Spektrum, üblicherweise UV-A bei 320–400 nm [61].

(A)



(B)

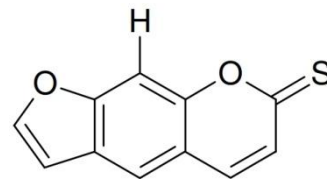


Abb. 13: natürliche Photosensibilisatoren: (A) Psoralen, (B) 2-Thiofuranocumarin

Beeinflussung des Zeitfaktors

Wie anhand der obigen Beispiele veranschaulicht, konnte mehrfach gezeigt werden, dass die PIB funktioniert.

Doch eines ist allen praktischen Anwendungen der PIB gemein: die minutenlange Inkubationsdauer des PS sowie die relativ lange nachfolgende Bestrahlung. Feese *et al.* erreichten Abtötungsraten von bis zu $5 \log_{10}$ -Stufen – nachdem sie die Bakterien (*Mycobacterium smegmatis*) zuvor für fünf Minuten mit TMPyP inkubiert und anschließend bis zu 30 Minuten mit einer inkohärenten Lichtquelle bestrahlt hatten [55]. Eine Optimierung des photodynamischen Prozesses hinsichtlich der Expositionszeiten (ggü. dem Farbstoff wie der Lichtquelle) erscheint also äußerst erstrebenswert, um die insgesamt Prozessdauer der PIB in den Bereich von wenigen Minuten oder Sekunden zu bringen. Hierfür bietet sich die Verwendung neuer inkohärenter Lichtquellen an, die in der Dermatologie neben Lasern schon einen etablierten Platz bei der PDT von Tumoren einnehmen [62].

Der Vorteil inkohärenter Lichtquellen liegt in ihren breiten Emissionsspektren (400–1000 nm), die sich mit den Absorptionsspektren vieler Photosensibilisatoren decken. Innerhalb dieser Gerätegruppe wurden Intense Pulse Light-Blitzlichtlampen (IPL) für verschiedene dermatologische Verfahren und Behandlungen entwickelt, z. B. zur Verjüngung lichtgeschädigter Haut, zur Entfernung von Naevi flammei (Feurermalen) oder zur Epilation [63-65].

IPLs sind hochenergetische Blitzlampen, die innerhalb von Millisekunden Lichtpulse hoher Strahlungsleistung (mW/cm^2) abgeben. Das zugrundeliegende Prinzip einer IPL ist die selektive thermale Zerstörung des Zielgewebes in Abhängigkeit des gewählten Spektrums, der Pulsdauer und der Fluoreszenz. Durch die Applikation kurzer Pulse wird die Hitzediffusion in um- und tieferliegendes Gewebe minimiert, um Nebenwirkungen zu verhindern. Das Spektrum des IPL-Applikators wird durch einen optischen Kantenfilter, den sog. Cut-off-Filter modifiziert.

HSPs – der erste Schritt des Widerstands

Wie oben erwähnt, geraten Bakterien und andere Keime durch Selektion und Mutation in die für sie günstige Lage, Resistenzen gegen Antibiotika zu entwickeln. Diese Abwehrstrategien sind aufgrund der spezialisierten Wirkmechanismen von Antibiotika sehr spezifisch und logischerweise sehr auf das jeweilige Agens fokussiert. Neben diesen zielgerichteten Abwehrmechanismen haben Bakterien noch einen ursprünglicheren, breit gefächerten Weg, auf Stressfaktoren zu reagieren. Werden sie solchen ausgesetzt, hat das die Bildung von sogenannten heatshock-, bzw. Hitzeschock-Proteinen (HSPs) zur Folge. Zuerst wurden sie 1962 als eine Reaktion auf erhöhte Temperatur entdeckt [66].

Diese Proteingruppe dient als Reparaturmechanismus, um fehlgefaltete und somit wirkungslose oder sogar schädliche andere Funktionsproteine wiederherzustellen. Sie sind zum einen ubiquitär in der Zelle vorhanden, da sie auch bei den immerwährend ablaufenden Proteinsyntheseprozessen benötigt werden, um die posttranslationale Proteinfaltung zu unterstützen. Aus diesem Grund werden sie „*Chaperone*“ genannt, da sie dem schädlichen Einfluss verschiedenster Agenzien auf die Tertiär- und Quartärstruktur von Funktionsproteinen entgegenwirken. HSPs sind sozusagen der erste Schritt der Widerstandsfähigkeit gegen schädliche Einflüsse und sie sind im Gegensatz zu anderen Resistenzmechanismen, wie z. B. der β -Lactamaseresistenz, eine sehr unspezifische Reaktion.

Doch werden sie nicht nur bei Hitzestress gebildet, ebenso bei Kälte und auch bei vielfältigen anderen belastenden Situationen: Schwermetalle, Ethanol, Aminosäureanaloge, oder auch Sauerstoffradikale [67]. Gerade letzter Punkt ist unter dem Aspekt der PIB natürlich besonders interessant. Wie Ziegelhoffer *et al.* zeigen konnten, werden HSP durch den bekannten PS Methylenblau induziert [68].

2 FRAGESTELLUNG

Die zunehmende Resistenz von Bakterien gegenüber Antibiotika erfordert die schnelle Entwicklung von neuen und effizienten Methoden mit zwei wichtigen Eigenschaften: die effektive Zerstörung der resistenten Bakterien und ein geringes oder kein eigenes Resistenzpotential. Daher besteht die Notwendigkeit, alternative Verfahren zu entwickeln. Eine neue Alternative ist die Photodynamische Inaktivierung von Bakterien (PIB). Diese Methode nutzt einen Farbstoff, Photosensibilisator (PS), der durch Absorption von sichtbarem Licht reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generiert. Diese reaktiven Sauerstoffspezies können bei geeigneter Wahl der Parameter (Konzentration des PS, Inkubationszeit, Bestrahlungszeit und Lichtdosis) die sofortige oxidative Abtötung der Bakterien bewirken.

Daher soll im ersten Teil dieser Arbeit untersucht werden, ob und inwiefern sich die PIB am Beispiel ausgewählter Keime in ihrer Effizienz steigern lässt, ohne an Effektivität (Reduktion um $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen) zu verlieren. Zu diesem Zweck soll der Einsatz einer hochenergetischen Blitzlichtlampe (IPL) als mögliche neue Lichtquelle für die PIB untersucht werden, um somit die bisherigen Bestrahlungszeiten von herkömmlichen kohärenten Lichtquellen von Minuten bis Stunden zu minimieren (~10 s), um damit auch den Gesamtzeitaufwand einer photodynamischen Inaktivierung von Bakterien zu reduzieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, ob und inwiefern die PIB eine Reaktion in den unspezifischen Abwehrmechanismen der Bakterien hervorrufen kann. Wie in der Einleitung angedeutet, reagieren Bakterien auf belastende Umweltreize wie Hitze, Kälte, Strahlung und dergleichen mehr mit der Expression von Hitzeschock-Proteinen (HSP). Diese stellen somit die erste Stressantwort der Bakterien dar. Vermögen die ROS, die bei der PIB erzeugt werden, die HSP-Expression zu induzieren? Und vermögen diese ihrerseits die bakterielle Zelle vor letalen Schäden zu bewahren oder sogar widerstandsfähiger zu machen? Mittels des Nachweises von DnaK, eines exemplarischen Vertreters aus der Gruppe der HSPs, wird überprüft, in welchem Maß die Bakterien auf den durch die PIB gesetzten oxidativen Reiz reagieren.

3 MATERIALIEN

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Produkte aus Deutschland (DE) bezogen.

3.1 Bakterienstämme

Benutzt wurden Methicillin-sensitiver *Staphylococcus aureus* (MSSA; ATCC 25923), MRSA (ATCC BAA-44 und ATCC 43300), und *Escherichia coli* (ATCC 25922), die bei 37 °C in Müller-Hinton-Bouillon unter aeroben Bedingungen kultiviert wurden, sowie *Bacillus atrophaeus* (ATCC 9372), der bei 30 °C ebenfalls in M.-H.-Bouillon kultiviert wurde.

3.2 Bakterienkulturmedien

3.2.1 Müller-Hinton-Bouillon

0,021 kg des pulverförmigen Müller-Hinton-Mediums (Merck KGaA, Frankfurt) wurden auf 1 L Millipore-Wasser gegeben. Nach Autoklavieren (121 °C, 20 min) wurde die Bouillon bis zum Gebrauch im Kühlraum gelagert.

3.2.2 Müller-Hinton-Agar

Die Agarplatten wurden vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des Uniklinikums Regensburg gefertigt und bezogen. Zu der oben beschriebenen Bouillon wurden noch 0,013 kg Agar pro Platte hinzugefügt.

3.3 Lösungen

3.3.1 PBS-Puffer

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS), 0,01 mol L⁻¹, enthaltend 0,027 mol L⁻¹ KCl und 0,14 mol L⁻¹ NaCl, bei einem pH von 7,4
PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

3.3.2 Lysis-Puffer

CellLytic™ B Cell Lysis Reagent aus CellLytic™ B Plus Kit
Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.3.3 BCA-Analyse-Kit

BCA Protein Assay Kit
Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA

3.4 Photosensibilisator

Eine 0,002 molare Stammlösung von TMPyP (5,10,15,20-Tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tetra(p-toluensulfonat); Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit einem Reinheitsgrad 97 % wurde durch Verdünnung mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ hergestellt, mit einem 0,22 μM -Filter gefiltert und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

Verdünnungen wurden mit PBS-Puffer hergestellt.

3.5 Western-Blot

3.5.1 Gele

3.5.1.1 Sammelgel

Die Rezeptur zum Gießen für zwei Sammelgele lautet wie folgt:

670 μL	30 % Acrylamid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
500 μL	0,5M Tris HCl Buffer, pH 6.8 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
2,7 mL	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
40 μL	10 % SDS (in Millipore Wiser), SDS Pellets (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)
40 μL	10 % APS (in Millipore Wasser), Ammoniumpersulfat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
4 μL	TEMED (<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Nach Zugabe der Radikalstarter APS und TEMED wurde die Flüssigkeit zwischen die eingespannten Glasplatten appliziert und mit 1 mL Isopropanol überschichtet, um superfizielle Blasenbildung zu verhindern. Nach 30 min Polymerisationsphase wurde der Isopropanol abgekippt und die Platten mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ kurz gespült. Im Anschluss daran wurde das Trenngel eingegossen.

3.5.1.2 Trenngel

Die Rezeptur zum Gießen für zwei Trenngele lautet wie folgt:

Polyacrylamidanteil 8 %

2,7 mL	30 % Acrylamid (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
2,5 mL	1,5M Tris HCl Buffer, pH 8.8 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
4,6 mL	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

100 µL 10 % SDS (in Millipore Wasser), SDS Pellets (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

100 µL 10 % APS (in Millipore Wasser), Ammoniumpersulfat (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

6 µL TEMED (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

Nach Einfüllen des Trenngels wurde ein 10-well-Kamm eingebracht und das Gel 30 min härten gelassen.

Fertiggestellte, aber nicht sofort benötigte Gele wurden bis zur Verwendung – jedoch maximal zwei Tage – feucht in Plastikfolie eingepackt und im Kühlschrank gelagert.

3.5.2 Pufferlösungen

3.5.2.1 Laufpuffer

100 mL 10x Tris/Glycine/SDS Buffer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

900 mL Millipore Wasser

3.5.2.2 Lämmli-Puffer

1:5-Puffer (1 Teil Puffer, 4 Teile Probe)

480 µL Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

20 µL β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

3.5.2.3 Transferpuffer

200 mL Methanol (Merck KGaA, Darmstadt)

100 mL 10x TG (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

700 mL Millipore Wasser

3.5.2.4 Waschpuffer

100 mL 10x Tris-Buffered Saline (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

500 µL Tween® 20 (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

900 mL Millipore Wasser

3.5.2.5 Magermilch

5%ig

5 g Magermilchpulver (J. M. Gabler Saliter GmbH & Co KG, Obergünzburg)

100 mL Waschpuffer

1%ig

Die 5%ige Magermilch wurde 1:4 mit Waschpuffer (s. 3.5.2.4) verdünnt.

3.5.3 Proteine und Antikörper

3.5.3.1 Molekularmarker

Page Ruler™

Prestained Protein Ladder (Prod.No. 11812124)

Thermo Scientific, Schwerte

3.5.3.2 Kontrollprotein

HSP70 DnaK (E. coli), (recomb.)

Axxora Deutschland GmbH, Lörrach

3.5.3.3 1° Antikörper

DnaK (E. coli), mAb (8E2/2) (mouse)

(1:10.000 in 1%iger Milch)

Axxora Deutschland GmbH, Lörrach

Anti-GAPDH-Antikörper (goat)

(1:2.000 in 1%iger Milch)

Antibodies-online GmbH, Aachen

3.5.3.4 2° Antikörper

ECL™ anti-mouse IgG, HRP-linked species-specific whole antibody (from sheep)

(1:5.000 in 1%iger Milch)

GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK

donkey anti-goat IgG-HRP

(1:5.000 in 1%iger Milch)

Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg

3.5.4 Entwicklung

3.5.4.1 Trägermaterialien

Hybond™-C Extra, Nitrocellulose, Supported, 0.45 Micron, 20x20 cm

GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK

Whatman® Chromatography Paper, 3MM Chr, 46x57 cm

Whatman GmbH, Dassel

3.5.4.2 Entwicklungsreagens

Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents
GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK

3.5.4.3 Film

Amersham Hyperfilm™ ECL
GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK

3.6 Technische Geräte

3.6.1 Zentrifugen

3.6.1.1 Megafuge 1.0

Heraeus Sepatech, ThermoFischer Scientific
Weiss Labortechnik GmbH, Heroldsberg

3.6.1.2 Biofuge pico

Biofuge pico
Best# 75003280
Heraeus instruments, Osterode

3.6.2 Spektrophotometer

Beckmann Spectrophotometer UV-DU 640
Beckmann Coulter GmbH, Krefeld

3.6.3 Blitzlichtlampe

Impulslampe IPL Ellipse
Applikator: VL-2 (550 nm)
Ellipse A/S, Hørsholm, Dänemark

3.6.4 Waldmannlampe

Waldmann UV236
Serien#: 01219-02
Waldmann Medizintechnik, Villingen-Schwenningen

UV236 wurde im Rahmen des EU-Projektes „DYNAMICRO“ von der Firma Waldmann Medizintechnik zur Verfügung gestellt [57].

3.6.5 Wasserbad

Ultraschallbad

Gerätetyp: USR 30 H, Serien#: SN8197241219

Merck Eurolab GmbH, Bruchsal

3.6.6 Microplate Reader

EMax, Precision Microplate Reader

Molecular Devices GmbH

3.6.7 Entwickler

Kodak M35 X-OMAT Processor

Eastern Kodak Company, Rochester, New York

4 METHODEN

Die beiden Versuchsteile der vorliegenden Arbeit (Toxizitätstest und HSP-Induktion) überlappen sich weitestgehend in der zu Grunde liegenden Methodik. Die Sequenz Bakterienkultur – Bestrahlung – CFU-Bestimmung lässt sich in den beiden Teilen wiederfinden, wenn auch mit unterschiedlichen Parametern.

Ab 4.5 wird die Proteingewinnung und -bestimmung beschrieben, die nur noch für den zweiten Aspekt der Arbeit, der Untersuchung der HSP-Expression, von Relevanz ist.

4.1 Bakterienkultur- und -gewinnungsverfahren

4.1.1 Toxizitätstests mit IPL

Eine Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes (*E. coli*, *S. aureus*, MRSA BAA-44 / 43300, *B. atrophaeus*) wurde hergestellt. Dazu wurden je 5 mL Müller-Hinton-Bouillon mit je einer CFU des Stammes angeimpft und bei 37 °C über Nacht (14-18 h) inkubiert. Die so gewonnenen Kulturen wurden zentrifugiert (Megafuge, 3.100 rpm, 15 min) und mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in PBS resuspendiert und im Spektrophotometer bei 600 nm auf eine optische Dichte von $\approx 0,6$ eingestellt, was $\approx 10^{7-8}$ Bakterien mL⁻¹ entspricht. Die so erhaltene Suspension wurde für die weiteren Phototoxizitätstests verwendet.

4.1.2 Heatshockinduktionstests

Benutzt wurde *E. coli* (ATCC 25922), der bei 37 °C in Müller-Hinton-Bouillon unter aeroben Bedingungen kultiviert wurden. Eine Übernachtskultur (150 mL, 37 °C, im 500 mL-Schikanekolben) wurde zentrifugiert (Megafuge, 3.100 rpm, 15 min) und mit M.-H.-Bouillon im Spektrophotometer auf eine optische Dichte von $\approx 1,6$ eingestellt. Dadurch konnte eine ausreichende Gesamtproteinmenge für den im weiteren Versuchsablauf vorzunehmenden Western-Blot erhalten werden. Das Volumen der so gewonnenen Suspension betrug ≈ 90 mL.

Davon wurden ≈ 80 mL für 30 min bei Raumtemperatur und ≈ 5 mL für 30 min im Wasserbad bei 50 °C inkubiert (Ultraschallbad, Merck, Bruchsal), mit einer anschließenden Ruhephase von weiteren 30 min bei RT. Vor der im Anschluss anstehenden photodynamischen Behandlung wurden je 4 mL als „präPDT-Probe“ für den Western-Blot separiert und auf Eis gelagert.

Die übrigen Bakteriensuspensionen (RT & 50 °C) wurden erneut zentrifugiert (Megafuge, 3.100 rpm, 10 min), und mit PBS-Puffer resuspendiert. Bei 600 nm wurde eine optische Dichte von $\approx 0,6$ eingestellt, was $\approx 10^{7-8}$ Bakterien mL^{-1} entspricht.

Die so erhaltene Suspensionen wurden für die weiteren Phototoxizitätstests verwendet (vgl. **Abb. 14**).

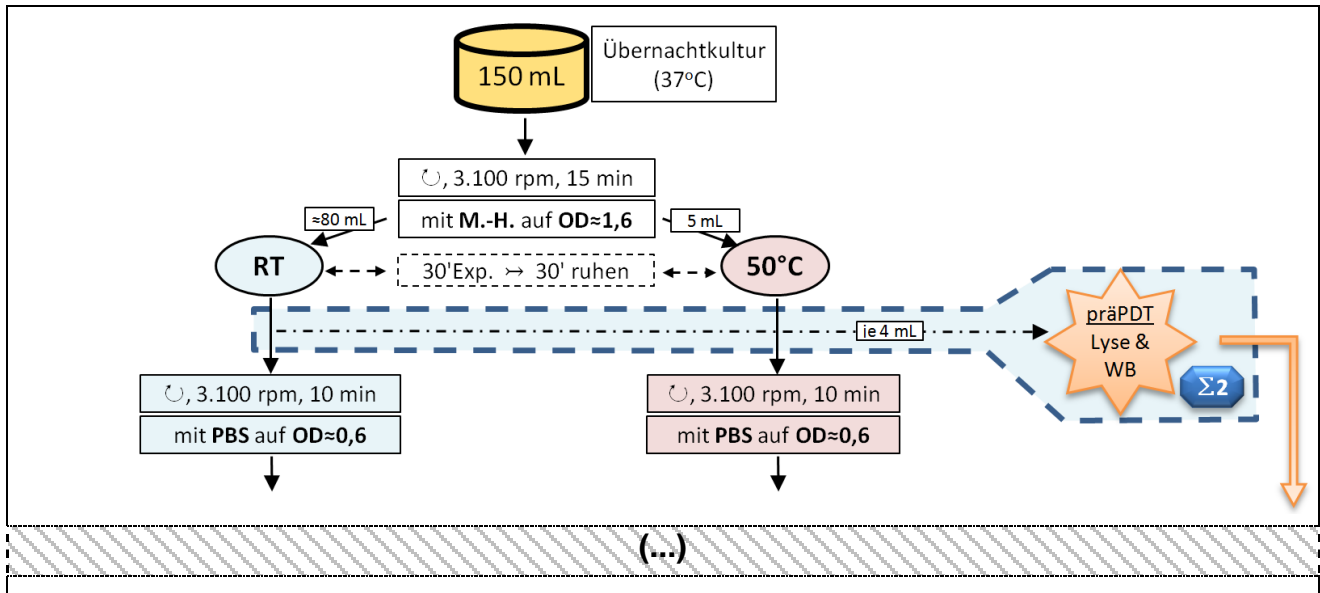


Abb. 14: Versuchsaufbau zur temperaturabhängigen HSP-Induktion innerhalb des Gesamtversuchs.

Legende:

M.-H.: Müller-Hinton-Medium | RT: Raumtemperatur | \cup , **x rpm**: mit **x** Umdrehungen pro Minute zentrifugieren | \rightarrow : anschließend, nächster Schritt | WB: Western-Blot | (...): weiterer Versuchsaufbau (s. **Abb. 16**)

4.2 Bestrahlungsparameter

Für den Toxizitätstest mit der IPL wurde eine kommerziell verfügbare Blitzlichtlampe IPL (VL-2 Applikator; Ellipse A/S, Hørsholm, Dänemark) mit einem Cut-off-Filter bei 550 nm verwendet.

Bei Werkseinstellungen entsprechen Pulslängen von 100 ms und 83 ms einer Energie von 20, bzw. $10 \text{ J}/\text{cm}^2$. Zur Findung von Dosis-Wirkungskurven wurde folgendermaßen verfahren: (I) $1 \times 20 \text{ J}/\text{cm}^2$, gefolgt von Inkrementen \acute{a} $20 \text{ J}/\text{cm}^2$ bis zu einer Maximaldosis von $80 \text{ J}/\text{cm}^2$ bei einer Pulsdauer von 100 ms. (II) $1 \times 10 \text{ J}/\text{cm}^2$, gefolgt von Inkrementen \acute{a} $10 \text{ J}/\text{cm}^2$ bis zu einer Maximaldosis von $40 \text{ J}/\text{cm}^2$ bei einer Pulsdauer von 83 ms.

Für die Versuche zur HSP-Induktion wurde eine Waldmann UV236-Lampe verwendet. Bei einer Leistung von $13,4 \text{ mW/cm}^2$ wurde für 15 min bestrahlt, was einer Energie von $12,06 \text{ J/cm}^2$ entspricht.

Die in beiden Versuchsteilen applizierte Energie lässt sich für beide Lampen nach folgender Formel ermitteln:

$$\text{Bestrahlungsenergie} \left[\frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \right] = \frac{\text{Leistung}}{\text{Fläche}} \times \text{Zeit} \left[\frac{\text{W}}{\text{cm}^2} \times \text{s} \right]$$

Die Bakteriensuspension wurde mit dem Photosensibilisator TMPyP inkubiert und anschließend bestrahlt. Zur Minimierung der Streuung wurden die 96-well-Platten mit dem Bakterien-PS-Gemisch von der Unterseite der Platten bestrahlt.

4.3 Bakterielle Phototoxizitätsmessung

Beim Auszählen von Bakterienkulturen wurde im Falle nicht vorhandener CFU – entsprechend einer totalen Reduktion des Bakterienwachstums – standardmäßig der Wert „10“ eingetragen, um eine graphische Darstellung auf einer logarithmischen Skala zu ermöglichen.

4.3.1 Toxizitätstests mit IPL

Je 3x 100 µL einer Bakteriensuspension (*E. coli*, *S. aureus*, MRSA BAA-44 / 43300, *B. atrophaeus*) mit einer Konzentration von $\approx 10^{7-8}$ Bakterien mL^{-1} wurden in einer 96-well-Platte mit je 100 µL einer TMPyP-Lösung der Konzentrationen 0 / 1,0 / 2,0 µM versetzt, so dass eine Endkonzentration von 0 / 0,5 / 1,0 µM resultierte. Danach wurde für 10 s bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert.

Unmittelbar im Anschluss daran wurden die Bakterien mittels der IPL wie oben beschrieben bestrahlt. Kontrollproben wurden entweder weder mit TMPyP versetzt noch bestrahlt oder nur mit dem PS inkubiert oder nur bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das Überleben der Bakterien durch Ausplattieren und Auszählen der CFU bestimmt. Dazu wurde von den behandelten und nichtbehandelten (PS/–, PS/–, PS/–) Bakteriensuspensionen Verdünnungsreihen angefertigt und auf Müller-Hinton-Agarplatten ausplattiert. Nach 14-18 h Inkubation bei 37 °C wurden die CFU ausgezählt (s. 4.4).

4.3.2 Hitzeschock-Induktionstest

Je 3x 100 μL der vorbehandelten Bakteriensuspensionen (RT & 50 °C) mit einer Bakterienkonzentration von $\approx 10^{7-8} \text{ mL}^{-1}$ wurden in einer 96-well-Platte mit der jeweils gleichen Menge von TMPyP-Lösungen der Konzentrationen 0 / 1,0 / 2,0 μM versetzt, so dass eine Endkonzentration von 0 / 0,5 / 1,0 μM resultierte. Inkubation erfolgte unter Lichtausschluss für 15 min. Kontrollproben wurden entweder weder mit TMPyP versetzt (0 μM , s.o.) noch bestrahlt oder nur mit dem PS inkubiert oder nur bestrahlt (vgl. 4.5, Abb. 16C₁). Nach der Bestrahlung wurde das Überleben der Bakterien durch Ausplattieren und Auszählen der CFU bestimmt. Dazu wurden von den behandelten und nicht behandelten (PS/ $\frac{1}{2}$, PS/ $\frac{1}{2}$, PS/ $\frac{1}{2}$) Bakteriensuspensionen Verdünnungsreihen angefertigt und auf Müller-Hinton-Agarplatten ausplattiert. Nach 14-18 h Inkubation bei 37 °C wurden die CFU ausgezählt (s. 4.4).

4.4 Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Um das Bakterienwachstum zu bestimmen, wurde die Methode von Miles, Misra und Irwin angewandt [69]. Abweichend vom im Original beschriebenen Verfahren wurden die gezählten Kolonien jedoch nur mit dem Verdünnungsfaktor gegengerechnet. Die relative Änderung bleibt dadurch unberührt.

Von der zu bestimmenden Bakteriensuspension wurde eine serielle Verdünnungsreihe mit Verdünnungen 1:10 angefertigt. Eine Müller-Hinton-Agar-Platte wurde in sechs Quadranten aufgeteilt und pro Teilbereich aus sechs verschiedenen, aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen je drei Tropfen á 20 μL aus einer Höhe von ca. 2 cm kontaktfrei aufgebracht. Nach jedem Tropfen wurde die Pipettenspitze gewechselt. Nachdem die Tropfen eingetrocknet waren, wurden die Agar-Platten umgedreht bei 37 °C für 14-18 h inkubiert. Siehe dazu **Abb. 15**.

Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt und über die drei Werte der jeweiligen Verdünnungsstufe ein Mittelwert sowie von diesen seinerseits ein Mittelwert über die jeweilige Behandlungsmodalität (z. B. RT / 1,0 μM TMPyP / $\frac{1}{2}$) gebildet. Die so ermittelten Werte wurden graphisch aufgearbeitet.

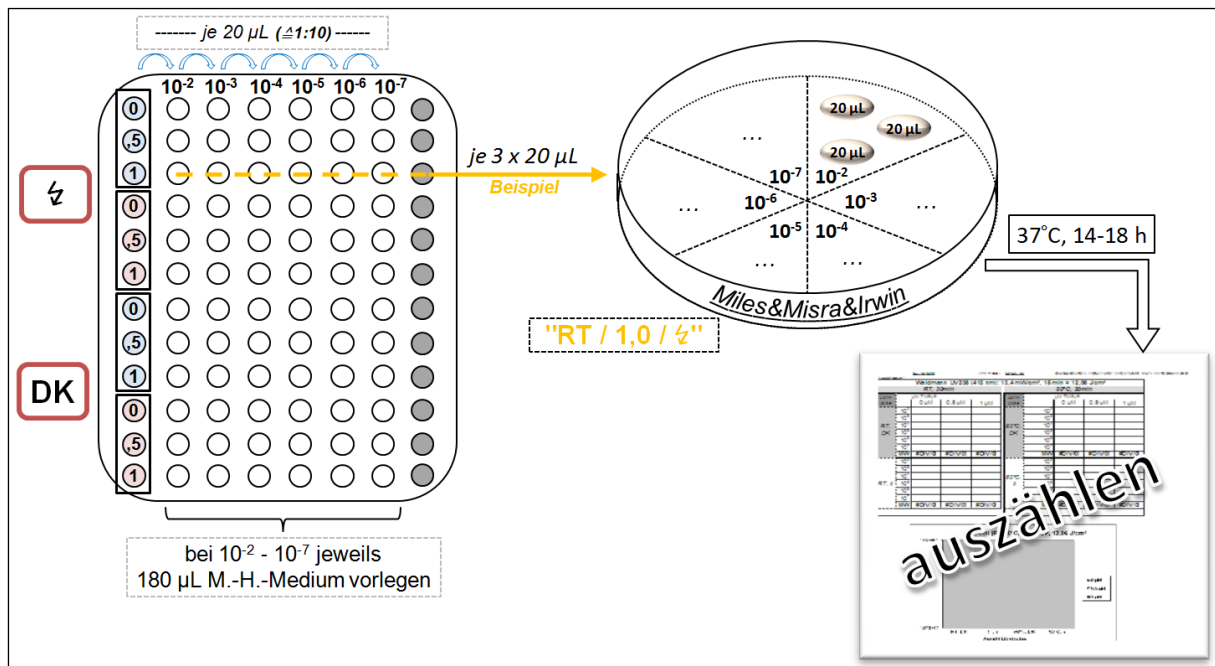


Abb. 15: Bakterienvereinzelung nach Miles, Misra und Irwin (s. auch **Abb. 16C₂**).

Legende:

⚡ / DK: Bestrahlungsmodalität (⚡: mit Bestrahlung; **DK**: ohne Bestrahlung, Dunkelkontrolle) |
 ○ / ●: bei **RT** und **50 °C** präexponierte Bakteriensuspensionen | 0 / ,5 / 1: jeweils vorliegende
 Konzentration von TMPyP [µM] | ●: nicht verwendete wells

4.5 Probengewinnung für Western-Blot

4.5.1 Photodynamischer Prozess

Für die Zelllyse vor dem Western-Blot wurden 4 mL einer Bakterienlösung benötigt. Wie sich in vorgeschalteten Versuchen gezeigt hatte, musste diese eine OD von $\approx 1,6$ aufweisen, um eine ausreichend hohe Proteinkonzentration für den Blot zu beinhalten. Um nun nach der PDT, die bei einer OD von $\approx 0,6$ durchgeführt wurde, die Bakterienlösung wieder anzureichern, wurde folgendermaßen verfahren: 30 mL der RT-Bakteriensuspension der OD $\approx 0,6$ wurden mit je 30 mL einer doppelt-konzentrierten TMPyP-Lösung versetzt, so dass bei einem Endvolumen von 60 mL eine Farbstoffendkonzentration von 0 / 0,5 / 1,0 µM vorlag (vgl. **Abb. 16B**).

Die Durchführung erfolgte in zwei 4-well-Platten (Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA) mit einem Endflüssigkeitsvolumen von 7,5 mL pro well (2 x 4 x 7,5 mL = 60 mL). Da pro Behandlungsmodalität (⚡ / DK mit je 0 / 0,5 / 1,0 µM TMPyP) zwei solcher 4-well-Platten benötigt wurden, entspricht das einem Gesamtbedarf von 12 derartiger Platten. Durch dieses Vorgehen wurde ein ausreichend niedriger

Flüssigkeitsspiegel erhalten, um bei der nachfolgenden Bestrahlung von der Unterseite der Platte von einem suffizienten Energietransport und minimierter Streustrahlung ausgehen zu können. Nach Versetzen mit der TMPyP-Lösung wurden die Bakterien 15 min inkubiert und anschließend bestrahlt, wie unter **4.2** beschrieben.

Danach wurden die zusammengehörigen Bakteriensuspensionen zentrifugiert (Megafuge, 3.100 rpm, 10 min) und das resultierende Pellet in PBS resuspendiert. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde mit dem Spektrophotometer bei 600 nm auf eine $OD \approx 1,6$ eingestellt (vgl. **Abb. 16D**).

4.5.2 Zelllyse

Um eine Proteindegradation zu vermeiden, wurden die Proben auf Eis gelagert oder anderweitig gekühlt. 4 mL der jeweiligen prä- und postPDT-Proben wurden zentrifugiert (Biofugepico, 3.100 rpm, 10 min; 4 °C), der Überstand verworfen und das resultierende Pellet in 0,4 mL Lysis-Puffer resuspendiert. Auf dem Horizontalrüttler wurden die Proben für 10 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (Biofugepico, 13.000 rpm, 5 min, 4 °C). Im zu verwendenden Überstand wurde mittels BCA-Analyse (s. 4.5.3) der Proteingehalt bestimmt und über alle Proben mittels Lysis-Puffer einander angeglichen. Alle Proben wurden mit Lämmli-Puffer versetzt und denaturiert (100 °C, 5 min) (vgl. **Abb. 16E**).

4.5.3 BCA-Analyse

Die BCA (bicinchoninic acid)-Methode diente zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration. Diese ist proportional zur Bakterienkonzentration. Dabei reagieren Cu^{2+} -Ionen mit Protein unter alkalischen Bedingungen zu einem Komplex, der anschließend zu einem einwertigen Kupferion Cu^+ reduziert wird, was proportional zur Proteinkonzentration ist. Das Cu^+ -Ion wird dann durch die Bicinchoninsäure zu einem violetten Farbkomplex gebunden, der bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden kann.

Mittels standardisierter Proben der Konzentrationen 0 / 0,1 / 0,5 / 1 / 2 mg mL⁻¹ wurde eine Eichkurve erstellt, zu der die erhaltenen Werte für die optische Dichte in Bezug gesetzt werden konnte. Im Anschluss wurden die Konzentrationen der Bakterienlysate mit entsprechenden Volumina an Lysispuffer aneinander angeglichen (siehe **Abb. 16E**).

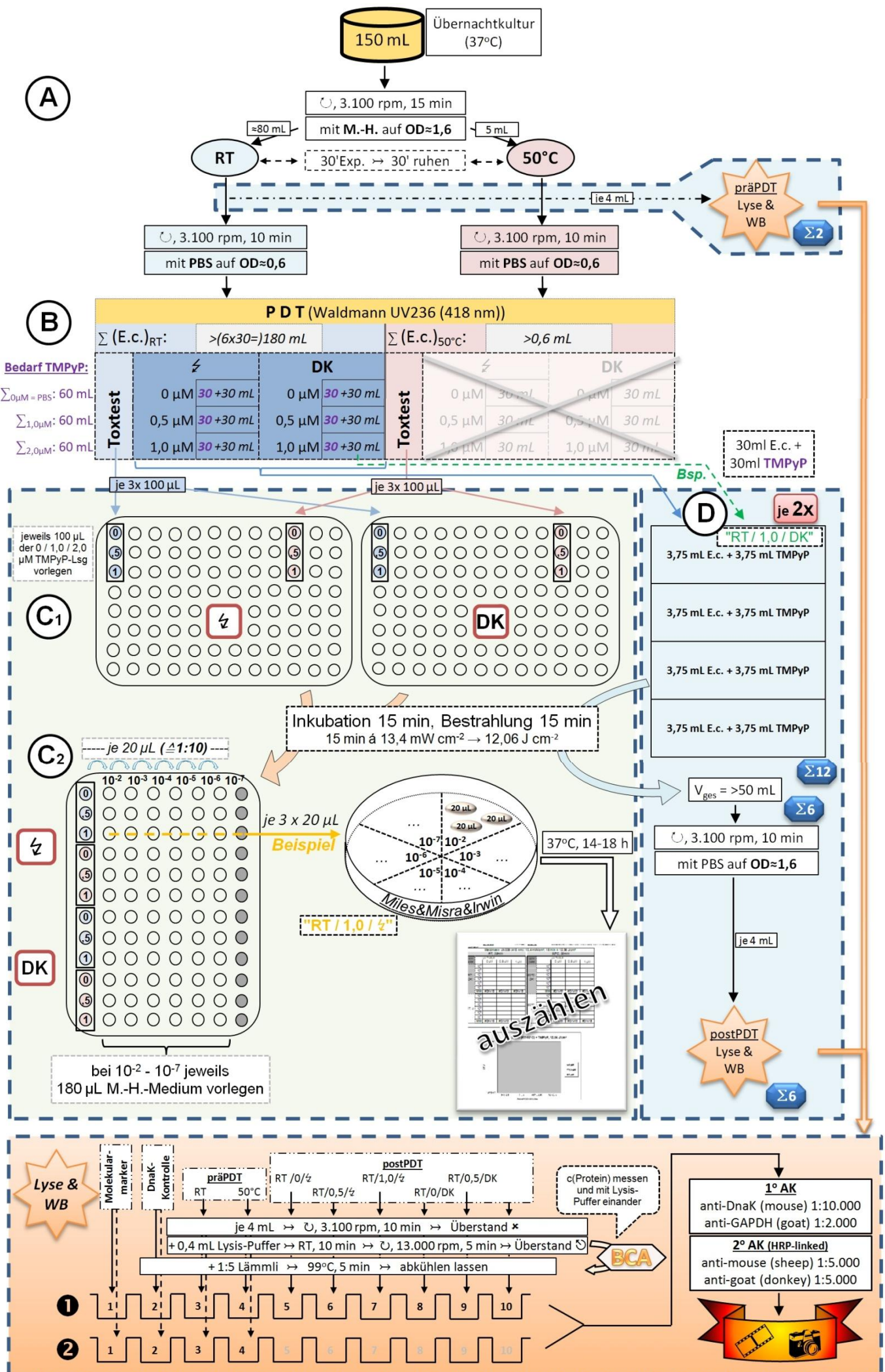


Abb. 16 (vorherige Seite): schematischer Versuchsaufbau zur prä- und postphotodynamischen (prä- und postPDT) Induktion, Extraktion und Bestimmung des bakteriellen heatshock-Proteins mit paralleler Toxizitätstestung.

A: Aufteilen der in der Übernachtskultur kultivierten Bakterien auf die zwei Versuchsäste (RT, 50 °C) sowie Abzweigen der beiden präPDT-Proben ($\Sigma 2$) (s. 4.1.2).

B: Pipettierschema der Bakterien mit dem Photosensibilisator TMPyP [da die bei 50 °C vorbehandelten Bakterien im weiteren Verlauf nicht zu bestrahlen waren, mussten sie nicht mit dem PS versetzt werden (\searrow)] (s. 4.5.1).

C₁: Bakterienverteilung auf die 96-well-Platten zum anschließenden Toxizitätstest (s. 4.3.2).

C₂: Bakterienvereinzelung nach Miles, Misra und Irwin (s. 4.4).

D: Verteilung der in **B** erstellten Bakterien-TMPyP-Gemische auf die 4-well-Platten. Da pro Modalität zwei solcher Platten ($\text{je } 2x$) benötigt wurden, ergibt sich eine Gesamtzahl von 12 Platten ($\Sigma 12$). Nach Bestrahlung und Wiederezusammenführen ergaben sich die sechs gewünschten postPDT-Proben ($\Sigma 6$) (s. 4.5.1).

E: Zellyse und Prozessierung für Western-Blot. Gel 1 (❶): all-in-one-Gel; Gel 2 (❷): separate Gegenüberstellung der RT- und 50 °C-Probe (wells 5-10 nur mit 1:5-Lämmli befüllt) (s. 4.5.2, 4.5.3, 4.6.1).

Details siehe Fließtext.

Legende:

RT: Raumtemperatur | ❄️: auf Eis, gekühlt | ☪️, **x rpm**: mit **x** Umdrehungen pro Minute zentrifugieren | ➡️: anschließend, nächster Schritt | 🌀: Horizontalrüttler | 🍷: entnehmen & weiterprozessieren | ✖️: verwerfen | x': x Minuten | $\Sigma_{x\mu\text{M}}$: benötigtes Gesamtvolumen der x μM TMPyP-Stammlösung (x=0;1;2) | $\Sigma(\text{E.c.})_x$: benötigtes Volumen der mit x vorhandenen Bakteriensuspension (x=RT;50 °C) | ☀️ / DK: Bestrahlungsmodalität (☀️: mit Bestrahlung; **DK**: ohne Bestrahlung, Dunkelkontrolle) | ⬡/⬢: bei **RT** und **50 °C** präexponierte Bakteriensuspensionen | 0 / ,5 / 1: jeweils vorliegende Konzentration von TMPyP [μM] | ⬤: nicht verwendete wells | 📊: BCA-Analyse | WB: Western-Blot

4.6 SDS-PAGE und Western-Blot

4.6.1 Elektrophorese und Blotten

Die Gelelektrophorese erfolgte im Laufpuffer 20 min bei 70 Volt durchs Sammelgel und 60 min bei 140 Volt durchs Trenngel, bis anhand des Molekularmarkers eine ausreichende Proteinauftrennung visuell beurteilt werden konnte (vgl. **Abb. 16E**).

Im Anschluss an die PAGE wurden die Proteine in Transferpuffer und unter Kühlung per Western-Blot auf die Hybond™-Nitrocellulose-Membran übertragen. Das Blotting-Sandwich wurde wie folgt zusammengesetzt:

Fiber Pad – Whatman®-Filterpapier – Gel – Hybond™-Membran – Whatman® Filterpapier – Fiber Pad.

Gebloftet wurde 50 min bei 0,3 A.

Danach wurde die Membran 3x in Waschpuffer gewaschen (1x 10 min, 2x 5 min), um sie von Resten des Transferpuffers zu säubern. In 5%iger Milch wurde die Membran für 1 h bei RT geblockt. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die in 1%iger Milch gelösten, primären Antikörper hinzugegeben (mouse anti-DnaK 1:10.000; goat anti-GAPDH 1:2.000).

Als Kontrolle für die erfolgreiche HSP-Induktion bei *E. coli* diene der Nachweis des Hitzeschockproteins DnaK [70].

Die Expressionslevel von DnaK wurden anhand des zugleich nachgewiesenen Proteins GAPDH normiert. GAPDH fungiert als sog. housekeeping-Antigen, das dazu dient, die übrige Proteinexpression in Relation zu einander setzen zu können. Housekeeping-Moleküle sind relativ konstant exprimierte Proteine, die als interner Standard fungieren, da sie für den Basismetabolismus der Zelle notwendig sind. Dadurch erlauben sie Vergleiche zur Expressionsrate anderer Proteine derselben Zelllinie [71]. Es werden unterschiedliche housekeeping-Moleküle benutzt, je nach Entität der untersuchten Zellen, z. B. Albumin bei Hepatozyten [72], α -, β -Tubuline [73, 74] oder GAPDH, das sowohl bereits in menschlichen Zellen [75, 76] als auch in Bakterien wie *E. coli* [77] zu diesem Zweck nachgewiesen wurde.

Je nach zeitlicher Situation wurde mit dem primären Antikörper entweder für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach abermaligem dreimaligen Waschen wurde für 1 h bei RT mit den sekundären Antikörpern inkubiert (sheep anti-mouse (DnaK) 1:5.000; donkey anti-goat (GAPDH) 1:5.000). Die dreimalig gewaschene Membran wurde abtropfen gelassen und auf einer gesäuberten Glasplatte gleichmäßig mit 1 mL des ECL-Reagens beträufelt. Nach einer

Inkubation von 30 s wurde das Reagens ablaufen gelassen, die Membran auf eine neue Glasplatte aufgebracht, mit Frischhaltefolie luftblasenfrei abgedeckt und zusammen mit einem entsprechend zugeschnittenen Film in eine Entwicklungskassette eingelegt. Je nach Signalstärke wurde 30 s bis zu 1 min belichtet (Kodak M35 X-OMAT Processor) (vgl. **Abb. 16E**).

4.6.2 Kontrolle: Anti-DnaK-Antikörfunktionalität

Vor die eigentlichen Versuchsreihen, in denen die HSP-Expression nachgewiesen werden sollte, wurde ein Versuch vorschaltet, um die Funktionalität des Antikörpers zu untersuchen. Darüber hinaus sollte festgestellt werden, in welchem Konzentrationsbereich das Antigen (DnaK = HSP70) vom Antikörper erkannt wurde und wie die jeweilige Signalstärke ist.

Dazu wurde vom vorliegenden Kontrollprotein DnaK eine sukzessive Verdünnungsreihe von 1 µg bis 0,03125 µg angefertigt, wie in **Abb. 17** schematisch dargestellt. Diese wurde mittels SDS-PAGE gem. **4.6.1** einer Elektrophorese unterzogen und mit Western-Blot (vgl. **Abb. 18**) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

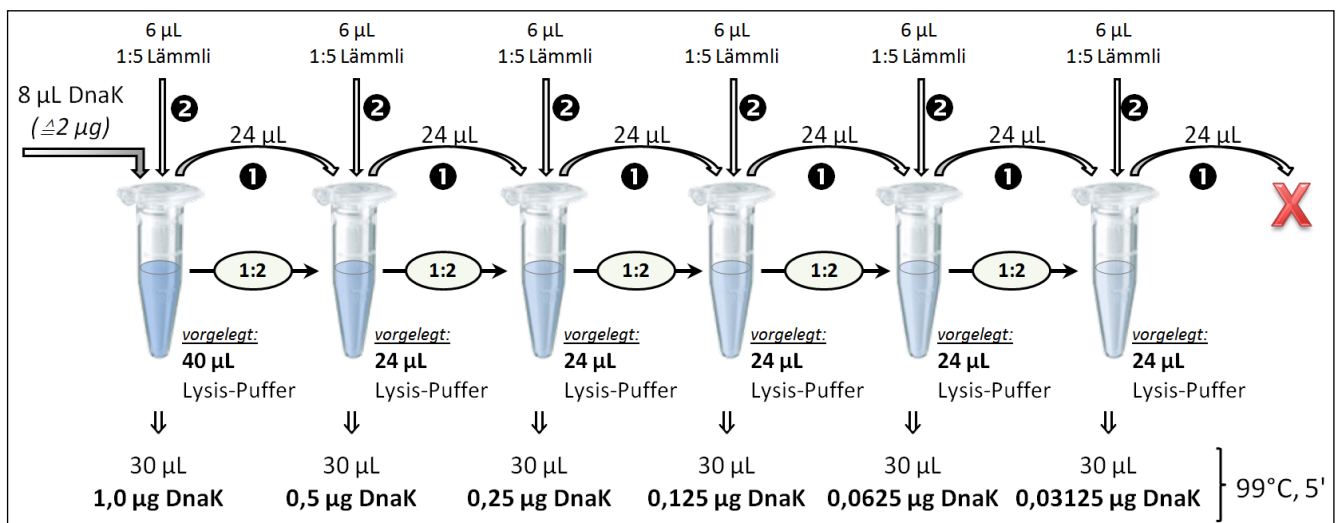


Abb. 17: Versuchsschema zur Überprüfung der Funktionalität und des Nachweisbereichs des anti-DnaK-Antikörpers mittels einer Verdünnungsreihe.

Zunächst wurde gemäß Abbildung in jedem Eppendorf-Cup Lysis-Puffer vorgelegt. Nach Zugabe der 8 µL DnaK in Cup1 wurde die Hälfte des daraus resultierenden Gesamtvolumens von 48 µL in Cup2 überführt, wodurch in Cup2 die Konzentration halbiert wurde. Schritt 1 wurde für alle Cups wiederholt (❶). Die letzten 24 µL wurden verworfen (X).

In Schritt 2 (❷) wurde in jedes Cup 6 µL 1:5-Lämmli gegeben, was mit den nach Schritt 1 verbleibenden 24 µL ein Gesamtvolumen von 30 µL ergab. Vor dem Auftragen der Proben wurden alle Proben 5 Minuten bei 99 °C gekocht.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Molekular- was?	marker	DnaK	→	→	→	→	→	1:5 Lämmli	→	→
V _{ges}	5 µL	30 µL	→	→	→	→	→	20 µL	→	→
m(Protein)	---	1 µg	0.5 µg	0.25 µg	0.125 µg	0.0625 µg	0.03125 µg	---	---	---

Abb. 18: Beladungsschema der wells des PAA-Gels zur Überprüfung der anti-DnaK-Antikörperfunktionalität.

Nicht beladene wells (8-10) wurden mit 20 µL Lämmli-Puffer befüllt.

Legende:

→: entsprechender Wert wie in vorhergehendem well

Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem primären, mouse anti-DnaK-Antikörper (Verdünnung 1:10.000 in 1%iger Magermilch) sowie mit dem sekundären, anti-mouse-Antikörper (1:5.000 in 1%iger Magermilch), wie in **4.6.1** ausführlich beschrieben.

4.6.3 Kontrolle: DnaK-Induktion durch Hitzeschock

Zur Verifizierung der Experimente wurde außerdem ein Versuch vorgeschaltet, um die grundsätzliche Induzierbarkeit von Hitzeschockproteinen nachzuweisen und mit dem Effekt der PIB auf ebendiese vergleichen zu können.

Dazu wurde eine ÜN-Kultur von *E. coli* auf zwei Versuchsäste aufgeteilt. Die Kontrolle wurde nicht einer erhöhten Temperatur ausgesetzt und 30 min bei RT stehen gelassen, die andere Probe wurde für dieselbe Zeit in ein Wasserbad von 50 °C gestellt. Im Anschluss daran wurden die Bakterien lysiert (vgl. **4.5.2**) und die Proteinkonzentrationen mittels BCA-Analyse (vgl. **4.5.3**) aneinander angeglichen. Gemäß **Abb. 19** wurde von beiden Proben eine Verdünnungsreihe erstellt und die so gewonnenen Proben wie unter **4.6.1** beschrieben einer SDS-PAGE unterzogen (vgl. **Abb. 20**).

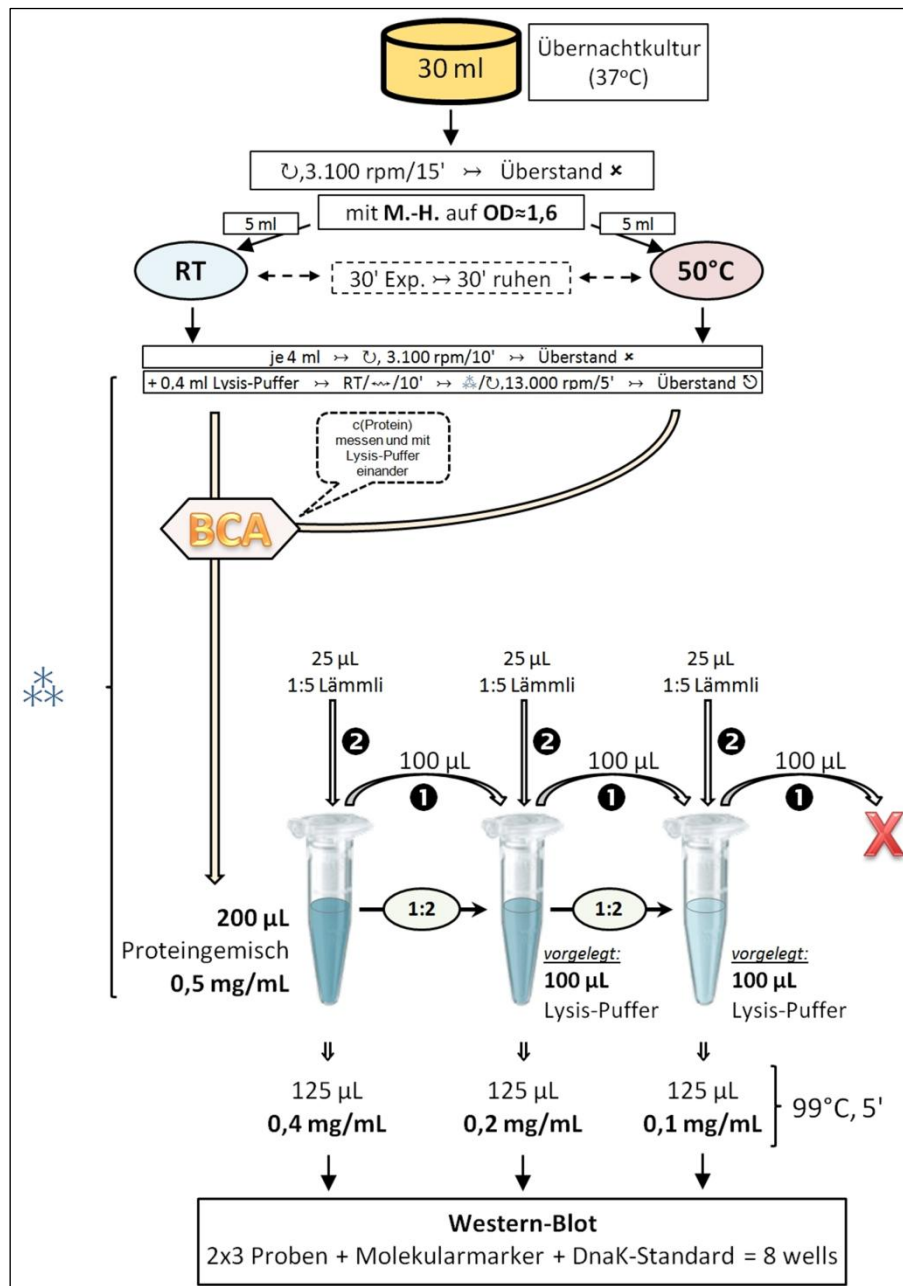


Abb. 19: Versuchsaufbau zum vergleichenden Nachweis der DnaK-Expression bei Raumtemperatur (RT) und erhöhter Temperatur (50 °C).

[Anm.: der Wert der angeglichenen Konzentration von 0,5 mg/mL ist exemplarisch gewählt und spiegelt nicht die tatsächlich vorliegende Konzentration wieder]

Zunächst wurde gemäß Abbildung in jedem Eppendorf-Cup Lysis-Puffer vorgelegt. Von den 200 µL der angeglichenen Proben wurden 100 µL in Cup2 überführt (Schritt 1, ①). Schritt 1 wurde für alle Cups wiederholt. Die letzten 100 µL wurden verworfen (✕).

In Schritt 2 (②) wurde in jedes Cup 25 µL 1:5-Lämmli gegeben, was mit den nach Schritt 1 verbleibenden 100 µL ein Gesamtvolumen von 125 µL der entsprechenden Konzentration ergab. Alle Proben wurden anschließend für 5 Minuten bei 99 °C gekocht.

Legende:

RT: Raumtemperatur | ❄: auf Eis, gekühlt | ↻, x rpm: mit x Umdrehungen pro Minute zentrifugieren | →: anschließend, nächster Schritt | ↻: Horizontalrüttler | ↻: entnehmen & weiterprozessieren | ✕: verwerfen | x': x Minuten | BCA: BCA-Analyse

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
was?	Molekular- marker	DnaK	RT 1	RT 1:2	RT 1:4	50°C 1	50°C 1:2	50°C 1:4	1:5 Lämmli	→
V _{ges}	5 µL	30 µL	→	→	→	→	→	→	20 µL	→
m(Protein)	---	0.25 µg	12 µg	6 µg	3 µg	12 µg	6 µg	3 µg	---	---

Abb. 20: Beladungsschema der wells des PAA-Gels zum vergleichenden Nachweis der DnaK-Expression bei RT und erhöhter Temperatur (50 °C).

Nicht beladene wells (9-10) wurden mit 20 µL Lämmli-Puffer befüllt.

[Anm.: der Wert von 12 µg in den wells 3 und 6 ist exemplarisch gewählt, vgl. Abb. 19]

Legende:

→: entsprechender Wert wie in vorhergehendem well

4.6.4 DnaK-Induktion durch PIB

Die einzelnen Kammern der Gele wurden mit den angeglichenen und mit Lämmli-Puffer versehenen Probe, die gem. 4.5 gewonnen wurden, sowie mit 5 µL des Molekular-markers und 0,25 µg Kontrollprotein DnaK beladen (vgl. Abb. 21).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
was?	Molekular- marker	DnaK	RT	50°C	RT / 0 / ¼	RT / 0.5 / ¼	RT / 1.0 / ¼	RT / 0 / DK	RT / 0.5 / DK	RT / 1.0 / DK
V _{ges}	5 µL	30 µL	→	→	→	→	→	→	→	→
m(Protein)	---	0.25 µg	12 µg	→	→	→	→	→	→	→

Abb. 21: Beladungsschema der wells des PAA-Gels zum vergleichenden Nachweis der DnaK-Expression bei PIB und erhöhter Temperatur.

[Anm.: der Wert von 12 µg in den wells 3-10 ist exemplarisch gewählt, vgl. Abb. 19]

Legende:

→: entsprechender Wert wie in vorhergehendem well

4.7 Auswertung der Blots

Die Blots wurden eingescannt und mit dem Programm ImageJ v1.45s (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) ausgewertet. Die Graustufen der einzelnen Banden wurden analysiert und zueinander sowie zu den jeweiligen Banden der internen Kontrolle, dem housekeeping-Protein GAPDH, in Relation gesetzt. Als Referenz wurde dabei stets die nichtbehandelte und bei RT belassene Probe genommen.

Anhand Abb. 22 bis Abb. 24 ist beispielhaft das Vorgehen der Blotauswertung nachzuvollziehen.



Abb. 22: Der eingescannte Blot (links) wurde in Graustufen abgespeichert (rechts).

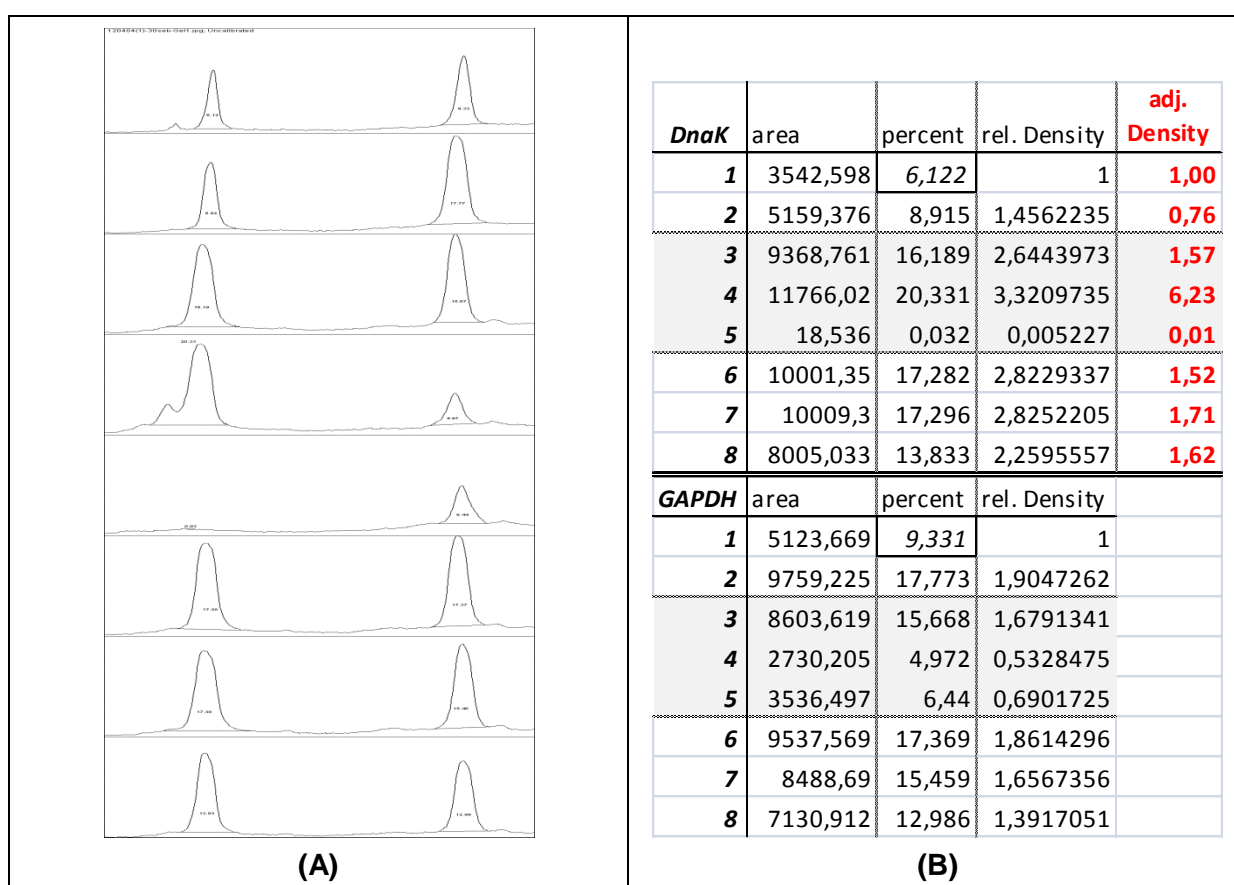


Abb. 23: (A) Beginnend bei Probe „RT“ (=Probe 1) wurde die Intensität der einzelnen Banden mit dem Programm ImageJ v1.45s grafisch ausgewertet. Der jeweils linke Peak gibt die Signalintensität der oberen Banden (DnaK) wieder, der rechte Peak entspricht der korrespondierenden unteren Bande (GAPDH) der jeweiligen Probe.

(B) Die Flächen unter den Kurven (area) wurden in prozentuale Anteile umgerechnet (percent). Im Anschluss wurde die jeweilige Kurvenfläche in Relation zur Fläche unter Referenzprobe 1 (DnaK und GAPDH) gesetzt (rel. Density). Die relativen Signalstärken der DnaK-Banden wurden zu jeweiligen relativen Signalstärken der GAPDH-Banden in Bezug gesetzt, um so die normierte relative Signalstärke der DnaK-Bande zu erhalten (adj. Density, rot).

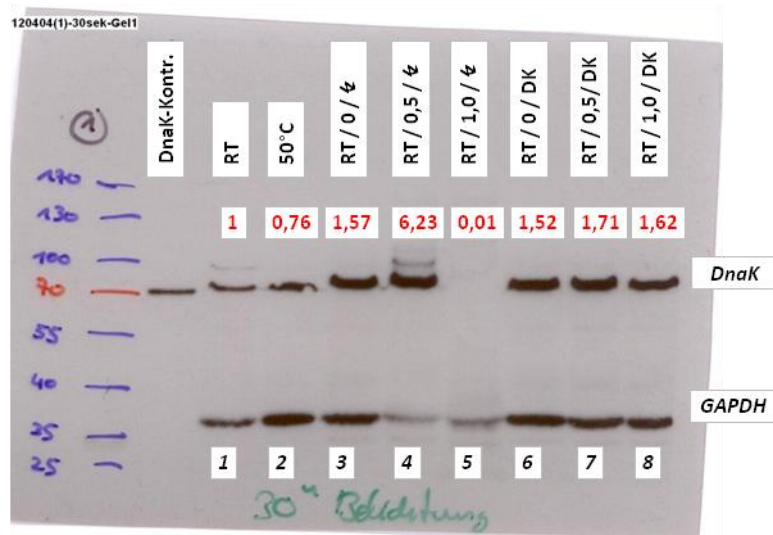


Abb. 24: fertig ausgewerteter Blot mit Angabe der normierten relativen Signalstärken (in *rot*) der DnaK-Banden der Proben 1-8 in Bezug auf die Referenzprobe 1.

5 ERGEBNISSE

5.1 Phototoxizitätstests mit IPL und TMPyP

Wie in Kapitel 4 beschrieben, wurden verschiedene Keime der PIB (Photodynamische Inaktivierung von Bakterien) unter Verwendung der IPL und des Farbstoffes TMPyP unterzogen. Im Folgenden soll auf die dabei erzielten Ergebnisse eingegangen werden. Nach der *Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)* werden dabei folgende Begrifflichkeiten definiert:

antimikrobiell = Reduktion um $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen

desinfizierend = Reduktion um $\geq 5 \log_{10}$ -Stufen [78].

In der vorliegenden Arbeit wurde die jeweilige Bedingung als erfüllt definiert, wenn der Mittelwert auf oder unter der geforderten Reduktionsstufe liegt.

Die in den **Abb. 26 bis Abb. 41** grafisch aufgetragenen Werte sind jeweils die Mittelwerte aus N=3 unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

Abb. 25 zeigt das Emissionsspektrum der IPL im Vergleich zum Absorptionsspektrum von TMPyP im relevanten Wellenlängenbereich. Das Emissionsspektrum der Lampe wurde mittels eines Cut-off-Filters begrenzt, der Wellenlängen von unter 550 nm absorbierte.

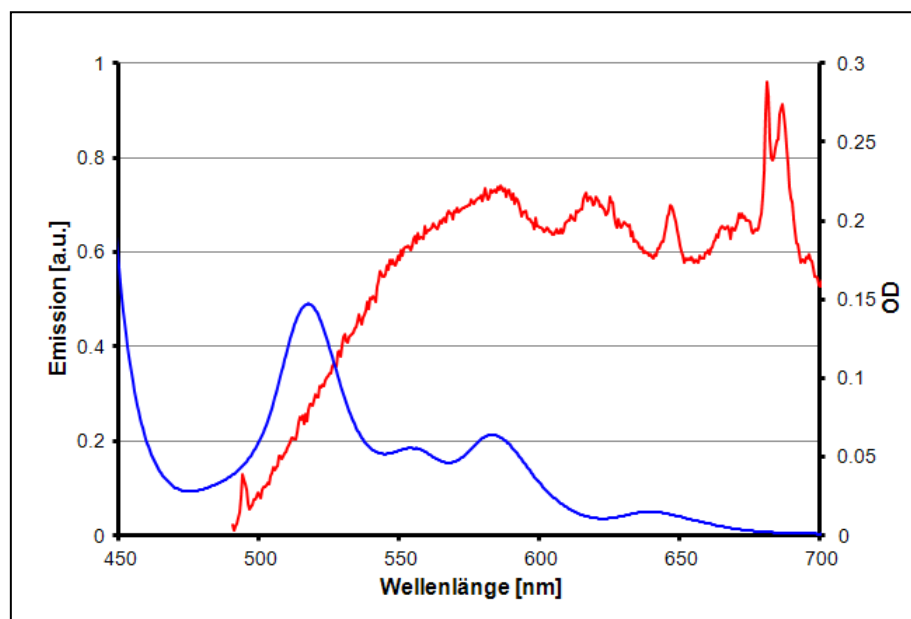



Abb. 25: TMPyP-Absorptionsspektrum (blau) und IPL-Emissionsspektrum (rot) im relevanten Wellenlängenbereich. Ein Cut-off-Filter absorbierte den Wellenlängenbereich unterhalb von 550 nm (nach [79]).

5.1.1 Photodynamische Wirkung von TMPyP gegenüber *E. coli*

Wie **Abb. 26** zeigt, konnte durch Bestrahlung mit 1-4 Lichtblitzen á 10 J/cm^2 eine Reduktion von *E. coli* erreicht werden. Mit vier Blitzen, was einer Gesamtenergie von 40 J/cm^2 entspricht, konnte bei einer TMPyP-Konzentration von $100 \text{ }\mu\text{M}$ eine Reduktion um mehr als 5 \log_{10} -Stufen erzielt werden. Bei keiner der anderen Konzentrationsstufen konnte ein antimikrobieller oder desinfizierender Effekt erzielt werden.

Abb. 27 zeigt die Ergebnisse bei der doppelten Energiemenge pro Lichtblitz von 20 J/cm^2 . Eine antimikrobielle Wirkung wurde hier bei der maximalen Farbstoffkonzentration von $100 \text{ }\mu\text{M}$ TMPyP mittels zweier Lichtblitze ($\Sigma 40 \text{ J/cm}^2$) erzielt, eine desinfizierende Wirkung zeigte sich bei derselben Konzentrationsstufe bei drei ($\Sigma 60 \text{ J/cm}^2$) und auch vier ($\Sigma 80 \text{ J/cm}^2$) Lichtimpulsen. Bei einer PS-Konzentration von $1 \text{ }\mu\text{M}$ oder $10 \text{ }\mu\text{M}$ wurde kein antimikrobieller Effekt erzielt.

Alleinige Bestrahlung (, 1-4 Lichtpulse, $0 \text{ }\mu\text{M}$ PS) hatte ebenso wenig einen reduzierenden Effekt auf das Wachstum von *E. coli* wie ausschließlich die alleinige Farbstoffzugabe ohne Belichtung (DK = 0 Lichtpulse).

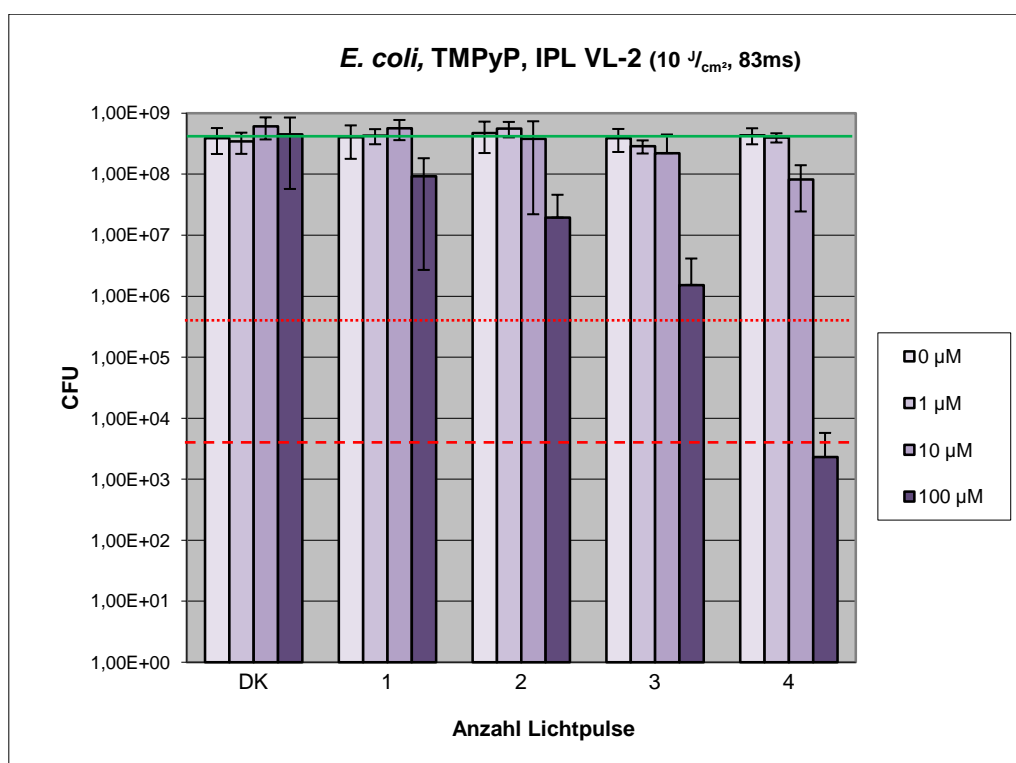


Abb. 26: Effekt der photodynamischen Behandlung mit 1-4 Lichtblitzen á 10 J/cm^2 gegenüber *E. coli* unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von TMPyP.
(— baseline; $3 \log_{10}$; - - - $5 \log_{10}$; DK: Dunkelkontrolle)

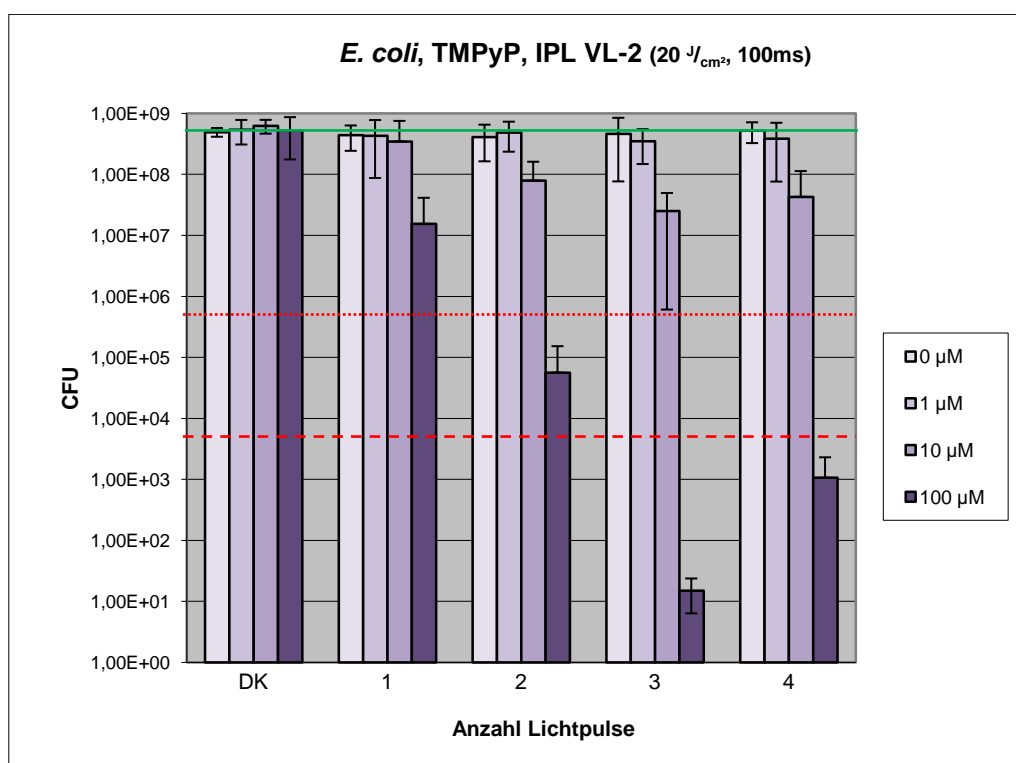


Abb. 27: Effekt der photodynamischen Behandlung mit 1-4 Lichtblitzen á 20 J/cm^2 gegenüber *E. coli* unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von TMPyP.
(— baseline; $3 \log_{10}$; - - - $5 \log_{10}$; DK: Dunkelkontrolle)

5.1.2 Photodynamische Wirkung von TMPyP gegenüber *S. aureus*

Bei den Versuchsreihen mit *S. aureus* konnte eine antibakterielle und auch eine desinfizierende Wirkung beobachtet werden. Die dafür notwendige Konzentration von TMPyP lag bei 10 µM, in Kombination mit bereits einem Lichtblitz von 10^4 J/cm^2 konnte eine nahezu vollständige Reduktion in der Keimzahl festgestellt werden. Eine höhere Zahl an Lichtimpulsen oder auch eine Erhöhung der Konzentration hatte keine Verbesserung des Ergebnisses zur Folge (**Abb. 28**). Bei drei Modalitäten ($3 \times 10^4 \text{ J/cm}^2 + 10$ bzw. 100 µM TMPyP sowie bei $4 \times 10^4 \text{ J/cm}^2 + 10 \text{ µM TMPyP}$) wurde ein reduzierter antimikrobieller Effekt beobachtet, bei dem die Wirkung der PIB weniger stark ausgeprägt war als erwartet, doch noch immer ein antimikrobieller Effekt i. S. e Reduktion von $\geq 3 \log_{10}$ vorlag.

Der mangelnde desinfizierende Effekt bei zunehmender Konzentration von TMPyP und $3 \times 10^4 \text{ J/cm}^2$ -Lichtblitzen erklärt sich dadurch, dass in einem der zugrundeliegenden Teilexperimente auf einer einzigen Agarplatte bis zur vorletzten Verdünnungsstufe (10^{-2} – 10^{-6}) jeweils eine CFU nachzuweisen war. Bedingt durch die logarithmische Skalierung resultiert das in dem entsprechend veränderten Mittelwert.

In der Versuchsreihe mit den Lichtimpulsen á 20^4 J/cm^2 konnte ebenfalls eine Reduktion um mehr als 5 \log_{10} -Stufen erreicht werden. Dies gelang ab PS-Konzentrationen von $\geq 10 \text{ µM TMPyP}$. Auffällig ist die sukzessive Abnahme des Reduktionseffekts bei 10 µM von einem bis hin zu vier Bestrahlungsimpulsen. Eine Steigerung der Farbstoffkonzentration brachte keine besseren Ergebnisse (vgl. **Abb. 29**).

Die Kontrollexperimente $\frac{1}{2}$, PS (DK) sowie $\frac{1}{2}$, PS (\square 1-4) zeigten in ihrem Effekt auf das Wachstumsverhalten von *S. aureus* lediglich Abweichungen von 0,5 bis 1 \log_{10} -Stufe vom CFU-Ausgangswert.

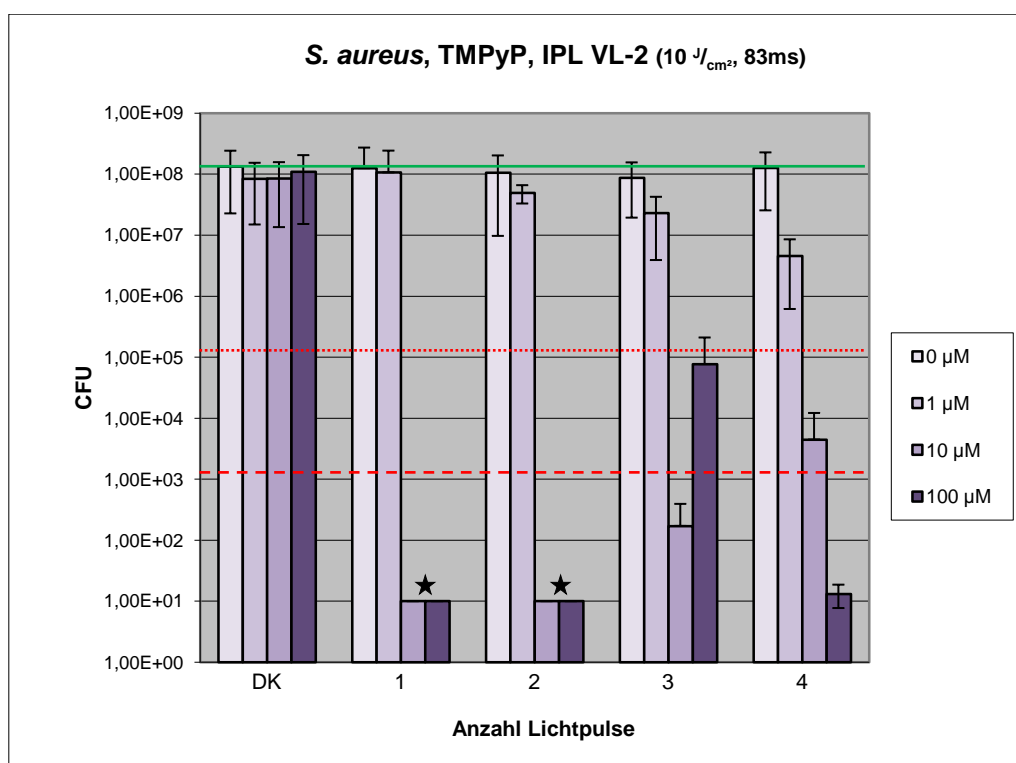


Abb. 28: Effekt der photodynamischen Behandlung mit 1-4 Lichtblitzen á 10 J/cm^2 gegenüber *S. aureus* unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von TMPyP.
(— baseline; $3 \log_{10}$; - - - $5 \log_{10}$; DK: Dunkelkontrolle; ★: unter Nachweisgrenze)

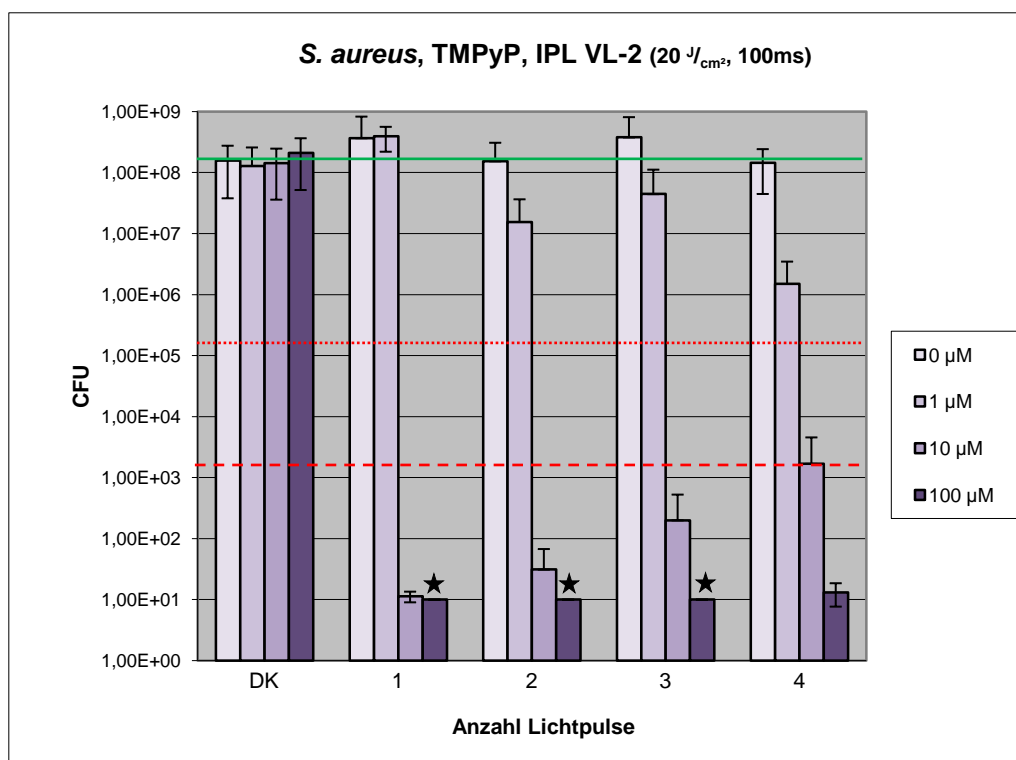


Abb. 29: Effekt der photodynamischen Behandlung mit 1-4 Lichtblitzen á 20 J/cm^2 gegenüber *S. aureus* unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von TMPyP.
(— baseline; $3 \log_{10}$; - - - $5 \log_{10}$; DK: Dunkelkontrolle; ★: unter Nachweisgrenze)

5.1.3 Photodynamische Wirkung von TMPyP gegenüber MRSA

Neben dem wildtypischen *Staphylococcus aureus* wurden auch zwei Methicillin-resistente Stämme (MRSA) untersucht.

5.1.3.1 MRSA BAA-44

Das MRSA-Isolat BAA-44 konnte unter Verwendung ab einer TMPyP-Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ und einer applizierten Lichtdosis von $10\ \text{J}/\text{cm}^2$ ebenfalls effektiv inaktiviert werden (Reduktion um $\geq 5\log_{10}$). Geringere Konzentrationen von TMPyP zeigten keine antimikrobielle Wirkung nach Lichtaktivierungen von bis zu vier aufeinanderfolgenden Lichtblitzen (**Abb. 30**).

Wie **Abb. 31** zeigt, konnten bei Impulsintensitäten von $20\ \text{J}/\text{cm}^2$ pro Lichtblitz die Effekte der vorherigen Untersuchung bestätigt werden (desinfizierende Wirkung bei $10\ \mu\text{M}$ und $100\ \mu\text{M}$). Darüber hinaus konnte bei einer Gesamtdosis von $80\ \text{J}/\text{cm}^2$ bei einer PS-Konzentration von $1\ \mu\text{M}$ TMPyP eine Reduktion um mehr als $3\log_{10}$ -Stufen beobachtet werden.

Die Kontrollexperimente $\frac{1}{2}$, PS (DK) sowie $\frac{1}{2}$, PS (\square 1-4) blieben ohne erkennbaren negativen Effekt auf das Wachstumsverhalten.

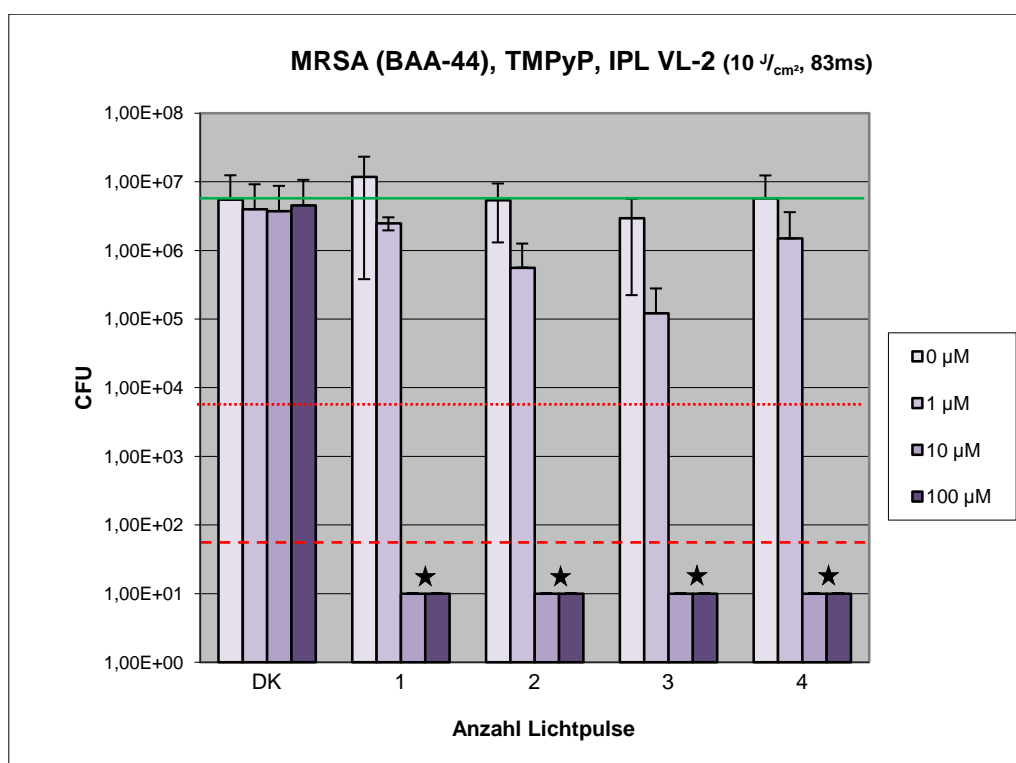


Abb. 30: Effekt der photodynamischen Behandlung mit 1-4 Lichtblitzen á 10 J/cm^2 gegenüber MRSA BAA-44 unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von TMPyP.
(— baseline; $3 \log_{10}$; - - - $5 \log_{10}$; DK: Dunkelkontrolle; ★: unter Nachweisgrenze)

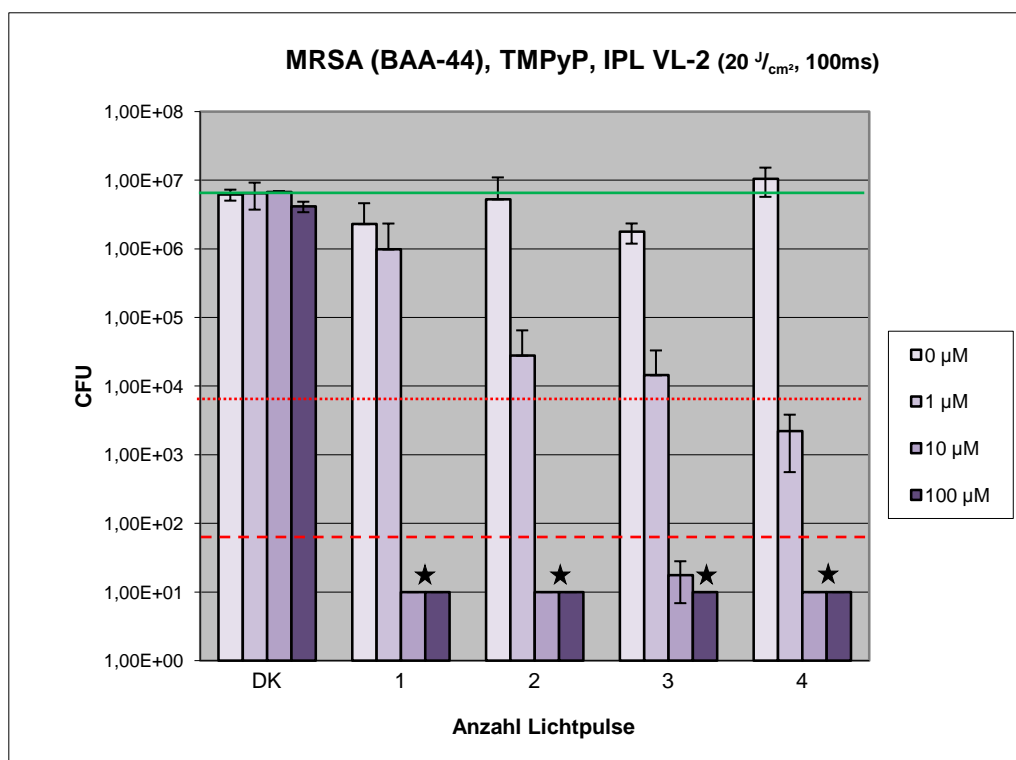


Abb. 31: Effekt der photodynamischen Behandlung mit 1-4 Lichtblitzen á 20 J/cm^2 gegenüber MRSA BAA-44 unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von TMPyP.
(— baseline; $3 \log_{10}$; - - - $5 \log_{10}$; DK: Dunkelkontrolle; ★: unter Nachweisgrenze)

5.1.3.2 MRSA 43300

Das zweite MRSA-Isolat zeigte sich ebenfalls suszeptibel für die photodynamische Behandlung. Bei Konzentrationsstufen von 10 μM TMPyP und höher war ein einmaliger Lichtblitz von 10, bzw. 20 J/cm^2 ausreichend, um Reduktion bis unterhalb der Nachweisgrenze zu erreichen, was einer Reduktion um mehr als 3 \log_{10} -Stufen entspricht (in **Abb. 32** und **Abb. 33** mit ★ gekennzeichnet).

In der mit 1 μM TMPyP inkubierten und bestrahlten Bakteriensuspension wurde nach Ausplattieren und Bestimmen der CFU ein tendenziell beeinträchtigtes Bakterienwachstum beobachtet, doch überschritt diese Reduktion nicht das mindestens erforderliche Pensum von 3 \log_{10} -Stufen (**Abb. 32**).

Eine Erhöhung der Lichtdosis bewirkte keinen gesteigerte antimikrobiellen Effekt bei der geringsten verwendeten Konzentration von TMPyP, wie in **Abb. 33** zu erkennen ist. Ein antibakterieller Effekt im Sinne einer Abnahme der CFU um mehr als 3 \log_{10} -Stufen konnte erst ab einer PS-Konzentration von 10 μM erreicht werden, unabhängig von der Anzahl der applizierten Lichtblitze (1-4).

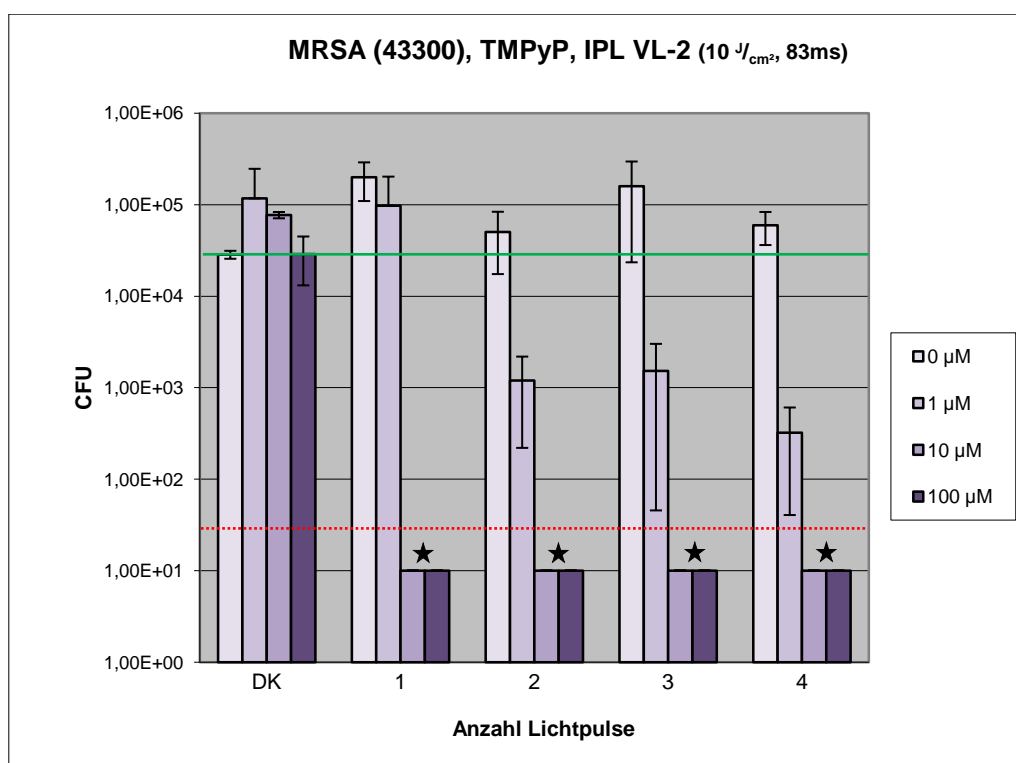


Abb. 32: Effekt der photodynamischen Behandlung mit 1-4 Lichtblitzen á 10 J/cm^2 gegenüber MRSA 43300 unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von TMPyP.
(— baseline; $3 \log_{10}$; - - - $5 \log_{10}$; DK: Dunkelkontrolle; ★: unter Nachweisgrenze)

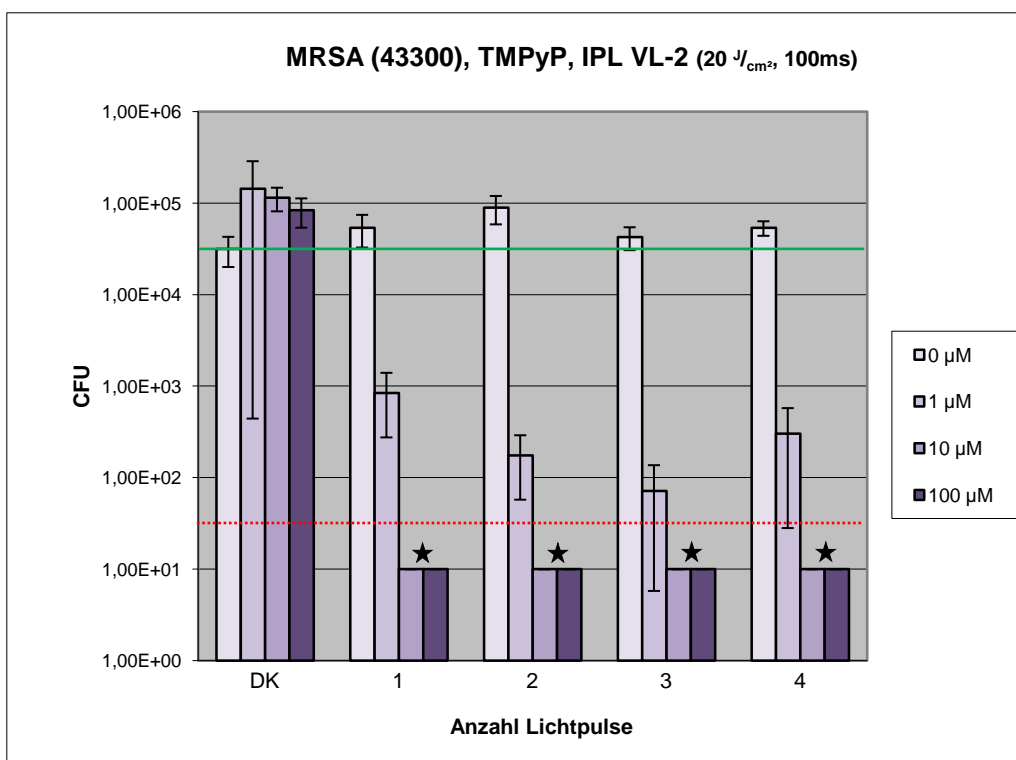


Abb. 33: Effekt der photodynamischen Behandlung mit 1-4 Lichtblitzen á 20 J/cm^2 gegenüber MRSA 43300 unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von TMPyP.
(— baseline; $3 \log_{10}$; - - - $5 \log_{10}$; DK: Dunkelkontrolle; ★: unter Nachweisgrenze)

Die Kontrollexperimente $\frac{1}{2}$, PS (DK) sowie $\frac{1}{2}$, PS (\square 1-4) blieben ohne erkennbaren Effekt auf das Wachstumsverhalten.

MRSA 43300 zeigte ein generell geringeres Wachstum als das andere MRSA-Isolat BAA-44 und auch als der wildtypische *S. aureus*, doch konnten beide MRSA-Isolate ebenso wie MSSA durch PIB inaktiviert werden. Die minimalen Bedingungen für eine Reduktion um $\geq 5 \log_{10}$ -Stufen waren für die untersuchten *S. aureus*-Stämme – Wildtyp sowie die beiden MRSA-Isolate – $10 \mu\text{M}$ TMPyP + ein Lichtblitz von $10^J/\text{cm}^2$. Eine TMPyP-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ zeigte unabhängig von den applizierten Lichtblitzen bei keinem der Isolate eine antibakterielle photodynamische Wirkung.

5.1.4 Photodynamische Wirkung von TMPyP gegenüber *B. atrophaeus*

Ein weiterer untersuchter Erreger war *Bacillus atrophaeus*.

Abb. 34 zeigt die Ergebnisse der Bestrahlung von TMPyP-inkubiertem *B. atrophaeus* mit 1-4 Lichtimpulsen á $10^J/\text{cm}^2$. Bei der Konzentration von $1 \mu\text{M}$ TMPyP wurden die CFU um $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen reduziert, allerdings unabhängig von der Anzahl der applizierten Lichtblitze (1-4, entsprechend $10\text{-}40^J/\text{cm}^2$). Ab einer TMPyP-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ wurde eine photodynamische Inaktivierung um $\geq 5 \log_{10}$ -Stufen erreicht, unabhängig von der Anzahl der Lichtblitze (1-4).

Bei Lichtimpulsen á $20^J/\text{cm}^2$ konnte bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ ebenfalls ein antimikrobieller Effekt (Reduktion $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen) beobachtet werden, mit Ausnahme bei einer Impulszahl von zwei Lichtblitzen (**Abb. 35**). Ab $10 \mu\text{M}$ PS-Konzentration wurden die CFU unabhängig von der Anzahl der Lichtblitze um mehr als $5 \log_{10}$ -Stufen reduziert. Bei einer Gesamtlichtdosis von $80^J/\text{cm}^2$ und einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ TMPyP ist ein im Vergleich zu den geringeren Lichtdosen erhöhtes Keimwachstum detektiert worden.

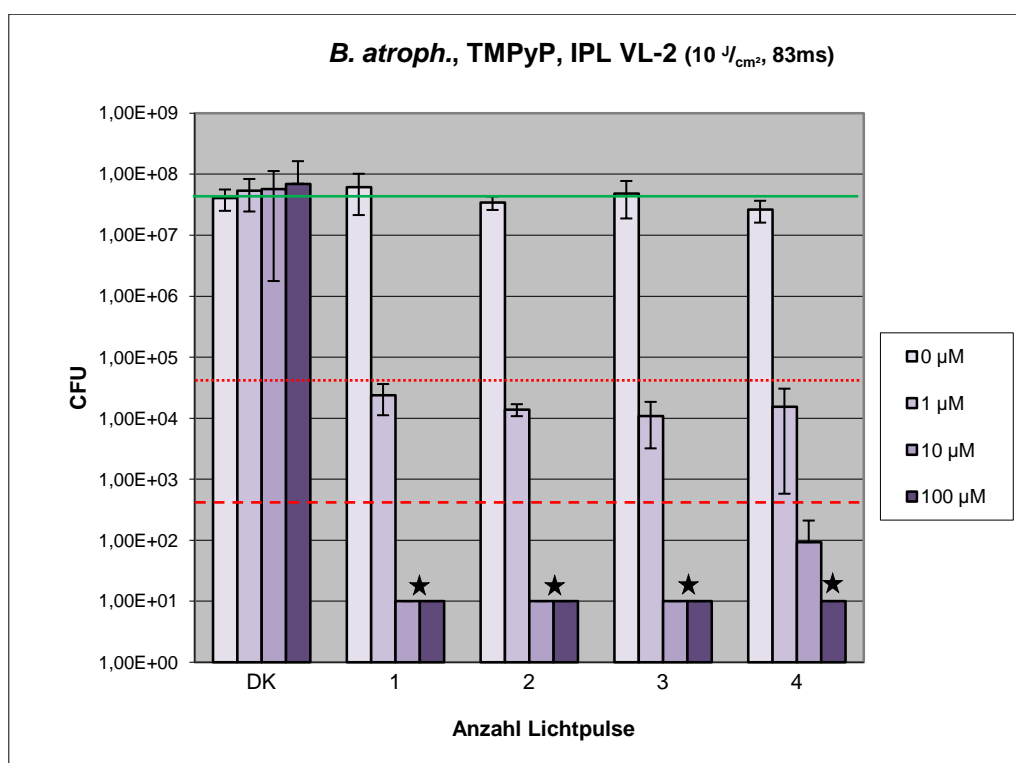


Abb. 34: Effekt der photodynamischen Behandlung mit 1-4 Lichtblitzen á 10 J/cm^2 gegenüber *B. atrophaeus* unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von TMPyP.
(— baseline; $3 \log_{10}$; - - - $5 \log_{10}$; DK: Dunkelkontrolle; ★: unter Nachweisgrenze)

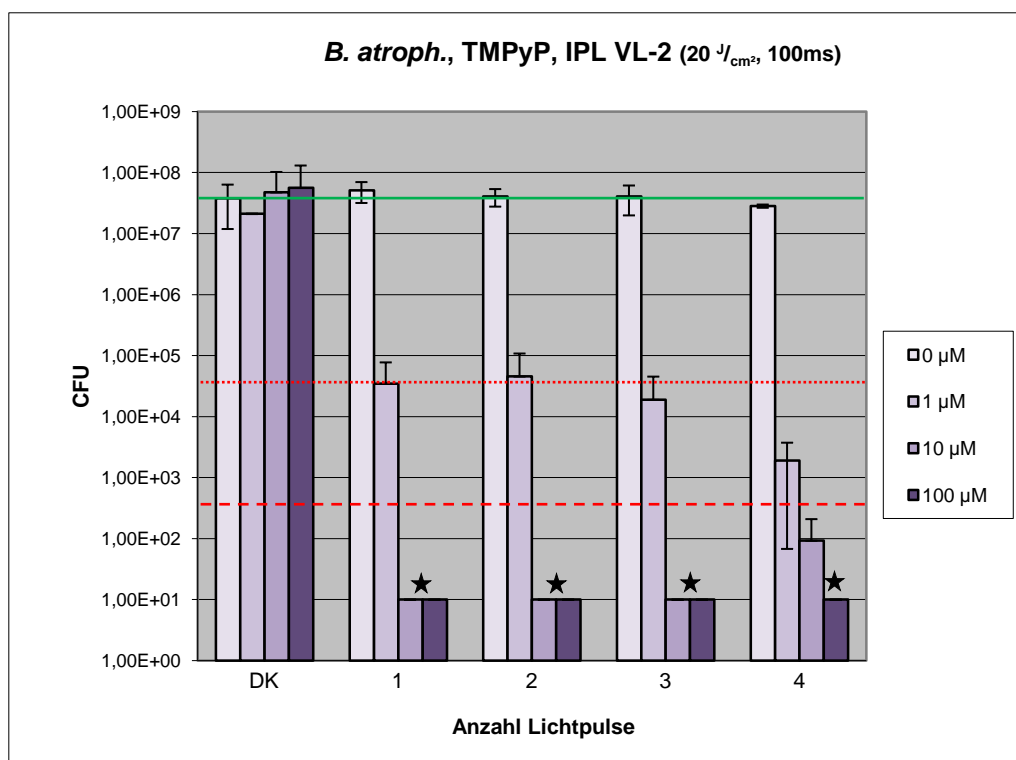


Abb. 35: Effekt der photodynamischen Behandlung mit 1-4 Lichtblitzen á 20 J/cm^2 gegenüber *B. atrophaeus* unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von TMPyP.
(— baseline; $3 \log_{10}$; - - - $5 \log_{10}$; DK: Dunkelkontrolle; ★: unter Nachweisgrenze)

Wie anhand von **Tabelle 2** zu erkennen ist, konnte unter Verwendung einer IPL mit Lichtblitzen von 10 J/cm^2 in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration des PS TMPyP bei allen untersuchten Bakterien eine antimikrobielle ($\geq 3 \log_{10}$ -Stufen) und eine desinfizierende ($\geq 5 \log_{10}$ -Stufen) photodynamische Wirkung erzielt werden.

Die Bedingungen in den Kontrollexperimenten $\frac{1}{2}$, PS (DK) sowie $\frac{1}{2}$, PS (\square 1-4) zeigten keinen erkennbaren Effekt auf das Wachstumsverhalten.

Σ Lichtdosis \rightarrow $c(\text{TMPyP})$ in $\mu\text{M} \rightarrow$	Lichtblitze á 10 J/cm^2												Lichtblitze á 20 J/cm^2											
	10 J/cm^2			20 J/cm^2			30 J/cm^2			40 J/cm^2			20 J/cm^2			40 J/cm^2			60 J/cm^2			80 J/cm^2		
	1	10	100	1	10	100	1	10	100	1	10	100	1	10	100	1	10	100	1	10	100	1	10	100
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	-	-	-	-	✓	-	-	✓	-	-	✓
<i>S. aureus</i>	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓
MRSA BAA-44	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓
MRSA 43300	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓
<i>B. atrophaeus</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Reduktion um		-	keine Reduktion oder $< 3 \log_{10}$ -Stufen																					
		✓	$\geq 3 \log_{10}$ -Stufen																					
		✓	$\geq 5 \log_{10}$ -Stufen																					

Tabelle 2: Die Übersichtstabelle zeigt das Ausmaß des photodynamischen reduktiven Effekts auf die verschiedenen untersuchten Bakterienstämme hinsichtlich der Versuchsbedingungen. Unter geeigneten Bedingungen konnte bei jedem Bakterienstamm eine Reduktion um $\geq 5 \log_{10}$ -Stufen erreicht werden.

5.2 Gegenüberstellung der Effekte PIB – Hitzeschock (50 °C)

Wie in der Einleitung erwähnt, reagieren Bakterien auf Stress unterschiedlichster Art (Hitze, Kälte, Ethanol, Sauerstoffradikale) mit der Expression der so genannten heatshock-Proteine (HSPs), die fehlgefaltete und damit wirkungslose oder sogar schädliche andere Proteine rekonfigurieren und damit eine Reparatur- und Wiederherstellungsfunktion innerhalb der Zelle erfüllen.

In diesem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich die HSP-Antworten auf den bekannten HSP-Induktor „Hitze“, bzw. „erhöhte Temperatur“ mit der durch PIB ausgelösten bakteriellen Antwort vergleichen lassen. Bekanntermaßen induzieren Sauerstoffradikale die HSP-Expression [67], die im Rahmen von photodynamischen Prozessen verstärkt gebildet werden. Es wurde untersucht, in welchem Ausmaß der bekannte PS TMPyP eine HSP-Expression induzieren kann, und darüber hinaus, ob eine vor photodynamischer Behandlung stattfindende Exposition gegenüber erhöhter Temperatur mit den damit einhergehenden erhöhten HSP-Leveln am Beispiel von DnaK die Bakterien weniger anfällig gegenüber dem photodynamischen Prozess macht.

5.2.1 Kontrollversuche

Bezüglich Sensitivität und Selektivität der verwendeten Antikörper wurden zuerst entsprechende Kontrollexperimente durchgeführt. Zudem wurde versucht, die HSP-Induktion durch alleinige Temperaturerhöhung am Beispiel von DnaK nachzuweisen.

5.2.1.1 Anti-DnaK-Antikörperfunktionalität

Zur Überprüfung der Spezifität des Antikörpers gegen das nachzuweisende Protein DnaK wurde eine Verdünnungsreihe des rekombinanten Proteins erstellt, wie in **4.6.2** beschrieben. Die Auswertung per Western-Blot gem. **4.7** ist in **Abb. 36** abgebildet.

Die Signale der Verdünnungsreihe liegen auf einer Höhe und im erwarteten Bereich von ~70 kDa [80]. Die Signalstärke nimmt mit zunehmendem Verdünnungsgrad ab, ohne jedoch komplett zu verschwinden.

Der Antikörper (1:10.000 verdünnt) erkennt das nachzuweisende Protein DnaK bis zu einer Konzentrationen bis zu 31×10^{-9} Gramm.

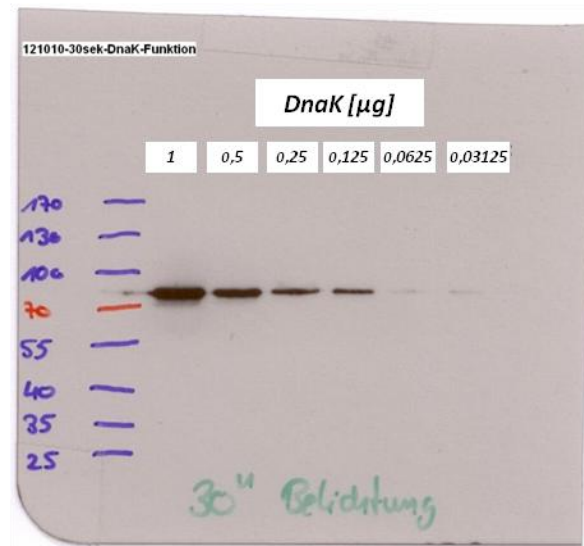


Abb. 36: Nachweis von rekombinanter DnaK mit anti-DnaK-Antikörper.

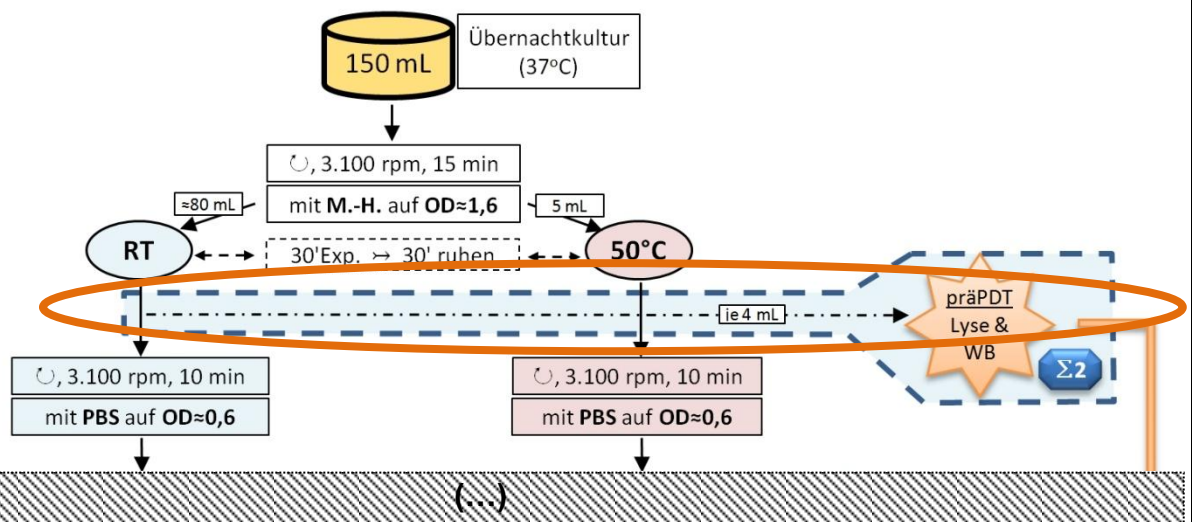
Seriell verdünnte Konzentrationen von DnaK (1–0,03125 µg) wurden mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung von anti-DnaK-Antikörper (1:10.000) nachgewiesen. Auf der linken Seite ist der Proteinstandardmarker angegeben (blaue und rote Zahlen, in kDa).

5.2.1.2 DnaK-Expression durch Hitzeschock

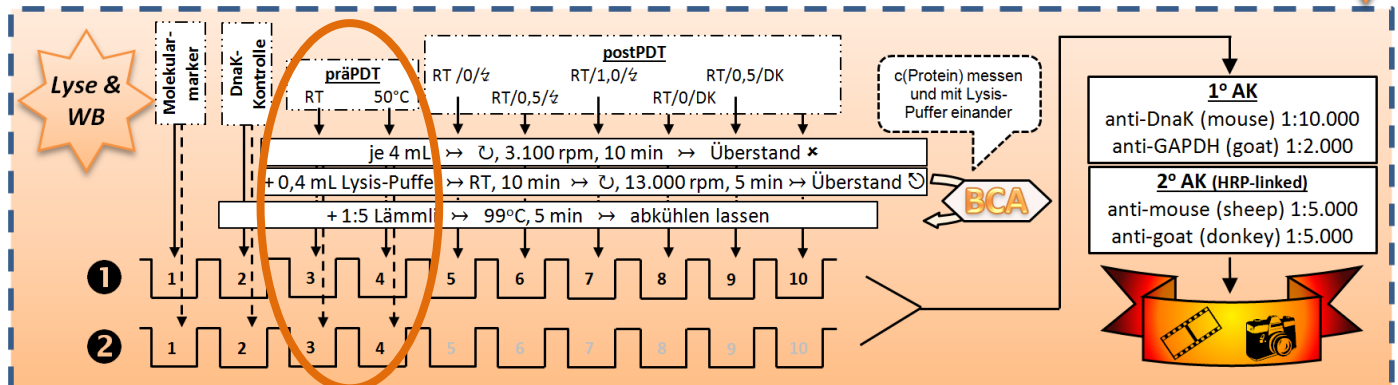
Wie aus **Abb. 16 (4.4)** hervorgeht, wurden bei jedem Versuch zwei Proben („präPDT“) separiert, die Aufschluss über die unterschiedliche HSP-Expression bei RT und 50 °C geben sollten (vgl. **Abb. 37A**). Das Ergebnis eines solchen Versuchsteils ist exemplarisch in **Abb. 37B** dargestellt.

Sowohl bei Gel1 als auch Gel2 waren die Signalintensitäten der detektierten DnaK-Banden nach heatshock-Induktion bei 50 °C schwächer als die Signalintensität der Referenzbande (Kultivierung der Bakterien bei RT, Nachweis der basalen DnaK-Expression).

(A)



(B)



(B)

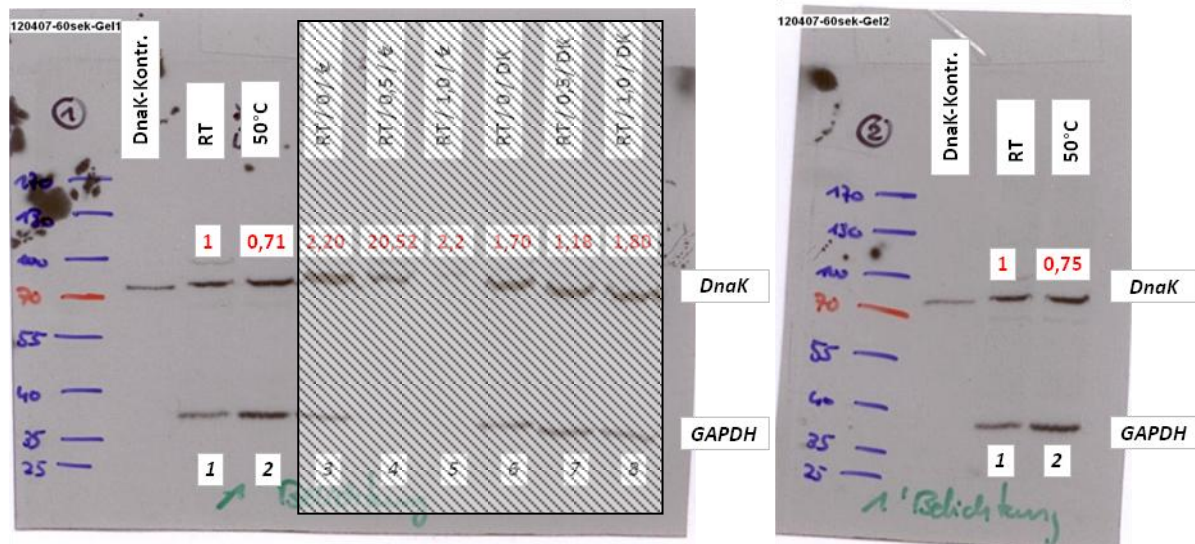


Abb. 37 (vorherige Seite): (A) Schematische Darstellung der relevanten Versuchsschritte (orange eingekreist) zur temperaturabhängigen HSP-Expression von *E. coli*; (B) beispielhaftes Ergebnis des Western-Blots aus (A): Gel 1 (1, links): all-in-one-Gel; Gel 2 (2, rechts): separate Gegenüberstellung der RT- und 50 °C-Probe (wells 5-10 nur mit 1:5-Lämmli befüllt); Die in rot dargestellten Werte geben die normierte Signalstärke der DnaK-Bande in Relation zur Referenzprobe (Probe 1) an; jeweils links auf dem Gel: Proteinstandardmarker (rote und blaue Zahlen/Linien, in kDa); [beachte: die wells 3+4 (oranger Kreis, Abb. 37A) entsprechen den Proben 1 (RT) und 2 (50 °C) in Abb. 37B; in Abb. 37A, linker Blot: Proben 3-8 hinsichtlich Temperaturabhängigkeit hier nicht relevant, deswegen grau hinterlegt]

Legende:

RT: Raumtemperatur | ❄: auf Eis, gekühlt | ☪, x rpm: mit x Umdrehungen pro Minute zentrifugieren | →: anschließend, nächster Schritt | ⇄: Horizontalrüttler | 🧴: entnehmen & weiterprozessieren | ✖: verwerfen | x': x Minuten | ☒ / DK: Bestrahlungsmodalität (☒: mit Bestrahlung; DK: ohne Bestrahlung, Dunkelkontrolle) | <BCA>: BCA-Analyse | WB: Western-Blot

Da der Nachweis der temperaturinduzierten HSP-Expression im Rahmen des Gesamtversuchs nicht in zufriedenstellendem Maße gelang, wurde der in 4.6.3 beschriebene separate Kontrollversuch gemacht, der ausschließlich den Nachweis der temperaturabhängigen HSP-Expression zum Ziel hatte.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abb. 38 zu sehen.

Nach Normierung der Ergebnisse unter Verwendung des Programms ImageJ v1.45s ergab die Auswertung, dass das Hitzeschockprotein DnaK nach Temperaturerhöhung in einer Menge vorlag, deren Signalstärke im Durchschnitt 95 % (als Mittelwert der relativen Signalstärken der DnaK-Banden der Proben 4-6) derjenigen der Referenzprobe bei RT entsprach.

Als institutsinterner Standard, um von einer erhöhten HSP-Expression sprechen zu können, wurde ein um 50 % stärkeres DnaK-Signal definiert (entsprechend 150 %, bzw. das 1,5-Fache der Referenzprobe).

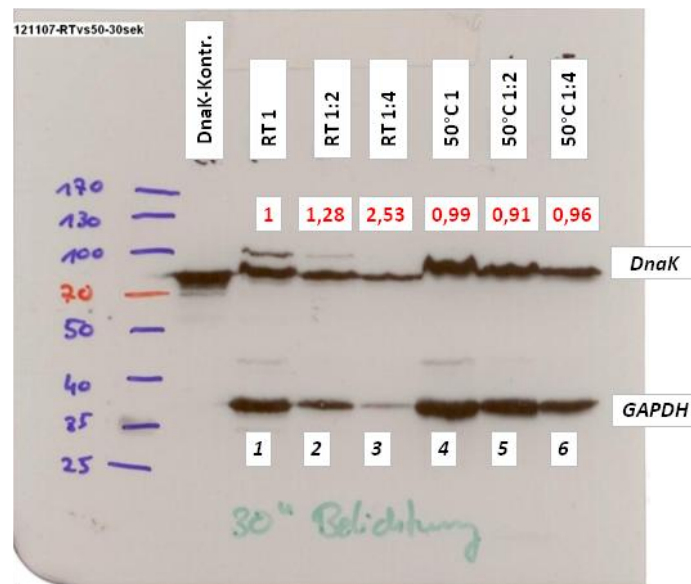


Abb. 38: Ergebnis des Kontroll-Blots zur DnaK-Expression von *E. coli* bei RT vs. 50 °C.

Proben 1-3: 1:2-Verdünnungsreihe der auf RT gehaltenen Referenzprobe

Proben 4-6: 1:2-Verdünnungsreihe der auf 50 °C erhitzten Probe

untere Reihe: housekeeping-Protein GAPDH; obere Reihe: heatshock-Protein DnaK

links (rote und blaue Zahlen/Linien): Proteinstandardmarker (in kDa)

Die in **rot** dargestellten Werte geben die normierte Signalstärke der DnaK-Bande in Relation zur Referenzprobe (Probe 1) an.

Es zeigte sich keine erhöhte HSP-Expression nach Hitzebehandlung.

Dementsprechend konnte keine verstärkte DnaK-Expression nach Hitzeschock (50 °C) bei *E. coli* nachgewiesen werden.

Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Schritt in dieser Doktorarbeit die Herangehensweise verändert, um eine HSP-Expression nach Hitzeschock nachweisen zu können. Wie in **Abb. 39** gezeigt, wurde die ÜN-Kultur nach dem Abzentrifugieren zunächst in frischem, vorgewärmtem Müller-Hinton-Medium resuspendiert und 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch dieses Vorgehen sollten die möglicherweise über Nacht in die stationäre Phase geratenen Bakterien (mögliche Stressinduktion) wieder in eine proliferative, stoffwechselaktive Wachstumsphase gelangen.

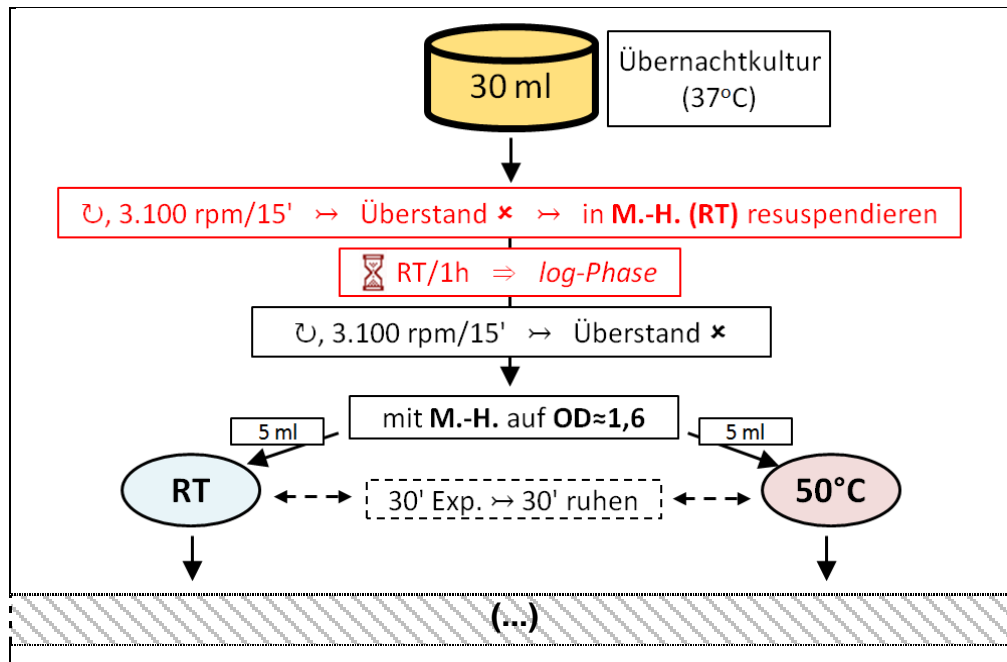


Abb. 39: Schematische Darstellung zum veränderten Versuchsablauf zur temperaturabhängigen DnaK-Expression von *E. coli*; Veränderungen zum ursprünglichen Prozedere in **rot**, der weitere Ablauf blieb unverändert (vgl. 4.6.3, Abb. 19).

Legende:

M.-H.: Müller-Hinton-Medium | RT: Raumtemperatur | \cup , x rpm: mit x Umdrehungen pro Minute zentrifugieren | \rightarrow : anschließend, nächster Schritt | *: verwerfen | x': x Minuten | ⌚ : Ruhephase

Die weitere Durchführung des Experimentes blieb unverändert zu 4.6.3.

In **Abb. 40** ist der resultierende Blot abgebildet. Innerhalb der jeweiligen Verdünnungsreihen (*Proben 1-3*, bzw. *Proben 4-6*) nahm die Signalstärke sowohl bei den Banden der DnaK als auch des housekeeping-Proteins GAPDH ab. Nach Normierung der Signalintensitäten der Banden der GAPDH-Ladungskontrollen ergab sich, dass die Intensität der 50 °C-Banden (*Proben 4-6*) lediglich 106 % der der Referenzbande (*Probe 1*) entsprach.

Durch den veränderten Versuchsablauf konnte also eine gesteigerte HSP-Induktion im Vergleich zum Vorversuch (dort: 95 %) erreicht werden. Allerdings konnte auch jetzt noch nicht von einer „Erhöhung“ gesprochen werden (nach institutsinterner Definition erst bei Werten ab 150 %).

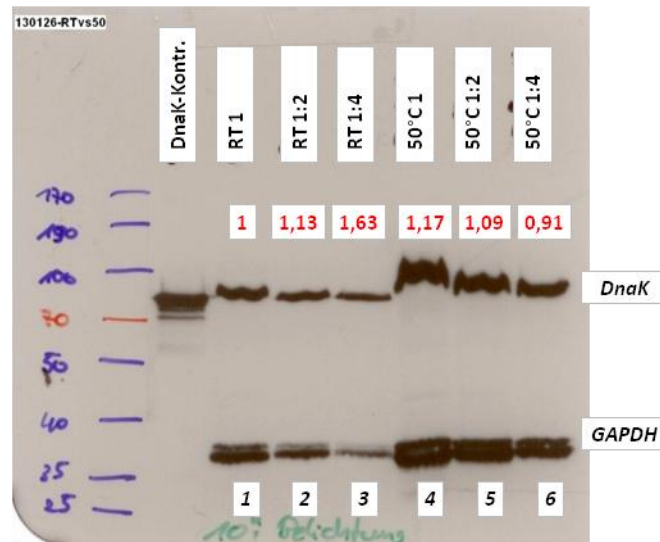


Abb. 40: Ergebnis des Kontrollversuchs zur DnaK-Expression von *E. coli* bei RT vs. 50 °C nach Änderung des Versuchsaufbaus.

Proben 1-3: 1:2-Verdünnungsreihe der auf RT gehaltenen Referenzprobe

Proben 4-6: 1:2-Verdünnungsreihe der auf 50 °C erhitzten Probe

untere Reihe: housekeeping-Protein GAPDH; obere Reihe: heatshock-Protein DnaK
links (rote und blaue Zahlen/Linien): Proteinstandardmarker (in kDa)

Die in **rot** dargestellten Werte geben die normierte Signalstärke der DnaK-Bande in Relation zur Referenzprobe (Probe 1) an.

Es zeigte sich eine nur leicht erhöhte HSP-Expression nach Hitzebehandlung.

5.2.2 Toxizität von Hitzeschock und PIB im Vergleich

In diesem Versuchsteil wurde der Effekt auf das bakterielle Wachstum von alleiniger Temperaturerhöhung einerseits und photodynamischer Behandlung andererseits sowie deren Kombination (Durchführung von PIB nach Hitzeexposition) untersucht. Bakteriensuspensionen von *E. coli* wurden mit TMPyP unterschiedlicher Konzentrationen bzw. PBS als Negativkontrolle inkubiert und nach 30 Minuten entweder bei RT oder bei 50 °C der Lichtquelle ausgesetzt (Waldmann UV236).

Abb. 41 zeigt die erzielten Ergebnisse bezüglich der CFU-Reduktion. Es ist deutlich zu sehen, dass eine alleinige Temperaturerhöhung keinen reduzierenden, also toxischen Effekt auf *E. coli* hat (50 °C, DK), ebenso wenig wie die ausschließliche Farbstoffexposition ohne Belichtung (RT, DK) oder Belichtung ohne Farbstoff (□).

Die Belichtung der mit Farbstoff versetzten Bakterienproben ergab ab einer Konzentration von 10 µM TMPyP bei beiden Temperaturmodalitäten (RT vs. 50 °C) eine Reduktion der CFU um mehr als 5 log₁₀-Stufen. Die photodynamische Inaktivierung, die bei 50 °C / 0,5 µM TMPyP + Licht gemessen wurde, lag im Bereich derjenigen, die bei

RT / 1,0 μM + Licht beobachtet wurde. In diesen beiden Fällen wurde ein desinfizierender Effekt (5 \log_{10} -Stufen) nicht erreicht.

Von einer gesteigerten Widerstandsfähigkeit der Bakterien ggü. PIB nach Temperaturexposition kann nicht gesprochen werden (50 °C, ζ), tendenziell wurde eher der gegenteilige Effekt beobachtet (vgl. **Abb. 41**).

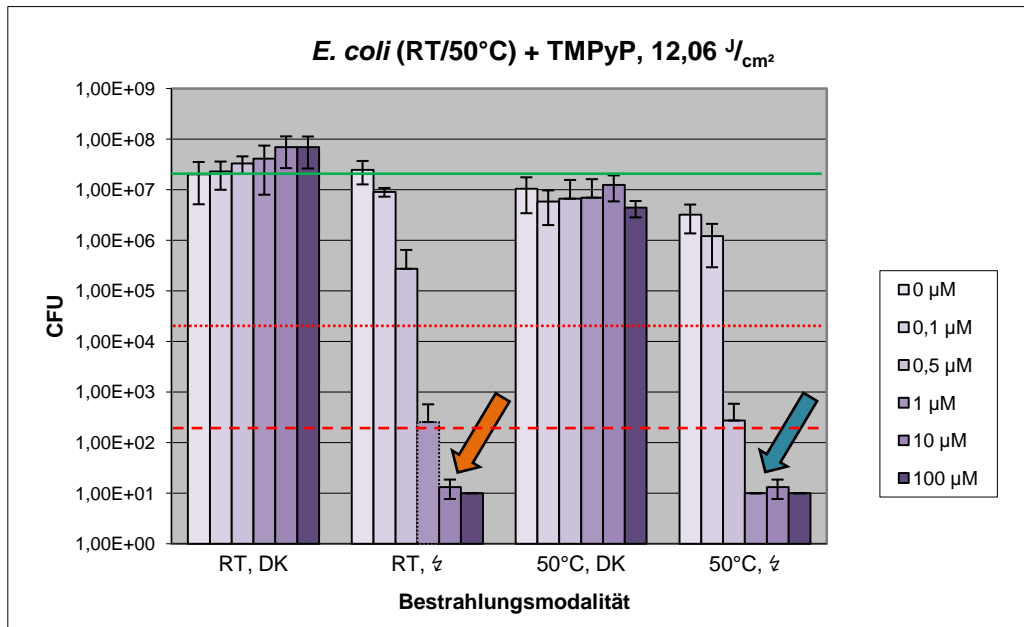


Abb. 41: Vergleich der Effekte der PIB auf *E. coli* bei verschiedenen TMPyP-Konzentrationen mit und ohne vorheriger Temperaturexposition.

Vorherige Temperaturexposition trägt nicht zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber der photodynamischen Behandlung bei, sondern zeigte ebenfalls eine Reduktion um $\geq 5 \log_{10}$ und dies bereits bei einer niedrigeren PS-Konzentration. Die Pfeile weisen auf die PS-Konzentration hin, bei der eine Reduktion um $\geq 5 \log_{10}$ erreicht wurde. Bei der auf RT belassenen Probe war dies bei 10 μM TMPyP der Fall (**oranger Pfeil**), nach Hitzeschock bereits bei 1 μM TMPyP (**blauer Pfeil**).

Legende:

RT / 50 °C: Temperatur vor Bestrahlung auf RT belassen / auf 50 °C erhöht | ζ / DK: mit / ohne Bestrahlung (12,06 J/cm^2) | — baseline; 3 \log_{10} ; - - - 5 \log_{10}

5.2.3 PIB-induzierte DnaK-Expression

5.2.3.1 Dosisfindung subletaler Konditionen

Um die Bakterien durch die photodynamischen Behandlung zu stimulieren, aber nicht zu eradizieren, wurden zunächst Versuche zur Findung der subletalen Dosis vorgeschaltet. Als Lichtquelle wurde die UV236 (Waldmann Medizintechnik) verwendet, die im Rahmen des EU-Projekts mit dem Titel „Development of a photodynamic treatment to eradicate and control the current spread of infectious antibiotic resistant microorganisms in man“ entwickelt worden ist. **Abb. 42** zeigt das Ergebnis dieser Vorversuche. Bei einer PS-Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ war nach einer Belichtung mit $12,06 \text{ J/cm}^2$ ein eingeschränktes Wachstum bemerkbar. Durch die photodynamischen Prozesse war also eine Schädigung erfolgt, ohne eine vollkommene Abtötung der Bakterien zu bewirken. Diese subletale Dosis wurde für die weiteren Versuche verwendet. Darüber hinaus wurde auch der Effekt der nächsthöheren, letalen PS-Konzentration von $1,0 \mu\text{M}$ untersucht.

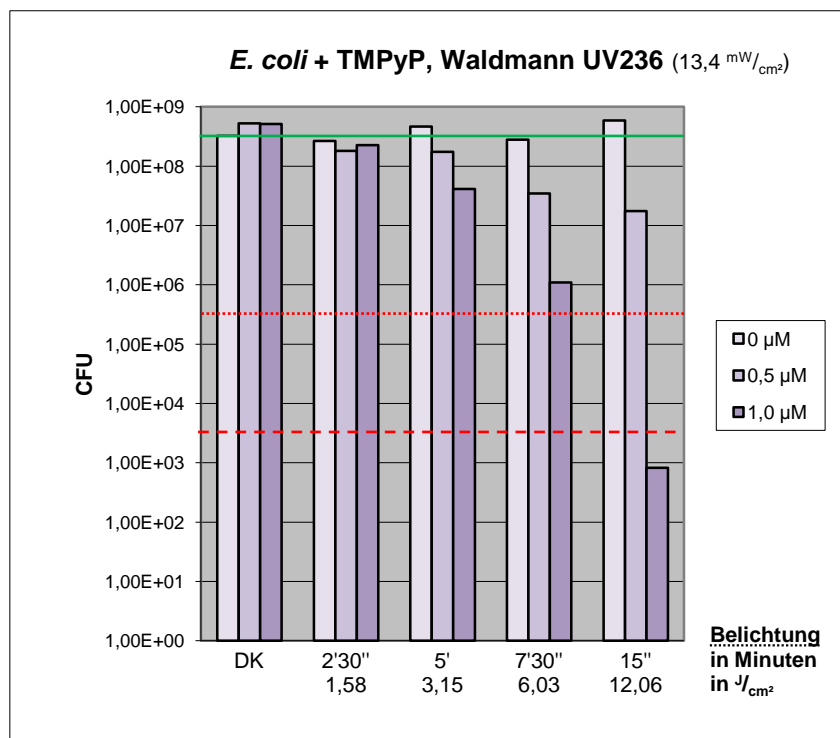


Abb. 42: exemplarisches Ergebnis der Dosisfindungsexperimente mit *E. coli* bei verschiedenen TMPyP-Konzentrationen (Inkubationszeit je 15 min) und Belichtungsparametern.

Bei einer PS-Konzentration von $1 \mu\text{M}$ war nach einer Belichtung mit $12,06 \text{ J/cm}^2$ ein eingeschränktes Wachstum bemerkbar ohne eine vollkommene Abtötung der Bakterien zu bewirken. Diese subletale Dosis wurde somit für die weiteren Versuche zur DnaK-Induktion verwendet.

(— baseline; $3 \log_{10}$; - - - $5 \log_{10}$)

5.2.3.2 Nachweis der DnaK-Expression

Mit dem in den Vorversuchen subletalen Bestrahlungsparametern wurden nun die Versuche zur HSP-Induktion mit anschließendem Western-Blot durchgeführt.

Die Expression von DnaK wurde direkt im Anschluss an die photodynamische Behandlung (TMPyP-Konzentrationen von 0 / 0,5 / 1,0 μM , Inkubation für 15 min, Bestrahlung mit 13,4 mW/cm^2 für 15 min = 12,06 J/cm^2) untersucht.

Diejenigen Proben, die den Versuchsprozess komplett durchlaufen hatten und nicht wie die Referenzprobe vor den Wasch- und Bestrahlungsschritten separiert worden waren, zeigten einen höheren DnaK-Grundspiegel als die Referenzprobe. Die drei nichtbelichteten Proben (*Proben 6-8*) sowie die zwar belichtete, aber nicht mit PS versetzte Probe (*Probe 3*) gaben ein um im Mittel ~60 % (Western-Blot gem. **Abb. 43**), bzw. im Mittel über alle vier unabhängigen Versuche um 275 % stärkeres DnaK-Signal als die Referenzprobe (*Probe 1*) (vgl. **Abb. 43**).

0,5 μM TMPyP mit nachfolgender Bestrahlung hatte ein 6,2fach (Western-Blot gem. **Abb. 43**), bzw. 11,5fach (Mittelwert über alle Versuche) verstärktes Signal zur Folge (*Proben 3+4*). Das DnaK-Signal zeigte sich hier um den zu erwartenden Bereich in allen Blots verschmiert, es zeigten sich mehrere dunkle Banden (*Probe 4*).

Bei 1,0 μM + $\frac{1}{2}$ (*Probe 5*) konnte in allen Blots so gut wie kein DnaK mehr detektiert werden, ebenso wenig wie GAPDH als Ladungskontrolle.

In den beiden sowohl mit PS versetzten als auch bestrahlten Versuchslinien (*Proben 4+5*) wurde ein deutlich abgeschwächtes Signal des housekeeping-Proteins GAPDH festgestellt, wohingegen es in den Proben 6-8 im Mittel die 1,7fache (vgl. Western-Blot gem. **Abb. 43**), bzw. 3,8fache (Mittelwert über alle Versuche) Intensität der Vergleichsprobe (*Probe 1*) hatte. Dieser veränderte Bezugswert wurde in die Berechnungen zur Veränderung der DnaK-Level mit einbezogen.

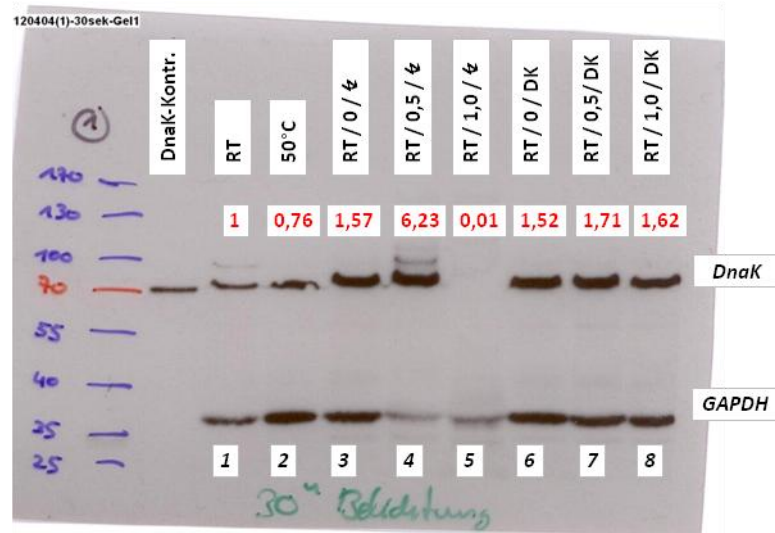


Abb. 43: repräsentativer Blot des Versuchs zur DnaK-Expression unter PIB.

Proben 1-3: 1:2-Verdünnungsreihe der auf RT gehaltenen Referenzprobe

Proben 4-6: 1:2-Verdünnungsreihe der auf 50 °C erhitzten Probe

untere Reihe: housekeeping-Protein GAPDH; obere Reihe: heatshock-Protein DnaK
links (rote und blaue Zahlen/Linien): Proteinstandardmarker (in kDa)

Die in **rot** dargestellten Werte geben die normierte Signalstärke der DnaK-Bande in Relation zur Referenzprobe (Probe 1) an.

Legende:

RT: Raumtemperatur | 4/DK: mit/ohne Bestrahlung ($12,06 \text{ J/cm}^2$)

Es konnte gezeigt werden, dass die photodynamische Behandlung von *E. coli* unter Verwendung des Photosensibilisators TMPyP zu deutlich erhöhten DnaK-Leveln führt.

Im Anhang ab Seite XIX sind die einzelnen Western-Blots zusammen mit der jeweiligen densitometrischen Auswertung zu finden.

6 DISKUSSION

6.1 Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung unter PIB

Steigende Resistenzraten gegen Antibiotika unter Mikroorganismen sind ein ernstzunehmendes Problem, dessen Relevanz im 21. Jahrhundert an Bedeutung zunehmen wird. Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch vollkommen unklar, inwiefern Bakterien oder Pilze Mechanismen entwickeln können, um sich gegen die PIB zur Wehr zu setzen. Die Fähigkeit von gramnegativen Bakterien, die Aufnahme von Molekülen durch ihre äußere Membran zu regulieren (vgl. [81]), könnte sie dazu befähigen, dass weniger PS in den Wirkungsbereich gelangt. Die negativ geladene äußere Membran dient den bisherigen PS als therapeutischer Ansatzpunkt. Die in der Einleitung aufgeführten Vertreter der verschiedenen chemischen Gruppen (Phenothiazin-, Porphyrin-, Fullerenderivate) zeichnen sich allesamt durch eine oder mehrere positive Ladungen aus, um ein elektrostatisches Anhaften an die äußere Wand/Membran und damit eine erhöhte PS-Konzentration im direkten Umfeld des Bakteriums zu gewährleisten. Eine Reduktion der negativen Ladungen in der LPS-haltigen Membran von gramnegativen Bakterien würde eine Adhäsion der Farbstoffmoleküle behindern oder gar blockieren. Dadurch würde eine geringere Menge an PS-Molekülen an die Membran binden und die wirksame Konzentration möglicherweise unterschritten werden. Dieser Mechanismus konnte beispielsweise für *Salmonella enterica* serovar Typhimurium nachgewiesen werden, das auf diese Weise die Anheftung des Antibiotikums Polymyxin verhindert [82].

Doch auch grampositive Bakterien könnten durch Veränderung der Zellwandstruktur eine verminderte Anfälligkeit für PS erlangen. Beispielsweise könnte eine dickere Zellwand die Penetration von Farbstoffen in das Bakterium erschweren oder verhindern. Diese Eigenschaft weisen z. B. *S. aureus* mit intermediärer Vancomycinresistenz auf. Deren Peptidoglykane in der Zellwand sind engmaschiger und dicker verknüpft, wie Pfeltz *et al.* zeigten [83]. Mit einer vergleichbar veränderten Zusammensetzung der Zellwand könnte es Bakterien gelingen, die Wirksamkeit der PIB zu reduzieren, da die PS die Zellwand nicht in dem Maße penetrieren können, wie es für eine effektive PIB nötig wäre.

Ein weiterer vorstellbarer Resistenzmechanismus ist in Verbindung mit den Porin-Molekülen der äußeren Membranhülle zu sehen. Die Mutante *E. coli* K12 hat eine Variation im Genlokus *ompB*, welcher für die Regulation der Porine OmpF und OmpC zuständig ist. Durch die daraus resultierende Minderexpression dieser Porinmoleküle weist die Mutante eine erhöhte Toleranz gegenüber β -Laktamantibiotika auf [84].

Multidrugresistance (MDR)-Effluxpumpen sind Transportmoleküle in der Zellwand, die unspezifisch toxische Metabolite oder aufgenommene Stoffe aktiv aus der Zelle hinaus transportieren. Bei humanen Krebszellen konnte z.B. deren Rolle bei Chemotherapeutikaresistenz gezeigt werden [85]. MDR-Effluxpumpen spielen bei bakteriellen Resistenzen gegen eine Vielzahl von Antibiotika eine wichtige Rolle [86-90]. Noch ist nicht bekannt, inwieweit die Aktivität dieser Pumpsysteme durch die bei der PIB verwendeten Farbstoffe induziert werden oder zu einer herabgesetzten Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber der PIB führen könnten.

Vorstellbar wären also spezifische Abwehrmechanismen gegen die PS-Moleküle. Gegen die während des Photosensibilisierungsprozesses entstehenden Reaktionsprodukte erscheint das schon weniger wahrscheinlich. Wobei es hier zu unterscheiden gilt, ob eine Typ I- oder Typ II-Reaktion vorliegt.

Die Radikale, die in der Typ I-Reaktion (HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$) entstehen, führen im weiteren Verlauf u. a. zur Bildung von H_2O_2 , die allesamt zur oxidierend-toxischen Wirkung der PIB beitragen. Enzymatische Abbauege dieser ROS werden z.B. durch die Superoxiddismutase (SOD) eröffnet, die das Superoxidanion zu O_2 und H_2O_2 weiter verstoffwechselt. Wasserstoffperoxid seinerseits ist das Substrat für die Katalase, die es zu O_2 und H_2O entgiftet.

In ihrer Studie konnten Nakonieczna *et al.* für *S. aureus* zeigen, dass eine stammabhängige intrinsisch erhöhte Aktivität der SOD mit einer verminderten Anfälligkeit gegenüber der PIB einhergeht. Darüber hinaus hatte die photodynamische Behandlung sogar eine Steigerung der enzymatischen Aktivität der SOD zur Folge. Eine echte Resistenz gegenüber PIB lag jedoch nicht vor, da entsprechende photodynamische Parameter hinsichtlich Lichtdosis und PS-Inkubationszeit geeignet waren, auch bei einer erhöhten SOD-Aktivität von MRSA diese effektiv abzutöten. Eine erhöhte SOD-Aktivität kann also zu einer verringerten Suszeptibilität, nicht jedoch zu einer vollständigen Resistenz gegenüber der PIB führen [91].

E. coli exprimiert u. a. eine periplasmatische kupfer- und zinkhaltige SOD [92], deren verstärkte Expression es dem Keim ermöglicht, in nicht-phagozytierenden Zellen wie HeLa- oder Epithelzellen besser zu überleben [93]. Der Einfluss einer PIB auf die SOD-Aktivität in *E. coli* wurde bislang noch nicht untersucht. In Anbetracht der bei *S. aureus* gemachten Beobachtungen liegt die Vermutung jedoch nahe, dass sich erhöhte SOD-

Level förderlich auf das Überleben von *E. coli* unter PIB auswirken könnten, d. h. eine verminderte Suszeptibilität gegenüber dem photodynamischen Prozess.

Mit den in Typ I-Reaktionen entstehenden Produkten liegen Verbindungen vor, für die spezifische Abbauwege existieren, da diese auch in Stoffwechselprozessen als schädliche und zu beseitigende Nebenprodukte anfallen, wie z. B. Superoxid, das in der Atmungskette entsteht [94]. Oder diese Verbindungen werden von anderen Organismen als deren Abwehrmechanismus produziert. HO^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 werden z. B. von Pflanzen zur Abwehr von Bakterien und anderen Erregern im Rahmen des „oxidative burst“ generiert [95]. Somit ist es naheliegend, dass Bakterien Enzyme aufweisen, mittels derer diese ROS abgebaut werden können.

Ein anderer Sachverhalt liegt vor, wenn man die Typ II-Reaktion betrachtet. Der hier entstehende Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$ unterscheidet sich bis auf seine gesteigerte Reaktionsfreudigkeit nicht vom ubiquitär vorhandenen Sauerstoff im Triplettgrundzustand, $^3\text{O}_2$. Er ist mit diesem chemisch identisch, er ist lediglich der erste angeregte Zustand des Grundzustands und hat ein um +0,98 eV unterschiedliches Energieniveau als dieser [96]. Ein Enzym, das $^1\text{O}_2$ abbauen würde, würde ebenso $^3\text{O}_2$ abbauen und ihn so den übrigen lebenswichtigen Prozessen entziehen. Es erscheint also sehr unwahrscheinlich, dass sich Bakterien direkt gegen $^1\text{O}_2$ als das eine oxidierende Agens zur Wehr setzen können, sondern dass sie stattdessen die vielzähligen oxidativen Schäden in den Griff bekommen müssen.

6.2 TEIL 1 – Blitzlichtverfahren mit IPL

6.2.1 Reduktion der Expositionszeiten

Die Wirkung der PIB wurde bereits in zahlreichen Studien belegt. Nicht nur die biologisch relevante Reduktion von Bakterien ($\geq 3 \log_{10} \triangleq \geq 99,9\%$), sondern auch die desinfizierende Wirkung ($\geq 5 \log_{10} \triangleq \geq 99,999\%$) der PIB in Anwesenheit eines Photosensibilisators und Licht ist bereits in mehreren Arbeiten gezeigt worden [57, 97-100]. Durch die geringen Intensitäten der Lichtquellen lagen die Inkubations- und Bestrahlungszeiten dabei im Bereich von 5-60 Minuten (Inkubation), bzw. 15-40 Minuten (Bestrahlung).

Die für eine effektive PIB benötigte Bestrahlungsintensität kann anstatt über die Bestrahlungsdauer auch durch eine leistungsstarke Lampe erreicht werden. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte dies eindrucksvoll unter Beweis gestellt werden. Mit einer

kommerziell verfügbaren IPL, die mit einem Cut-off-Filter bei 550 nm versehen war, und unter Verwendung des Photosensibilisators TMPyP konnten verschiedene Bakterien sehr schnell inaktiviert werden [79]. Seit der Einführung von Blitzlichtlampen (IPL) in den klinischen Gebrauch im Jahr 1994 [101] nahm ihre Bedeutung v. a. in der Dermatologie stetig zu [102]. Derartige Lampen vermögen hochenergetische Lichtblitze abzugeben, Verwendung finden sie u. a. zur Haarentfernung, Therapie von Gefäßmissbildungen (z. B. Teleangiektasien) oder bei Akne [103]. Kennzeichnende Eigenschaft dieses Gerätes ist es, innerhalb von Sekundenbruchteilen die mehrfache Strahlungsleistung zu erreichen, die z. B. von einer UV236 Waldmann-Lampe innerhalb von 15 Minuten abgegeben wird. So werden von der UV236 Lichtquelle nach den genannten 15 Minuten ca. 12 J/cm^2 abgegeben, für eine Energiedosis von 20 J/cm^2 braucht es bei der IPL Ellipse dagegen nur einen Lichtblitz von 100 ms.

Der in dieser Arbeit verwendete Farbstoff TMPyP (vgl. Einleitung), der Standardvertreter aus der Gruppe der Porphyrinphotosensibilisatoren, wurde schon erfolgreich für die PIB herangezogen [53-56]. Da zudem das Emissionsspektrum der IPL mit dem Absorptionsspektrum der Porphyrine überlappt, lag es nahe, diesen bereits etablierten Farbstoff mit der neuen Lampentechnik zu kombinieren, um die photodynamische Effektivität gegenüber *E. coli*, MSSA, MRSA, und *B. atrophaeus* zu testen.

6.2.2 Interpretation der graphischen Ergebnisse

Zur Interpretation der graphischen Ergebnisse ist zu sagen, dass von den in den verschiedenen, unabhängigen Experimenten gezählten CFU des jeweils untersuchten Bakteriums der Mittelwert gebildet und bewertet worden ist. Extremwerte, die z. B. durch einzelne gezählte Kulturen in hohen Verdünnungsstufen zustande kommen, haben damit einen starken Effekt auf das Ergebnis.

Ein möglicher Weg, diesem Problem mathematisch zu begegnen, wäre anstatt des Mittelwerts den Median zur Bewertung heranzuziehen. Dadurch, dass der Median die Werte gewichtet, wirken sich einzelne Extremwerte nicht so stark auf das Ergebnis aus, wie dies beim Mittelwert der Fall ist.

Die photodynamische Behandlung zeigte bei allen untersuchten Bakterienstämmen (*E. coli*, *S. aureus*, MRSA, *B. atrophaeus*) deutliche reduktive Effekte. Bei einer TMPyP-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ und einem einzelnen Lichtblitz von 10 J/cm^2 konnte bei jedem untersuchten grampositiven Keim innerhalb von 83 ms eine Reduktion um mehr als

5 log₁₀-Stufen erreicht werden, beim gramnegativen *E. coli* wurde derselbe Effekt bei 100 µM TMPyP und 4 Lichtblitzen von 10 J/cm² mit einer Gesamtdauer von 400 ms erzielt.

Im Allgemeinen zeigten sich *E. coli*-Bakterien der PIB gegenüber weniger empfindlich als die weiteren untersuchten, grampositiven Keime. Durch die Zellwandstruktur von gramnegativen Keimen mit ihrer aus innerer und äußerer Membran bestehenden dickeren, doppelten Zellwand könnte sich die generell schwächere Wirkung der PIB erklären lassen. So konnte bei *S. aureus* bei niedrigeren Lichtdosen und Farbstoffkonzentrationen eine antimikrobielle photodynamische Wirkung von mindestens 3 log₁₀-Stufen erzielt werden. Grundsätzlich ist jedoch zu sagen, dass sowohl bei *E. coli* als auch bei *S. aureus* unter entsprechenden Bedingungen eine vollständige Abtötung erreicht werden kann, wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Dies ist kohärent zu bereits publizierten Daten. So benötigten Maisch *et al.* mit XF73, einem weiteren Vertreter aus der Klasse der Porphyrinphotosensibilisatoren, 20fach höhere PS-Konzentrationen, um einen ähnlichen antimikrobiellen Effekt bei *E. coli* zu erzeugen, wie dies für *S. aureus* der Fall war [57].

Eichner *et al.* untersuchten den photodynamischen Effekt auf verschiedene Mikroorganismen, darunter *C. albicans*, EHEC, MRSA und *E. coli*, unter Verwendung von TMPyP [104]. Auch hier zeigte sich, dass für *E. coli* höhere PS-Konzentrationen oder längere Bestrahlungszeiten notwendig waren, um einen ähnlichen reduktiven Effekt zu erzielen wie bei *S. aureus*. Bei einer gleichen Inkubations- sowie Bestrahlungszeit von je 10 s war bei *E. coli* für eine Reduktion um ≥ 5 log₁₀-Stufen eine 10fach höhere TMPyP-Konzentration notwendig, bzw. bei gleicher PS-Konzentration eine 6fach längere Bestrahlung.

Abgesehen davon konnten Eichner *et al.* die effektive Inaktivierung mit einer Bestrahlungsdauer von lediglich 10 s in einem sehr kleinen Zeitfenster erzielen, gerade mit Blick auf die oben erwähnten Inkubations- und Bestrahlungszeiten im Minutenbereich (vgl. 6.2.1)

In dieser Arbeit wurde durch entsprechende Lampentechnik eine weitere Minimierung der Bestrahlungszeit erreicht. Im direkten Vergleich zu Eichner *et al.* gelang dies mit der IPL unter Verwendung der 10fachen TMPyP-Konzentration (10 µM vs. 1 µM) in einem Hundertstel der Zeit (100 ms vs. 10 s). Somit konnte gezeigt werden, dass auch durch extrem kurze Belichtungszeiten eine erfolgreiche Dekolonisierung von Oberflächen bewirkt werden kann.

6.3 TEIL 2 – DnaK-Induktion

6.3.1 DnaK-Induktion durch Hitzeschock

Bakterien reagieren auf Stress mit der Ausbildung von Hitzeschockproteinen, auch und vor allem bei erhöhter Temperatur [66].

Im ersten Versuchsaufbau, der diese HSP-Expression durch erhöhte Temperatur nachvollziehen sollte, gelang es nicht, vermehrte HSP-Level zu detektieren (vgl. **5.2.1.2**).

Im nachgeschalteten zweiten, modifizierten Versuchsaufbau (vgl. **5.2.1.2**, **Abb. 39**) wurde das Medium der Übernachtskultur durch frisches, vorgewärmtes Medium ausgewechselt und eine anschließende einstündige Ruhephase angeschlossen, bevor die Bakteriensuspension auf 50 °C erhitzt wurde, um einen Hitzeschock zu induzieren. Dadurch, so die Überlegung, würden die Bakterien von der stationären Phase, in die sie über Nacht geraten sein könnten, in die stoffwechselaktive Phase zurückkehren. Der über Nacht eventuell eingetretene Nährstoffmangel als möglicher Stressor würde damit aus dem System entfernt werden und die womöglich vorliegende erhöhte basale HSP-Expression würde sich durch Abbau von HSP wieder reduzieren und auf diese Weise so gering wie möglich sein. Somit würde durch den nachfolgenden Hitzeschock eine verstärkte HSP-Expression nachgewiesen werden können.

In der Auswertung zeigte sich allerdings, dass dieser Ansatz nicht den gewünschten Effekt hatte und es nicht zu einer nachweisbar erhöhten HSP-Expression durch Temperaturerhöhung kam. Unter diesem Gesichtspunkt konnte auf eine Wiederholung der bisherigen Experimente hinsichtlich der Vergleichbarkeit zum Temperatureffekt verzichtet werden.

St. Denis *et al.* führten einen Versuch zur HSP-Expression unter ähnlichen Versuchsbedingungen durch, in dem sie *E. coli* ebenfalls über 30 min einer Temperatur von 50 °C aussetzten (vgl. [105]). Im Unterschied zu den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen konnte von dieser Forschergruppe eine verstärkte HSP-Expression detektiert werden. Dies zeigt grundsätzlich, dass die in dieser Doktorarbeit gewählten Parameter wie Temperatur (50 °C) und Zeitdauer (30 min) geeignet scheinen einen ausreichenden Stress zu induzieren, ohne die Vitalität von *E. coli* zu beeinträchtigen. Allerdings konnte bis zum Abschluss dieser Arbeit kein ausreichender Hitzeschock durch eine Temperaturerhöhung erzielt werden.

6.3.2 DnaK-Induktion durch PIB

In der Einleitung wurde erklärt, dass bei angeregten PS zwei Wege der Energieabgabe existieren, die Typ I- und die Typ II-Reaktion (s. S. 15). Beide Typen können gleichzeitig auftreten, ihr Verhältnis hängt jedoch vom verwendeten PS sowie von den Konzentrationen von Substrat und Sauerstoff ab [106].

Die Photosensibilisatoren Methylenblau (MB) und Toluidinblau O (TBO) sind zwei bekannte, strukturell sehr ähnliche Vertreter aus der Gruppe der Phenothiazine und haben vergleichbare photochemische und -physikalische Eigenschaften (s. S. 18). Wie Ziegelhoffer *et al.* zeigen konnten, kann Methylenblau HSP induzieren [68]. Auch St. Denis *et al.* berichten von erhöhten HSP-Leveln unter Behandlung mit TBO, die nachzuweisenden Zielproteine hierbei waren GroEL und DnaK. Nach photodynamischer Behandlung waren die Expressionslevel von GroEL, bzw. DnaK in dieser Studie bis zu sieben-, bzw. dreimal so hoch wie die der Vergleichsproben. Die Bestimmung der aufgetragenen Proteinmenge erfolgte hierbei ausschließlich vor dem Lysieren und Blotten unter Verwendung der BCA-Methode (Proteinkonzentrationsbestimmung) und ohne eine weitere Visualisierung der Signalintensitäten der Proteinbanden oder eines Kontrollproteins (GAPDH) im Western-Blot [105].

Wie oben beschrieben, wurde in der vorliegenden Arbeit die Ladungskontrolle neben der BCA-Analyse auch per housekeeping-Protein durchgeführt. Es zeigte sich in der Auswertung der verschiedenen Blots, dass die Intensität der housekeeping-Proteinbanden (*Proben 6-8*) durchschnittlich um das 3,83-Fache gegenüber dem Vergleichswert (*Probe 1*) erhöht war. Somit bleibt die Frage offen, ob eine alleinige Ladungskontrolle mittels Bestimmung der Proteinkonzentration durch die BCA-Methode aussagekräftige Ergebnisse liefern kann, da die BCA lediglich die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Bakterienlysate erlaubt. Dadurch ist kein Rückschluss auf das Verhältnis der vorliegenden Proteine zueinander möglich. Durch ausschließliches Messen eines exemplarischen Proteins und dessen Expression kann damit keine Aussage über eine relative Steigerung der Expression getroffen werden.

Bolean *et al.* zeigten, dass PIB mit dem Fluoreszinderivat Bengalrosa (*Rose Bengal, RB*) in *Streptococcus mutans* zu einer verstärkten GroEL-Expression führte. Als internen Standard verwendeten sie drei Proteine, deren Expressionslevel sich unter den Stressbedingungen im Versuch (Exposition ggü. H_2O_2) nicht wesentlich änderten und aus diesem Grund als geeignet in Betracht gezogen wurden [107]. Jedoch ist hier anzumerken, dass diese Standardproteine *ex post* als solche definiert wurden, als sich im Western-Blot zeigte, dass deren Expression gleich blieb. Der Proteinnachweis im

Western-Blot erfolgte mittels Silberfärbung, welche zwar die empfindlichste unspezifische Färbemethode ist, dabei jedoch äußerst störanfällig ist und ein hohes Maß an Standardisierung erfordert. Sie ist aufwändig, zeitraubend (1-2 h), schwer exakt reproduzierbar und vor allem nicht quantifizierbar, da unterschiedliche Proteine verschieden intensiv angefärbt werden [108]. Als problematisch ist anzumerken, dass die in der Publikation von Boelan *et al.* verwendeten Proteine nicht weiter spezifiziert sondern nur anhand ihres Molekulargewichts kategorisiert wurden, so dass eine Vergleichbarkeit, bzw. Reproduzierbarkeit umso weniger gegeben ist.

Es ist davon auszugehen, dass der jeweils vorherrschende Typ von Energieübertrag von PS auf O₂ (Typ I- oder Typ II-Reaktion) eine nicht unwesentliche Rolle in der bakteriellen Antwort spielt.

PS, bei denen der Energieübertrag vom aktivierten Triplettzustand vorwiegend nach der Typ I-Reaktion abläuft, führen über Redox-Reaktionen zu ROS, gegen die bereits bakterielle Abwehrmechanismen bestehen, wie z. B. mit der Superoxiddismutase gegen das Superoxidanion.

Die sogenannte Quantenausbeute oder „quantum yield“ Φ_{Δ} beschreibt, welcher Prozentsatz der Energieabgabe als Typ II-Reaktion abläuft, entsprechend wie hoch die Singulett-Sauerstoffausbeute eines PS ist.

Laut Wilkinson *et al.* gelten dabei u. a. folgende Werte:

Φ_{Δ} [MB in H₂O] = 0,55 ([109], S. 262, No. 1.245)

Φ_{Δ} [RB in H₂O] = 0,76 ([109], S. 262, No. 1.169)

Φ_{Δ} [TMPyP in H₂O] = 0,77 ([109], S. 184, No. 2.117).

Man sieht, dass der quantum yield von MB im Vergleich zu TMPyP deutlich geringer ist, MB generiert weniger Singulett-Sauerstoff als TMPyP. Die von Ziegelhoffer *et al.* gemessene heatshock-Antwort unter photodynamischer Behandlung bei Verwendung von Methylenblau könnte also nicht nur durch Singulett-Sauerstoff, sondern auch durch die ebenfalls in starkem Ausmaß generierten weiteren ROS hervorgerufen worden sein [68].

Im Allgemeinen besitzen Phenothiazine eine $\Phi_{\Delta} < 0,5$ (vgl. [109], S. 161f, No. 1.240-1.246), sodass die Expression von HSP durch Toluidinblau O nach Lichtaktivierung nicht alleine nur auf Singulett-Sauerstoff zurückzuführen ist, sondern dass möglicherweise doch Typ I-erzeugte ROS eine wesentliche Rolle bei der Induktion von HSP spielen [105].

Das Porphyrinderivat TMPyP hat eine mit $\Phi_{\Delta}=0,77$ im Vergleich dazu stark erhöhte Quantenausbeute, der Energieübertrag läuft damit vorwiegend nach dem Typ II-Mechanismus ab, mit einer höheren $^1\text{O}_2$ -Ausbeute.

So gesehen sollte bei einem Vergleich der molekularen Auswirkungen eines PS auf Bakterien in Hinblick auf die HSP-Induktion immer auch der vorherrschende Reaktionsmechanismus des PS ins Auge gefasst werden. Ziegelhoffer *et al.* gehen davon aus, dass die von ihnen gemessene HSP-Induktion unter Methylenblau durch $^1\text{O}_2$ verursacht worden ist und führen an, dass $^1\text{O}_2$ die HSP-Expression sowohl direkt als auch indirekt hochreguliert [68]. Gerade in Anbetracht der Tatsache, dass MB vor allem Typ I-Reaktionen macht und damit die $^1\text{O}_2$ -Ausbeute vergleichsweise gering ist, wird sich die HSP-Expression vor allem mit dem vorherrschenden Typ I-Mechanismus begründen lassen anstatt mit dem eher weniger vorliegenden, $^1\text{O}_2$ -produzierenden Typ II-Mechanismus.

Die in dieser Doktorarbeit gemessenen DnaK-Level nach photodynamischer Behandlung waren in den Bakterienlysaten durchgehend erhöht, wie die densitometrische Auswertung der Blots ergab (vgl. **5.2.3**). Dies war in vier unabhängigen Experimenten der Fall. Exemplarisch ist hier noch einmal ein repräsentativer Blot abgebildet (vgl. **Abb. 44**).

Auffällig ist, dass auch in der nicht erhitzten, nicht mit Farbstoff versetzten und nicht belichteten Probe (*Probe 3*) ein stärkeres DnaK-Signal detektiert wurde als in der unbehandelten und bei RT belassenen Referenzprobe (*Probe 1*). Dies war in allen durchgeführten Blots der Fall. Ein Wärmereiz als eventuelle Ursache kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Proben zum einen nicht über RT erwärmt wurden und zum anderen die erhitzte Vergleichsprobe (*Probe 2*) ein schwächeres Signal zeigt.

Beim Vergleich der DnaK-Signale der Proben des "Photodynamik-Astes" des Versuches (*Proben 3-8*) fällt zudem auf, dass in den unbehandelten Proben erhöhte basale DnaK-Signale gemessen wurden (*Proben 3, 6-8*). "Unbehandelt" bedeutet hierbei Licht, aber kein PS (*Probe 3*) oder PS, aber kein Licht (*Proben 7-8*) oder keines von beiden (*Probe 6*).

Diese auffälligen, jedoch innerhalb dieses Versuchszweiges im Vergleich zur Referenzprobe (*Probe 1*) gleichsinnig erhöhten Werte kann man als starkes Indiz für eine veränderte Ausgangslage in diesem Versuchsteil werten.

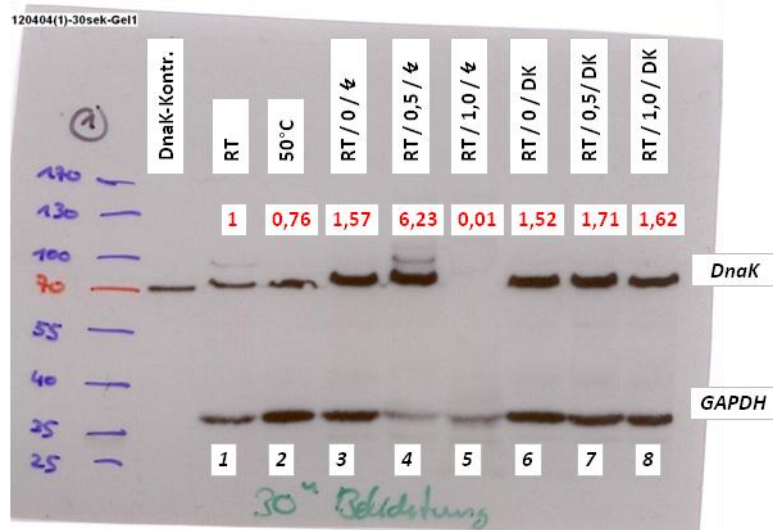


Abb. 44: repräsentativer Blot des Versuchs zur HSP-Expression unter PIB.

Probe 1: Referenzprobe, ohne PS, ohne Bestrahlung, bei RT belassen;

Probe 2: Referenzprobe, ohne PS, ohne Bestrahlung, Temperaturerhöhung auf 50 °C;

Proben 3-5: aufsteigende PS-Konzentration und Bestrahlung;

Proben 6-8: aufsteigende PS-Konzentration ohne Bestrahlung;

Die in **rot** dargestellten Werte geben die normierte Signalstärke der DnaK-Bande in Relation zur Referenzprobe (Probe 1) an.

Legende:

RT: Raumtemperatur | ½/DK: mit/ohne Bestrahlung ($12,06 \text{ J/cm}^2$)

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass die zeitliche Verzögerung der Versuchsdurchführung ein Bakterienwachstum begünstigt hat. Denn während die Proben 1+2 direkt nach der initialen halbstündigen Temperaturexposition separiert und lysiert wurden, durchliefen die Proben 3-8 das weitere Prozedere. Die alleinige Prozessdauer (Zentrifugieren, Inkubieren, Bestrahlen, nochmals Zentrifugieren) summierte sich auf 50 Minuten, wozu noch die Zeit gerechnet werden muss, die zum Pipettieren, etc. benötigt wird. Bei einer Generationszeit von 20 Minuten für *E. coli* könnte damit gut der Bereich einer relevanten Bakterienreplikation erreicht worden sein.

Was jedoch gegen diese Theorie spricht, dass aufgrund einer erhöhten Gesamtproteinmenge auch mehr housekeeping-Protein in den Proben 3-8 vorgelegen hat, ist, dass vor dem Beladen der Probenkammern im Gel (wells) des Western-Blots die BCA-Analyse mit Messung des Gesamtproteinkonzentration durchgeführt wurde. Gerade durch dieses Vorgehen sollte ein Angleichen des Gesamtproteingehalts der Proben erreicht werden. Die BCA-Analyse ergab für die Proben 3 und 6-8 durchgehend

erhöhte Werte der Gesamtproteinkonzentration im Vergleich zur den Proben 1+2, bzw. auch zu Probe 5 (*RT* / 1,0 / ϵ). Dies könnte zur Folge gehabt haben, dass durch die für diese Verdünnungsschritte notwendigen Pipettierschritte und die dabei mitunter stark variierenden zu transferierenden Volumina nach der BCA-Analyse und vor dem Beladen der wells ein interner Fehler aufgetreten ist. Das könnte zu der oben beschriebenen Auffälligkeit geführt haben.

Unabhängig davon sollte durch das in 4.7 beschriebene Vorgehen der densitometrischen Auswertung der Graustufen der Banden in der Blotauswertung eine relative Vergleichbarkeit der einzelnen Signale trotz schwanker Füllmengen erreicht worden sein.

Es fällt auf, dass in der Probe der höchsten PS-Konzentration von 1,0 μ M TMPyP und anschließender Bestrahlung (*Probe 5*) ein sehr schwaches housekeeping-Signal und so gut wie kein DnaK-Signal detektiert werden konnte. Diese Beobachtung konnte in allen unabhängigen Experimenten wiederholt gemacht werden (vgl. **Abb. 44**).

Diese Tatsache, dass in Probe 5 generell wenig Protein vorzuliegen schien, und das im Gegensatz dazu bei 0,5 μ M TMPyP und Bestrahlung (*Probe 4*) noch deutlich vorhandene housekeeping- sowie stark erhöhte DnaK-Signal lassen einen starken oxidativen Schaden des Bakteriums unter 1,0 μ M TMPyP vermuten. Die Epitope der Antigene GAPDH und DnaK waren nicht mehr in ausreichender Integrität vorhanden, damit der jeweilige Antikörper ausreichend binden konnte. Kohärent dazu wurde in den für diese Arbeit durchgeführten Toxizitätstest zur Dosisfindung (vgl. 5.2.3.1) festgestellt, dass bei einer PS-Konzentration von 0,5 μ M die Bakterien effektiv reduziert werden, ohne jedoch vollständig abgetötet zu werden, während bei 1 μ M eine starke Reduktion um deutlich mehr als 5 \log_{10} -Stufen erreicht wurde. Der Unterschied zwischen subletaler und letaler Dosis, der sich in den Toxizitätstests zeigte, spiegelt sich damit auch in den Ergebnissen der Western-Blots anschaulich wieder.

Die verwendete Methoden und der dazugehörige experimentelle Ablauf zeigen, dass ein Nachweis von HSP möglich ist und dass nach einer Stimulierung mit subletalen Dosen eines photodynamischen Prozesses eine Induktion von DnaK als relevantem HSP erfolgte, die mittels Western-Blot nachgewiesen werden konnte.

6.4 Verbesserungsvorschläge

zu 5.2.2 Toxizität von Hitzeschock und PIB im Vergleich

In diesem Versuchsteil, der den Effekt einer der photodynamischen Behandlung vorausgehenden Temperaturexposition mit dadurch einhergehender HSP-Expression untersuchte, konnte kein protektiver Einfluss i. S. e. eines besseren Überlebens nach PIB festgestellt werden. Ursache dafür könnte sein, dass die für diese Arbeit gewählte Versuchsparameter nicht ausreichend war, um HSP zu induzieren, wie unter **6.3.1** schon diskutiert.

Da jedoch nach subletaler Bestrahlung eindeutig eine Erhöhung der HSP-Level festgestellt wurde (vgl. **5.2.3.2**), ließe sich dieser Effekt ausnutzen, indem man untersucht, welchen Einfluss hinsichtlich einer protektiven Wirkung gegenüber dem photodynamischen Prozess durch eine erhöhte HSP-Expression eine vorhergehende subletale Bestrahlung auf eine nachfolgende Bestrahlung mit höherer Dosis hat.

zu 4.6.3 Kontrolle: DnaK-Induktion durch Hitzeschock

Da die Induktion von HSP durch Erhitzen auf 50 °C auch im modifizierten Versuchsaufbau nicht gelang, könnte man diesen an weiteren Stellen ändern.

Ein möglicher Ansatzpunkt wäre es, auch während der Versuchsdurchführung für bessere O₂-Versorgung zu sorgen: zum einen vor der Temperaturexposition das Medium zu wechseln (wie geschehen), nun jedoch die Bakteriensuspension für die gleiche Zeit oder auch länger (zwei bis drei Stunden) im Schikanekolben schwenken zu lassen. Zum anderen könnte man die Suspension auch während der Temperaturexposition rütteln bzw. schwenken, damit sich die Bakterien nicht nur in einer stoffwechselaktiven, sondern tatsächlich in einer log-Wachstumsphase befinden.

Ein Wechsel des Mediums im Anschluss an die Temperaturexposition mit anschließender abermaliger Ruhepause ist ebenfalls in Erwägung zu ziehen, um die Bakterien mit neuen Nährstoffen zu versorgen. Sever *et al.* zeigten, dass gerade in der Erholungsphase eine vermehrte DnaK-Expression vorliegt. Sie setzten denselben *E. coli*-Stamm ein, der auch für diese Doktorarbeit verwendet wurde (ATCC 25922), den sie über eine Zeitspanne von 105 min von 37 °C auf 55 °C erhitzen und wieder auf 37 °C abkühlen ließen. Nach weiteren 12 h bei 37 °C wurden 6fach erhöhte DnaK-Werte pro Bakterienzelle festgestellt. Darüber hinaus zeigten sich die derart vorbehandelten Zellen widerstandsfähiger gegenüber erneutem Hitzestress [110].

Übertragen auf die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bedeutet das, dass versucht werden könnte, eine längere Rekuperationszeit als 30 min nach Temperaturerhöhung anzusetzen.

Auch könnte versucht werden, das Experiment mit einem anderen *E. coli*-Stamm statt des ATCC 25922 durchzuführen, wie z. B. mit dem von St. Denis *et al.* eingesetzten ATCC 33780 [105] oder den von Mizushima *et al.* verwendeten *E. coli*-Stämmen, bzw. Mutanten K-12, W3110 oder KY1429 [111].

zu 6.3.2 DnaK-Induktion durch PIB

Wie in 6.3.2 beschreiben, wurden im PS-Ast trotz Ladungskontrolle mit BCA-Analyse konsequent erhöhte Signalintensitäten des housekeeping-Proteins GAPDH festgestellt, was die Vergleichbarkeit der Werte erschwerte. Ein in Erwägung zu ziehender Schritt ist die interne Referenz statt mit den Intensitäten der Blotsignale mit der spezifischen Enzymaktivität von GAPDH (in U/mg Gesamtprotein) zu bilden.

Dazu wird zunächst die Gesamtproteinkonzentration bestimmt, z. B. mittels des Bradford-Tests (vgl. [112]). Im Anschluss daran wird die Aktivität des entsprechenden Zielenzyms photometrisch bestimmt. Das Bakterienzelllysate, in dem das Enzym enthalten ist und dessen Gesamtproteingehalt zuvor gemessen wurde, wird zu einem vorgefertigten Substratgemisch gegeben, das die vom zu untersuchenden Enzym umzusetzenden Substrate enthält. GAPDH katalysiert unter NAD^+ - und Phosphatverbrauch sowie NADH/H^+ -Produktion die Umwandlung von Glycerinaldehydphosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Indem man die Zunahme der NADH/H^+ -Konzentration photometrisch gegen die Zeit bestimmt, bekommt man die Aktivität des Enzyms in Units (U). Ein U entspricht dabei 1 μMol umgesetztes Substrat pro Minute. Bezieht man diese nun auf die eingangs bestimmte Gesamtproteinkonzentration, erhält man die spezifische Enzymaktivität in U pro mg Gesamtprotein (vgl. auch [113]).

Um nun die DnaK-Konzentration, die durch Western-Blot und damit in einem denaturierendem Verfahren bestimmt wird, in Relation zur spezifischen GAPDH-Aktivität setzen zu können, könnte man versuchen, die Proben nach der Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration auf die beiden Versuchsäste (DnaK-Bestimmung durch Western-Blot einerseits sowie Bestimmung der spez. GAPDH-Aktivität andererseits) aufzuteilen.

Dadurch wäre pro Probe ein exakter Bezugspunkt festgelegt und die Vergleichbarkeit auch der DnaK-Signale besser gegeben.

7 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte in zwei Versuchskomplexen sowohl der Einfluss einer IPL-Blitzlichtlampe auf die photodynamische Inaktivierung von antibiotikaresistenten und -suszeptiblen Keimen als auch die Wirkung und Auswirkung des Hitzeschockproteins DnaK auf die photodynamische Suszeptibilität von *E. coli* *in vitro* untersucht werden.

In Zeiten steigender Resistenzraten von Bakterien gegen Antibiotika bietet sich mit dem Wirkprinzip der Photodynamik ein vielversprechender Weg, auch in Zukunft Infektionen – nicht nur bakterieller Art – zu begegnen. Das Manko von photodynamischen Prozessen liegt bisher sowohl in den langen Inkubationszeiten von Farbstoff und Zielstruktur (Bakterien, Viren, Pilzen) als auch langen Expositionszeiten gegenüber der Belichtung. Diese sind notwendig, damit der PS bei den inkubierten Organismen eine photodynamische antimikrobielle Wirkung entfalten kann.

Bei Bakterien sind eine Reihe von unspezifischen Abwehrmechanismen bekannt, mit denen diese auf Stressfaktoren reagieren. Einer dieser Wege ist die Ausbildung von sogenannten heatshock- oder Hitzeschockproteinen (HSPs). Diese Klasse von Reparaturproteinen dient dazu, fehlgefaltete Proteine wiederherzustellen, was die schädliche Wirkung der ursächlichen Stressoren zu reduzieren hilft. HSP-Expression unter photodynamischer Behandlung wurde bereits beschrieben, in dieser Doktorarbeit sollte darüber hinaus untersucht werden, in welchem Maß eine erhöhte Expression von HSP-Proteinen – am Beispiel von DnaK – zu einer verstärkten Widerstandsfähigkeit der Bakterien gegenüber der PIB beitragen könnte.

7.1 Blitzlichtverfahren mit IPL

Im ersten Teil der Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich die bis dato in langen Belichtungszeiten übertragenen Lichtdosen in kurzer Zeit applizieren ließen und wie sich das auf den antimikrobiellen photodynamischen Effekt auswirke.

Dazu wurden verschiedene Bakterien mit TMPyP, einem in der Literatur gut bekannten und unter konventionellen Bedingungen (lange Belichtung) gut antimikrobiell wirksamen PS, inkubiert und anschließend durch eine handelsübliche Blitzlichtlampe IPL mit hochenergetischen Lichtblitzen von max. 100 ms Dauer belichtet. Die insgesamt applizierte Lichtdosis entsprach dabei mindestens derjenigen, die auch in konventionellen Versuchen mit 30 oder mehr Minuten Belichtungszeit erreicht wurde.

Nach einer sehr kurzen Inkubationszeit von 10 s und einer Konzentration des Photosensibilisators TMPyP von 10 μM zeigte eine Belichtung von lediglich 83 ms bei *S. aureus*, zwei unterschiedliche MRSA-Stämme sowie *B. atrophaeus* eine antibakterielle Effizienz von 99,999 %, was einer Reduktion um 5 \log_{10} -Stufen entspricht, unabhängig vom Antibiotikaresistenzmuster der verwendeten Isolate. Beim ebenfalls untersuchten Keim *E. coli* zeigte sich, dass stärkere Bedingungen notwendig waren, um den gleichen reduktiven Effekt zu erzielen. Hier wurden – bei derselben Inkubationszeit (10 s) – eine PS-Konzentration von 100 μM und drei Lichtblitze á 100 ms benötigt, um dieselbe Reduktionsrate zu erzielen.

7.2 Heatshock-Antwort

Der zweite Teil der vorliegenden Doktorarbeit hatte die bakteriellen Antwortmechanismen auf photodynamische Behandlung zum Gegenstand. Die an anderer Stelle schon beobachtete reaktive HSP-Expression nach Stress unterschiedlicher Art sollte hinsichtlich ihres Vorhandenseins und Ausprägung nach Inkubation mit dem PS TMPyP und nachfolgender Bestrahlung untersucht werden.

Wurden Suspensionen von *E. coli* mit 0,5 μM TMPyP inkubiert und anschließend bestrahlt (subletale photodynamische Bedingungen), konnten mittels Western-Blot erhöhte Level des heatshock-Proteins DnaK nachgewiesen werden. Der Vergleich erfolgte mittels Bezugnahme auf die simultane Expression des housekeeping-Proteins GAPDH.

Es zeigte sich bei einer Konzentration von 1,0 μM TMPyP und Bestrahlung mit 12,06 J/cm^2 , dass fast keine Proteine mehr nachweisbar waren, sowohl housekeeping- als auch heatshock-Protein waren in deutlich reduzierter Konzentration vorhanden. Als Grund hierfür ist höchstwahrscheinlich der starke oxidative Schaden durch generierten Singulett-Sauerstoff und ROS zu sehen.

Erhöhte Expression von HSP erzeugt eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress (ROS). In dieser Arbeit führte eine Temperaturerhöhung (50 °C) bei *E. coli* nicht zu einem abgeschwächten antimikrobiellen Effekt i. S. e. erhöhten Widerstandsfähigkeit gegen die nachfolgende PIB (Erzeugung von oxidativem Stress). Es konnte auch hier eine Reduktion um mehr als 5 \log_{10} -Stufen erreicht werden.

Gleichwohl ist anzumerken, dass durch die Temperaturerhöhung auf 50 °C keine vermehrte DnaK-Expression nachweisbar war.

8 AUSBLICK

Mit der Meldung vom 23.05.2013, dass das neuartige Antibiotikum Dalbavancin (Dalvance®) von der US-amerikanischen Arzneimittelaufsichtsbehörde FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) zugelassen wurde, gibt es seit Längerem wieder einen neuen Wirkstoff in der Klasse der Antibiotika [114]. Daneben veröffentlichten Corey *et al.* erst im Juni 2014 im *New England Journal of Medicine* eine Studie, in der sie die gute Wirksamkeit des neues Antibiotikums Oritavancin bei bakteriellen Hautinfektionen hervorheben [115]. Die Zulassung durch die FDA ist noch ausstehend.

Doch ungeachtet dieser beiden Erfolgsmeldungen steht die Gesellschaft im Kampf gegen multiresistent-bakterielle Infektionen mit Antibiotika zusehends auf verlorenem Posten. Die photodynamische Inaktivierung von Bakterien wird keine vollständige Alternative zur Antibiotika-Therapie darstellen, dazu fehlt ihr alleine die intrakorporale Applikabilität. Vielmehr bietet sich die PIB als synergistischer Behandlungsansatz an, der die Langlebigkeit und Wirkdauer von Antibiotika im klinischen Alltag durchaus erhöhen könnte. Gerade in Bereichen, in denen die Stärken der PIB liegen, wie z. B. der Oberflächenwirksamkeit, könnte dieser Synergismus bei synchronem Gebrauch von PIB und Antibiotika stark zum Tragen kommen.

Patienten mit chronisch infizierten Wunden leiden häufig unter vaskulären Grunderkrankungen, die Infektionen des peripheren Gewebes durch Sauerstoff- und Nährstoffmangelversorgung begünstigen. Darüber hinaus gelangen systemisch verabreichte Antibiotika durch die Grunderkrankung erschwert zum Ort des Geschehens. In oberflächlichen Wunden herrscht zudem eine Wundflora, die nicht den optimalen Wirkbedingungen der meisten Antibiotika entspricht (z. B. durch pH-Wert-Alterationen oder Biofilmbildung).

Eine vielversprechende, erste klinische Phase-IIa-Studie zur PIB abseits des Mausmodells wurde 2013 von Morley *et al.* im *British Journal of Dermatology* veröffentlicht. Dort wurden die Wunden von Patienten mit infizierten chronisch-venösen und diabetischen Fußulzera erfolgreich photodynamisch behandelt. Neben einer Dekolonisierung wurde darüber hinaus auch eine verbesserte Heilungstendenz in Vergleich zur Referenzgruppe beobachtet [116].

Auch neben diesem patientenzentrierten Einsatzgebiet ist eine Verwendung der PIB vorstellbar, z. B. in Form von „autodekolonisierenden Oberflächen“. Durch Einbettung des PS in entsprechende Trägersubstanzen kann erreicht werden, dass die Bakterien nicht direkt mit dem PS, sondern lediglich mit den generierten ROS in Kontakt kommen.

Die *Queen's University of Belfast* hat im Jahr 2007 ein Patent auf eine derartige Technik eingereicht [117] und dieselbe Arbeitsgruppe arbeitet auch momentan an der Weiterentwicklung von photodynamisch-aktiven Lacken und Farben [118]. Wie sie in ihrer Zusammenfassung erwähnen, ist gerade die Verwendung im Gesundheitssektor zur Beschichtung von Türklinen, Patientenbettgestellen, aber genauso von Wand- oder Deckenflächen besonders interessant, um eine nosokomiale Verbreitung von Krankenhauskeimen zu verhindern.

Von besonderem Interesse dürfte hierbei sein, Photosensibilisatoren mit hoher Quantenausbeute zu entwickeln, die unter vergleichsweise geringen Lichtdosen wie durch Tageslicht oder Raumbeleuchtung Singulett-Sauerstoff in ausreichendem Maß erzeugen, um effizient eine Keimreduktion auf photodynamisch-aktiven Oberflächen aller Art zu ermöglichen.

Daher wurde auch hier an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie in der Arbeitsgruppe „Antimicrobial Photodynamic and Cold Plasma“, in der auch diese Doktorarbeit entstanden ist, eine neue Photosensibilisatorklasse entwickelt. Dabei handelt es sich um SAPYR, einen wasserlöslichen und fotostabilen PS. Dieser weist ein Φ_{Δ} von 99 % auf und zeigte in photodynamischen Experimenten antimikrobielle Effekte sowohl gegen Bakterien in Suspension wie im Biofilm [119]. Nun wäre es interessant herauszufinden, inwiefern von einem derartigen „nur-Typ II-PS“ eine HSP-Induktion bei Bakterien induziert werden kann.

Auch der kombinierte Effekt von SAPYR mit IPL stellt einen vielversprechenden Forschungsansatz dar.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ζ	Belichtung/Bestrahlung (<i>gem. beschriebenen Parametern</i>)
Φ_{Δ}	Quantenausbeute (<i>erzeugte 1O_2-Moleküle pro vom PS absorbiertem Photon</i>)
A	Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
CFU	colony-forming unit; Kolonie bildende Einheit
cm ²	Quadratzentimeter
Da	Dalton; 1 Da = 1 u = $1,661 \times 10^{-27}$ kg \triangleq 10^{-3} kg mol ⁻¹
DK	Dunkelkontrolle
DnaK	eukaryotisches HSP (70 kDa)
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (36 kDa)
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSP	heatshock protein; Hitzeschockprotein
IPL	intense pulsed light
J	Joule; 1 J = 1 kg m ² s ⁻²
kDa	10 ³ Dalton
kg	Kilogramm
L	Liter
µg	10 ⁻⁹ Kilogramm (<i>10⁻⁶ Gramm</i>)
µL	10 ⁻⁶ Liter

µm	10 ⁻⁶ Meter
µM	10 ⁻⁶ mol L ⁻¹
M	mol L ⁻¹
m	Meter
MB	Methylenblau
mg	10 ⁻⁶ Kilogramm (10 ⁻³ Gramm)
mL	10 ⁻³ Liter
min	Minute
mol	1 mol \triangleq 6,022 x 10 ²³ Teilchen
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
nm	10 ⁻⁹ Meter
ÜN	Übernacht (-kultur, z. B.)
¹ O ₂	Sauerstoff im Singulettzustand, Singulett-Sauerstoff
³ O ₂	Sauerstoff im Triplettzustand, Triplett-Sauerstoff
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PIB	Photodynamische Inaktivierung von Bakterien
PDT	Photodynamische Therapie
PS	Photosensibilisator
RB	Rose Bengal
rpm	Umdrehungen pro Minute

ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMPyP	5,10,15,20-Tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin
u	atomare Einheit; $1 \text{ u} = 1 \text{ Da} = 1,661 \times 10^{-27} \text{ kg} \triangleq 10^{-3} \text{ kg mol}^{-1}$
W	Watt

LITERATURVERZEICHNIS

1. ECDC, *Interactive Database*. http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/table_reports.aspx, 2012.
2. Hof, H., Dörries, R., *Duale Reihe: Medizinische Mikrobiologie*. 3 ed. 2005: Georg Thieme Verlag.
3. ECDC, *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1011_SUR_annual_EARS_Net_2009.pdf, 2010.
4. Arzneimittelkommission-UKR, *Arzneimittelliste - Kalkulierte Initialtherapie von Infektions-erkrankungen, Stand: Januar 2012*. 2012.
5. DANMAP, *DANMAP 2011 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark*. http://www.danmap.org/Downloads/~media/Projekt%20sites/Danmap/DANMAP%20reports/Danmap_2011.ashx, 2012: p. 28.
6. AHI. *The Antibiotic Ban in Denmark*. [cited 2012-11-26]; Available from: <http://www.ahi.org/issues-advocacy/animal-antibiotics/the-antibiotic-ban-in-denmark-a-case-study-on-politically-driven-bans/>.
7. AHI. *Antibiotics and Risk*. [cited 2012-11-26]; Available from: <http://www.ahi.org/issues-advocacy/animal-antibiotics/antibiotics-and-danger/>.
8. WHO, *The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals. Report of a WHO Meeting. Berlin, Germany, 13-17 October 1997*. WHO/EMC/ZOO/97.4, 1997.
9. Ferber, D., *Infectious disease. From pigs to people: the emergence of a new superbug*. Science, 2010. **329**(5995): p. 1010-1.
10. Birosova, L. and M. Mikulasova, *The effect of environmental pollutants and food processing on the development of antibiotic resistance*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2012.
11. Kardas, P., et al., *A systematic review and meta-analysis of misuse of antibiotic therapies in the community*. Int J Antimicrob Agents, 2005. **26**(2): p. 106-13.
12. Mitchison, D.A., *How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 1998. **2**(1): p. 10-5.
13. Niederman, M.S., *Principles of appropriate antibiotic use*. Int J Antimicrob Agents, 2005. **26 Suppl 3**: p. S170-5.
14. Coates, A.R. and Y. Hu, *Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections*. Br J Pharmacol, 2007. **152**(8): p. 1147-54.
15. Cottagnoud, P., et al., *Preincubation of pneumococci with beta-lactams alone or combined with levofloxacin prevents quinolone-induced resistance without increasing intracellular levels of levofloxacin*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(8): p. 3517-9.

16. Firsov, A.A., et al., *Testing the mutant selection window hypothesis with Staphylococcus aureus exposed to daptomycin and vancomycin in an in vitro dynamic model*. J Antimicrob Chemother, 2006. **58**(6): p. 1185-92.
17. Epstein, B.J., J.G. Gums, and K. Drlica, *The changing face of antibiotic prescribing: the mutant selection window*. Ann Pharmacother, 2004. **38**(10): p. 1675-82.
18. Livermore, D.M., *The need for new antibiotics*. Clin Microbiol Infect, 2004. **10 Suppl 4**: p. 1-9.
19. Fox, J.L., *The business of developing antibacterials*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(12): p. 1521-8.
20. Spellberg, B., et al., *Trends in antimicrobial drug development: implications for the future*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(9): p. 1279-86.
21. Butler, M.S. and M.A. Cooper, *Antibiotics in the clinical pipeline in 2011*. J Antibiot (Tokyo), 2011. **64**(6): p. 413-25.
22. Tsiodras, S., et al., *Linezolid resistance in a clinical isolate of Staphylococcus aureus*. Lancet, 2001. **358**(9277): p. 207-8.
23. Meka, V.G. and H.S. Gold, *Antimicrobial resistance to linezolid*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(7): p. 1010-5.
24. Toh, S.M., et al., *Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant Staphylococcus aureus resistant to the synthetic antibiotic linezolid*. Mol Microbiol, 2007. **64**(6): p. 1506-14.
25. Nannini, E., B.E. Murray, and C.A. Arias, *Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Curr Opin Pharmacol, 2010. **10**(5): p. 516-21.
26. Heinrich-Böll-Stiftung, *Fleischatlas 2013 - Daten und Fakten über Tiere als Nahrungsmittel*. http://www.bund.net/fileadmin/bundnet/publikationen/landwirtschaft/130108_bund_landwirtschaft_fleischatlas.pdf, 2013.
27. Raab, O., *Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien*. Z Biol, 1900. **39**: p. 524-526.
28. von Tappeiner, H. and A. Jodlbauer, *Über die Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme*. Arch Klin Med, 1904. **80**: p. 427-487.
29. IHM. *Herrmann v. Tappeiner*. [cited 2012-11-26]; Available from: <http://ihm.nlm.nih.gov/luna/servlet/detail/NLMNLM~1~1~101430162~190132:Hermann-v--Tappeiner?qvq=w4s:/what/Portraits;lc=NLMNLM~1~1&mi=3679&trs=25624#>.
30. Jesionek, H. and H. Tappeiner, *Zur Behandlung der Hautcarcinome mit fluoreszierenden Stoffen*. Dtsch Arch Klin Med, 1905. **82**: p. 223-226.
31. Hausmann, W.H., *Die sensibilisierende Wirkung tierischer Farbstoffe und ihre physiologische Bedeutung*. Wien Klin Wochenschr, 1908. **21**: p. 1527-1529.

32. Meyer-Betz, F., *Untersuchung über die biologische (photodynamische) Wirkung des Hämatoporphyrins und anderer Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs*. Dtsch Arch Klin Med, 1913. **112**: p. 476-503.
33. Policard, A., *Studies of experimental tumours under Wood's light*. Comp Rend Soc Biology, 1924. **91**: p. 1423-1428.
34. Auler, H. and G. Banzer, *Untersuchung über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren*. Z Krebsforsch, 1942. **53**: p. 65-68.
35. Figge, F.H.J., G.S. Weiland, and D.J. Manganiello, *Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins*. Proc Soc Biol Med, 1948. **68**(640-641).
36. Parrish, J.A., et al., *Photochemotherapy of psoriasis with oral methoxalen and longwave ultraviolet light*. N Engl J Med, 1974. **291**: p. 1207-1211.
37. Dougherty, T.J., et al., *Photodynamic therapy*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(12): p. 889-905.
38. Wainwright, M., *Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT)*. J Antimicrob Chemother, 1998. **42**(1): p. 13-28.
39. Hamblin, M.R. and T. Hasan, *Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?* Photochem Photobiol Sci, 2004. **3**(5): p. 436-50.
40. Maisch, T., et al., *Antibacterial photodynamic therapy in dermatology*. Photochem Photobiol Sci, 2004. **3**(10): p. 907-17.
41. Pereira Gonzales, F. and T. Maisch, *Photodynamic inactivation of microorganisms as an innovative approach to kill mucocutaneous and skin microorganisms*. G Ital Dermatol Venereol, 2010. **145**(4): p. 477-89.
42. Maisch, T., *A new strategy to destroy antibiotic resistant microorganisms: antimicrobial photodynamic treatment*. Mini Rev Med Chem, 2009. **9**(8): p. 974-83.
43. Dai, T., Y.Y. Huang, and M.R. Hamblin, *Photodynamic therapy for localized infections--state of the art*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2009. **6**(3-4): p. 170-88.
44. Maisch, T., et al., *Antibakterielle Photodynamische Therapie*. Hautarzt, 2005. **56**(11): p. 1048-55.
45. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy*. Lancet, 1984. **1**(8391): p. 1396-7.
46. Jones, L.R. and L.I. Grossweiner, *Singlet oxygen generation by Photofrin in homogeneous and light-scattering media*. J Photochem Photobiol B, 1994. **26**(3): p. 249-56.
47. Szeimies, R.M., et al., *9-Acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn), a novel photosensitizer for photodynamic therapy: uptake kinetics and intracellular localization*. J Photochem Photobiol B, 1996. **34**(1): p. 67-72.

48. Aveline, B., *Primary processes in photosensitization mechanisms.*, in *Comprehensive Series in Photosciences. Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology*. 2001, Elsevier: Amsterdam. p. 17-37.
49. Sharma, S.K., et al., *Drug discovery of antimicrobial photosensitizers using animal models*. *Curr Pharm Des*, 2011. **17**(13): p. 1303-19.
50. Menezes, S., M.A. Capella, and L.R. Caldas, *Photodynamic action of methylene blue: repair and mutation in Escherichia coli*. *J Photochem Photobiol B*, 1990. **5**(3-4): p. 505-17.
51. Dobson, J. and M. Wilson, *Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser*. *Arch Oral Biol*, 1992. **37**(11): p. 883-7.
52. Wainwright, M., et al., *A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1997. **19**(1): p. 75-80.
53. Nitzan, Y., A. Balzam-Sudakevitz, and H. Ashkenazi, *Eradication of Acinetobacter baumannii by photosensitized agents in vitro*. *J Photochem Photobiol B*, 1998. **42**(3): p. 211-8.
54. Nitzan, Y. and H. Ashkenazi, *Photoinactivation of Acinetobacter baumannii and Escherichia coli B by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths*. *Curr Microbiol*, 2001. **42**(6): p. 408-14.
55. Feese, E. and R.A. Ghiladi, *Highly efficient in vitro photodynamic inactivation of Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother*, 2009. **64**(4): p. 782-5.
56. Quiroga, E.D., et al., *Mechanistic aspects of the photodynamic inactivation of Candida albicans induced by cationic porphyrin derivatives*. *Eur J Med Chem*, 2012. **58**: p. 332-9.
57. Maisch, T., et al., *Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(4): p. 1542-52.
58. Osawa, E., *Superaromaticity*. 「化学」 (Kagaku), 1970. **25**: p. 854–863.
59. Kroto, H., et al., *C60: Buckminsterfullerene*. *Nature*, 1985. **318**: p. 162-163.
60. Tegos, G.P., et al., *Cationic fullerenes are effective and selective antimicrobial photosensitizers*. *Chem Biol*, 2005. **12**(10): p. 1127-35.
61. Miller, S.S. and E. Eisenstadt, *Enhanced sensitivity of Escherichia coli umuC to photodynamic inactivation by angelicin (isopsoralen)*. *J Bacteriol*, 1985. **162**(3): p. 1307-10.
62. Brancalion, L. and H. Moseley, *Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy*. *Lasers Med Sci*, 2002. **17**(3): p. 173-86.
63. Goldman, M.P., R.A. Weiss, and M.A. Weiss, *Intense pulsed light as a nonablative approach to photoaging*. *Dermatol Surg*, 2005. **31**(9 Pt 2): p. 1179-87; discussion 1187.
64. Raulin, C., B. Greve, and H. Grema, *IPL technology: a review*. *Lasers Surg Med*, 2003. **32**(2): p. 78-87.

65. Shamban, A.T., *Current and new treatments of photodamaged skin*. Facial Plast Surg, 2009. **25**(5): p. 337-46.
66. Ritossa, F., *A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila*. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), 1962. **18**(12): p. 571–573.
67. De Maio, A., *Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams*. Shock, 1999. **11**(1): p. 1-12.
68. Ziegelhoffer, E.C. and T.J. Donohue, *Bacterial responses to photo-oxidative stress*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(12): p. 856-63.
69. Miles, A.A., S.S. Misra, and J.O. Irwin, *The estimation of the bactericidal power of the blood*. J Hyg (Lond), 1938. **38**(6): p. 732-49.
70. Arsene, F., T. Tomoyasu, and B. Bukau, *The heat shock response of Escherichia coli*. Int J Food Microbiol, 2000. **55**(1-3): p. 3-9.
71. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. J Biotechnol, 1999. **75**(2-3): p. 291-5.
72. Goldsworthy, S.M., et al., *Variation in expression of genes used for normalization of Northern blots after induction of cell proliferation*. Cell Prolif, 1993. **26**(6): p. 511-8.
73. Choi, J.K., et al., *Phorbol esters selectively and reversibly inhibit a subset of myofibrillar genes responsible for the ongoing differentiation program of chick skeletal myotubes*. Mol Cell Biol, 1991. **11**(9): p. 4473-82.
74. Serels, S., et al., *Molecular studies of human connexin 43 (Cx43) expression in isolated corporal tissue strips and cultured corporal smooth muscle cells*. Int J Impot Res, 1998. **10**(3): p. 135-43.
75. Petersen, B.H., et al., *Effect of treatment with biosynthetic human growth hormone (GH) on peripheral blood lymphocyte populations and function in growth hormone-deficient children*. J Clin Endocrinol Metab, 1990. **70**(6): p. 1756-60.
76. Tang, W.W., et al., *Leukemia inhibitory factor ameliorates experimental anti-GBM Ab glomerulonephritis*. Kidney Int, 1996. **50**(6): p. 1922-7.
77. Zwirgmaier, K., W. Ludwig, and K.H. Schleifer, *Recognition of individual genes in a single bacterial cell by fluorescence in situ hybridization--RING-FISH*. Mol Microbiol, 2004. **51**(1): p. 89-96.
78. DGHM, D.-K.d., *Anforderungskatalog für die Aufnahme von chemischen Desinfektionsverfahren in die Desinfektionsmittel-Liste der DGHM*. 2002: p. 9-16.
79. Maisch, T., et al., *Fast and effective: intense pulse light photodynamic inactivation of bacteria*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2012. **39**(7): p. 1013-21.
80. Axxora. *DnaK (E. coli)(recomb) Produktdatenblatt*. 2012 01.02.2012]; Available from: http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/reports/els_1323691225.pdf.
81. Ehrenberg, B., Z. Malik, and Y. Nitzan, *Fluorescence spectral changes of hematoporphyrin derivative upon binding to lipid vesicles, Staphylococcus aureus and Escherichia coli cells*. Photochem Photobiol, 1985. **41**(4): p. 429-35.

82. Vaara, M., et al., *Characterization of the lipopolysaccharide from the polymyxin-resistant pmrA mutants of Salmonella typhimurium*. FEBS Lett, 1981. **129**(1): p. 145-9.
83. Pfeltz, R.F., et al., *Characterization of passage-selected vancomycin-resistant Staphylococcus aureus strains of diverse parental backgrounds*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(2): p. 294-303.
84. Jaffe, A., Y.A. Chabbert, and O. Semonin, *Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams*. Antimicrob Agents Chemother, 1982. **22**(6): p. 942-8.
85. Wu, C.P., C.H. Hsieh, and Y.S. Wu, *The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy*. Mol Pharm, 2011. **8**(6): p. 1996-2011.
86. Webber, M.A. and L.J. Piddock, *The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(1): p. 9-11.
87. Li, X.Z. and H. Nikaido, *Efflux-mediated drug resistance in bacteria*. Drugs, 2004. **64**(2): p. 159-204.
88. Li, X.Z. and H. Nikaido, *Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update*. Drugs, 2009. **69**(12): p. 1555-623.
89. Poole, K., *Efflux-mediated antimicrobial resistance*. J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(1): p. 20-51.
90. Poole, K., *Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms*. Ann Med, 2007. **39**(3): p. 162-76.
91. Nakonieczna, J., et al., *Superoxide dismutase is upregulated in Staphylococcus aureus following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment*. BMC Microbiol, 2010. **10**: p. 323.
92. Benov, L.T. and I. Fridovich, *Escherichia coli expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25310-4.
93. Battistoni, A., et al., *Increased expression of periplasmic Cu,Zn superoxide dismutase enhances survival of Escherichia coli invasive strains within nonphagocytic cells*. Infect Immun, 2000. **68**(1): p. 30-7.
94. Turrens, J.F., *Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain*. Biosci Rep, 1997. **17**(1): p. 3-8.
95. Mehdy, M.C., *Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens*. Plant Physiol, 1994. **105**(2): p. 467-472.
96. Wilkinson, F., W.P. Helman, and A.B. Ross, *Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution - an expanded and revised compilation*. Journal of Physical and Chemical Reference Data, 1995. **24**(2): p. 663-1021.
97. Maisch, T., et al., *Determination of the antibacterial efficacy of a new porphyrin-based photosensitizer against MRSA ex vivo*. Photochem Photobiol Sci, 2007. **6**(5): p. 545-51.

98. Omar, G.S., M. Wilson, and S.P. Nair, *Lethal photosensitization of wound-associated microbes using indocyanine green and near-infrared light*. BMC Microbiol, 2008. **8**: p. 111.
99. Sharma, M., et al., *Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(1): p. 299-305.
100. Dai, T., et al., *Photodynamic therapy for Acinetobacter baumannii burn infections in mice*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(9): p. 3929-34.
101. Goldman, M.P., *Treatment of benign vascular lesions with the Photoderm VL high-intensity pulsed light source*. Adv Dermatol, 1997. **13**: p. 503-21.
102. Babilas, P., et al., *Intense pulsed light (IPL): a review*. Lasers Surg Med, 2010. **42**(2): p. 93-104.
103. Ellipse. *Ellipse IPL-PLUS*. [cited 2012-12-10]; Available from: <http://www.ellipse.org/en-NEW/-Ellipse-I%C2%B2PL-PLUS.1846.aspx>.
104. Eichner, A., et al., *Dirty hands: photodynamic killing of human pathogens like EHEC, MRSA and Candida within seconds*. Photochem Photobiol Sci, 2012. **12**(1): p. 135-47.
105. St Denis, T.G., et al., *Analysis of the bacterial heat shock response to photodynamic therapy-mediated oxidative stress*. Photochem Photobiol, 2011. **87**(3): p. 707-13.
106. Castano, A.P., T.N. Demidova, and M.R. Hamblin, *Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2004. **1**: p. 279-293.
107. Bolean, M., et al., *Photodynamic therapy with rose bengal induces GroEL expression in Streptococcus mutans*. Photomed Laser Surg, 2010. **28 Suppl 1**: p. S79-84.
108. Poehling, H.-M. and V. Neuhoff, *Visualization of proteins with a silver "stain": A critical analysis* Electrophoresis, 1981. **2**(3): p. 141-147.
109. Wilkinson, F., W.P. Helman, and A.B. Ross, *Quantum yields for the photosensitized formation of lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution*. J. Phys. Chem. Ref. Data, 1993. **22**(1): p. 113-262.
110. Seyer, K., et al., *Escherichia coli heat shock protein DnaK: production and consequences in terms of monitoring cooking*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(6): p. 3231-7.
111. Mizushima, T., M. Matsuo, and K. Sekimizu, *Induction of DnaK and GroEL heat shock proteins by fluoroquinolones in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(1): p. 193-5.
112. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem., 1976. **72**: p. 248–254.
113. Eichner, A., *Anpassung von Pseudomonas aeruginosa an die Mukoviszidose-Lunge: anaerobe Regulation metabolischer Schlüsselenzyme*, in Fakultät für Biologie. 2012, Ludwig-Maximilian-Universität: München. p. 69ff.

114. FDA. *FDA approves Dalvance to treat skin infections*. [cited 2014-05-12]; Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm398724.htm>.
115. Corey, G.R., et al., *Single-dose oritavancin in the treatment of acute bacterial skin infections*. N Engl J Med, 2014. **370**(23): p. 2180-90.
116. Morley, S., et al., *Phase IIa randomized, placebo-controlled study of antimicrobial photodynamic therapy in bacterially colonized, chronic leg ulcers and diabetic foot ulcers: a new approach to antimicrobial therapy*. Br J Dermatol, 2012. **168**(3): p. 617-24.
117. WIPO. *Word Intellectual Property Organization - Patent WO/2007/088392*. [cited 2014 - 06-23]; Available from: <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2007088392>.
118. QUB. *Queen's University of Belfast/Enterprise Development: Photodynamic Antimicrobial Paints & Varnishes*. [cited 2014-06-23]; Available from: <http://www.qub.ac.uk/directorates/EnterpriseDevelopment/CommercialOpportunities/AllLicensingOpportunities/PhotodynamicAntimicrobialPaintsVarnishes/>.
119. Cieplik, F., et al., *Photodynamic biofilm inactivation by SAPYR--an exclusive singlet oxygen photosensitizer*. Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 477-87.

PRÄSENTATIONEN UND PUBLIKATIONEN

Posterpräsentationen

Struck by lightning: Speedy photodynamic killing of MRSA and E. coli by intense pulse light

Spannberger, F., Regensburger, J., Felgenträger, A., Bäumler, W., Maisch, T.; 9th International Symposium on Photodynamic Therapy and Photodiagnosis in Clinical Practice, Brixen, Brixen-Bressanone, Italien. (16.–20. Oktober 2012)

Publikationen

Fast and effective: intense pulse light photodynamic inactivation of bacteria

Maisch, T., Spannberger, F., Regensburger, J., Felgenträger, A., Bäumler, W., Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2012. **39**(7): p. 1013-21

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Franz R. Spannberger
Geburtstag	09. Mai 1987
Geburtsort	Regensburg
Adresse	Bernhardstr. 7 D-93053 Regensburg

WERDEGANG UND PRAKTIKA

2007–2014	Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg
06.2014	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote „gut“
09.2009	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote „gut“

Praktisches Jahr

10.2013–01.2014	Prof. Dr. Steuer, Klinik für Chirurgie, Universidad Austral de Chile (Hospital Base Valdivia, Valdivia/Chile)
06.2013–10.2013	Prof. Dr. Pfeiffer, Abteilung für Pulmonologie, Krankenhaus Donaustauf, Lehrstuhl der Universität Donaustauf Prof. Dr. Riegger, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II (Kardiologie), Universität Regensburg Prof. Dr. Müller-Schilling, Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I (Gastroenterologie), Universität Regensburg Prof. Dr. Fleck, Klinik und Poliklinik für Rheumatologie, Asklepios Klinikum Bad Abbach, Universität Regensburg
02.2013–06.2013	Prof. Dr. Seelbach-Göbel, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Krankenhaus St. Hedwig, Lehrstuhl der Universität Regensburg

Famulaturen

07.2012–08.2012	Gynäkologie und Geburtshilfe, Krankenhaus St. Hedwig, Regensburg
04.2011–04.2011	Ambulante Patientenversorgung, Institut für Überdruck-Medizin, Regensburg
08.2010–09.2010	Ambulanz und Primärversorgung, Hospital Filadelfia, Filadelfia (Paraguay)
04.2010–04.2010, 07.2010–08.2010	Orthopädie und Unfallchirurgie/ Thoraxchirurgie, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder, Regensburg

Weiteres

01.2010	Druckkammerbediener (zertifiziert nach GTÜM, VDD)
---------	---

DANKSAGUNG

Mein Dank geht an Prof. Dr. Wolfgang Bäumler und besonders an meinen Doktorvater PD Dr. Tim Maisch für die Bereitstellung und die Betreuung der Arbeit. Während der gesamten Labor- und Bearbeitungszeit stand er mir stets mit Rat und Tat zur Seite und begegnete mir nie ablehnend, wenn ich mit Fragen oder Anmerkungen auf ihn zukam. Unter seiner Leitung finden sich in seiner Arbeitsgruppe sehr angenehme Arbeitsbedingungen gepaart mit hohem wissenschaftlichem Standard und ich bin sehr froh und dankbar, das erlebt haben zu dürfen. Ich könnte mir keinen Betreuer vorstellen, dem ich an seiner Statt den Vorzug gegeben hätte.

Mein Dank gilt ebenso Ewa Kowalewski und Francesco Santarelli, die mich vor allem in der Anfangszeit unterstützt und mir geduldig und ausführlich die Gerätschaften und das wissenschaftliche Arbeiten mit denselben erklärt haben. Darüber hinaus sorgten sie wie auch alle ihre Kolleginnen und Kollegen für gute Stimmung, was mir so manches tristes Pipettieren und Ausplattieren erleichterte.

Danke an die ganze Arbeitsgruppe, es hat mir viel Spaß bereitet, mit euch zusammenzuarbeiten! Namentlich: Anja Eichner, Ariane Felgenträger, Anita Gollmer, Johannes Regensburger, Tatjana Schifferstein und Petra Unger.

Danke auch an Eva Peterhof (die ich noch als Herschberger kenne), die mir vor allem während des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit eine große Hilfe war, als es galt, die Unbilden des Western-Blots auszuhalten. Ohne sie wäre meine Frustrationstoleranz definitiv um einiges mehr strapaziert worden.

In diesem Zusammenhang danke auch an Fernanda Pereira Gonzalez, die als Leidensgenossin des Blottens die Höhen und Tiefen des Laboralltags mit mir durchlitt. Herzlichen Glückwunsch zum Doktorgrad!

Gracias a mi polola por la motivación final de llevar esta tesis a término poniéndome un “plazo límite emocional”. ¡Eres irremplazable!

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen geliebten Eltern. Ohne Euch und Eure vorbehaltlose Unterstützung in allen Belangen während des gesamten Studiums (und auch schon die ganzen Jahre zuvor) stünde ich nicht dort, wo ich jetzt bin. Danke, dass Ihr meinen Wissensdurst nicht nur gutgeheißen, sondern stets auch gefordert und gefördert habt!

Nisi dominus frustra.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Weitere Personen waren an der inhaltlich materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 10.07.2014

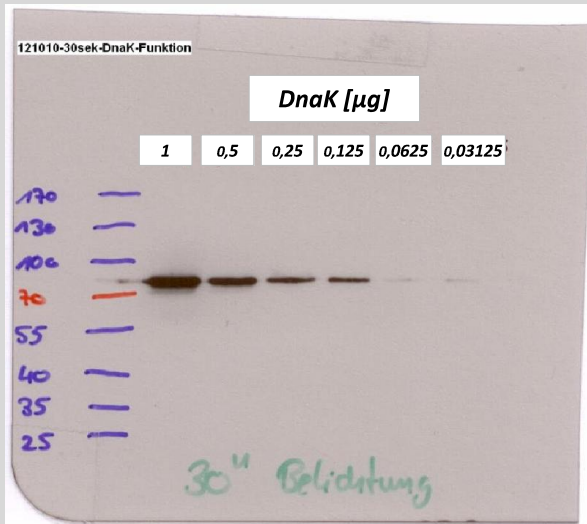
Franz R. Spannberger

ANHANG

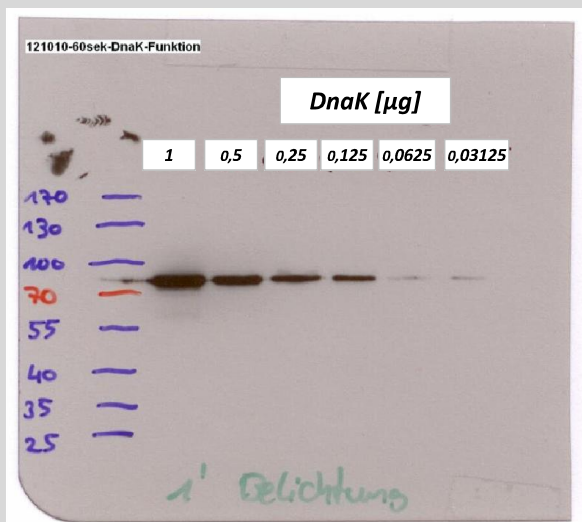
Legende zur Systematik der Sortierung der Western-Blots

	<u>Methode</u>	<u>Ergebnis</u>	<u>Diskussion</u>
DnaK-Antikörperfunktionalität	gem. Kap. 4.6.2	Kap. 5.2.1.1	---
RT-50°C (1)	gem. Kap. 4.6.3	Kap. 5.2.1.2	Kap. 6.3.1
RT-50°C (2)	gem. Kap. 4.6.3	Kap. 5.2.1.2	Kap. 6.3.1
RT-50°C-PIB im Vergleich	gem. Kap. 4.6.4	Kap. 5.2.3.2	Kap. 6.3.2

121010-DnaK-Antikörperfunktionalität-30sek



121010-DnaK-Antikörperfunktionalität-60sek



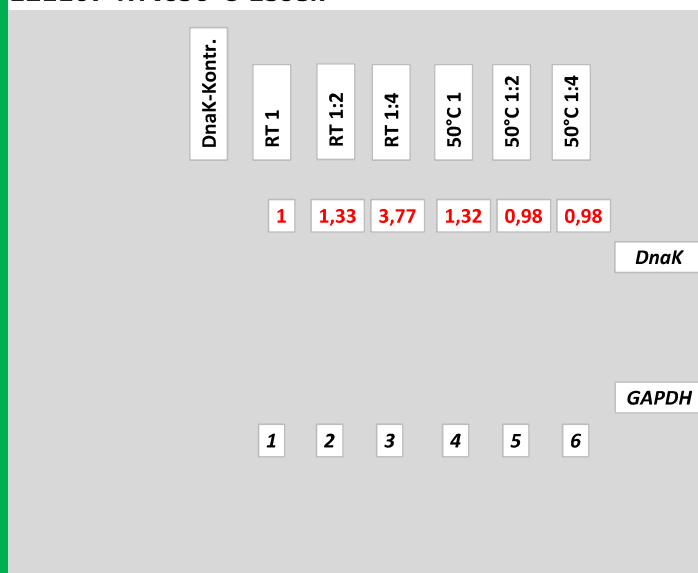
30sek: 30 Sekunden Belichtungszeit im Entwickler

60sek: 60 Sekunden -"-

90sek: 90 Sekunden -"-

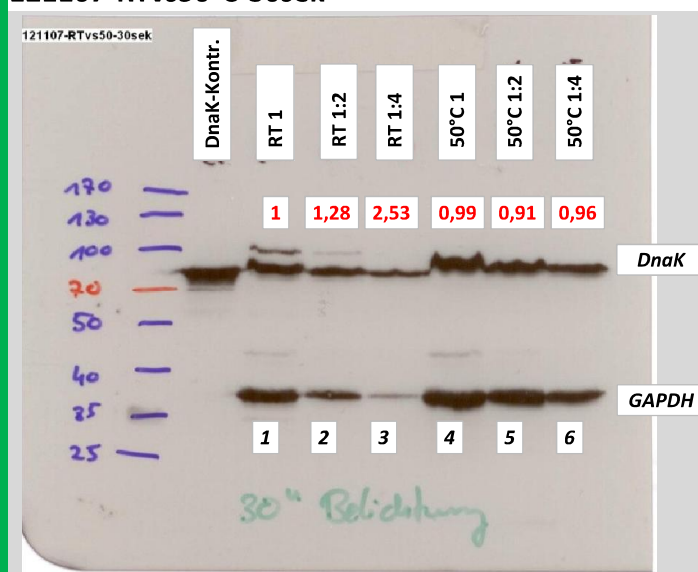
120sek: 120 Sekunden -"-

121107-RTvs50°C-15sek



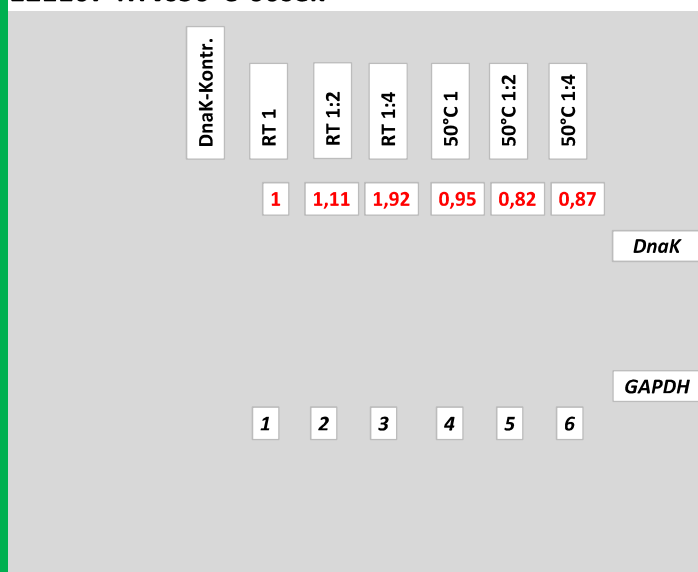
<i>DnaK</i>	area	percent	rel. Density	adj. Density	
1	8565,518	18,668	1	1,00	RT 1
2	6351,669	13,843	0,74153632	1,33	RT 1:2
3	4353,841	9,489	0,50830298	3,77	RT 1:4
4	10805,83	23,551	1,2615706	1,32	50°C 1
5	8913,933	19,428	1,04071138	0,98	50°C 1:2
6	6891,497	15,02	0,80458539	0,98	50°C 1:4
<i>GAPDH</i>	area	percent	rel. Density	1,09	
1	9111,569	22,027	1		
2	5081,79	12,285	0,55772461		
3	1228,941	2,971	0,13487992		
4	8721,468	21,083	0,95714351		
5	9709,589	23,472	1,06560131		
6	7513,033	18,162	0,82453353		

121107-RTvs50°C-30sek



<i>DnaK</i>	area	percent	rel. Density	adj. Density	
1	10963,08	18,283	1	1,00	RT 1
2	8126,589	13,552	0,74123503	1,28	RT 1:2
3	6262,64	10,444	0,57124104	2,53	RT 1:4
4	14131,63	23,567	1,28901165	0,99	50°C 1
5	11778,44	19,642	1,07433135	0,91	50°C 1:2
6	8702,347	14,512	0,79374282	0,96	50°C 1:4
<i>GAPDH</i>	area	percent	rel. Density	0,95	
1	11252,71	19,533	1		
2	6522,64	11,322	0,57963446		
3	2543,619	4,415	0,22602775		
4	14691,73	25,502	1,30558542		
5	13295,78	23,079	1,18153893		
6	9302,761	16,148	0,82670353		

121107-RTvs50°C-60sek



<i>DnaK</i>	area	percent	rel. Density	adj. Density	
1	10386,42	19,062	1	1,00	RT 1
2	7783,983	14,286	0,74944917	1,11	RT 1:2
3	6636,832	12,18	0,63896758	1,92	RT 1:4
4	12726,22	23,356	1,22526492	0,95	50°C 1
5	9761,004	17,914	0,93977547	0,82	50°C 1:2
6	7194,205	13,203	0,69263456	0,87	50°C 1:4
<i>GAPDH</i>	area	percent	rel. Density	0,88	
1	10447,28	19,091	1		
2	7080,447	12,939	0,67775392		
3	3468,255	6,338	0,3319889		
4	13467,18	24,61	1,2890891		
5	11932,93	21,806	1,14221361		
6	8326,619	15,216	0,79702478		

DnaK: DnaK-Level

GAPDH: GAPDH-Level, housekeeping-Protein

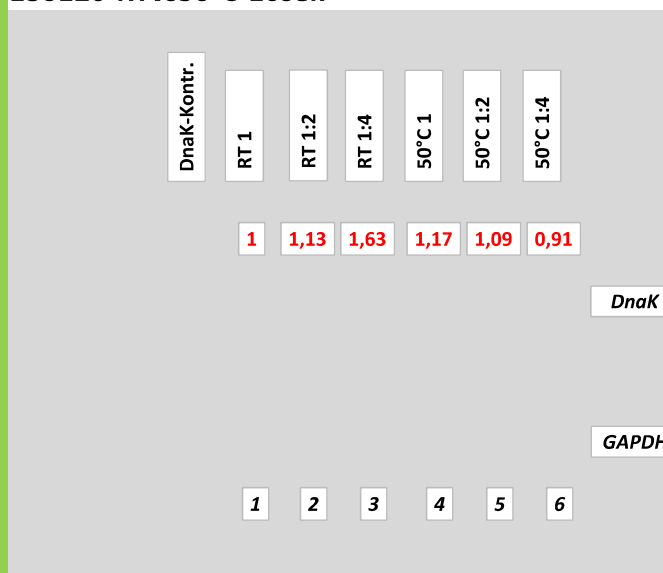
30sek: 30 Sekunden Belichtungszeit im Entwickler

60sek: 60 Sekunden -"

90sek: 90 Sekunden -"

120sek: 120 Sekunden -"

130126-RTvs50°C-10sek



DnaK	area	percent	rel. Density	adj. Density	
1	8768,296	14,547	1	1,00	RT 1
2	6242,983	10,357	0,7119681	1,13	RT 1:2
3	5145,276	8,536	0,58678765	1,63	RT 1:4
4	17456,65	28,961	1,99085722	1,17	50°C 1
5	14003,1	23,232	1,59703032	1,09	50°C 1:2
6	8659,861	14,367	0,98762631	0,91	50°C 1:4
GAPDH	area	percent	rel. Density	1,06	
1	11468,59	16,032	1		
2	7229,033	10,106	0,63036427		
3	4136,497	5,783	0,36071607		
4	19481,7	27,234	1,69872754		
5	16744,08	23,407	1,46001747		
6	12474,1	17,438	1,0876996		

15sek/30sek/60sek haben zu starke Signale

DnaK: DnaK-Level

GAPDH: GAPDH-Level, housekeeping-Protein

30sek: 30 Sekunden Belichtungszeit im Entwickler

60sek: 60 Sekunden -"-

90sek: 90 Sekunden -"-

120sek: 120 Sekunden -"-

im Ggs. zu 07.11.12 hier mit Mediumwechsel und 60'-Pause vor Temperaturexposition
(hier ebenfalls keine relativ verstärkte HSP-Expression messbar)

Referenz:		
HSP-Level Probe 1		
HSP ↑	HSP _{basal}	
RT / 0.5 / ½	MW (3,6-8) µSD	
6,23	1,61 ± 0,08	
	-	
	1,605069979 MW (adj. Dens. 3,6-8)	
	0,079870529 SD (adj. Dens. 3,6-8)	

DnaK	area	percent	rel. Density	ad. Density
1	3542,598	6,122	1	1,00 RT
2	5159,376	8,915	1,4562235	0,76 50°C
3	9368,761	16,189	2,6443973	1,57 RT / 0 / ½
4	11766,024	20,331	3,3209735	6,23 RT / 0.5 / ½
5	18,536	0,032	0,005227	0,01 RT / 1.0 / ½
6	10001,347	17,282	2,8229337	1,52 RT / 0 / DK
7	10009,296	17,296	2,8252205	1,71 RT / 0.5 / DK
8	8005,033	13,833	2,2595557	1,62 RT / 1.0 / DK
GAPDH	area	percent	rel. Density	
1	5123,669	9,331	1	
2	9759,225	17,773	1,9047262	
3	8603,619	15,668	1,6791341	
4	2730,205	4,972	0,5328475	
5	3536,497	6,44	0,6901725	
6	9537,569	17,369	1,8614296	1,65
7	8488,69	15,459	1,6567356	
8	7130,912	12,986	1,3917051	

DnaK	area	percent	rel. Density	ad. Density
1	1733,113	48,996	1	1,00 RT
2	1804,113	51,004	1,0409829	0,45 50°C

GAPDH	area	percent	rel. Density
1	4076,012	30,149	1
2	9443,69	69,851	2,3168596

DnaK: DnaK-Level

GAPDH: GAPDH-Level, housekeeping-Protein

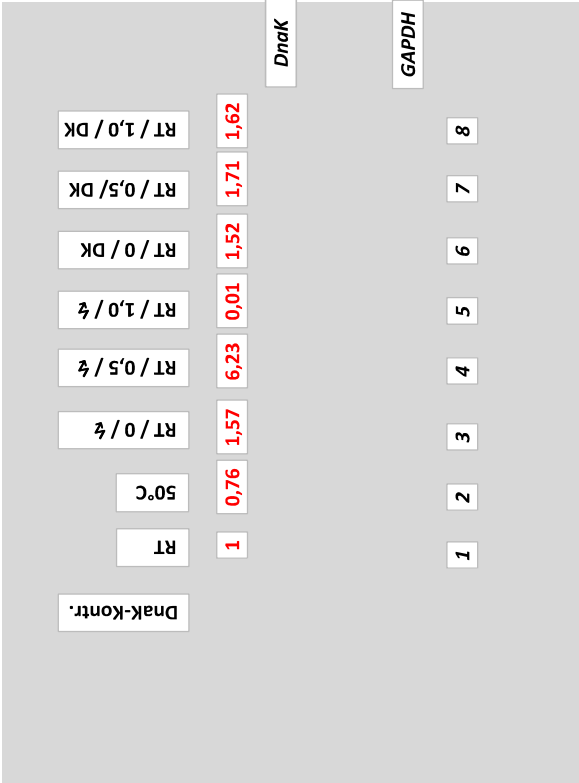
30sek: 30 Sekunden Belichtungszeit im Entwickler

60sek: 60 Sekunden

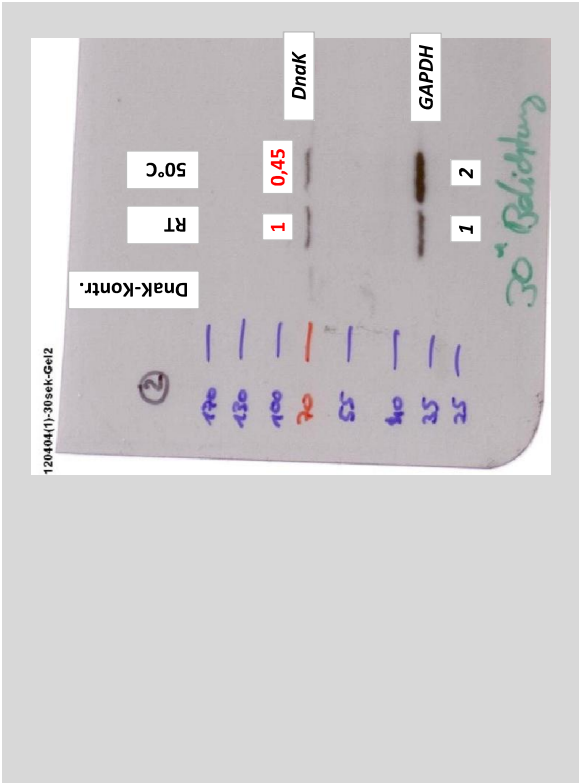
90sek: 90 Sekunden

120sek: 120 Sekunden

120404(1)-30sek-Gel1



120404(1)-30sek-Gel2



Referenz:		
HSP-Level Probe 1		
HSP ↑	HSP _{basal}	
RT / 0.5 / ¼	MW (3,6,8)±SD	
5,03	1,79 ± 0,12	
	-	
	1,79173058 MW (adj. Dens. 3,6-8)	
	0,116263667 SD (adj. Dens. 3,6-8)	
Mittelwerte V120404(1)		
5,63		

DnaK	area	percent	rel. Density	ad. Density
1	4212,134	6,491	1	1,00 RT
2	5594,326	8,621	1,3281467	0,83 50°C
3	10035,953	15,466	2,3826837	1,65 RT / 0 / ¼
4	14693,116	22,643	3,4883685	5,03 RT / 0.5 / ¼
5	92,364	0,142	0,0218764	0,02 RT / 1.0 / ¼
6	10659,296	16,427	2,5307349	1,75 RT / 0 / DK
7	10576,953	16,3	2,5111693	1,91 RT / 0.5 / DK
8	9026,347	13,91	2,1429672	1,85 RT / 1.0 / DK
GAPDH	area	percent	rel. Density	
1	6531,376	10,476	1	
2	10401,175	16,683	1,5924971	
3	9420,397	15,11	1,4423444	
4	4526,326	7,26	0,6930126	
5	5885,054	9,439	0,9010118	
6	9465,79	15,183	1,4493127	1,34
7	8568,962	13,744	1,3119511	
8	7546,376	12,104	1,1554028	

DnaK	area	percent	rel. Density	ad. Density
1	2877,477	50,093	1	1,00 RT
2	2866,77	49,907	0,9962869	0,57 50°C

GAPDH	area	percent	rel. Density
1	6256,447	36,279	1
2	10988,811	63,721	1,7564156

DnaK: DnaK-Level

GAPDH: GAPDH-Level, housekeeping-Protein

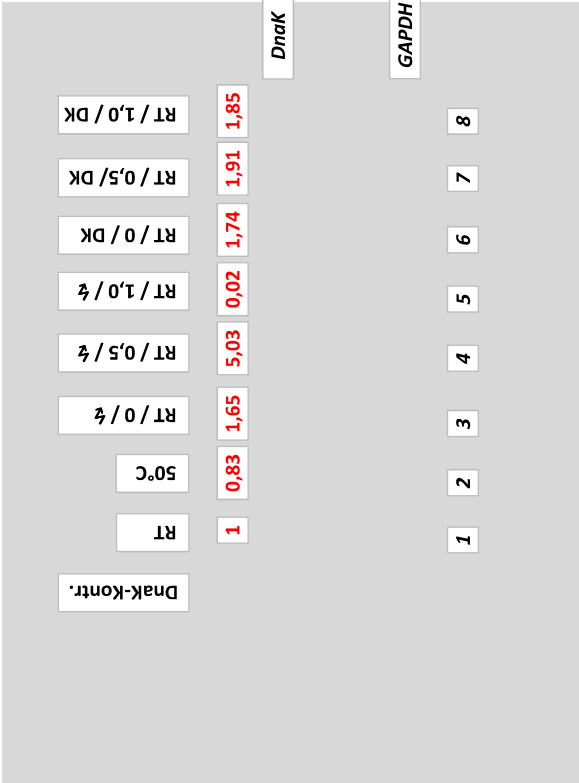
30sek: 30 Sekunden Belichtungszeit im Entwickler

60sek: 60 Sekunden

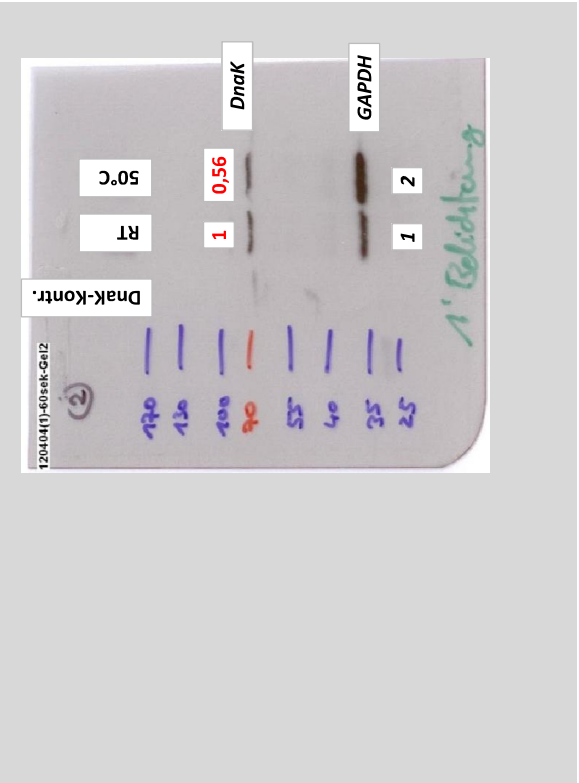
90sek: 90 Sekunden

120sek: 120 Sekunden

120404(1)-60sek-Gel1



120404(1)-60sek-Gel2



Referenz:		
HSP-Level Probe 1		
HSP ↑ RT / 0.5 / ¼		HSP _{basal} MW (3,6-8) kSD
13,56		5,54 ± 1,20
		-
		5,539478105 MW (adj. Dens. 3,6-8)
		1,202559475 SD (adj. Dens. 3,6-8)

DnaK	area	percent	rel. Density	ad. Density
1	102,607	0,263	1	1,00 RT
2	2044,941	5,251	19,965779	2,03 50°C
3	7911,64	20,316	77,247148	6,21 RT / 0 / ¼
4	7135,459	18,323	69,669202	13,56 RT / 0.5 / ¼
5	20,828	0,053	0,2015209	0,02 RT / 1.0 / ¼
6	6061,004	15,564	59,178707	3,82 RT / 0 / DK
7	6392,104	16,414	62,410646	5,62 RT / 0.5 / DK
8	9273,66	23,814	90,547529	6,51 RT / 1.0 / DK
GAPDH	area	percent	rel. Density	
1	479,163	1,284	1	
2	4721,891	12,657	9,8574766	
3	5959,134	15,973	12,440031	
4	2461,548	6,598	5,1386293	
5	4284,841	11,485	8,944704	
6	7413,669	19,872	15,476636	13,24
7	5323,669	14,27	11,113707	
8	6663,983	17,862	13,911215	
DnaK	area	percent	rel. Density	ad. Density
1	267,678	6,532	1	1,00 RT
2	3830,012	93,468	14,309247	1,19 50°C

GAPDH	area	percent	rel. Density
1	722,941	7,699	1
2	8667,619	92,301	11,9887

DnaK: DnaK-Level

GAPDH: GAPDH-Level, housekeeping-Protein

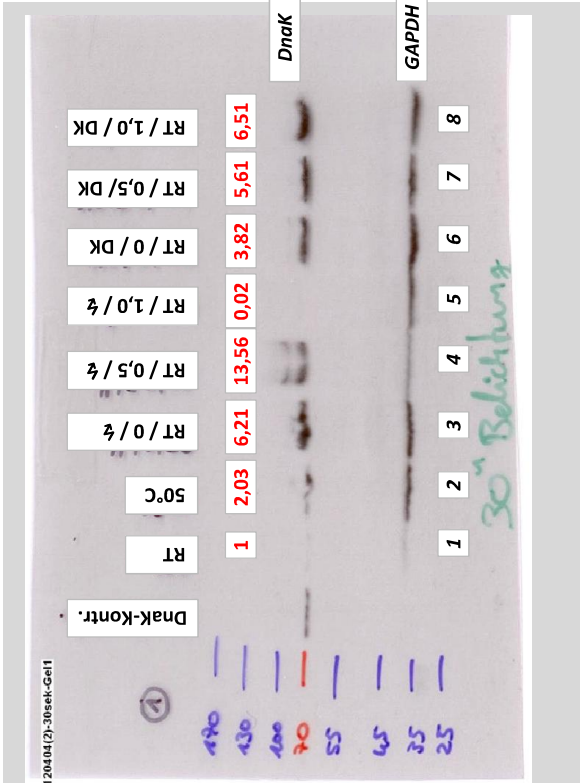
30sek: 30 Sekunden Belichtungszeit im Entwickler

60sek: 60 Sekunden

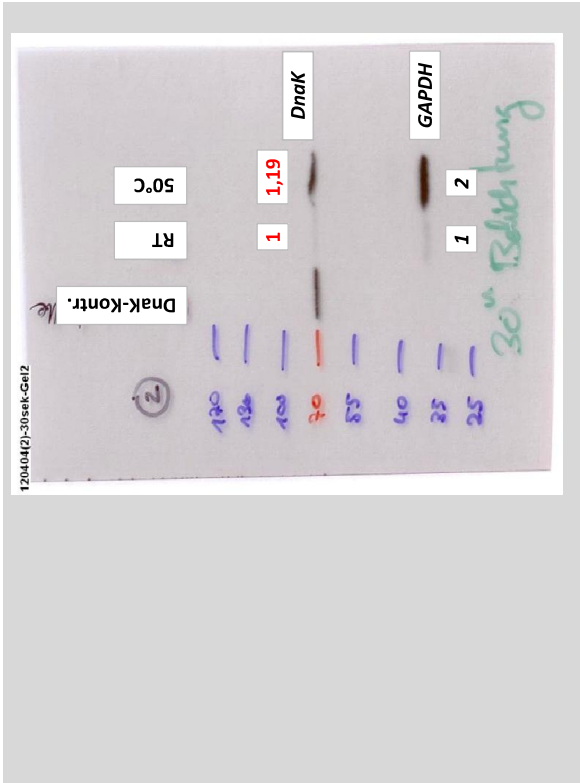
90sek: 90 Sekunden

120sek: 120 Sekunden

120404(2)-30sek-Gel1



120404(2)-30sek-Gel2



Referenz:		
HSP-Level Probe 1		
HSP ↑	HSP _{basal}	
RT / 0.5 / ¼	MW (3,6-8) _{±SD}	
15,55	7,09 ± 1,46	
	-	
	7,091202809 MW (adj. Dens. 3,6-8)	
	1,459178141 SD (adj. Dens. 3,6-8)	
Mittelwerte V120404(2)		
14,55		

DnaK	area	percent	rel. Density	ad. Density
1	134,142	0,28	1	1,00 RT
2	2692,598	5,621	20,075	2,72 50°C
3	9427,66	19,68	70,285714	7,85 RT / 0 / ¼
4	9927,823	20,724	74,014286	15,55 RT / 0.5 / ¼
5	27,95	0,058	0,2071429	0,03 RT / 1.0 / ¼
6	7539,125	15,738	56,207143	5,07 RT / 0 / DK
7	7801,882	16,286	58,164286	7,04 RT / 0.5 / DK
8	10353,196	21,612	77,185714	8,40 RT / 1.0 / DK
GAPDH	area	percent	rel. Density	
1	804,284	1,755	1	
2	5929,376	12,94	7,3732194	
3	7197,497	15,707	8,9498575	
4	3828,154	8,354	4,760114	
5	5115,841	11,164	6,3612536	
6	8914,761	19,455	11,08547	9,37
7	6645,74	14,503	8,2638177	
8	7387,326	16,121	9,185755	
DnaK	area	percent	rel. Density	ad. Density
1	517,87	9,787	1	1,00 RT
2	4773,719	90,213	9,2176356	1,16 50°C

GAPDH	area	percent	rel. Density
1	1285,012	11,19	1
2	10198,518	88,81	7,9365505

DnaK: DnaK-Level

GAPDH: GAPDH-Level, housekeeping-Protein

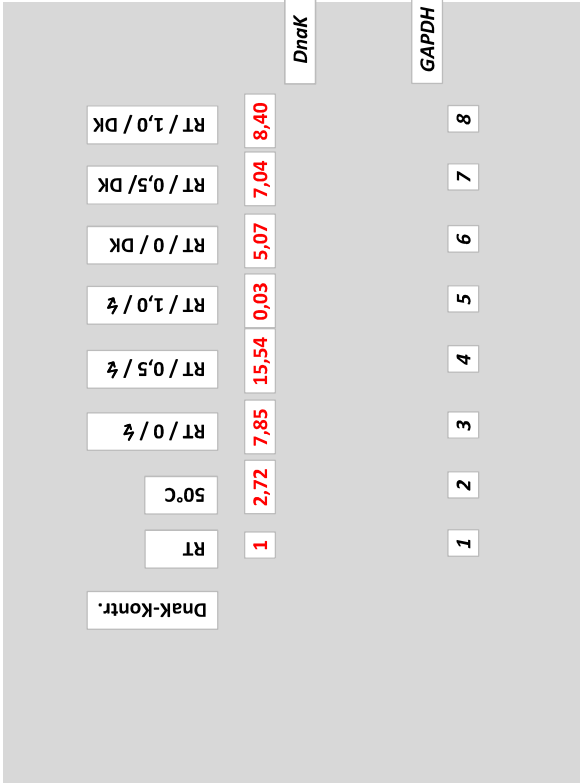
30sek: 30 Sekunden Belichtungszeit im Entwickler

60sek: 60 Sekunden

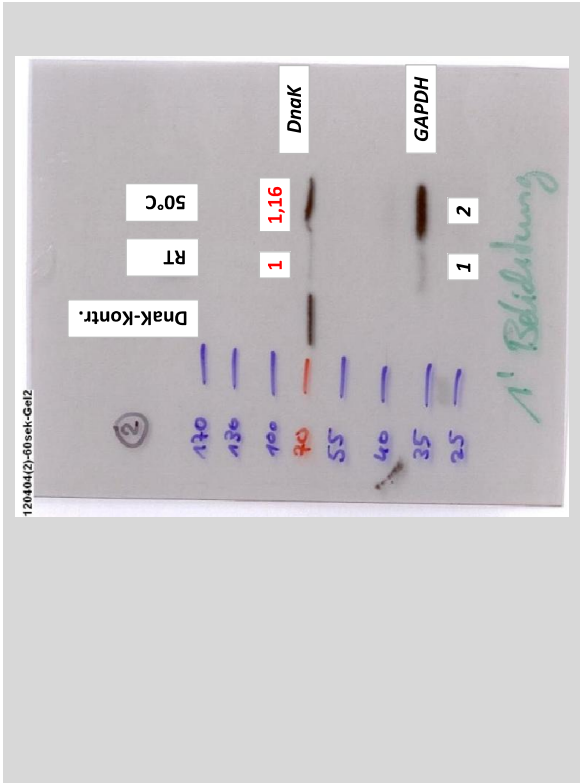
90sek: 90 Sekunden

120sek: 120 Sekunden

120404(2)-60sek-Gel1



120404(2)-60sek-Gel2



120406-30sek-Gel1

Dnak-Kont.	RT	50°C	RT / 0 / 4	RT / 0,5 / 4	RT / 1,0 / 4	RT / 0 / DK	RT / 0,5 / DK	RT / 1,0 / DK
	1	0,87	1,51	2,95	0,02	1,62	1,24	0,02

<i>DnaK</i>	<i>GAPDH</i>
8	1
7	2
6	3
5	4
4	5
3	6
2	7
1	8

<i>DnaK</i>	area	percent	rel. Density	adj. Density
1	3739,941	8,104	1	1,00 RT
2	6213,083	13,463	1,6612784	0,87 50°C
3	8861,054	19,201	2,3693238	1,51 RT / 0 / 4
4	8519,368	18,461	2,2780109	2,95 RT / 0.5 / 4
5	59,192	0,128	0,0157947	0,02 RT / 1.0 / 4
6	9699,489	21,018	2,5935341	1,62 RT / 0 / DK
7	8962,347	19,421	2,3964709	1,25 RT / 0.5 / DK
8	94,192	0,204	0,0251728	0,02 RT / 1.0 / DK
<i>GAPDH</i>	area	percent	rel. Density	
1	4650,134	8,917	1	
2	8854,054	16,978	1,9040036	
3	7295,205	13,989	1,5688012	
4	3590,74	6,885	0,7721207	
5	4887,497	9,372	1,0510261	
6	7427,569	14,243	1,5972861	1,62
7	8938,64	17,14	1,9221711	
8	6506,033	12,476	1,3991253	

<i>DnaK</i>	area	percent	rel. Density	adj. Density
1	1887,87	50,432	1	1,00 RT
2	1855,527	49,568	0,982868	0,45 50°C

120406-30sek-Gel2

<i>GAPDH</i>	area	percent	rel. Density
1	4182,548	31,54	1
2	9078,74	68,46	2,170577

DnaK: DnaK-Level

GAPDH: GAPDH-Level, housekeeping-Protein

30sek: 30 Sekunden Belichtungszeit im Entwickler

60sek: 60 Sekunden

90sek: 90 Sekunden

120sek: 120 Sekunden

Referenz:		
HSP-Level Probe 1		
HSP ↑	HSP _{basal}	
RT / 0.5 / ¼	MW (3,6-8) _{µSD}	
2,92	1,22 ± 0,82	
	-	
	1,215778979 / MW (adj. Dens. 3,6-8)	
	0,820660369 / SD (adj. Dens. 3,6-8)	
Mittelwerte V120404(2)		
2,93		

DnaK	area	percent	rel. Density	ad. Density
1	4745,255	8,407	1	1,00 RT
2	7204,033	12,764	1,5182586	0,88 50°C
3	11147,803	19,751	2,3493517	1,72 RT / 0 / ¼
4	12451,359	22,061	2,6241228	2,92 RT / 0.5 / ¼
5	42,657	0,076	0,0090401	0,01 RT / 1.0 / ¼
6	10894,439	19,302	2,2959439	1,74 RT / 0 / DK
7	9914,539	17,566	2,0894493	1,40 RT / 0.5 / DK
8	41,536	0,074	0,0088022	0,01 RT / 1.0 / DK
GAPDH	area	percent	rel. Density	
1	6711,983	9,715	1	
2	11533,56	16,694	1,7183736	
3	9180,711	13,289	1,3678847	
4	6034,175	8,734	0,8990221	
5	8761,924	12,682	1,305404	
6	8852,811	12,814	1,3189913	1,34
7	10035,225	14,525	1,4951107	
8	7977,225	11,547	1,1885744	
DnaK	area	percent	rel. Density	ad. Density
1	2997,598	50,253	1	1,00 RT
2	2967,426	49,747	0,9899309	0,58 50°C

GAPDH	area	percent	rel. Density
1	7266,64	37,018	1
2	12363,589	62,982	1,7013885

DnaK: DnaK-Level

GAPDH: GAPDH-Level, housekeeping-Protein

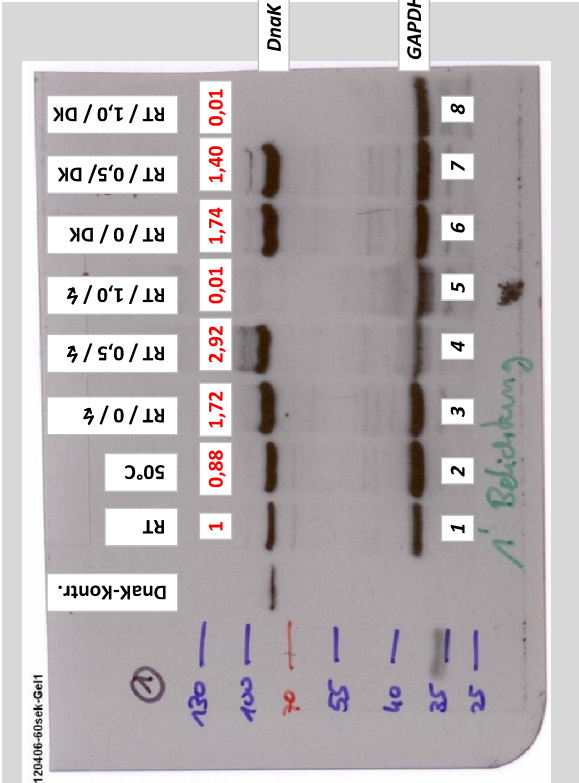
30sek: 30 Sekunden Belichtungszeit im Entwickler

60sek: 60 Sekunden

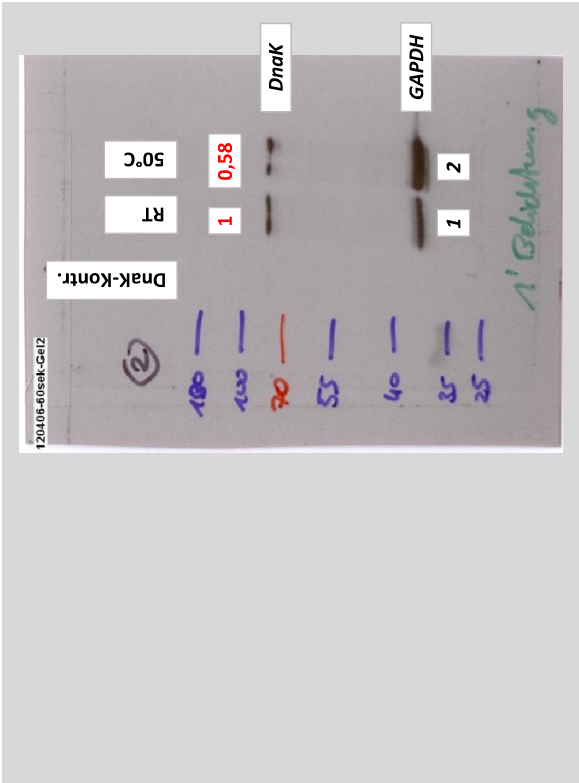
90sek: 90 Sekunden

120sek: 120 Sekunden

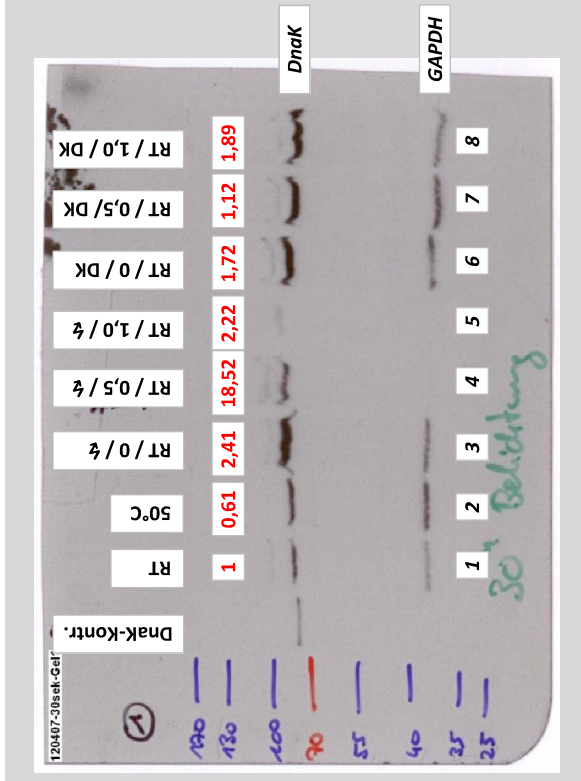
120406-60sek-Gel1



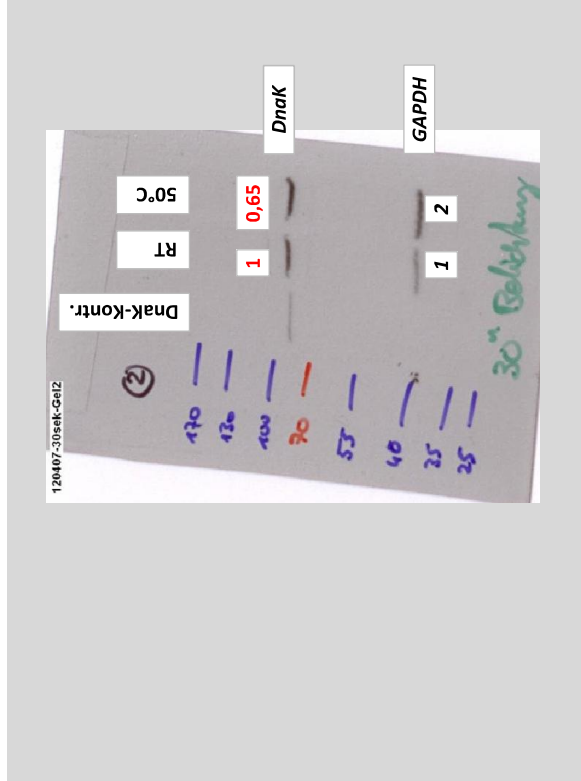
120406-60sek-Gel2



120407-30sek-Gel1



120407-30sek-Gel2



DnaK	area	percent	rel. Density	adj. Density
1	1967,991	5,027	1	1,00 RT
2	3058,234	7,812	1,5540084	0,61 50°C
3	8344,933	21,315	4,2401034	2,41 RT / 0 / 4
4	3846,711	9,826	1,9546449	18,52 RT / 0,5 / 4
5	440,456	1,125	0,2237915	2,22 RT / 1,0 / 4
6	7329,832	18,723	3,7244878	1,72 RT / 0 / DK
7	6878,933	17,571	3,4953252	1,12 RT / 0,5 / DK
8	7282,569	18,602	3,7004177	1,89 RT / 1,0 / DK
GAPDH				
1	1159,284	7,834	1	
2	2973,184	20,091	2,5645902	
3	2039,406	13,781	1,7591269	
4	122,314	0,827	0,1055655	
5	116,899	0,79	0,1008425	
6	2505,648	16,932	2,161348	2,25
7	3617,184	24,443	3,1201174	
8	2264,305	15,301	1,9531529	

DnaK	area	percent	rel. Density	adj. Density
1	3517,82	39,471	1	1,00 RT
2	5394,669	60,529	1,5335056	0,66 50°C

GAPDH	area	percent	rel. Density
1	2304,355	30,004	1
2	5375,77	69,996	2,3328889

Referenz:		
HSP-Level Probe 1		
HSP ↑	HSP _{basal}	
RT / 0,5 / 4	MW (3,6-8) kSD	
18,52	1,79 ± 0,53	
	-	
	1,78710277 / MW (adj. Dens. 3,6-8)	
	0,531899561 / SD (adj. Dens. 3,6-8)	

DnaK: DnaK-Level

GAPDH: GAPDH-Level, housekeeping-Protein

30sek: 30 Sekunden Belichtungszeit im Entwickler

60sek: 60 Sekunden

90sek: 90 Sekunden

120sek: 120 Sekunden

Referenz:		
HSP-Level Probe 1		
HSP ↑ RT / 0.5 / ¼	HSP _{basal} MW (3,6-8) ±SD	
20,52	1,72 ± 0,42	
		1,722553078 MW (adj. Dens. 3,6-8)
		0,415446443 SD (adj. Dens. 3,6-8)

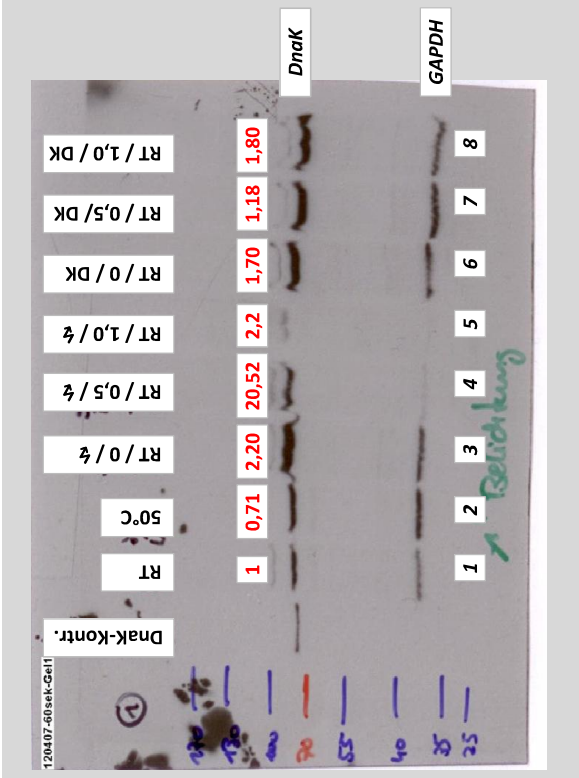
DnaK	area	percent	rel. Density	adj. Density
1	2887,698	5,513	1	1,00 RT
2	4309,062	8,227	1,4922909	0,71 50°C
3	10604,953	20,246	3,6724107	2,20 RT / 0 / ¼
4	6697,803	12,787	2,3194268	20,52 RT / 0.5 / ¼
5	648,527	1,238	0,2245601	2,21 RT / 1.0 / ¼
6	9361,338	17,872	3,2417921	1,70 RT / 0 / DK
7	8983,782	17,151	3,1110103	1,19 RT / 0.5 / DK
8	8886,296	16,965	3,0772719	1,80 RT / 1.0 / DK
GAPDH	area	percent	rel. Density	
1	2095,941	8,916	1	
2	4402,719	18,728	2,1004935	
3	3501,012	14,893	1,6703679	
4	236,971	1,008	0,1130552	
5	213,385	0,908	0,1018394	
6	4001,305	17,021	1,9090399	1,98
7	5481,205	23,316	2,615074	
8	3575,598	15,21	1,7059219	

DnaK	area	percent	rel. Density	adj. Density
1	3888,648	42,46	1	1,00 RT
2	5269,719	57,54	1,3551578	0,75 50°C

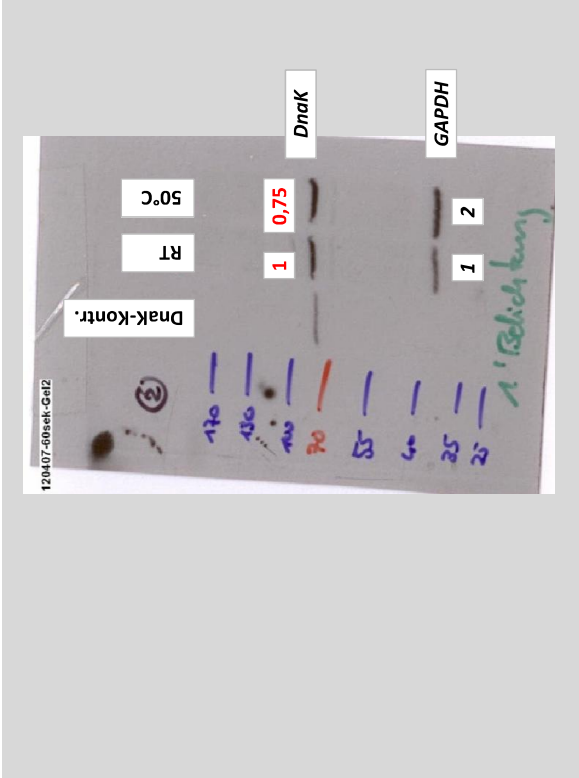
GAPDH	area	percent	rel. Density	
1	3458,598	35,508	1	
2	6281,841	64,492	1,8162668	

DnaK: DnaK-Level
GAPDH: GAPDH-Level, housekeeping-Protein
 30sek: 30 Sekunden Belichtungszeit im Entwickler
 60sek: 60 Sekunden
 90sek: 90 Sekunden
 120sek: 120 Sekunden

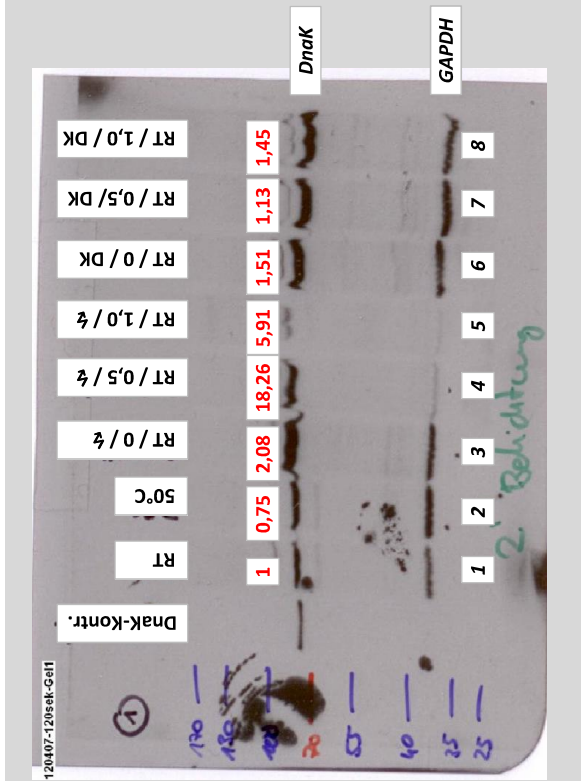
120407-60sek-Gel1



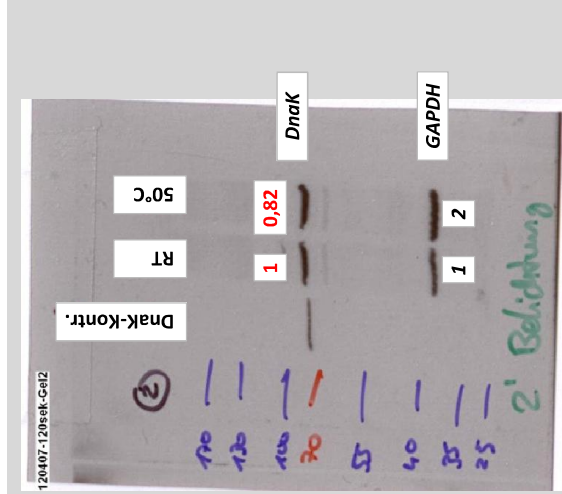
120407-60sek-Gel2



120407-120sek-Gel1



120407-120sek-Gel2



DnaK	area	percent	rel. Density	adj. Density
1	4289,062	6,838	1	1,00 RT
2	5317,841	8,478	1,2398362	0,75 50°C
3	12325,803	19,651	2,8737935	2,08 RT / 0 / 4
4	9387,752	14,967	2,1887979	18,25 RT / 0,5 / 4
5	1339,184	2,135	0,3122258	5,91 RT / 1,0 / 4
6	10072,581	16,059	2,3484937	1,51 RT / 0 / DK
7	9965,56	15,888	2,3234864	1,13 RT / 0,5 / DK
8	10026,489	15,985	2,3376718	1,45 RT / 1,0 / DK
GAPDH				
1	3416,941	10,617	1	
2	5639,062	17,522	1,650372	
3	4731,77	14,703	1,3848545	
4	409,556	1,273	0,119902	
5	180,556	0,561	0,0528398	
6	5310,719	16,502	1,5542997	1,65
7	7002,033	21,757	2,0492606	
8	5491,548	17,064	1,6072337	

DnaK	area	percent	rel. Density	adj. Density
1	4188,82	42,995	1	1,00 RT
2	5553,669	57,005	1,3258518	0,82 50°C

GAPDH	area	percent	rel. Density
1	4187,527	38,127	1
2	6795,598	61,873	1,6228132

Referenz:		
HSP-Level Probe 1		
HSP ↑ RT / 0,5 / 4	HSP _{basal} MW (3,6-8) ±SD	
18,25	1,54 ± 0,39	
	1,543602777 MW (adj. Dens. 3,6-8)	
	0,39135944 SD (adj. Dens. 3,6-8)	
Mittelwerte V120407		
19,10		
Mittelwerte über alle Versuche		
Ø HSP ↑	HSP _{basal}	
11,50	2,75 ± 2,14	
MW (GAPDH 3, 6-8)	3,83	
	2,751747422 MW (adj. Dens. 3,6-8)	
	2,137466395 SD (adj. Dens. 3,6-8)	

beschreibt erhöhte
basale Proteinexpression
im PS-Ast des Versuchs;
MW der unbehandelten
Proben 3, 6-8

- ↳ im Mittel 11,5fach mehr DnaK nach Bestrahlung (Probe 4)
- ↳ im Mittel 275% mehr DnaK auch ohne Behandlung (Proben 3, 6-8)
- ↳ im Mittel 383% mehr housekeeping-Protein (unbeh. Proben 3, 6-8)

DnaK: DnaK-Level

GAPDH: GAPDH-Level, housekeeping-Protein

30sek: 30 Sekunden Belichtungszeit im Entwickler

60sek: 60 Sekunden

90sek: 90 Sekunden

120sek: 120 Sekunden