

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

SUSCEPTIBILITY OF SODA- AND SODB-DEFICIENT ESCHERICHIA COLI MUTANT  
TOWARDS ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC INACTIVATION VIA THE TYPE I-  
MECHANISM OF ACTION

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Pouriya Faraj Tabrizi

2019



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

SUSCEPTIBILITY OF SODA- AND SODB-DEFICIENT ESCHERICHIA COLI MUTANT  
TOWARDS ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC INACTIVATION VIA THE TYPE I-  
MECHANISM OF ACTION

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Pouriya Faraj Tabrizi

2019

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Tim Maisch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Ritter

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2019

*Learn modesty, if you desire knowledge. A highland would never be irrigated by a river.*  
Pouriya-ye Vali

Diese Publikationsdissertation basiert auf folgender Publikation:

---

**Susceptibility of *sodA*- and *sodB*-deficient *Escherichia coli* mutant towards antimicrobial photodynamic inactivation via the type I-mechanism of action**

Faraj Tabrizi P, Wennige S, Berneburg M, Maisch T

Photochem Photobiol Sci. 2018 Mar 14;17(3):352-362. doi: 10.1039/c7pp00370f.

PMID: 29489001

---

Impact-Faktor: 2,902 (2017 Journal Citation Reports ®, Clarivate Analytics, Juni 2018)

**Anmerkung:**

Diese Dissertation wurde durch ein Promotionsstipendium der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg gefördert.

## **Inhaltsverzeichnis**

1 Einleitung.....	8
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Stämme und Kultivierung.....	11
2.2 Photosensibilisatoren.....	11
2.3 Anzahl absorbiertes Photonen.....	11
2.4 Lichtquellen.....	12
2.5 Photodynamische Inaktivierung.....	12
2.6 Quenching-Experimente mit Enzymen.....	13
2.7 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Experimente.....	13
2.8 Auswertung der koloniebildenden Einheit (KBE).....	13
2.9 Quantitative Echtzeit-PCR.....	13
2.10 Uptake-/Attachment-Experimente.....	15
2.11 Statistische Analyse.....	15
3 Ergebnisse.....	16
3.1 Photodynamische Inaktivierung mit TMPyP.....	16
3.2 Quenching-Experimente mit TMPyP.....	16
3.3 Photodynamische Inaktivierung mit MB.....	17
3.4 Quenching-Experimente mit MB.....	17
3.5 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Experimente.....	18
3.6 Quantitative Echtzeit-PCR.....	20
3.7 Uptake-/Attachment-Experimente.....	20
4 Diskussion.....	21
5 Zusammenfassung.....	26
6 Abkürzungsverzeichnis.....	27
7 Literaturverzeichnis.....	28
8 Originalpublikation.....	33
9 Anhang.....	44
9.1 Danksagung.....	44

## **1 Einleitung**

Steigende Resistenzen gegenüber zugelassenen antibiotischen Substanzen stellen für die Menschheit im 21. Jahrhundert eine ernsthafte Bedrohung dar (1). Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin haben der übermäßige und missbräuchliche Einsatz von Antibiotika zur Entwicklung Antibiotika-resistenter pathogener Mikroorganismen geführt. Zu den bekanntesten und gefürchtetsten Bakterien zählen der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* sowie der Vancomycin-resistente *Enterococcus* (2). Nach Angaben des U.S. Department of Health and Human Services erkranken jährlich mindestens 2 Millionen Menschen an Infektionen mit Antibiotika-resistenten Bakterien. Darüber hinaus versterben circa 23.000 Menschen jährlich an den direkten Folgen, noch weitaus mehr an den Spätkomplikationen dieser Infektionen im Rahmen chronischer Erkrankungen (3). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) warnte in einem globalen Bericht aus dem Jahr 2014 zur Überwachung von Antibiotikaresistenzen vor einer „post-antibiotischen Ära, in der gewöhnliche Infektionen und kleinere Verletzungen wieder zum Tode führen könnten“ (4). Über die vergangenen Jahrzehnte hat die Entwicklung neuer antibiotischer Wirkstoffe abgenommen, während die Rate der Resistenzen gestiegen ist. Dieses Ungleichgewicht erfordert die Entwicklung neuer Ansätze zur effektiven Beseitigung pathogener Mikroorganismen (5).

Antibiotika wirken nach dem sogenannten „single target“-Prinzip: Ein ausgewählter Reaktionsschritt im bakteriellen Metabolismus wird blockiert, sodass es zum Zelltod kommt (bakterizide Wirkung) oder die vorhandenen Kolonien sich nicht mehr fortpflanzen können (bakteriostatische Wirkung). Ist dieser Angriffspunkt aufgrund einer Resistenz nicht mehr verfügbar, verliert die antibiotische Substanz ihre Wirkung (6,7). Daher ist es dringend nötig, andere Möglichkeiten zu erforschen, um bakterielle Krankheitserreger effektiv abzutöten und Resistenzentwicklungen zu verhindern. Eine alternative Methode, die das Problem des „single target“-Prinzips umgeht, ist die photodynamische antimikrobielle Chemotherapie (PACT), welche bereits effektive Ansätze als antimikrobielles Verfahren zeigt (8,9).

Grundlage dieses Verfahrens ist die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Ein Photosensibilisator (PS), der abhängig von seinen chemischen Eigenschaften entweder ins Zellmilieu aufgenommen wird oder von außen an die Zellwand bindet, wird durch Lichtabsorption entsprechender Wellenlänge in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff ( $^3\text{O}_2$ ) vom Grundzustand ( $S_0$ ) in einen sehr instabilen Singulett-Zustand ( $S_1$ ) angeregt. Die auf diese Weise erzeugte Energie kann von dem PS auf verschiedenen Wegen wieder abgegeben werden, z. B. in Form von Wärme oder Fluoreszenz (10). Eine weitere Möglichkeit ist die

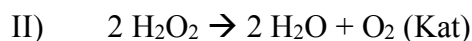
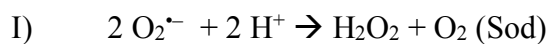


Relaxation in den ebenfalls kurzlebigen, aber etwas stabileren Triplett-Zustand ( $T_1$ ) durch „intersystem crossing“. Ab diesem Punkt ist der weitere Relaxationsweg von den photochemischen und -physikalischen Eigenschaften und der genauen Lokalisation des PS sowie dem Substratangebot in unmittelbarer Umgebung abhängig. In der Typ I-Reaktion ( $T_I$ ) kommt es zur Übertragung eines Elektrons oder Wasserstoffatoms von dem angeregten PS im Triplett-Zustand ( $T_1$ ) auf ein Substratmolekül, z. B. auf  $^3O_2$ . Hierbei entstehen Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ), welche in weiteren Reaktionsschritten zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder Hydroxyl-Radikalen ( $\cdot OH$ ) reagieren können (11,12).

In der Typ II-Reaktion ( $T_{II}$ ) findet ein direkter Energietransfer auf  $^3O_2$  statt. Dies führt zur Relaxation des PS und Anregung des  $^3O_2$  aus dem Triplett-Zustand in den Singulett-Zustand. Hierbei entsteht hochreaktiver energiereicher Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) mit antiparalleler Spinausrichtung der ungepaarten Elektronen ( $^1\Delta_g$ ) (13,14). Ein typischer  $T_{II}$ -PS ist das TMPyP (5,10,15,20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphyrin tetra(p-toluenesulfonate)) aus der Gruppe der Porphyrine. Das relative Verhältnis der unterschiedlichen Reaktionstypen ist neben den oben genannten chemischen Eigenschaften auch von dem Redoxpotential des gewählten PS abhängig. Phenothiazine, zu deren bekanntesten Vertreter das aufgrund seiner geringen Organtoxizität vielfältig in der klinischen Medizin eingesetzte Methylenblau (MB) zählt, haben ein geringes Redoxpotential und sind für einen Elektronentransfer auf  $^3O_2$  zur Formation von ROS geeignet. Daher gehören Phenothiazine entsprechend dieser Eigenschaft zu den  $T_I$ -PS (15–17). Der biologische Schaden am Zielorganismus wird durch einen sogenannten „oxidative burst“ erzeugt, indem essentielle Strukturen des Zellstoffwechsels, wie z. B. Proteine oder Lipide, oxidiert und damit inaktiviert werden (18). Bisher sind gegenüber PACT keine Resistenzen im Sinne steigender bakterieller Überlebensraten nach repetitiver PACT-Behandlung bekannt. Nach 10 Zyklen fraktioneller Inaktivierung und anschließender erneuter Kultivierung kam es bei *Escherichia coli*-, *Staphylococcus aureus*- und *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen zu keinem Anstieg der Überlebensraten. Auch bei dem Hefepilz *Candida albicans* wurden nach 20 Zyklen PACT keine erhöhten Überlebensraten detektiert (19,20). Es wirkt anders als gängige antibiotische Substanzen nach einem „multi target“-Prinzip. Mutagene Effekte, z.B. Schäden an dem Erbgut der Mikroorganismen, wurden bisher nicht festgestellt (21). Zum Verständnis der Resistenzentwicklung ist die Erforschung anti-oxidativer Prozesse im bakteriellen Metabolismus unentbehrlich. Protektive Schlüsselenzyme sind vor allem Superoxiddismutase (Sod) und Katalase (Kat) (22). Diese zwei wichtigen endogen produzierten anti-oxidativen Enzyme werden vorrangig von den Regulons *oxyR* und *soxRS* reguliert. Die suffiziente

Funktion dieser Regulationsmechanismen ist ein überlebenswichtiger Faktor bei der Abwehr von extra- und intrazellulär erzeugten ROS (23). Beide Systeme agieren als Redoxsensoren und induzieren Transkriptionsfaktoren für die Synthese von DNA-Reparaturenzymen, Enzymen des Kohlenstoffwechsels sowie den bereits erwähnten anti-oxidativen Enzymen (24–28). Das Vorkommen dieser beiden Regulons in einer Vielzahl bakterieller Spezies untermauert die immense Bedeutung für das Überleben. Selbst in Bakterien mit vorzugsweise anaerobem Stoffwechsel sind diese Regulons zu finden. Hier nimmt *oxyR* neben anderen Regulons, die im anti-oxidativen Stoffwechsel eine Rolle spielen, z. B. *perR* und *rpoS*, eine wichtige Position in der Toleranz von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein (29,30). Folglich ist die Induktion anti-oxidativer Enzyme, wie z.B. Sod und Kat, ein wichtiger Prozess im bakteriellen Metabolismus, um bei Exposition von oxidativem Stress zu überleben.

Sod reagiert mit O<sub>2</sub><sup>•-</sup> und katalysiert die Reaktion zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (I), welches in einer Folgereaktion (II) von Kat zu O<sub>2</sub> und Wasser (H<sub>2</sub>O) umgesetzt wird (31).



Die vorliegende Studie evaluierte die Effizienz von PACT gegenüber dem gramnegativen Bakterium, *Escherichia coli* (AB1157, Wildtyp; *E. coli*-WT), sowie einer korrespondierenden Mutante, *Escherichia coli* PN134 (AB1157 plus (*sodA*::Mud PR13)25 (*sodB*-kan)1-Δ; *E. coli*-PN134), welche die beiden Enzyme Sod A und Sod B nicht synthetisieren kann, mit zwei PS aus unterschiedlichen chemischen Klassen mit jeweils unterschiedlicher <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Quantenausbeute (Φ<sub>Δ</sub>). Abhängig von dem gewählten PS, dem Vorhandensein bzw. der Funktion entsprechender Abwehrmechanismen sowie der Art der erzeugten ROS fällt die Überlebensrate der getesteten Stämme unterschiedlich aus.

Um die Effektivität von PACT zu erhöhen, müssen die anti-oxidativen Schutzmechanismen im bakteriellen Metabolismus besser verstanden und analysiert werden.

In dieser Studie wurden TMPyP und MB als PS verwendet, da beide im Rahmen der PACT effektive antibakterielle Effekte gezeigt haben (32,33). MB hat eine im Vergleich zu TMPyP geringere <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Quantenausbeute (Φ<sub>Δ</sub> = 0,52). TMPyP hingegen erzeugt deutlich mehr <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Φ<sub>Δ</sub> = 0,74) und hat sich in T<sub>II</sub>-basierter PACT als geeigneter PS *in vitro* etabliert (14,34–37).

## **2 Material und Methoden**

### 2.1 Stämme und Kultivierung

*E. coli*-WT und *E. coli*-PN134 (zur Verfügung gestellt von James Imlay, University of Illinois, USA) wurden unter aeroben Bedingungen in 5 ml Müller-Hinton-Bouillon in einem Schüttelinkubator (Certomat R; B. Braun Melsungen AG, Melsungen) bei 180 rpm (revolutions per minute) und 37 °C für 14 bis 16 Stunden kultiviert (38). Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 3.000 rpm für 10 Minuten (Universal 320 R; Andreas Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen). Nach Entfernung des Überstandes wurden die Pellets der Kultur auf eine optische Dichte (OD) von 0,6 verdünnt (Specord 50 Plus; Analytik Jena AG, Jena). Dies entspricht einer Koloniezahl von  $10^{7-8}$ /ml. In PACT- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Experimenten ohne den Zusatz von Enzymen wurden die bakteriellen Pellets in 50 % H<sub>2</sub>O dest. (Merck KGaA, Darmstadt) und 50 % PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without calcium chloride and magnesium chloride; Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) verdünnt, sodass nach der Hinzugabe von dem jeweiligen PS eine finale Volumenkonzentration von 75 % H<sub>2</sub>O dest. und 25 % PBS erreicht wurde. Auch in den Experimenten mit den Enzymen, welche entsprechend den Herstellerangaben in 100 % PBS gelöst wurden, wurde durch entsprechende Präparation eine finale Volumenkonzentration analog zu den oben genannten Experimenten erreicht.

### 2.2 Photosensibilisatoren

Für T<sub>I</sub>-Reaktionen wurde MB mit folgenden Endkonzentrationen verwendet: 5 µM, 10 µM und 15 µM. Als T<sub>II</sub>-PS wurde das TMPyP mit den Endkonzentrationen 1 µM, 2,5 µM, 5 µM und 10 µM verwendet. Beide PS (1 mM; Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) wurden in H<sub>2</sub>O dest. gelöst, durch einen 0,22 µM Porenfilter filtriert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

### 2.3 Anzahl absorbierter Photonen

Gemäß der von Cieplik et al. entwickelten Formel zur besseren Vergleichbarkeit photodynamischer Prozesse mithilfe der Anzahl absorbierter Photonen pro Sekunde (39) betragen die Endkonzentrationen in den PACT-Experimenten mit MB max.  $c_{MB} = 0,8 \times c_{TMPyP}$ , um die möglichst gleiche Anzahl absorbierter Photonen analog zu den Experimenten mit TMPyP zu haben:

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

$\varepsilon(\lambda)$ , Extinktionskoeffizient [(mol x cm)<sup>-1</sup>];  $P_{em}(\lambda)$ , wellenlängenabhängige Leistung der gewählten Lichtquelle [mW x nm<sup>-1</sup>];  $c$ , Konzentration des PS [μM];  $d$ , Dicke des Lösungsmittel [mm];  $c_0$ , Lichtgeschwindigkeit [m x s<sup>-1</sup>];  $h$ , Planck-Konstante [J x s];  $\lambda$ , Wellenlänge [nm].

Nach Anwendung der Formel als Grundlage zur Berechnung der MB-Endkonzentrationen konnte kein antimikrobieller Effekt für T<sub>1</sub>-PACT mit MB nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Zur Erzielung eines photodynamischen Effektes mussten daher höhere MB-Endkonzentrationen verwendet werden.

## 2.4 Lichtquellen

Die Strahlungsdichte (mW x cm<sup>-2</sup>) wurde mit einem Thermalsensor gemessen (Nova 30 A-P-SH; Ophir-Spiricon, North Logan, Utah, USA). Das Emissionsspektrum der beiden Lichtquellen wurde mithilfe eines Monochromators mit CCD-Einheit („charged-coupled device“; Spex 232; HORIBA France SAS, Longjumeau Cedex, Frankreich) ermittelt. Das Absorptionsspektrum beider PS wurde bei Raumtemperatur mittels Spektralphotometrie (Specord 50 Plus; Analytik Jena AG, Jena) verifiziert.

In TMPyP-Experimenten wurden die Proben mit einer durch einen Schmalbandfilter Blaulicht-emittierenden Lichtquelle (Waldmann Blue V; Herbert Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen) in einem Bereich von 400 nm bis 450 nm (Maximum von 436,5 nm) mit einer Strahlungsdichte von 18 mW x cm<sup>-2</sup> für 10 Sekunden bei einer flächenbezogenen Strahlungsenergie von ca. 0,18 J x cm<sup>-2</sup> bestrahlt (40). In MB-Experimenten wurden die Proben mit einer durch einen Schmalbandfilter Rotlicht-emittierenden Lichtquelle (Waldmann PDT 1200; Herbert Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen) in einem Bereich von 650 nm bis 700 nm (Maximum von 671 nm) mit einer Strahlungsdichte von 46,5 mW x cm<sup>-2</sup> für 60 Sekunden bei einer flächenbezogenen Strahlungsenergie von ca. 2,78 J x cm<sup>-2</sup> bestrahlt (41).

## 2.5 Photodynamische Inaktivierung

25 μl der Bakterienlösung (OD = 0,6) und 25 μl des PS (in doppelter Konzentration) wurden in Mikrotiterplatten mit 96 Wells (Corning Costar; Corning, New York, USA) für

10 Sekunden bei Dunkelheit inkubiert. Eine Platte wurde zu den oben genannten Bedingungen mit der korrespondierenden Lichtquelle bestrahlt, während die andere Platte für die Dauer der Bestrahlung weiter im Dunkeln (keine Bestrahlung, PS im Dunkeln) inkubiert wurde. Anschließend wurden Aliquots von je 20 µl jeder Probe seriell sieben Mal 1:10 in 180 µl Müller-Hinton-Bouillon verdünnt. Eine unbehandelte Kontrolle (keine Bestrahlung, kein PS) und eine bestrahlte Kontrolle (Bestrahlung, kein PS) wurden in jeder Versuchsreihe mitgeführt.

## 2.6 Quenching-Experimente mit Enzymen

Sod und Kat (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Missouri, USA) wurden gemäß den Herstellerangaben in PBS gelöst. Unter Berücksichtigung des Löslichkeitsproduktes wurden folgende Lösungen bestimmt: Sod 54,4 U/25µl; Kat 13,6 U/25 µl. Die weiteren Versuchsschritte liefen analog zu den oben genannten PACT-Experimenten ab. Bei nun drei Komponenten pro Versuchsreihe (Bakterien, PS, Enzym) wurde der PS 4-fach konzentriert hinzugegeben, damit die festgelegte finale Volumenkonzentration von 75 % H<sub>2</sub>O dest. und 25 % PBS erreicht werden konnte.

## 2.7 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Experimente

Als zusätzliche Kontrollreihe wurden beide Stämme mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,0 % bzw. 1,5 %; Merck KGaA, Darmstadt) behandelt. Die gleiche Versuchsreihe wurde analog zu den PACT-Experimenten – jedoch ohne Bestrahlung – sowohl mit als auch ohne Enzymprotektion durch Sod oder Kat durchgeführt.

## 2.8 Auswertung der koloniebildenden Einheit (KBE)

Die bakteriellen Proben wurden nach photodynamischer oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung auf Müller-Hinton-Agarplatten entsprechend der Methode von Miles, Misra und Irwin pipettiert (42). Nach einer Inkubation von 14 bis 16 Stunden bei 37 °C erfolgte die manuelle Auszählung der KBE. Alle Experimente fanden in mindestens 3-facher Ausführung statt.

## 2.9 Quantitative Echtzeit-PCR

*E. coli*-WT wurde unter aeroben Bedingungen in 5 ml Müller-Hinton-Bouillon in einem Schüttelinkubator bei 180 rpm und 37 °C für 14 bis 16 Stunden kultiviert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 3.000 rpm für 10 Minuten. Nach Entfernung des Überstandes wurden die bakteriellen Pellets in 18 ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst. Es erfolgte die photodynamische

Vorbehandlung mit 0  $\mu$ M und 5  $\mu$ M MB im Sinne einer subletalen Dosis analog zu den vorherbeschriebenen MB-Experimenten. Anschließend wurden die Suspensionen erneut bei 3.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und die Überstände verworfen.

Die bakterielle RNA wurde mithilfe des NucleoSpin RNA-Kits entsprechend den Herstellerangaben isoliert (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren). Nach RNA-Isolation erfolgte die quantitative Bestimmung jeder RNA-Probe mittels eines UV-Vis-Spektralphotometers (NanoDrop 2000c; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Alle RNA-Proben wurden auf die Probe mit der geringsten RNA-Menge verdünnt, bevor die Umschreibung in cDNA erfolgte. Nach Hinzugabe von 7  $\mu$ l der Herstellerspezifischen Mastermixtur und Auffüllung mit H<sub>2</sub>O dest. auf ein Reaktionsvolumen von 19  $\mu$ l erfolgte die Erwärmung der Proben auf 70 °C für 10 Minuten in einem Thermozykler. Anschließend wurde 1  $\mu$ l Reverse Transkriptase zu jeder Probe hinzugegeben. Es erfolgte die Erhitzung auf 42 °C für weitere 45 Minuten bzw. auf 70 °C für weitere 10 Minuten. Die Amplifikation und Detektion der cDNA wurde mithilfe des LightCycler 96-Systems mit SYBR-Green I als entsprechenden Farbstoff durchgeführt (Roche Diagnostics International Ltd; Rotkreuz, Schweiz). Das Reaktionsvolumen betrug 20  $\mu$ l (10  $\mu$ l SYBR-Green I, 8  $\mu$ l Nuklease-freies Wasser, 1  $\mu$ l cDNA, 0,5  $\mu$ l Vorwärts- und 0,5  $\mu$ l Rückwärtsprimer des entsprechenden Gens). Jede Probe wurde in doppelter Ausführung gemessen. Alle Proben wurden in einem Zyklus prä-inkubiert. Nach der 3-Schritt-Amplifikation (95 °C für 10 Sekunden, 58 °C für 10 Sekunden, 72 °C für 10 Sekunden) in 45 Zyklen folgte die Schmelz- und Abkühlphase. Die „crossing points“ (Cx) wurden mit Bezug zu dem Haushaltsgen *gapA* (Kodierungsgen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; GAPDH) mit der bereitgestellten Software analysiert (LightCycler 96, Version 1.1.0.1320; Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Schweiz).

Die Primer wurden mit Primer Blast vom National Center for Biotechnology Information erstellt ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)). Folgende Primer wurden verwendet: 5'-ACTTACGAGCAGATCAAAGC-3' (*gapA*<sub>vorwärts</sub>); 5'-AGTTTCACGAAGTTGTCGTT-3' (*gapA*<sub>rückwärts</sub>); 5'-CCAGAATTTGCCAACCTGCC-3' (*sodA*<sub>vorwärts</sub>); 5'-TCGATAGCCGCTTTCAGGTC-3' (*sodA*<sub>rückwärts</sub>); 5'-CTTTGGTTCTGGCTGGACCT-3' (*sodB*<sub>vorwärts</sub>); 5'-AGTGCTCCAGATAGCCAGGA-3' (*sodB*<sub>rückwärts</sub>). Alle Experimente fanden in mindestens 3-facher Ausführung statt. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese detektiert. Die relative Quantifizierung der Genexpression von *sodA* und

*sodB* nach photodynamischer Inaktivierung im Vergleich zu den unbehandelten Proben wurde entsprechend der Methode von Livak und Schmittgen (43) durchgeführt.

#### 2.10 Uptake-/Attachment-Experimente

400 µl der bakteriellen Suspension (OD = 0,6) wurden mit je 400 µl MB oder TMPyP bei Endkonzentrationen von 1 µM, 10 µM, 50 µM und 100 µM für je 1 Minute inkubiert. Nach der Inkubationsphase erfolgte die Zentrifugation bei 3.000 rpm für 5 Minuten. Anschließend wurden die Überstände spektralphotometrisch im Bereich des Absorptionsmaximums des jeweiligen PS gemessen. Referenzmessungen wurden in H<sub>2</sub>O dest. durchgeführt (44–46).

#### 2.11 Statistische Analyse

Die Auswertung der KBE nach Miles, Misra und Irwin beinhaltet die Werte von 3 unabhängigen Experimenten mit 3 Stichproben pro Versuchsgruppe. Die KBE-Zahl einer Probe wurde als mediane KBE-Zahl der entsprechenden Teilproben mit einem 95 %-Konfidenzintervall berechnet. Für jede Versuchsreihe wurde der Median mit dem Tukey-Test bestimmt. Alle Datenanalysen wurden mit GraphPad Prism 7 (La Jolla, Kalifornien, USA) durchgeführt.

### **3 Ergebnisse**

#### 3.1 Photodynamische Inaktivierung mit TMPyP

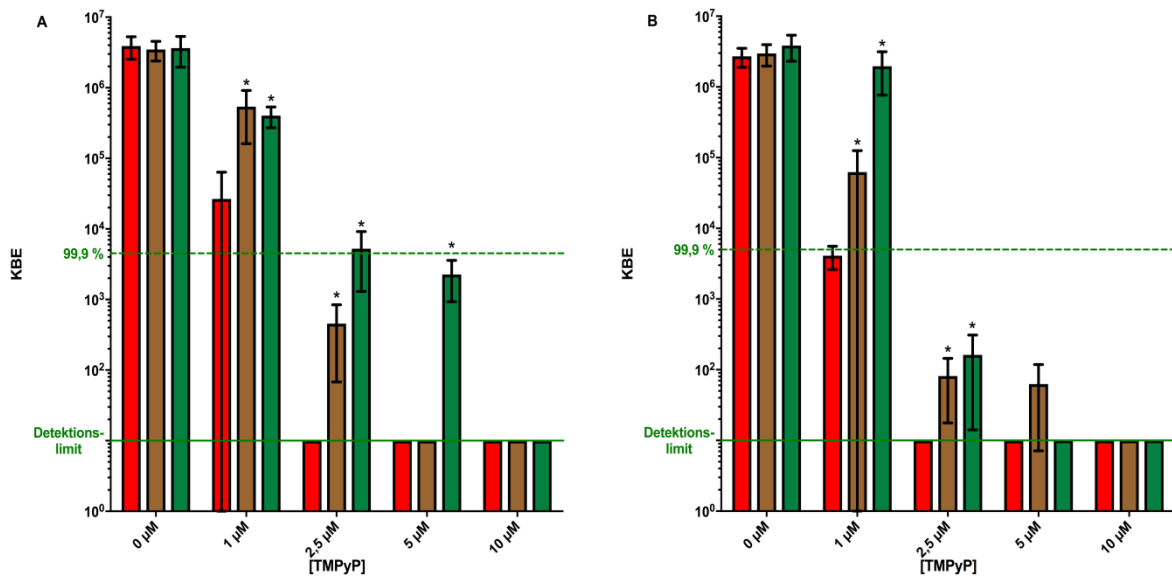
Gemessen wurde die Reduktion der KBE-Zahl von *E. coli*-WT und *E. coli*-PN134 mit TMPyP. Alle Kontrollen bei Verwendung beider PS zeigten keine verminderten Überlebensraten bei allen verwendeten Konzentrationen ( $< 1 \log_{10}$  Stufen-Reduktion). Die KBE-Zahl beider Keime wurde um jeweils  $\geq 5 \log_{10}$  Stufen bei einer Mindestkonzentration von  $2,5 \mu\text{M}$  TMPyP reduziert (Abb. 1A und 1B; rote Säule). In der Eradikationseffektivität mit TMPyP ergab sich kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Überlebensrate bzw. die Anzahl der KBE zwischen *E. coli*-WT und *E. coli*-PN134 (Tukey-Test:  $p > 0,005$ ).

#### 3.2 Quenching-Experimente mit TMPyP

In den Kat-Quenching-Versuchen (Bestrahlung, PS, Enzym) mit *E. coli*-WT überlebten mehr als  $5 \log_{10}$  KBE bei  $1 \mu\text{M}$  TMPyP und  $\approx 2,5 \log_{10}$  KBE bei  $2,5 \mu\text{M}$  TMPyP im Vergleich zu einer kompletten Eradikation (unterhalb des Detektionslimits) bei den entsprechenden Konzentrationen ohne die Hinzugabe von Kat (Bestrahlung, PS, kein Enzym) (Abb. 1A; rote vs. braune Säule;  $p < 0,005$ ). Bei höheren TMPyP-Konzentrationen ( $5 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ) wurde kein Quenching-Effekt detektiert bzw. keine Bakterien überlebten oberhalb des Detektionslimits (Abb. 1A; braune Säule). Die Hinzugabe von Sod bewirkte ebenfalls einen signifikanten Überlebensvorteil beider Stämme bei einer Konzentration von  $2,5 \mu\text{M}$  TMPyP ( $p < 0,005$ ). Bei der gewählten Höchstkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  TMPyP wurde kein Überlebensvorteil durch eine Enzymgabe gemessen (Abb. 1A; grüne Säule).

In Quenching-Experimenten mit *E. coli*-PN134 überlebten bei Konzentrationen von  $2,5 \mu\text{M}$  und  $5 \mu\text{M}$  TMPyP durch die Hinzugabe von Kat ca.  $2 \log_{10}$  KBE. Analog zu der Versuchsreihe ohne Enzymprotektion durch Kat konnten ab  $10 \mu\text{M}$  TMPyP keine KBE gezählt werden (Abb. 1B; braune Säule). Durch die Hinzugabe von Sod bei  $1 \mu\text{M}$  TMPyP wurde eine hohe Überlebensrate ( $> 10 \log_{10}$  KBE) von *E. coli*-WT gemessen. Die Differenz zwischen den gezählten KBE im Vergleich zu den Kontrollen betrug hier max.  $1 \log_{10}$  Stufe. Mehr als  $2 \log_{10}$  KBE überlebten bei  $2,5 \mu\text{M}$  TMPyP. Ab  $5 \mu\text{M}$  TMPyP zeigte sich durch die Hinzugabe von Sod kein Überlebensvorteil gegenüber der Versuchsreihe ohne Sod (Abb. 1B; grüne Säule). Insgesamt ergab sich bezüglich der Empfindlichkeit bei T<sub>II</sub>-PACT mit TMPyP kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Stämmen ( $p > 0,005$ ; Abb. 1A vs. Abb. 1B; Vergleich der beiden Stämme bei jeder Endkonzentration).





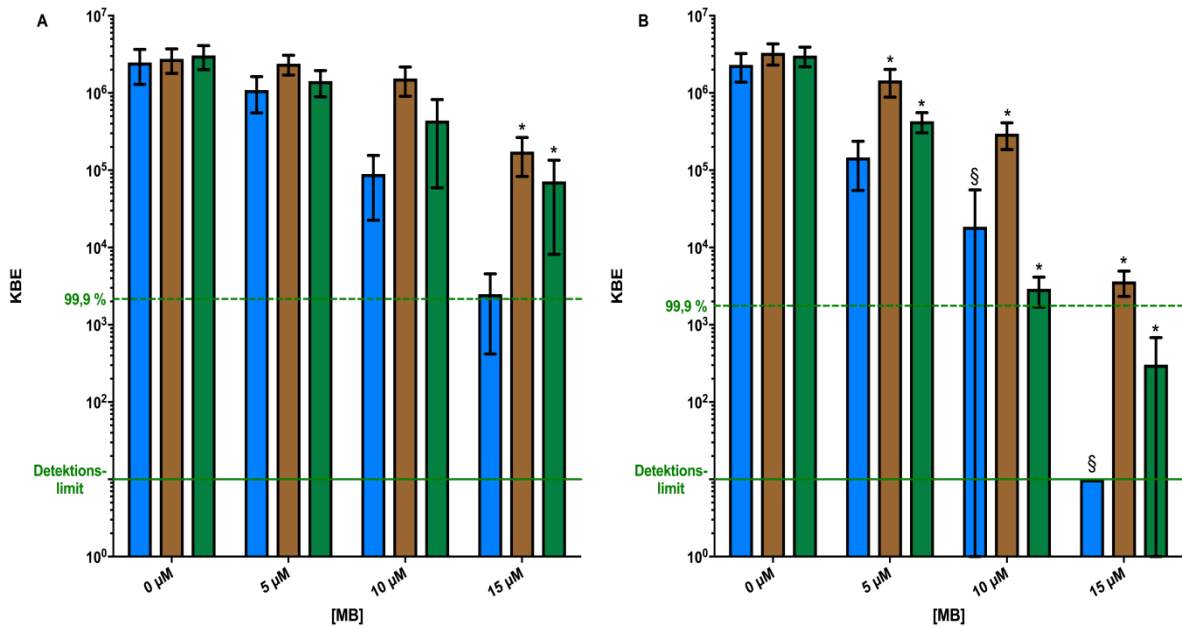
**Abbildung 1:** Photodynamische Inaktivierung von *E. coli*-WT (A) und *E. coli*-PN134 (B) mit TMPyP ohne Enzyme (rote Säule), mit Kat-Inkubation (braune Säule) und Sod-Inkubation (grüne Säule). Die Ergebnisse (n = 3) sind als KBE-Median mit einem 95 %-Konfidenzintervall angegeben. Die gestrichelte Linie markiert eine KBE-Reduktion um  $\geq 3 \log_{10}$  Stufen ( $\geq 99,9 \%$ ). Die durchgezogene Linie gibt das Detektionslimit an ( $10^1$  KBE). Nach dem Tukey-Test ergab sich bei allen mit \* markierten Säulen in den Enzymversuchen ein signifikanter Unterschied zu den PACT-Experimenten ohne Enzyme (rote Säule). Unbehandelte Kontrollen zeigten keine Dunkeltoxizität (Daten nicht dargestellt).

### 3.3 Photodynamische Inaktivierung mit MB

Bei 15  $\mu\text{M}$  MB konnte die Überlebensrate von *E. coli*-WT um  $\geq 3 \log_{10}$  Stufen reduziert werden (Abb. 2A; blaue Säule). Bei der gleichen Konzentration zeigte sich eine signifikant höhere Eradikation ( $\geq 5 \log_{10}$  Stufen) von *E. coli*-PN134 ( $p < 0,005$ ). Auch bei 10  $\mu\text{M}$  MB ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen dem Überleben der beiden Stämme (Abb. 2B; blaue Säule).

### 3.4 Quenching-Experimente mit MB

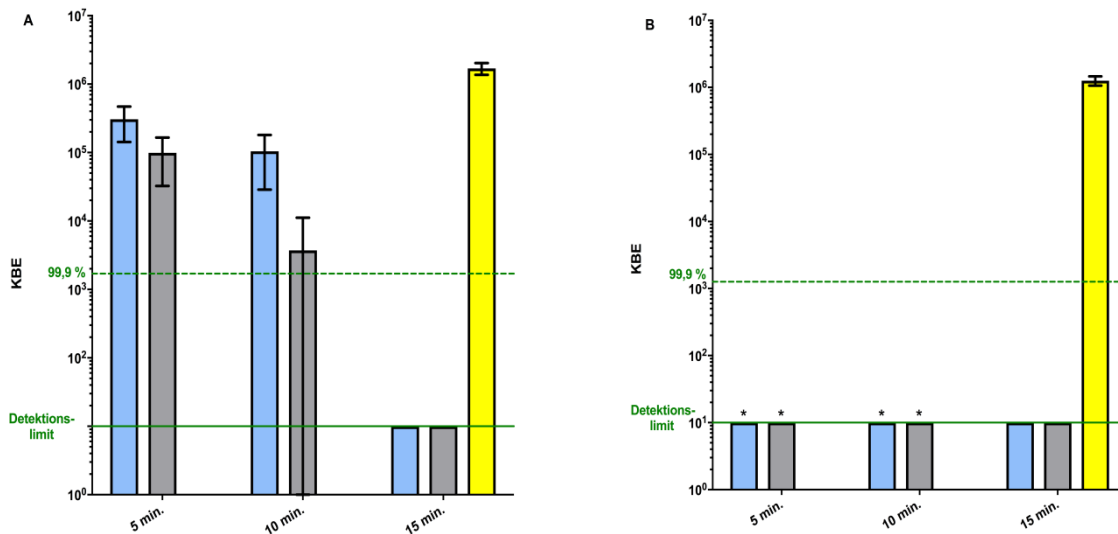
Die Hinzugabe von anti-oxidativen Enzymen (Bestrahlung, PS, Enzym) zeigte hier ebenfalls einen Überlebensvorteil gegenüber den Experimenten ohne Enzymprotektion (Bestrahlung, PS, kein Enzym). Quenching mit Sod oder Kat verhinderte eine  $3 \log_{10}$  Stufen-Reduktion der KBE-Zahl von *E. coli*-WT bei allen verwendeten Konzentrationen von MB nach Bestrahlung (Abb. 2A; braune und grüne Säule). Die Hinzugabe von Kat konnte *E. coli*-PN134 bei allen Konzentration in  $T_1$ -PACT-Experimenten mit MB vor einer  $3 \log_{10}$  Stufen-Reduktion bewahren, während dies trotz der Hinzugabe von Sod ab 10  $\mu\text{M}$  MB nicht mehr möglich war. Ab dieser Konzentration wurde eine  $3 \log_{10}$  Stufen-Reduktion beobachtet (Abb. 2B; braune und grüne Säule).



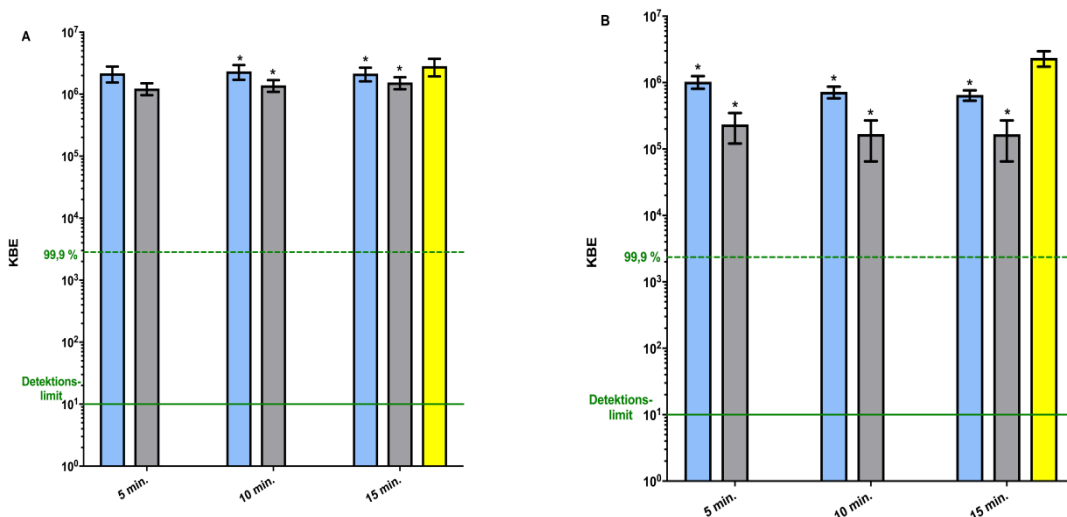
**Abbildung 2:** Photodynamische Inaktivierung von *E. coli*-WT (A) und *E. coli*-PN134 (B) mit MB ohne Enzyme (blaue Säule), mit Kat-Inkubation (braune Säule) und Sod-Inkubation (grüne Säule). Die Ergebnisse (n = 3) sind als KBE-Median mit einem 95 %-Konfidenzintervall angegeben. Die gestrichelte Linie markiert eine KBE-Reduktion um  $\geq 3 \log_{10}$  Stufen ( $\geq 99,9\%$ ). Die durchgezogene Linie gibt das Detektionslimit an ( $10^1$  KBE). Nach dem Tukey-Test ergab sich bei allen mit \* markierten Säulen der Enzymversuche ein signifikanter Unterschied zu den korrespondierenden PACT-Experimenten ohne Enzyme (blaue Säule). Bei mit § markierten Säulen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen (blaue Säule; A vs. B). Unbehandelte Kontrollen zeigten keine Dunkeltoxizität (Daten nicht dargestellt).

### 3.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Experimente

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten mit 1,0 % bzw. 1,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde *E. coli*-WT komplett eradiziert. Der Nachweis von KBE bei *E. coli*-PN134 befand sich bereits nach 5 Minuten Behandlungszeit unterhalb des Detektionslimits (Abb. 3). Quenching mit Kat verhinderte nahezu vollständig die Abtötung von *E. coli*-WT. Hierbei zeigte sich eine maximale Differenz der Überlebensrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle von ca.  $1/3 \log_{10}$  Stufe. Bei *E. coli*-PN134 zeigte sich bei einer Überlebensdifferenz von max.  $1/2 \log_{10}$  Stufe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle die gleiche Tendenz (Abb. 4). Insgesamt verhinderte die Hinzugabe von Kat eine signifikante Reduktion der Überlebensrate beider Stämme ( $p < 0,005$ ).



**Abbildung 3:** Inaktivierung von *E. coli*-WT (A) und *E. coli*-PN134 (B) mit 1,0 % (blaue Säule) oder 1,5 % (graue Säule) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Inkubationszeit von 5, 10 und 15 Minuten. Die Kontrolle (gelbe Säule) wurde für 15 Minuten mit H<sub>2</sub>O dest. inkubiert. Die Ergebnisse (n = 3) sind als KBE-Median mit einem 95 %-Konfidenzintervall angegeben. Die gestrichelte Linie markiert eine KBE-Reduktion um  $\geq 3 \log_{10}$  Stufen ( $\geq 99,9\%$ ). Die durchgezogene Linie gibt das Detektionslimit an ( $10^1$  KBE). Nach dem Tukey-Test ergab sich bei allen mit \* markierten Säulen (B) ein signifikanter Unterschied zu den korrespondierenden Säulen (blaue und graue Säule; A).



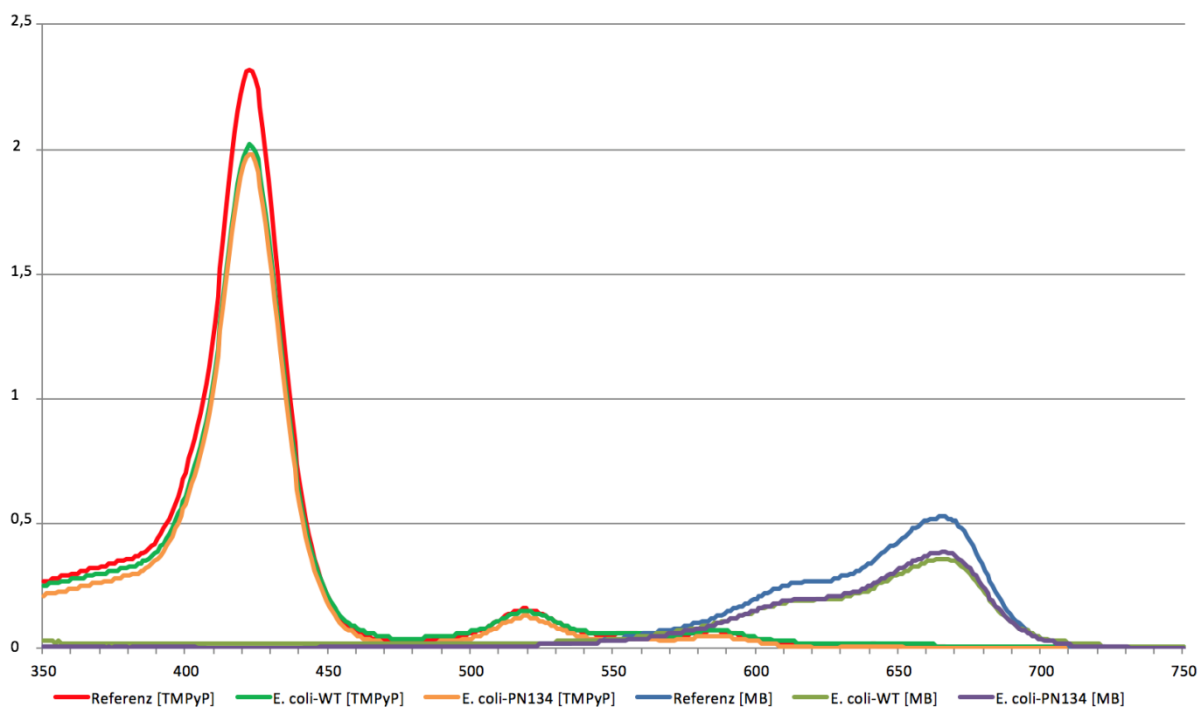
**Abbildung 4:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Quenching mit Kat. Inaktivierung von *E. coli*-WT (A) und *E. coli*-PN134 (B) mit 1,0 % (blaue Säule) oder 1,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach einer Inkubationszeit von 5, 10 und 15 Minuten nach vorheriger Inkubation mit Kat. Die Kontrolle (gelbe Säule) wurde für 15 Minuten mit H<sub>2</sub>O dest. und Kat inkubiert. Die Ergebnisse (n = 3) sind als KBE-Median mit einem 95 %-Konfidenzintervall angegeben. Die gestrichelte Linie markiert eine KBE-Reduktion um  $\geq 3 \log_{10}$  Stufen ( $\geq 99,9\%$ ). Die durchgezogene Linie gibt das Detektionslimit an ( $10^1$  KBE). Nach dem Tukey-Test ergab sich bei allen mit \* markierten Säulen ein signifikanter Unterschied zu den korrespondierenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Proben ohne vorherige Inkubation mit Kat (blaue und graue Säule, Abb. 3 vs. Abb. 4).

### 3.6 Quantitative Echtzeit-PCR

Die C<sub>x</sub>-Werte für alle Proben lagen zwischen 20 und 26 Zyklen. Die Daten wurden entsprechend der unbehandelten Kontrolle normiert (keine Bestrahlung, kein PS). Zwischen subletaler PACT-Vorbehandlung und der unbehandelten Kontrolle zeigte sich keine signifikante Veränderung der Genexpression von *sodA* und *sodB* ( $p > 0,99$ ). *GapA* wurde als Haushaltsgen bestimmt.

### 3.7 Uptake-/Attachment-Experimente

Die Absorptionsmaxima von den PS und den Überständen in jeder Probe wurden gemessen. Zwischen den verwendeten Stämmen zeigte sich keine unterschiedliche Aufnahme- bzw. Adhäsionsmenge von TMPyP und MB (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Absorptionsmaxima von TMPyP (400 bis 450 nm) und MB (650 bis 700 nm). 10  $\mu$ M TMPyP (Referenz; rote Linie) und 10  $\mu$ M MB (Referenz; blaue Linie) wurden in H<sub>2</sub>O dest. gemessen. Nach der Inkubationsphase mit 10  $\mu$ M TMPyP bzw. 10  $\mu$ M MB für je 1 Minute erfolgte die Zentrifugation bei 3.000 rpm für 5 Minuten. Anschließend erfolgte die spektralphotometrische Messung der Überstände im Bereich des Absorptionsmaximums des jeweiligen PS.

## **4 Diskussion**

Die vorliegende Studie untersuchte die Wirksamkeit von PACT mit zwei verschiedenen PS an den beiden Stämmen *E. coli*-WT und *E. coli*-PN134.

Um beide Stämme vergleichen zu können, musste zunächst gewährleistet sein, dass ausreichende und vor allem gleiche Mengen des entsprechenden PS aufgenommen wurden bzw. in ausreichender Nähe zum Zielorganismus waren, um eine photodynamische Wirkung erzielen zu können. Für eine effektive Eradikation ist dies unerlässlich (47). Der signifikante Unterschied, der sich bei den höheren MB-Konzentrationen zwischen den beiden Stämmen ergab, beruhte nicht auf die Aufnahme unterschiedlicher Mengen von MB, da die entsprechenden spektralphotometrischen Versuche zeigten, dass ähnliche Mengen aufgenommen bzw. sich an das bakterielle Pellet angeheftet hatten (Abb. 5). Folglich ist die Anzahl photo-aktiver Moleküle der entsprechenden PS in beiden Stämmen sehr ähnlich, was einen Vergleich hinsichtlich des Überlebens erlaubt. *E. coli* hat eine negativ geladene Zellwand. Aufgrund der elektrostatischen Anziehung empfiehlt sich daher die Verwendung positiv geladener PS, um die Effektivität von PACT zu erhöhen. Dai et al. untermauern diese These, indem sie zeigten, dass die Verwendung nicht-kationischer PS in einer geringeren Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber PACT resultierte (18). Die positive Ladung ermöglichte zum einen die Adhäsion an die Zellwand bzw. Penetration durch die Zellwand hindurch und zum anderen die Aufnahme in das Zellinnere. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie ausschließlich positiv geladene PS verwendet.

Insgesamt war *E. coli*-PN134 deutlich empfindlicher gegenüber T<sub>I</sub>-PACT als *E. coli*-WT (Abb. 2). Die Deaktivierung der Gene *sodA* und *sodB* und die Abwesenheit der korrespondierenden Proteine Sod A und Sod B hat somit einen signifikanten Einfluss auf das Überleben der beiden Stämme bezogen auf T<sub>I</sub>-PACT mit MB. Während ab 15 µM MB bei *E. coli*-WT ein antimikrobieller Effekt beobachtet wurde ( $\geq 3 \log_{10}$  Stufen-Reduktion), resultierte die Behandlung von *E. coli*-PN134 in einer Desinfektion ( $\geq 5 \log_{10}$  Stufen-Reduktion) (48). Ein basales *sod*-Level ist also ein Überlebensfaktor gegenüber ROS. In Experimenten mit TMPyP, das eine <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Quantenausbeute von  $\Phi_{\Delta} = 0,74$  besitzt (35), war die Überlebensrate der beiden Stämme ähnlich (Abb. 1). Obwohl oxidativer Stress in unmittelbarer Umgebung der Bakterien in Abwesenheit von anti-oxidativen Enzymen wie Sod A und Sod B zu einer erhöhten Vulnerabilität der Mutante führt (49), unterschied sich die Überlebensrate beider Stämme in T<sub>II</sub>-PACT mit TMPyP (32) in dieser Arbeit nicht. Zwar konnte die Hinzugabe von anti-oxidativen Enzymen in TMPyP-Experimenten die

Überlebensraten beider Stämme nicht auf das Niveau der Quenching-Experimente mit MB anheben, dennoch war ein signifikanter Anstieg der basalen Überlebensraten beider Stämme zu verzeichnen, obwohl der allgemeine Trend auf ein höheres Überleben von *E. coli*-WT hinweist (Abb. 1 vs. Abb. 2). Die Protektion durch die Hinzugabe von Sod oder Kat hatte vor allem in T<sub>I</sub>-PACT einen Einfluss, wo vermehrt Radikale entstehen, mit denen Sod und Kat reagieren können. In T<sub>II</sub>-PACT mit TMPyP entsteht der biologische Schaden vor allem durch <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, wogegen Sod und Kat nicht protektiv wirken können. Folglich ist die Abwesenheit dieser beiden Enzyme vor allem in T<sub>I</sub>-PACT relevant. Dies könnte eine Erklärung für das signifikant bessere Überleben von *E. coli*-WT gegenüber *E. coli*-PN134 sein.

Nichtsdestotrotz sollte der Unterschied zwischen endogen produzierten und exogen applizierten Enzymen nicht außer Acht gelassen werden. In dieser Studie wurden beide Enzyme hinzugegeben, um ROS, die sowohl in T<sub>I</sub>- als auch in T<sub>II</sub>-Reaktionen entstehen, unschädlich zu machen. Der Unterschied dieser beiden Reaktionswege ist nicht absolut, sondern relativ. Beide PS können sowohl <sup>1</sup>O<sub>2</sub> als auch typische T<sub>I</sub>-ROS produzieren. Ein weiteres Indiz für diese Hypothese ist der gemessene Überlebensvorteil beider Stämme nach der Hinzugabe eines einzelnen Quenchers – unabhängig von dem gewählten PS. Trotz der hohen <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Quantenausbeute von TMPyP ( $\Phi_{\Delta} = 0,74$ ) (35) hat auch hier die Hinzugabe von T<sub>I</sub>-ROS-Quenchern wie Sod und Kat das Überleben verbessert. Die Menge der aktiven antioxidativen Enzyme zum Zeitpunkt der photodynamischen Inaktivierung der Bakterien hat einen erheblichen Einfluss auf das Überleben, ob exogen hinzugefügt – und damit physiologisch in dieser hohen Quantität vermutlich nicht möglich – oder endogen durch die Bakterien synthetisiert. Durch die hohe <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-Quantenausbeute in T<sub>II</sub>-PACT mit TMPyP ist hier vor allem <sup>1</sup>O<sub>2</sub> als toxisches Agens für den antimikrobiellen Schaden verantwortlich. Nach dem von Cieplik et al. (39) entwickelten Verfahren zur Berechnung von Bestrahlungsparametern und Vergleichbarkeit photodynamischer Prozesse mithilfe der Anzahl absorbiertes Photonen pro Sekunde waren MB-Endkonzentration von max.  $c_{MB} = 0,8 \times c_{TMPyP}$  vorgesehen. Da aber Experimente mit MB bei diesen Endkonzentrationen zu keinem suffizienten Erfolg im Sinne einer adäquaten Reduktion der KBE-Zahl führten, wurden sowohl höhere Endkonzentrationen als auch eine ca. 6-fach höhere Bestrahlungsdauer und eine ca. 15-fach höhere flächenbezogene Strahlungsenergie in T<sub>I</sub>-Experimenten mit MB bestimmt. Die höhere Effektivität von TMPyP wird bei geringerer Konzentration und weniger photo-aktiven Molekülen im Vergleich zu MB umso deutlicher. So gibt es neben der Anzahl der photo-aktiven Moleküle eine Vielzahl anderer Parameter, die das Ausmaß der antimikrobiellen Wirkung von PACT beeinflussen können. Die Bedeutung der generierten

$^1\text{O}_2$ -Menge pro einem PS-Molekül für die Effektivität der antimikrobiellen Wirkung unter den genannten Bedingungen ist enorm. Je höher die  $^1\text{O}_2$ -Quantenausbeute, umso erfolgreicher war die photodynamische Therapie. Im translationalen Kontext kann diese Erkenntnis für die Suche nach einem therapeutischen Fenster hilfreich sein. Auch die typischen  $\text{T}_1$ -ROS spielen im Gesamtkontext der PACT sowohl bei  $\text{T}_1$ - als auch bei  $\text{T}_{\text{II}}$ -PACT eine wichtige Rolle, da durch entsprechende enzymatische Abwehrmechanismen PACT in seinem Wirkungsbereich gemindert wird. Nakonieczna et al. zeigten auf Proteinebene die Hochregulation von Sod bei ausgewählten *Staphylococcus aureus*-Stämmen nach  $\text{T}_{\text{II}}$ -basierter PACT mit einem PS aus der Gruppe der Porphyrine – Protoporphyrin IX (50). Karavolos et al. beobachteten ebenfalls eine vermehrte Synthese von Sod bei *Staphylococcus aureus* nach oxidativem Stress (51). In der vorliegenden Studie wurde auf genetischer Ebene keine Hochregulation von *sodA* und *sodB* nach subletaler PACT-Behandlung von *E. coli*-WT quantifiziert. Trotz der Aussetzung von oxidativem Stress durch photodynamische Behandlung wurde im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen keine erhöhte Genexpression und somit kein Einfluss auf das Überleben verzeichnet. Das basale Genlevel von *sodA* und *sodB* ist nicht ausreichend, um bei einer bestimmten Mindestkonzentration die Bakterien suffizient zu schützen. Im Gegensatz zu den Quenching-Experimenten, die einen nicht-physiologischen Zustand widerspiegeln und *in vivo* unter diesen Bedingungen nicht möglich sind, bewirkt die Hinzugabe der anti-oxidativen Enzyme eine Protektion der Bakterien. Diese Erkenntnis hebt die Bedeutung anti-oxidativer Enzyme hervor. Das Überleben ist an dieser Stelle eine Frage der Quantität und Lokalisation dieser Enzyme. Der Metabolismus der ausgewählten Stämme kann sich nicht an diese Bedingungen anpassen. Allerdings können durch zufällige Mutationen oder *in vitro* Kultivierung auch sogenannte Überexpressionsmutanten (52) entstehen, die anti-oxidative Enzyme über die derzeit bestehenden physiologischen Grenzen hinaus produzieren und eine vermehrte Toleranz im Sinne höherer Überlebensraten gegenüber  $\text{T}_1$ -PACT zeigen, welche mit dem Überleben in den Quenching-Experimenten bei  $\text{T}_1$ -PACT zu vergleichen sind. Hier wurden die Überlebensraten auf ein Niveau angehoben, auf dem nahezu kein antimikrobieller ( $\geq 3 \log_{10}$  Stufen-Reduktion) oder desinfizierender ( $\geq 5 \log_{10}$  Stufen-Reduktion) Effekt mehr detektiert wurde.

Weniger protektiv war die Hinzugabe von Sod oder Kat gegen in  $\text{T}_{\text{II}}$ -PACT generierten  $^1\text{O}_2$ . Hierbei handelt es sich um molekularen Sauerstoff in einem angeregten und damit energiereichen Zustand mit antiparalleler Spinausrichtung der ungepaarten Elektronen ( $^1\Delta_g$ ) (13,14).  $^1\text{O}_2$  agiert hier als wirkungsvolles Oxidationsmittel und leitet somit oxidative Prozesse zur Schädigung des Bakteriums ein (53). Dosselli et al. zeigten, dass subletale PACT

die Synthese verschiedener Proteine im bakteriellen Metabolismus hinsichtlich Zellteilung, Nahrungsaufnahme und Abwehr von oxidativem Stress beeinflusst. Unter anderem wurde die Expression von *katA* in *Staphylococcus aureus* bei subletaler und letaler PACT quantifiziert. Die Ergebnisse zeigten eine 4-fach erhöhte Induktion von *katA* nach letaler PACT im Vergleich zur subletalen PACT, was zeigt, dass die Bakterien in der Lage sind, auf genetischer Ebene auf oxidativen Stress zu reagieren, und vermehrt protektive Enzyme synthetisieren können (54). Allerdings zeigte sich bei Dosselli et al., dass eine Mehrexpression zu keinem Überlebensvorteil führte, was möglicherweise daran lag, dass der PS an anderer Stelle lokalisiert war als die anti-oxidativen Enzyme und so eine photodynamische Inaktivierung nicht verhindert werden konnte (54).

In der vorliegenden Studie konnte auf genetischer Ebene kein relevanter Einfluss von PACT festgestellt werden. Es zeigte sich keine signifikante Hochregulation von *sodA* oder *sodB*. Obwohl andere Studien alternierende Proteinsynthesemuster nach PACT-Behandlung detektierten, fand hier kein Anstieg der Genexpression statt. Es führt zu der Hypothese, dass die verschiedenen Proteinmuster möglicherweise nicht direkt durch PACT induziert wurden. Nach repetitiver PACT-Behandlung mit den gleichen überlebenden Stämmen und trotz verändertem Proteinsynthesemuster kam es nach wie vor zu keinem Anstieg der Überlebensraten, was für die klinische Anwendung von PACT eine wichtige Rolle spielen könnte (19,20). Im Gegensatz dazu haben *in vitro* kultivierte *E. coli*-Mutanten, die entweder essentielle anti-oxidative Gene und/oder Regulons überexprimieren oder entbehren (Abb. 1-4), ein besseres oder schlechteres Überleben – wie in der vorliegenden Studie untersucht wurde. Bei beiden Varianten ergibt sich hinsichtlich der Überlebensraten ein großer Unterschied. Kim et al. untersuchten die Rolle von *oxyR* in T<sub>1</sub>-PACT mit MB (52). Eine Überexpression von *oxyR* und damit vermehrte Aktivität von Sod und Kat in *E. coli*-WT führte zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber PACT. *OxyR* verhinderte durch die Induktion protektiver Enzyme die Inaktivierung von Sod und Kat. Zusätzlich induzierte es die Expression von Kat. In einem weiteren Versuch erhöhten Kim et al. die Empfindlichkeit der getesteten Stämme hochgradig durch Inaktivierung von *oxyR* (52). Kritisch muss an dieser Stelle die Auswertung der KBE mittels nicht-logarithmischer Skalierung gesehen werden, welche in der Studie von Kim et al. zur Anwendung kam, da diese Methode nicht den internationalen Hygienerichtlinien entspricht (55,56). Im Einklang mit der vorliegenden Studie spielt sowohl die Verfügbarkeit als auch der Schutz anti-oxidativer Enzyme wie Sod und Kat durch essentielle Regulons wie *oxyR* und *soxRS* als Schlüsselregulatoren für das Überleben der Bakterien eine wesentliche Rolle. Ein suffizienter Schutz gegen T<sub>1</sub>-ROS setzt



eine korrekte Funktion anti-oxidativer Enzyme voraus. Ist die Funktion dieser Enzyme entweder indirekt durch den Mangel protektiver oder induzierender Gene wie *oxyR* oder *soxRS* (51,52) oder direkt durch das Fehlen entsprechender Proteine gestört, kommt es zur erheblichen Verminderung der Überlebensrate der entsprechenden bakteriellen Stämme.

## **5 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine *E. coli*-Mutante, die aufgrund genetischer Manipulation nicht in der Lage ist, die beiden Enzyme Sod A und Sod B zu bilden, gegenüber PACT hochempfindlich ist. Bakterielle Abwehrmechanismen in T<sub>I</sub>- und T<sub>II</sub>-basierter PACT können teilweise und je nach Ausmaß der entstehenden ROS bis zu einem gewissen Grad durch die Hinzugabe von Enzymen wie Sod oder Kat unterstützt werden. Ferner zeigte sich unter den gegebenen Bedingungen hinsichtlich der Genregulation keine signifikante Veränderung von *sodA* und *sodB* nach subletaler photodynamischer Reizung, sodass endogene bakterielle Mechanismen keinen suffizienten Schutz gewährleisteten. Mit Blick auf die gesamte PACT scheint sich hier hinsichtlich der Resistenzproblematik aufgrund des „multi target“-Ansatzes ein neuer Weg zu ergeben. Auch die negativen Aspekte der Photodynamik in der antimikrobiellen Therapie müssen betrachtet werden. So beobachteten Eckl et al. kürzlich, dass minimale Veränderungen der Untersuchungs- und Therapieparameter eine gewisse Dunkeltoxizität von TMPyP bei *Bacillus atrophaeus* bewirkten, was verdeutlicht, dass für die klinische Anwendung von PACT als antimikrobielles Verfahren weitere Untersuchungen zur Erhöhung der Anwendungssicherheit notwendig sind (57). Versuche zur Desinfektion klinischer Blutprodukte unternahm Marciel et al., indem sie Blutprodukte der PACT mit verschiedenen PS unterzogen. Hierbei kam es bei Verwendung eines kationischen Porphyrins zur effektiven Reduktion der Keimzahl ohne signifikante osmotische Schäden der zu transfundierenden Blutbestandteile, die bei den herkömmlichen Desinfektionsmethoden durchaus üblich sind (58). Die Tendenz zur Verwendung von Photosensibilisatoren aus chemischen Klassen, die im menschlichen Organismus vorkommen, kommt auch hier zum Vorschein. So spielen die umfangreich untersuchten Porphyrine im Hämoglobin-Stoffwechsel eine wichtige Rolle. Andererseits wird das MB aus der Gruppe der Phenothiazine in vielen chirurgischen Disziplinen der klinischen Medizin eingesetzt (59–61).

Das Prinzip der Photodynamik wird heute breit in der Medizin therapeutisch und diagnostisch genutzt und hat sich zum Teil auch in den Leitlinien der entsprechenden medizinischen Fachgesellschaften bei bestimmten Erkrankungen etabliert (62,63). Für den effektiven klinischen und industriellen Einsatz als antimikrobielles Verfahren sind weitere Untersuchungen notwendig. Allerdings verweist bereits die aktuelle Datenlage auf ein vielversprechendes Verfahren hin.

## **6 Abkürzungsverzeichnis**

CCD	charge-coupled device
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
<i>E. coli</i> -WT	<i>Escherichia coli</i> -Wildtyp
<i>E. coli</i> -PN134	<i>Escherichia coli</i> -PN134
gapA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> O dest.	Wasser (destilliert)
Kat	Katalase
MB	Methylenblau
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-Sauerstoff
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	(molekularer) Sauerstoff
·OH	Hydroxyl-Radikal
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anion
OD	optische Dichte
PACT	Photodynamische antimikrobielle Chemotherapie
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without calcium chloride and magnesium chloride
PCR	polymerase chain reaction
PS	Photosensibilisator
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
S <sub>0</sub>	Grundzustand
S <sub>1</sub>	Singulett-Zustand
Sod	Superoxiddismutase
T <sub>1</sub>	Triplett-Zustand
T <sub>I</sub>	Typ I
T <sub>II</sub>	Typ II
TMPyP	5,10,15,20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphyrin tetra(p-toluenesulfonate)
WHO	World Health Organization

## **7 Literaturverzeichnis**

1. Cressey D. Drug-resistant bacteria and lack of new antibiotics pose ‘catastrophic threat’. Nature News Blog. 2013.
2. Rossolini GM, Mantengoli E. Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy. In: *Clinical Microbiology and Infection*. 2008. p. 2–8.
3. U.S. Department of Health and Human Services. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC. 2013.
4. WHO. Antimicrobial Resistance - Global Report on Surveillance. World Heal Organ. 2014.
5. Spellberg B. The future of antibiotics. *Crit Care*. 2014;18(3):228.
6. Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Infect*. 2009 Sep;59 Suppl 1(2):S4-16.
7. Livermore DM. Are all beta-lactams created equal? *Scand J Infect Dis Suppl*. 1996;101:33–43.
8. Maisch T, Szeimies R-M, Jori G, Abels C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(10):907–17.
9. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3(5):436–50.
10. Aveline B. Primary processes in photosensitization mechanisms. *Compr Ser Photosciences*. 2001;17–37.
11. Oleinick N. Basic Photosensitization. Available from: <http://photobiology.info/Oleinick.html>
12. Glaeser J, Nuss AM, Berghoff BA, Klug G. Singlet oxygen stress in microorganisms. *Adv Microb Physiol*. 2011;58:141–73.
13. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother*. 1998 Jul;42(1):13–28.
14. Maisch T, Baier J, Franz B, Maier M, Landthaler M, Szeimies R-M, et al. The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 Apr 24;104(17):7223–8.
15. Kasimova KR, Sadasivam M, Landi G, Sarna T, Hamblin MR. Potentiation of photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria mediated by six phenothiazinium dyes by addition of azide ion. *Photochem Photobiol Sci*. 2014 Nov;13(11):1541–8.
16. Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DR, Bolton FJ. A study of

- photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1997 Sep;19(1):75–80.
17. Garcia-Diaz M, Huang Y-Y, Hamblin MR. Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy. *Methods.* 2016 Jul 1.
  18. Dai T, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 6(3–4):170–88.
  19. Tavares A, Carvalho CMB, Faustino MA, Neves MGPMS, Tomé JPC, Tomé AC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs.* 2010;8(1):91–105.
  20. Giuliani F, Martinelli M, Cocchi A, Arbia D, Fantetti L, Roncucci G. In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Feb;54(2):637–42.
  21. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006 Jun;38(5):468–81.
  22. Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:755–76.
  23. Vatansever F, de Melo WCMA, Avci P, Vecchio D, Sadasivam M, Gupta A, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species--bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. *FEMS Microbiol Rev.* 2013 Nov;37(6):955–89.
  24. Sherman DR, Sabo PJ, Hickey MJ, Arain TM, Mahairas GG, Yuan Y, et al. Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 Jul 3;92(14):6625–9.
  25. Storz G, Tartaglia LA, Farr SB, Ames BN. Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends Genet.* 1990 Nov;6(11):363–8.
  26. Storz G, Tartaglia LA, Ames BN. Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science.* 1990 Apr 13;248(4952):189–94.
  27. González-Flecha B, Demple B. Genetic responses to free radicals. Homeostasis and gene control. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:69–87.
  28. Pomposiello PJ, Demple B. Global adjustment of microbial physiology during free radical stress. *Adv Microb Physiol.* 2002;46:319–41.

29. Diaz PI, Slakeski N, Reynolds EC, Morona R, Rogers AH, Kolenbrander PE. Role of oxyR in the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 2006 Apr;188(7):2454–62.
30. Honma K, Mishima E, Inagaki S, Sharma A. The OxyR homologue in *Tannerella forsythia* regulates expression of oxidative stress responses and biofilm formation. *Microbiology.* 2009 Jun;155(Pt 6):1912–22.
31. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969 Nov 25;244(22):6049–55.
32. Maisch T, Spannberger F, Regensburger J, Felgenträger A, Bäuml W. Fast and effective: intense pulse light photodynamic inactivation of bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2012 Jul;39(7):1013–21.
33. Wainwright M, Phoenix DA, Laycock SL, Wareing DR, Wright PA. Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1998 Mar 15;160(2):177–81.
34. Regensburger J, Maisch T, Felgenträger A, Santarelli F, Bäuml W. A helpful technology--the luminescence detection of singlet oxygen to investigate photodynamic inactivation of bacteria (PDIB). *J Biophotonics.* 2010 Jun;3(5–6):319–27.
35. Wilkinson F, Helman WP, Ross AB. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *J Phys Chem Ref Data.* 1993;22:113–262.
36. Baier J, Maisch T, Regensburger J, Loibl M, Vasold R, Bäuml W. Time dependence of singlet oxygen luminescence provides an indication of oxygen concentration during oxygen consumption. *J Biomed Opt.* 12(6):064008.
37. Redmond RW, Gamlin JN. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem Photobiol.* 1999;70(4):391–475.
38. Sobota JM, Gu M, Imlay JA. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide poison 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate synthase, the first committed enzyme in the aromatic biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2014 Jun;196(11):1980–91.
39. Cieplik F, Pummer A, Regensburger J, Hiller K-A, Späth A, Tabenski L, et al. The impact of absorbed photons on antimicrobial photodynamic efficacy. *Front Microbiol.* 2015;6:706.
40. Tabenski I, Cieplik F, Tabenski L, Regensburger J, Hiller K-A, Buchalla W, et al. The impact of cationic substituents in phenalen-1-one photosensitizers on antimicrobial

- photodynamic efficacy. *Photochem Photobiol Sci*. 2016 Jan 6;15(1):57–68.
41. Felgenträger A, Maisch T, Dobler D, Späth A. Hydrogen bond acceptors and additional cationic charges in methylene blue derivatives: photophysics and antimicrobial efficiency. *Biomed Res Int*. 2013;2013:482167.
  42. Miles AA, Misra SS, Irwin JO. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond)*. 1938;38(6):732–49.
  43. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
  44. George S, Hamblin MR, Kishen A. Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria. *Photochem Photobiol Sci*. 2009 Jun;8(6):788–95.
  45. Gollmer A, Felgenträger A, Bäuml W, Maisch T, Späth A. A novel set of symmetric methylene blue derivatives exhibits effective bacteria photokilling - a structure-response study. *Photochem Photobiol Sci*. 2015 Feb;14(2):335–51.
  46. Gollmer A, Felgentraeger A, Maisch T, Flors C. Real-time imaging of photodynamic action in bacteria. *J Biophotonics*. 2017 Feb;10(2):264–70.
  47. Szeimies RM, Karrer S, Abels C, Steinbach P, Fickweiler S, Messmann H, 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 Biol*. 1996;34(1):67–72.
  48. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Anforderungskatalog für die Aufnahme von chemischen Desinfektionsverfahren in die Desinfektionsmittel-Liste der DGfHM. 2002;9–16.
  49. Gort AS, Imlay JA. Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. *J Bacteriol*. 1998 Mar;180(6):1402–10.
  50. Nakonieczna J, Michta E, Rybicka M, Grinholc M, Gwizdek-Wiśniewska A, Bielawski KP. 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 Dec 17;10:323.
  51. Karavolos MH, Horsburgh MJ, Ingham E, Foster SJ. Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. 2003 Oct;149(Pt 10):2749–58.
  52. Kim SY, Kim EJ, Park J-W. Control of singlet oxygen-induced oxidative damage in *Escherichia coli*. *J Biochem Mol Biol*. 2002 Jul 31;35(4):353–7.

53. Baier J, Maisch T, Maier M, Landthaler M, Bäuml W. Direct detection of singlet oxygen generated by UVA irradiation in human cells and skin. *J Invest Dermatol.* 2007 Jun;127(6):1498–506.
54. Dosselli R, Million R, Puricelli L, Tessari P, Arrigoni G, Franchin C, et al. Molecular targets of antimicrobial photodynamic therapy identified by a proteomic approach. *J Proteomics.* 2012 Dec 21;77:329–43.
55. Powell EO. Growth rate and generation time of bacteria, with special reference to continuous culture. *J Gen Microbiol.* 1956 Dec;15(3):492–511.
56. The Environmental Protection Agency. *Water Treatment Manual: Disinfection.* 2011.
57. Eckl DB, Dengler L, Nemmert M, Eichner A, Bäuml W, Huber H. A Closer Look at Dark Toxicity of the Photosensitizer TMPyP in Bacteria. *Photochem Photobiol.* 2018;94(1):165–72.
58. Marciel L, Teles L, Moreira B, Pacheco M, Lourenço LM, Neves MG, et al. An effective and potentially safe blood disinfection protocol using tetrapyrrolic photosensitizers. *Future Med Chem.* 2017;9(4):365–79.
59. Patel HP, Chadwick DR, Harrison BJ, Balasubramanian SP. Systematic review of intravenous methylene blue in parathyroid surgery. *Br J Surg.* 2012 Oct;99(10):1345–51.
60. Celik S, Almalı N, Aras A, Yılmaz Ö, Kızıltan R. Intraoperatively Testing the Anastomotic Integrity of Esophagojejunostomy Using Methylene Blue. *Scand J Surg.* 2017 Mar;106(1):62–7.
61. Doll D, Novotny A, Rothe R, Kristiansen JE, Wietelmann K, Boulesteix A-L, et al. Methylene Blue halves the long-term recurrence rate in acute pilonidal sinus disease. *Int J Colorectal Dis.* 2008 Feb;23(2):181–7.
62. Morton C, Szeimies R-M, Sidoroff A, Wennberg A-M, Basset-Seguin N, Calzavara-Pinton P, et al. European Dermatology Forum Guidelines on topical photodynamic therapy. *Eur J Dermatol.* 25(4):296–311.
63. Railkar R, Agarwal PK. Photodynamic Therapy in the Treatment of Bladder Cancer: Past Challenges and Current Innovations. *Eur Urol Focus.* 2018;4(4):509–11.





Cite this: *Photochem. Photobiol. Sci.*,  
2018, 17, 352

## Susceptibility of *sodA*- and *sodB*-deficient *Escherichia coli* mutant towards antimicrobial photodynamic inactivation *via* the type I-mechanism of action

Pouriya Faraj Tabrizi, Sara Wennige, Mark Berneburg and Tim Maisch \*

Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) is a multi-target method to inactivate pathogenic microorganisms by exciting a photosensitizer (PS) with visible light of appropriate wavelength in the presence of molecular oxygen ( $^3\text{O}_2$ ). There are two major pathways by which reactive oxygen species (ROS) are produced. In type I ( $T_1$ )-reactions, radicals such as superoxide ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) and hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) are generated by electron transfer. In type II ( $T_{II}$ )-reactions, highly reactive singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) is produced by direct energy transfer. This study investigated the efficiency of PACT in Gram-negative *Escherichia coli* wild type (EC WT) and the mutant *Escherichia coli* PN134 (EC PN134) which is not able to produce SOD A and SOD B, by means of two different photosensitizers (PS) from different chemical classes with different  $^1\text{O}_2$  quantum yields: methylene blue (MB) and 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphyrin tetra(*p*-toluenesulfonate) (TMPyP). Mutants, which lack antioxidant enzymes, were particularly susceptible towards  $T_1$ -PACT. In the case of PACT with MB, quenching agents such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were sufficient for protecting both the wild type and the mutant, whereas they were not in PACT with TMPyP. The genetic levels of *sodA* and *sodB* were examined after photodynamic treatment regarding their potential resistance. This study showed that – under the photodynamic conditions presented in this study – expression of *sodA* and *sodB* was not directly influenced by PACT-generated oxidative stress, although SOD enzymes are part of the major defense machinery against oxidative stress and were thus expected to be upregulated. Overall the susceptibility of EC PN134 and EC WT differed towards photodynamic inactivation *via*  $T_1$ -mechanism of action. Thus, already existing defense mechanisms against ROS in bacteria might influence the susceptibility against  $T_1$ -PACT, while this was not the case using  $T_{II}$ -photosensitizers.

Received 6th October 2017,  
Accepted 21st February 2018  
DOI: 10.1039/c7pp00370f  
rsc.li/ppps

### Introduction

The increasing resistance of approved antibiotics poses a “catastrophic threat” to humankind in the 21<sup>st</sup> century.<sup>1</sup> The excessive and unfortunately incorrect use of antibiotics in both human and veterinary medicine has led to the development of resistant pathogenic microorganisms such as Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) or Vancomycin-resistant *Enterococci* (VRE).<sup>2</sup> According to the U.S. Department of Health and Human Services, at least 2 million people in the United States become infected with antibiotic-resistant bacteria every year. Moreover, 23 000 people die per year as a direct consequence and even more from subsequent complications in relation with other diseases.<sup>3</sup> In a recent global

report on the surveillance of antimicrobial resistance, the World Health Organization (WHO) has warned of “a post-antibiotic era in which common infections and minor injuries can cause death again”.<sup>4</sup> The development of new classes of antibiotics has been steadily declining over the past decades, while the rate of antibiotic resistance has crucially increased. This imbalance demands the development of new approaches to the effective eradication of pathogenic microorganisms.<sup>5</sup> This overriding public health issue necessitates intensive research into new multi-target methods to avoid the problems involved in antibiotic resistance. Antibiotics usually act against a specific single-target in bacterial metabolism according to a so-called key-keyhole principle. If this target is not available due to developed antibiotic-resistance, bacteria may become indestructible very quickly.<sup>6,7</sup>

One new method termed photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) has already been proved to present an effective antimicrobial approach.<sup>8,9</sup>

Department of Dermatology, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany. E-mail: tim.maisch@ukr.de

PACT is based on the generation of highly reactive oxygen species (ROS) by means of a photosensitizer (PS) that is either located in pathogens or attached to their cell walls and excited by visible light of appropriate wavelength in the presence of molecular (in ground-triplet state) oxygen ( $^3\text{O}_2$ ). The excited PS may relax into its ground state *via* different pathways.<sup>10</sup> The ratio which of these pathways is favoured depends on the type of PS used and the microenvironment of the PS localization.

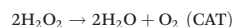
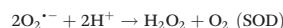
In the type I ( $\text{T}_1$ )-pathway, an electron or hydrogen ion is transferred from the excited PS to molecules in its vicinity, *e.g.*  $^3\text{O}_2$ . In the presence of  $^3\text{O}_2$  this transfer enables the formation of superoxide ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) that can further transform to other ROS such as hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ) *via* the Fenton reaction.<sup>11,12</sup> In the type II ( $\text{T}_{11}$ )-pathway, energy from the excited PS is directly transferred to molecular oxygen, thus forming highly reactive singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ).<sup>13,14</sup> Both reactions may occur simultaneously, but the proportions depend on the photo-chemical structure of the chosen PS, particularly regarding its redox potential. PS, like MB, with a low redox potential are good electron acceptors and mainly follow the  $\text{T}_1$ -pathway.<sup>15</sup> Reduction of MB by bacteria leads to the formation of colourless neutral species, which are not photodynamic active and do not seem to be an important factor in PACT action.<sup>16</sup> PS with a high redox potential are poor electron acceptors that act on the  $\text{T}_{11}$ -mechanism.<sup>17</sup> ROS generated by the photodynamic process react immediately with target biomolecules, such as proteins and lipids, and thus inactivate pathogenic microorganisms through an "oxidative burst".<sup>18</sup>

Up to now, bacterial cells have not shown increasing robustness or resistance, not in the classical sense of antibiotic resistance, but in terms of higher survival rates after repeated PACT treatment (lesser susceptibility). After 10 intervals of fractional inactivation and adjacent regrowth over the course of PACT, survival rates did not increase, neither in *Escherichia coli* (EC) strains nor in *Staphylococcus aureus* (SA) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA) strains. Survival rates were also not increased in *Candida albicans* (CA) after 20 PACT treatments.<sup>19,20</sup> PACT has been defined as a multi-target process with an antimicrobial impact on several microorganisms and a low mutagenic level.<sup>21</sup>

Nevertheless, to understand the potential of developing tolerance or reduced susceptibility to the "oxidative burst" induced by PACT, it is essential to study the specific defense strategies of bacteria.

Bacterial key players against oxidative stress are superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT).<sup>22</sup> SOD and CAT are two major endogenous enzymatic antioxidants that are primarily regulated by the oxidative stress regulons OxyR and SoxRS. Oxidative stress response regulation by these two regulons is a fundamental factor for survival during exposure to exogenously and endogenously produced ROS.<sup>23</sup> Both systems act as redox sensors as well as transcription factors that induce the expression of DNA repair enzymes, enzymes of the carbon metabolism, and – of course – the antioxidant enzymes mentioned above.<sup>24–28</sup> The functional presence of OxyR and SoxRS in a multitude of bacteria species shows the importance of

these regulons.<sup>29,30</sup> OxyR and SoxRS are even present in anaerobes such as *Bacteroidetes* species, in which OxyR is involved in  $\text{H}_2\text{O}_2$  tolerance despite the presence of many other oxidative stress regulators (for instance, PerR and RpoS). Thus, induction of antioxidant proteins such as SOD and CAT plays an important role in the antioxidant defense machinery of bacteria against ROS. SOD forms a first-line defense against superoxide and catalyses its reaction to  $\text{H}_2\text{O}_2$  that is finally detoxified in a subsequent reaction by CAT.<sup>31</sup>



This study investigated the efficiency of PACT in Gram-negative *Escherichia coli* wild type (EC WT) and the mutant *Escherichia coli* PN134 (EC PN134) that is not able to produce the two main isoenzymes SOD A and SOD B. Therefore, the involvement of this bacterial defense system was analysed in respect to photodynamically generated oxidative stress for the efficient eradication of bacteria. Successful PACT depends on the applied PS and the interaction of the generated oxygen species with the bacterial defense systems. The chemical structure of the applied PS determines the amount and sort of generated ROS. Thus, the survival rates in PACT can be very different due to the applied PS.<sup>15</sup> Also, the available antioxidant enzymes, *e.g.* SOD or CAT have a crucial impact on survival in PACT. Depending on the generated ROS those bacterial defense mechanisms are protective or not. To increase the efficiency of PACT, it is essential to understand the specific defense strategies of bacteria and evaluate the importance of SOD. Therefore, the common photosensitizers TMPyP and MB were used in this study, because both PS have shown sufficient photodynamic inactivation of EC but differ in their  $^1\text{O}_2$  quantum yield. MB has a low redox potential and mainly follows the  $\text{T}_1$ -pathway ( $\Phi_{\Delta} = 0.52$ ). TMPyP as a  $\text{T}_{11}$ -PS generates much more  $^1\text{O}_2$  ( $\Phi_{\Delta} = 0.74$ ), which causes large damage in  $\text{T}_{11}$ -based PACT.<sup>14,32–35</sup>

## Materials and methods

### Bacterial strains and cultivation

This study used Gram-negative *Escherichia coli* (AB1157 – a K12 derivative; EC WT) and an insertionally inactivated mutant *Escherichia coli* PN134 (AB1157 plus *sodA::Mud PR13*25 (*sodB-kan*)1- $\Delta$ ; both gifted from James Imlay, University of Illinois, USA; EC PN134).<sup>36</sup> The bacteria were aerobically cultivated in 5 ml of Mueller-Hinton bouillon on a shaking incubator (Certomat R; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) at 180 rpm and 37 °C. After overnight incubation (14 h to 16 h) and reaching the stationary phase, cells were centrifuged at 3000 rpm (Universal 320 R; Andreas Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen, Germany) for 10 minutes. Supernatants were carefully removed, and pellets were diluted to an optical density (OD) of 0.6 (Specord 50 Plus; Analytik Jena AG, Jena, Germany) corresponding to  $10^{7-8}$  colonies per ml. In PACT and

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> experiments without enzymes, bacterial pellets were diluted in a solution composed of 50% distilled water (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and 50% PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without calcium chloride and magnesium chloride; Sigma-Aldrich Co. LLC., St Louis, Missouri, USA). After the addition of the PS a final volume concentration of 75% distilled water and 25% PBS was obtained. In PACT and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quenching experiments, bacterial pellets were diluted in 100% distilled water, and the enzyme, which was solved in 100% PBS due to the manufacturer's protocol, was added afterwards. After the addition of the remained components (PS or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100% distilled water) a final volume concentration of 75% distilled water and 25% PBS was obtained as well.

#### Photosensitizer

Powders of 1 mM of TMPyP (5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphyrin tetra(*p*-toluenesulfonate)) and 1 mM of MB (methylene blue) were purchased from Sigma-Aldrich Co. LLC., St Louis, Missouri, USA. Both PS were dissolved in distilled water and filtered through a 0.22 μm pore layer. Stock solutions of 1 mM of both PS were stored in the dark at 4 °C. TMPyP experiments were conducted with final concentrations of 1 μM, 2.5 μM, 5 μM, and 10 μM and MB experiments with 5 μM, 10 μM, and 15 μM.

#### Number of absorbed photons

According to the formula developed by Cieplik *et al.*,<sup>37</sup> each MB concentration, which was used for incubation with bacteria, needs to be multiplied by 0.8 compared to TMPyP when focusing on the number of absorbed photons to compare the efficacy of these different PS:

$$\text{absorbed photons/second} = \sum_{\lambda} \left( 1 - 10^{-\epsilon(\lambda) \cdot c \cdot d} \cdot P_{\text{em}}(\lambda) \cdot \frac{\lambda}{c_0 \cdot h} \right)$$

$\epsilon(\lambda)$ , extinction coefficient [(mol cm<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>];  $P_{\text{em}}(\lambda)$ , spectral radiant power of the respective light source [mW nm<sup>-1</sup>];  $c$ , concentration of the PS [μM];  $d$ , thickness of the solution [mm];  $c_0$ , velocity of light [m s<sup>-1</sup>];  $h$ , Planck constant [J s];  $\lambda$ , wavelength [nm].

However, in this study much higher MB concentrations were chosen (see Discussion).

#### Light sources

The irradiance (mW cm<sup>-2</sup>) was measured with a low-power thermal sensor (Nova 30 A-P-SH, Ophir-Spiricon, North Logan, Utah, USA) at the level of bacteria. The emission spectra of both light sources were recorded by means of a monochromator with a CCD detection unit (SPEX 232, HORIBA France SAS, Longjumeau Cedex, France). Absorption spectra of MB and TMPyP were recorded at room temperature using a spectrophotometer (Specord 50 Plus; Analytik Jena AG, Jena, Germany).

In TMPyP experiments, samples were illuminated with a source emitting narrow-band blue light with a peak at

436.5 nm in a range from 400 to 450 nm (Waldmann Blue V, Herbert Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen, Germany) at an irradiance of 18 mW cm<sup>-2</sup> for 10 seconds, resulting in a radiant exposure of approximately 0.18 J cm<sup>-2</sup>.<sup>38</sup> In MB experiments, a source emitting narrow-band red light with a peak at 671 nm in a range from 650 to 700 nm (Waldmann PDT 1200, Herbert Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen, Germany) at an irradiance of 46.5 mW cm<sup>-2</sup> for 60 seconds was used, resulting in a radiant exposure of approximately 2.78 J cm<sup>-2</sup>.<sup>39</sup>

#### Photodynamic inactivation

25 μl of bacteria (OD = 0.6) and 25 μl of the PS (double concentrated) were transferred into a clear 96-well plate (Corning Costar; Corning, New York, USA). After incubation in the dark for 10 seconds, one plate was illuminated with the corresponding light source, while the other plate was incubated in the dark for the same length of time. Afterwards, aliquots of 20 μl of each sample were serially diluted seven times 1 : 10 in 180 μl of Mueller-Hinton bouillon. A negative control (no illumination, no PS) and a positive control (illumination without PS) were conducted as control samples in each experiment.

#### Quenching experiments with enzymes

Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) (both Sigma-Aldrich Co. LLC., St Louis, Missouri, USA) were diluted in PBS according to the manufacturer's recommendation. 54.4 units SOD per 25 μl and 13.6 units CAT per 25 μl – taking into consideration the combined solubility limits of 50 μl of bacteria (OD = 0.6) and 25 μl of PS (4-fold concentrated) – were pipetted into a clear 96-well plate. After incubation in the dark for 10 seconds, one plate was illuminated with the corresponding light source, while the other plate was incubated in the dark for the same length of time. Afterwards, aliquots of 20 μl of each sample were serially diluted seven times 1 : 10 in 180 μl of Mueller-Hinton bouillon. A negative control (no illumination, no PS, enzyme) and a positive control (illumination, no PS, enzyme) were conducted in each experiment as control samples.

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> experiments

As an additional control, both strains were treated with different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) to ensure the lethal effect of the bacteria against this proven disinfectant agent. Therefore, 25 μl of bacteria and 25 μl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in distilled water were pipetted into clear 96-well plates. Amounting to a final H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> volume concentration of 1.0% and 1.5%, all samples were incubated in the dark for 5, 10, and 15 minutes. Corresponding to the PACT assays, aliquots of 20 μl were serially diluted again. As a control, an additional step was conducted in every experiment using the equivalent strain only incubated in distilled water.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quenching experiments were conducted by pipetting 25 μl of enzyme – either SOD or CAT –, 25 μl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4-fold concentrated), and 50 μl of bacteria (OD = 0.6) into a 96-well plate using the identical steps to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> experiment.

### Examination of colony-forming units (CFU)

Samples were plated into Mueller-Hinton agar plates according to Miles, Misra, and Irwin.<sup>40</sup> After 14 h to 16 h of incubation at 37 °C, CFUs were counted manually. All experiments were conducted at least three times.

### Real-time PCR analysis

EC WT cultivated in 5 ml of Mueller-Hinton bouillon in a shaking incubator at 180 rpm and 37 °C was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. After careful removal of the supernatant, the bacterial pellet was diluted in 18 ml of distilled water. Afterwards, the bacterial suspension was pretreated with 0 µM and 5 µM in terms of a sub-lethal dose of MB upon illumination with a source emitting red light (Waldmann PDT 1200, Herbert Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen, Germany) at an irradiance of 46.5 mW cm<sup>-2</sup> for 60 seconds, resulting in a radiant exposure of approximately 2.78 J cm<sup>-2</sup>.<sup>39</sup> Simultaneously, control samples (bacteria incubated with PS only) were conducted in the dark. Again, samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes, and supernatants were removed.

Bacterial RNA was isolated with NucleoSpin RNA-kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol. After RNA isolation, the amount of total RNA in each sample was measured and quantified with a UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop 2000c; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). All RNA samples were normalized through dilution to the sample with the lowest RNA amount before conversion into cDNA. A Mastermix was prepared according to the manufacturer's protocol (SuperScript II Reverse Transcriptase; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). 7 µl of the specific Mastermix was added to each sample, and distilled water was filled up to a reaction volume of 19 µl. Then, all samples were constantly preheated to 70 °C for 10 minutes using a thermal cycler (Peltier Thermal Cycler-PTC 200; MJJ Research, Waltham, Massachusetts, USA) followed by the addition of 1 µl of reverse transcriptase (see above) to each sample (final reaction volume: 20 µl). Again, all samples were heated to 42 °C for 45 minutes and reheated to 70 °C for 10 minutes.

cDNA was amplified and detected by means of the LightCycler 96-system in combination with SYBR-Green I as the respective fluorescence dye (Roche Diagnostics International Ltd; Rotkreuz, Switzerland). Reaction volume for each sample was 20 µl (10 µl SYBR-Green I, 8 µl nuclease-free water, 1 µl cDNA, 0.5 µl forward and 0.5 µl reverse primer of correspondent gene), and each sample was prepared in duplicate. All samples were preincubated in one cycle. 3 step-amplification (95 °C for 10 seconds, 58 °C for 10 seconds, and 72 °C for 10 seconds) in 45 cycles was followed by high resolution-melting and cooling. Crossing points (Cx) were analyzed in reference to the determined housekeeping gene gapA (encoding gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A) with the provided software (LightCycler 96, Version

1.1.0.1320.; Roche Diagnostics International Ltd, Rotkreuz, Switzerland).

Primers were designed with PRIMER BLAST from the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Following primers were used: 5'-ACTTACGAGCAGATCAAAGC-3' (gapA<sub>forward</sub>); 5'-AGTTTCACGAAGTTGTCGT-3' (gapA<sub>reverse</sub>); 5'-CCAGAATTTGCCAACCTGCC-3' (sodA<sub>forward</sub>); 5'-TCGATAGCCGCTTTCAGGTC-3' (sodA<sub>reverse</sub>); 5'-CTTTGGTCTGGCTGGACCT-3' (sodB<sub>forward</sub>); 5'-AGTGCTCCAGATAGCCAGGA-3' (sodB<sub>reverse</sub>). All experiments were conducted at least three times. PCR products were verified by means of gel electrophoresis. Relative quantification of sodA and sodB gene expression was done to determine the change of expression of sodA or sodB after PACT relative to the untreated group based on the methodology of Livak K.J. and Schmittgen T.D.<sup>55</sup>

### Uptake/attachment assays

400 µl of bacteria (OD = 0.6) were incubated with increasing concentrations of 400 µl of MB or TMPyP for 1 minute. The final concentrations were 1, 10, 50, and 100 µM for each PS. After the incubation period, bacterial suspensions were centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes. The supernatant was carefully removed, and absorption of the supernatant was spectrophotometrically determined with respect to the absorption maximum of the PS. References were measured in distilled water.<sup>41-43</sup>

### Data analysis

The CFU assay implicates the data from at least three independent experiments with three subsamples per experimental group. The CFU counts of a sample were calculated as the median CFU counts of the corresponding subsamples with 95% confidence interval. For each experimental group the median was statistically rated using the Tukey-interval method. All data analysis was performed using GraphPad Prism 7 for Windows (La Jolla, California, USA).

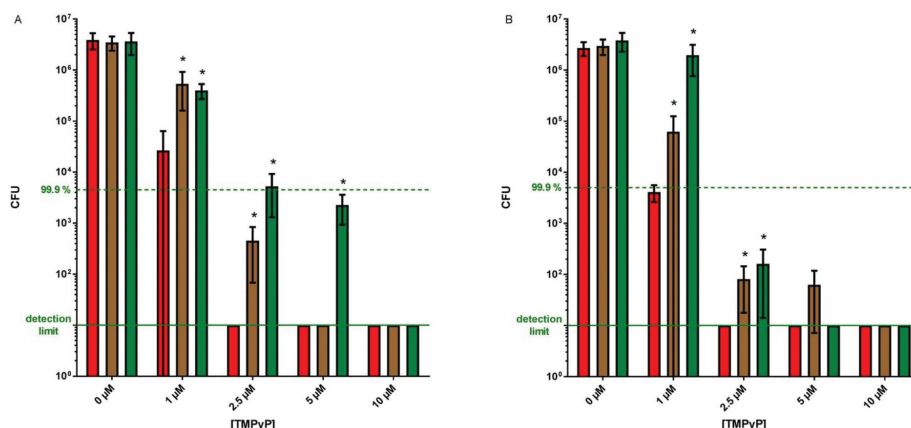
## Results

### Photodynamic inactivation of bacteria with TMPyP

Firstly, the photodynamically induced bacterial reduction of CFU was evaluated for EC WT and EC PN134 using TMPyP or MB as the respective photosensitizer. Negative controls (no illumination, no PS), positive controls (illumination, no PS), and dark controls (PS without illumination) did not reduce survival rates for any of the concentrations (<1 log<sub>10</sub> reduction of CFU). Both strains were reduced by ≥5 log<sub>10</sub> steps using a minimum concentration of 2.5 µM of TMPyP (Fig. 1A and B, red column). There was no significant difference of the PACT killing efficacy of TMPyP between EC WT or EC PN134 mutant strain (Tukey interval method: *p* > 0.005).

### Quenching experiments with TMPyP

In CAT quenching experiments with EC WT, more than 5 log<sub>10</sub> CFUs at 1 µM of TMPyP and ≈2.5 log<sub>10</sub> CFUs at 2.5 µM sur-



**Fig. 1** Photodynamic inactivation EC WT (A) and EC PN134 (B) with light-activated TMPyP without enzymes (red), with the addition of CAT (brown) or SOD (green). Results ( $n = 3$ ) are shown as CFU medians with 95% confidence interval. Dashed line shows a CFU reduction of  $\geq 3$   $\log_{10}$  steps ( $\geq 99.9\%$ ). Continuous line shows the detection limit of  $10^1$  CFUs. According to the Tukey interval method, bars marked with \* were found significantly different from the PACT treated samples (red bars) at the given concentrations. Untreated controls showed no reduction in survival rates (data not shown).

vived, compared to a complete inactivation without addition of CAT (Fig. 1A, red column vs. brown column,  $p > 0.005$ ). At higher concentrations of TMPyP no quenching effect of CAT was detected, that means no CFUs were detected at 5  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 1A, brown column). Phototoxic assays with SOD effectuated a survival of both strains at 2.5  $\mu\text{M}$  of TMPyP ( $p < 0.005$ ). Again, at higher concentrations of TMPyP, no CFUs were detected at 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 1A, green column).

Quenching experiments with EC PN134 yielded similar results. With CAT, CFU survival amounts at 2.5  $\mu\text{M}$  and 5  $\mu\text{M}$  were nearly 2  $\log_{10}$ . No CFUs were counted at 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 1B, brown column). With SOD, eradication at 1  $\mu\text{M}$  was less than 1  $\log_{10}$  step compared to the positive control. More than 2  $\log_{10}$  CFUs survived at 2.5  $\mu\text{M}$ , and no CFUs (below detection limit) survived at 5  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 1B, green column). Overall there were no differences in the sensitivity of both strains observed in T<sub>II</sub>-PACT treatment or quenching with CAT or SOD ( $p > 0.005$ ; pairwise comparison of the corresponding bars in Fig. 1A vs. 1B at the given concentrations).

#### Photodynamic inactivation of bacteria with MB

In MB experiments with EC WT, CFU was reduced by  $\geq 3$   $\log_{10}$  steps only at the highest concentration of 15  $\mu\text{M}$  (Fig. 2A, blue column). In contrast, EC PN134 of the same MB concentration was eradicated by more than 2  $\log_{10}$  steps, resulting in complete 5  $\log_{10}$  reduction at 15  $\mu\text{M}$  (below detection limit,  $p < 0.005$  based on the Tukey Interval method) (Fig. 2B, blue column).

#### Quenching experiments with MB

Like in PACT TMPyP experiments, the used quenchers increased the survival rates of both strains compared to the

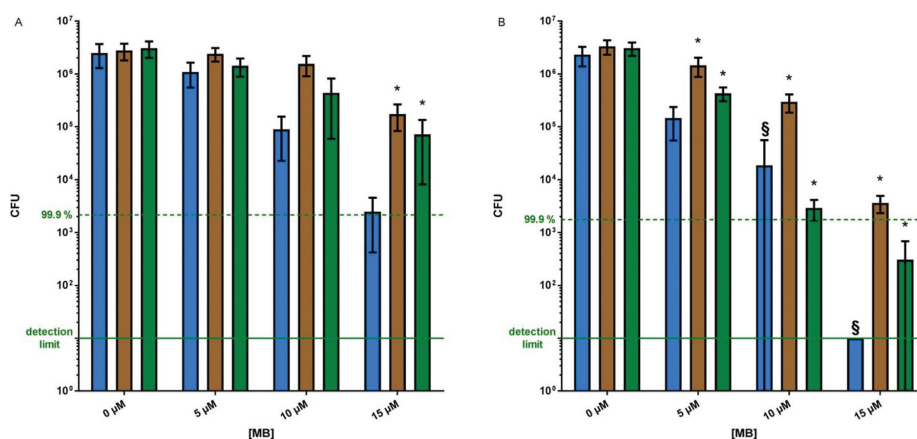
basic phototoxic assay under the same conditions (Fig. 2A and B, brown and green columns). Quenching with SOD or CAT prevented a  $\geq 3$   $\log_{10}$  reduction in EC WT CFUs at all concentrations. In quenching experiments with EC PN134, a 3  $\log_{10}$  reduction was also impeded in EC PN134 and CAT CFUs at all concentrations. In quenching experiments with SOD, the enzyme could not prevent the reduction of the mutant at higher concentrations. At 10  $\mu\text{M}$ , a 3  $\log_{10}$  reduction was observed.

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> experiments

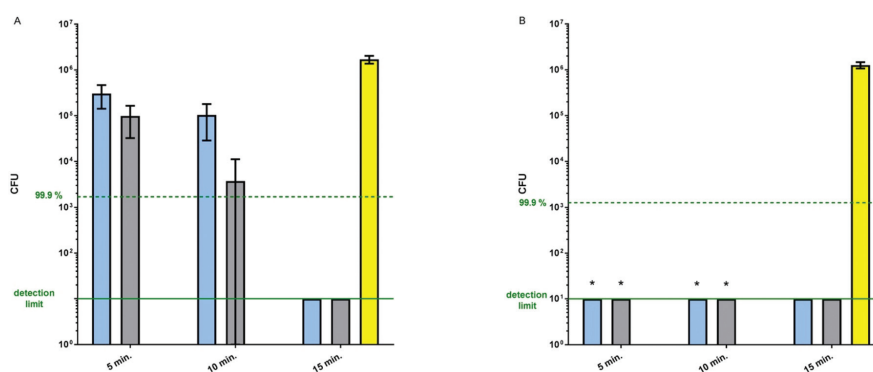
After incubation with 1.0% of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 minutes, EC WT was eradicated completely (below detection limit), whereas the EC PN134 strain was already eradicated to below detection limit after incubation with 1.0% of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 minutes (Fig. 3). Quenching hydrogen peroxide with CAT showed that – at each point in time during the CAT quenching experiment with EC WT – survival rates maximally differed only by a  $\frac{1}{3}$   $\log_{10}$  step compared to the untreated control ( $p < 0.005$ ). For EC PN134, the difference in survival rates was  $\approx \frac{1}{2}$   $\log$  step at each point in time with 1.0% of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and only 1  $\log_{10}$  step less than the untreated control with 1.5% of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 4). Overall, both strains were prevented from 3  $\log_{10}$  reduction of inactivation when CAT was substituted ( $p < 0.005$ ).

#### Real-time PCR analysis

Crossing points (Cx) for all samples ranged between 20 and 26 cycles irrespective of photodynamic treatment (data not shown). The data were normalized to the untreated controls (no PS, no light). Under the given condition, there was no significant change of *sodA* and *sodB* gene expression between



**Fig. 2** Photodynamic inactivation EC WT (A) and EC PN134 (B) with light-activated MB without enzymes (blue), with the addition of CAT (brown) or SOD (green). Results ( $n = 3$ ) are shown as CFU medians with 95% confidence interval. Dashed line shows a CFU reduction of  $\geq 3 \log_{10}$  steps ( $\geq 99.9\%$ ). Continuous line shows the detection limit of  $10^1$  CFUs. According to the Tukey interval method, bars marked with \* were found significantly different from the PACT treated samples (blue bars) in (A) and (B) at the given concentrations; bars marked with § were found significantly different between both strains (blue bars) in (B) vs. (A) at the given concentrations. Untreated controls showed no reduction in survival rates (data not shown).



**Fig. 3** Inactivation of EC WT (A) and EC PN134 (B) with 1.0% (blue column) or 1.5% (grey column)  $\text{H}_2\text{O}_2$  after 5, 10 and 15 minutes. CFUs of untreated control (yellow column) were counted after 15 minutes of incubation with water. Results ( $n = 3$ ) are shown as CFU medians with 95% confidence interval. Continuous line shows the detection limit of  $10^1$  CFUs. According to the Tukey interval method, bars in (B) marked with \* were found significantly different from (A) (blue and grey bars).

PACT treated and untreated samples ( $p > 0.99$ ). GapA was determined as a housekeeping gene.

#### Uptake/attachment assays

The absorption maxima of PS and supernatants used in each sample were measured. TMPyP and MB were attached or taken up by both strains. The absorbance did not differ between these two strains after incubation with TMPyP or MB (Fig. 5).

## Discussion

This study investigated the photodynamic antimicrobial efficiency of PACT using EC WT and the mutant EC PN134 by means of two different PS from different chemical classes with different  $^1\text{O}_2$  quantum yields: MB and TMPyP.

For successful photodynamic inactivation, the uptake or attachment of the PS is very important.<sup>44</sup> The difference detected in MB-based photodynamic inactivation of the two

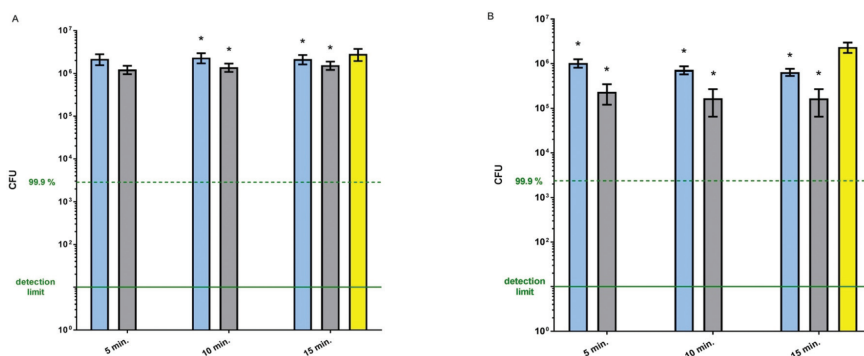


Fig. 4  $\text{H}_2\text{O}_2$ -quenching with CAT. Inactivation of EC WT (A) and EC PN134 (B) with 1.0% (blue column) or 1.5% (grey column)  $\text{H}_2\text{O}_2$  after 5, 10 and 15 minutes in combination with CAT. CAT was added prior PACT treatment. CFUs of untreated control (yellow column) were counted after 15 minutes of incubation with water and CAT. Results ( $n = 3$ ) are shown as CFU medians with 95% confidence interval. Continuous line shows the detection limit of  $10^2$  CFUs. According to the Tukey interval method, bars marked with \* were found significantly different from  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated samples without CAT in Fig. 3 (blue and grey bars).

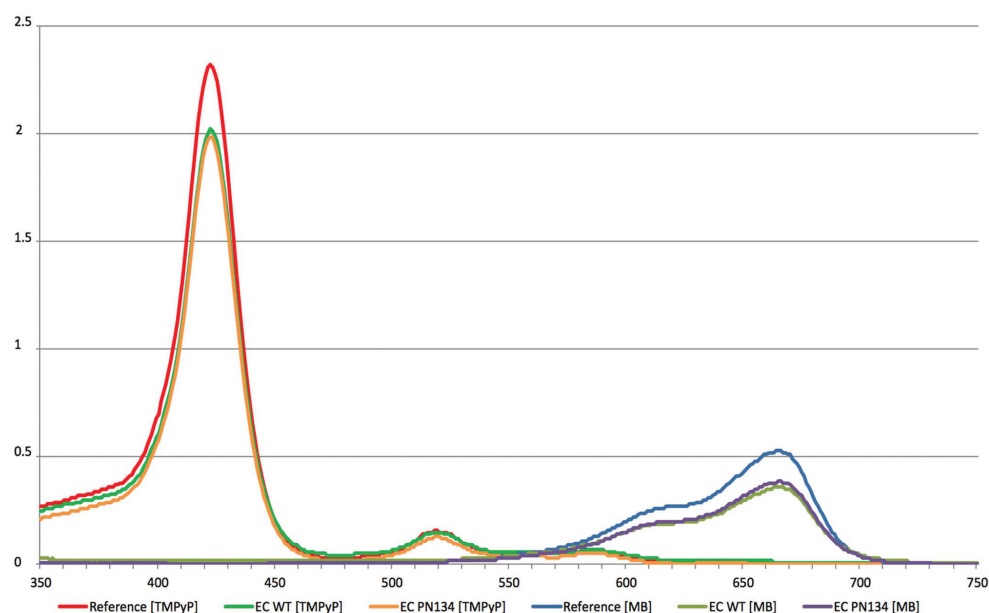


Fig. 5 Absorption maxima of TMPyP at 400 to 450 nm and MB at 650 to 700 nm.  $10 \mu\text{M}$  TMPyP (reference, red line) and  $10 \mu\text{M}$  MB (reference, blue line) in distilled water. Supernatants were measured after centrifugation at 3000 rpm for 5 minutes and incubation for 1 minute with  $10 \mu\text{M}$  TMPyP (EC WT: light green line; EC PN134: orange line) or  $10 \mu\text{M}$  MB (EC WT: green line; EC PN134: purple line). Absorption rates of other concentrations are not shown.

strains was not related to the uptake and attachment of MB, because spectroscopic measurement showed that nearly the same amounts of PS were taken up (Fig. 5). Thus, the number

of photo-active molecules of each PS in both strains was nearly the same, which allowed a comparison of photodynamic inactivation. EC species are Gram-negative bacteria with negatively

charged cell walls. The application of positively charged PS increased the efficacy of PACT, because of the electrostatic attraction due to Dai *et al.*, who confirmed that non-cationic PS result in lower susceptibility to PACT, because positive charge allowed either good attachment or penetration through the cell wall and direct uptake into the cell milieu.<sup>18</sup> Therefore, in this study, positively charged photosensitizers such as TMPyP and MB were used that do not require any pre-incubation steps for sufficient attachment.

In general, this study showed that the mutant EC PN134 is more susceptible to T<sub>I</sub>-PACT than EC WT (Fig. 2). Survival rates of PACT with MB as a so-called T<sub>I</sub>-PS differed between the strains at 15 μM (Fig. 2). At this concentration eradication of EC PN134 resulted in a disinfectant effect ( $\geq 5 \log_{10}$  steps), contrariwise only an antimicrobial effect ( $\geq 3 \log_{10}$  steps) was detected with EC WT according to the German guidelines of hygiene.<sup>45</sup> The lack of *sodA* and *sodB* gene impaired PACT with T<sub>I</sub>-PS – at a point, where antimicrobial or disinfectant effects were observed firstly. Here, where T<sub>I</sub>-PACT started becoming operative and relevant due to the observed effects, the difference in survival between both strains showed up. A basic SOD level in EC WT protected against ROS, such as superoxide and other radicals, and acted as an important survival factor against PACT-induced oxidative stress. In PACT assays with TMPyP, which is a T<sub>II</sub>-PS producing a high amount of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ( $\Phi_{\Delta} = 0.74$ ),<sup>33</sup> survival rates of the two strains were not as different as in T<sub>I</sub>-PACT (Fig. 1). Although it is obvious that the absence of antioxidant enzymes such as SOD A and B increases the vulnerability of the mutant,<sup>46</sup> the difference in mortality between both strains, at which a relevant effect was seen (1 μM TMPyP, minimum concentration to achieve an antibacterial effect), was not as high as in T<sub>I</sub>-PACT (Fig. 1:  $\approx 1 \log_{10}$  step vs. Fig. 2:  $\approx 2.5 \log_{10}$  steps).<sup>47</sup>

Even when quenchers were added in TMPyP experiments, both strains did not have survival rates as high as in MB-quenching experiments (Fig. 2 vs. Fig. 1). Overall, the addition of quenchers effected positive survival shifts referring to the basic survival rates of each strain although the general trend indicated higher survival rates of the wild type. In terms of T<sub>I</sub>-PACT the protection by activity of SOD or CAT was more effective. Without these protective enzymes, the susceptibility of EC PN134 in MB experiments was higher than in TMPyP experiments. In TMPyP-based PACT, the eradicating efficacy was mainly based on <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. The lack of the antioxidant enzyme SOD was thus more relevant in T<sub>I</sub>-based PACT. SOD A and SOD B that were produced by EC WT were responsible for its survival advantage over EC PN134. However, the impact of endogenously produced SOD differed from exogenously applied SOD. SOD and CAT were used as quenchers to scavenge and detoxify ROS that could be generated in T<sub>I</sub>- as well as in T<sub>II</sub>-reactions. One should keep in mind that the difference between T<sub>I</sub>- and T<sub>II</sub>-reactions is not absolute but relative. Both chosen PS can produce <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and other T<sub>I</sub>-typical oxygen radicals. Scavenging ROS with exogenously added quenchers had a crucial impact on survival. The addition of a single quencher resulted in an enhanced survival rate in this study – independent of the PS

used. Although PACT with TMPyP generates three times more <sup>1</sup>O<sub>2</sub> than typical ROS, the exogenous addition of T<sub>I</sub>-ROS quenching enzymes such as SOD and CAT resulted in a shift in survival. Survival was determined by the amount of active anti-oxidative enzymes at the time of photodynamic inactivation – irrespective of its origin, whether endogenously produced by the bacteria themselves or exogenously added, which is physiologically not achievable. Despite its lower generation of ROS in comparison to MB, a fundamental part of antimicrobial damage in TMPyP-based PACT was caused by <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. According to the method for calculating irradiation parameters developed by Cieplik *et al.*,<sup>37</sup> each MB concentration in this study should be multiplied by the factor 0.8 compared to TMPyP, when focusing on the number of absorbed photons per second. Experiments that had failed to eradicate bacteria resulted in the use of much higher concentrations of MB together with a 6-fold increased illumination time and a 15-fold higher radiation exposure (data not shown). However, eradication with TMPyP was still much more effective in this study even though much fewer TMPyP than MB molecules were excited. Thus, other factors besides the number of absorbed photons of the PS affected antimicrobial photodynamic efficacy. The amount of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generation per one PS molecule was more important for effective antimicrobial eradication. The more <sup>1</sup>O<sub>2</sub> a PS (here: TMPyP) produced, the more effective and efficient was PACT. This perception might be interesting for finding a therapeutic window in the context of a clinical approach. But T<sub>I</sub>-ROS also have an important role in PACT, because quenching them with SOD or CAT resulted in higher survival rates for TMPyP and MB as PS. Nakonieczna *et al.* showed that SOD activity is up-regulated in SA strains susceptible to PACT after PACT treatment with Protoporphyrin IX.<sup>48</sup> Karavolos *et al.* proved that expression of SOD in SA increased after oxidative stress.<sup>49</sup> In the present study, up-regulation of the *sodA* and *sodB* genes was not quantified after sub-lethal doses of PACT in EC WT. Although bacterial cells tried to overcome photodynamic treatment and oxidative stress, expression of the *sodA* and *sodB* genes was not increased. Baseline expression of *sodA* and *sodB* did not prevent EC WT from efficient eradication. Antioxidant genes were not up-regulated after photodynamic treatment in comparison to untreated samples and had therefore no impact on surviving. Under any given conditions, PACT-generated ROS did not affect the up-regulation of antioxidant genes. In contrast to quenching experiments – that did not resemble natural conditions at all – it was not physiologically possible to generate enough enzymes that protect against oxidative stress. The bacterial metabolism of the chosen strains was not adaptable to these conditions. For sufficient protection against ROS in mutants cultured *in vitro* with SOD and/or CAT, overexpression could achieve survival rates beyond physiological limits that are comparable to those obtained in quenching experiments. The present study showed that the addition of SOD or CAT to photosensitizer-incubated bacteria samples increased survival rates and may prevent antimicrobial ( $\geq 3 \log_{10}$ ) and even disinfectant ( $\geq 5 \log_{10}$ ) eradication. T<sub>I</sub>-generated ROS were



quenched with antioxidant enzymes. Thus, the bacterial enzymatic defense machinery could sufficiently protect bacteria from MB-generated ROS. In contrast, bacterial antioxidant enzymes were harmless or less protective against TMPyP-generated  $^1\text{O}_2$ , because singlet oxygen is molecular oxygen at the lowest lying electronic excited ( $^1\Delta_g$ ) state (+0.98 eV). This excitation energy was sufficient to activate oxidative processes such as damaging and eradicating bacteria.<sup>50</sup> Dosselli *et al.* proved that sub-lethal PACT treatment influenced the expression of different proteins involved in bacterial metabolism, the protection against oxidative stress, cell division, and the uptake of sugar. Dosselli *et al.* compared, among other proteins, the expression of CatA in SA between sub-lethal and lethal PACT treatment. Their results showed a 4-times higher inducing factor of CatA after lethal treatment than after sub-lethal treatment, which means that bacteria tried to protect themselves from oxidative stress by increasing the expression of antioxidant proteins.<sup>51</sup> This process emphasized that domestically guided defense mechanisms do not protect EC or SA from PACT-mediated oxidative stress.<sup>51</sup> The present study confirmed that PACT-induced oxidative stress had no relevant influence on the upregulation of *sod*-genes. Although other studies have shown different protein patterns after PACT treatment, this study did not show any increase in genetic levels. The results of the present study lead to the hypothesis that the different protein patterns, as quantified in previous studies, are not directly induced by PACT. Higher survival rates were neither observed using different protective protein patterns nor by multiple repetition of PACT experiments with the same strain and adjacent regrowth,<sup>19,20</sup> nor – as in the present study – with the basic *sod*-gene level. In contrast, *in vitro* cultured EC mutants that either lack (Fig. 1–4) or overexpress essential antioxidant genes and/or regulons showed altered responses to oxidative stress.<sup>52</sup> Kim *et al.* examined the role of *oxyR* by inducing oxidative stress *via* PACT with MB. In Kim *et al.*'s study overexpression of *oxyR* regulon in EC reduced susceptibility to PACT established by increased SOD and CAT activity. There, *OxyR* protected both proteins from oxidative inactivation by inducing other antioxidant enzymes. Additionally, *oxyR* regulon induced expression of CAT. Kim *et al.* also showed that the lack of *oxyR* regulon highly increased sensitivity.<sup>52</sup> However, the use of non-logarithmic scales, which was performed in Kim's study, is not the common method for quantifying bacterial eradication and does not fit the international guidelines for hygiene.<sup>53,54</sup> In accordance with the results of the present study, the availability of SOD and other antioxidant enzymes as well as the protection of such enzymes by essential regulons introduced *OxyR* and *SoxRS* as key regulators for protecting cells against PACT-mediated oxidative stress.  $T_1$ -pathway PACT-mediated oxidative stress needed to be managed by the undisturbed function of antioxidant enzymes. Bacterial survival decreased rapidly when the functions of these enzymes are exacerbated either indirectly by the lack of protecting or inducing regulons such as *oxyR* or *soxRS*<sup>50</sup> or directly by the lack of particular genes (Fig. 1–4).

## Conclusion

The present study showed that *sodA*- and *sodB*-inactivated mutants are highly susceptible to PACT. The lack of antioxidant enzymes is an essential factor for the survival of bacteria. Bacterial protection in  $T_1$ - and  $T_{II}$ -based PACT can be partially supported by quenching agents such as SOD and CAT. Furthermore, no upregulation of *sodA*- and *sodB*-genes has yet been observed after photodynamic treatment under the given conditions. Therefore, this type of bacterial defense mechanism might be ineffective against PACT.

## Conflicts of interest

All authors declare no financial or commercial conflict of interest.

## Acknowledgements

We gratefully thank James Imlay from the University of Illinois for providing the wild type and the mutant. Pouriya Faraj Tabrizi was supported by a scholarship from the Faculty of Medicine of the University Medical Center Regensburg, Germany.

## References

- 1 D. Cressey, *Drug-resistant bacteria and lack of new antibiotics pose "catastrophic threat"*, Nature News Blog, 2013.
- 2 G. M. Rossolini and E. Mantengoli, Antimicrobial resistance in Europe and its potential impact on empirical therapy, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008, **14**(Suppl 6), 2–8.
- 3 U.S. Department of Health and Human Services, *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 | Antibiotic/Antimicrobial Resistance | CDC*, 2013.
- 4 WHO, *Antimicrobial Resistance - Global Report on Surveillance*, World Health Organization, 2014.
- 5 B. Spellberg, The future of antibiotics, *Crit. Care*, 2014, **18**(3), 228.
- 6 N. Woodford and D. M. Livermore, Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge, *J. Infect.*, 2009, **59**(Suppl 1(2)), S4–16.
- 7 D. M. Livermore, Are all beta-lactams created equal?, *Scand. J. Infect. Dis., Suppl.*, 1996, **101**, 33–43.
- 8 T. Maisch, R.-M. Szeimies, G. Jori and C. Abels, Antibacterial photodynamic therapy in dermatology, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, **3**(10), 907–917.
- 9 M. R. Hamblin and T. Hasan, Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2004, **3**(5), 436–450.
- 10 B. Aveline, Primary processes in photosensitization mechanisms, *Compr. Ser. Photosci.*, 2001, 17–37.
- 11 N. Oleinick, Basic Photosensitization. Available from: <http://photobiology.info/Oleinick.html>.

- 12 J. Glaeser, A. M. Nuss, B. A. Berghoff and G. Klug, Singlet oxygen stress in microorganisms, *Adv. Microb. Physiol.*, 2011, **58**, 141–173.
- 13 M. Wainwright, Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), *J. Antimicrob. Chemother.*, 1998, **42**(1), 13–28.
- 14 T. Maisch, J. Baier, B. Franz, M. Maier, M. Landthaler, R.-M. Szeimies, *et al.*, The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, **104**(17), 7223–7228.
- 15 K. R. Kasimova, M. Sadasivam, G. Landi, T. Sarna and M. R. Hamblin, Potentiation of photoinactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria mediated by six phenothiazinium dyes by addition of azide ion, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2014, **13**(11), 1541–1548.
- 16 M. Wainwright, D. A. Phoenix, J. Marland, D. R. A. Wareing and F. J. Bolton, A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1997, **19**(1), 75–80.
- 17 M. Garcia-Diaz, Y.-Y. Huang and M. R. Hamblin, Use of fluorescent probes for ROS to tease apart Type I and Type II photochemical pathways in photodynamic therapy, *Methods*, 2016, **109**, 158–166.
- 18 T. Dai, Y.-Y. Huang and M. R. Hamblin, Photodynamic therapy for localized infections—state of the art, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2009, **6**(3–4), 170–188.
- 19 A. Tavares, C. M. B. Carvalho, M. A. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, J. P. C. Tomé, A. C. Tomé, *et al.*, Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment, *Mar. Drugs*, 2010, **8**(1), 91–105.
- 20 F. Giuliani, M. Martinelli, A. Cocchi, D. Arbia, L. Fantetti and G. Roncucci, In vitro resistance selection studies of RLP068/Cl, a new Zn(II) phthalocyanine suitable for antimicrobial photodynamic therapy, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, **54**(2), 637–642.
- 21 G. Jori, C. Fabris, M. Soncin, S. Ferro, O. Coppellotti, D. Dei, *et al.*, Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications, *Lasers Surg. Med.*, 2006, **38**(5), 468–481.
- 22 J. A. Imlay, Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide, *Annu. Rev. Biochem.*, 2008, **77**, 755–776.
- 23 F. Vatansever, W. C. M. A. de Melo, P. Avci, D. Vecchio, M. Sadasivam, A. Gupta, *et al.*, Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species—bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2013, **37**(6), 955–989.
- 24 D. R. Sherman, P. J. Sabo, M. J. Hickey, T. M. Arain, G. G. Mahairas, Y. Yuan, *et al.*, Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, **92**(14), 6625–6629.
- 25 G. Storz, L. A. Tartaglia, S. B. Farr and B. N. Ames, Bacterial defenses against oxidative stress, *Trends Genet.*, 1990, **6**(11), 363–368.
- 26 G. Storz, L. A. Tartaglia and B. N. Ames, Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation, *Science*, 1990, **248**(4952), 189–194.
- 27 B. González-Flecha and B. Demple, Genetic responses to free radicals. Homeostasis and gene control, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, **899**, 69–87.
- 28 P. J. Pomposiello and B. Demple, Global adjustment of microbial physiology during free radical stress, *Adv. Microb. Physiol.*, 2002, **46**, 319–341.
- 29 P. I. Diaz, N. Slakeski, E. C. Reynolds, R. Morona, A. H. Rogers and P. E. Kolenbrander, Role of oxyR in the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*, *J. Bacteriol.*, 2006, **188**(7), 2454–2462.
- 30 K. Honma, E. Mishima, S. Inagaki and A. Sharma, The OxyR homologue in *Tannerella forsythia* regulates expression of oxidative stress responses and biofilm formation, *Microbiology*, 2009, **155**(Pt 6), 1912–1922.
- 31 J. M. McCord and I. Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**(22), 6049–6055.
- 32 J. Regensburger, T. Maisch, A. Felgenträger, F. Santarelli and W. Bäuml, A helpful technology—the luminescence detection of singlet oxygen to investigate photodynamic inactivation of bacteria (PDIB), *J. Biophotonics*, 2010, **3**(5–6), 319–327.
- 33 F. Wilkinson, W. P. Helman and A. B. Ross, Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1993, **22**, 113–262.
- 34 J. Baier, T. Maisch, J. Regensburger, M. Loibl, R. Vasold and W. Bäuml, Time dependence of singlet oxygen luminescence provides an indication of oxygen concentration during oxygen consumption, *J. Biomed. Opt.*, 2007, **12**(6), 64008.
- 35 R. W. Redmond and J. N. Gamlin, A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules, *Photochem. Photobiol.*, 1999, **70**(4), 391–475.
- 36 J. M. Sobota, M. Gu and J. A. Imlay, Intracellular hydrogen peroxide and superoxide poison 3-deoxy-D-arabinoheptulose 7-phosphate synthase, the first committed enzyme in the aromatic biosynthetic pathway of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 2014, **196**(11), 1980–1991.
- 37 F. Cieplik, A. Pummer, J. Regensburger, K.-A. Hiller, A. Späth, L. Tabenski, *et al.*, The impact of absorbed photons on antimicrobial photodynamic efficacy, *Front. Microbiol.*, 2015, **6**, 706.
- 38 I. Tabenski, F. Cieplik, L. Tabenski, J. Regensburger, K.-A. Hiller, W. Buchalla, *et al.*, The impact of cationic substituents in phenalen-1-one photosensitizers on antimicrobial photodynamic efficacy, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016, **15**(1), 57–68.
- 39 A. Felgenträger, T. Maisch, D. Dobler and A. Späth, Hydrogen bond acceptors and additional cationic charges in methylene blue derivatives: photophysics and antimicrobial efficiency, *BioMed Res. Int.*, 2013, **2013**, 482167.
- 40 A. A. Miles, S. S. Misra and J. O. Irwin, The estimation of the bactericidal power of the blood, *J. Hyg.*, 1938, **38**(6), 732–749.

- 41 S. George, M. R. Hamblin and A. Kishen, Uptake pathways of anionic and cationic photosensitizers into bacteria, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2009, **8**(6), 788–795.
- 42 A. Gollmer, A. Felgenträger, W. Bäuml, T. Maisch and A. Späth, A novel set of symmetric methylene blue derivatives exhibits effective bacteria photokilling - a structure-response study, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, **14**(2), 335–351.
- 43 A. Gollmer, A. Felgenträger, T. Maisch and C. Flors, Real-time imaging of photodynamic action in bacteria, *J. Biophotonics*, 2017, **10**(2), 264–270.
- 44 R. M. Szeimies, S. Karrer, C. Abels, P. Steinbach, S. Fickweiler, H. Messmann, *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), 67–72.
- 45 Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, *Anforderungskatalog für die Aufnahme von chemischen Desinfektionsverfahren in die Desinfektionsmittel-Liste der DGHM*, 2002, 9–16.
- 46 A. S. Gort and J. A. Imlay, Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses, *J. Bacteriol.*, 1998, **180**(6), 1402–1410.
- 47 T. Maisch, F. Spannberger, J. Regensburger, A. Felgenträger and W. Bäuml, Fast and effective: intense pulse light photodynamic inactivation of bacteria, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **39**(7), 1013–1021.
- 48 J. Nakonieczna, E. Michta, M. Rybicka, M. Grinholc, A. Gwizdek-Wisniewska and K. P. Bielawski, 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**, 323.
- 49 M. H. Karavolos, M. J. Horsburgh, E. Ingham and S. J. Foster, Role and regulation of the superoxide dismutases of *Staphylococcus aureus*, *Microbiology*, 2003, **149**(Pt 10), 2749–2758.
- 50 J. Baier, T. Maisch, M. Maier, M. Landthaler and W. Bäuml, Direct detection of singlet oxygen generated by UVA irradiation in human cells and skin, *J. Invest. Dermatol.*, 2007, **127**(6), 1498–1506.
- 51 R. Dosselli, R. Million, L. Puricelli, P. Tessari, G. Arrigoni, C. Franchin, *et al.*, Molecular targets of antimicrobial photodynamic therapy identified by a proteomic approach, *J. Proteomics*, 2012, **77**, 329–343.
- 52 S. Y. Kim, E. J. Kim and J.-W. Park, Control of singlet oxygen-induced oxidative damage in *Escherichia coli*, *J. Biochem. Mol. Biol.*, 2002, **35**(4), 353–357.
- 53 E. O. Powell, Growth rate and generation time of bacteria, with special reference to continuous culture, *J. Gen. Microbiol.*, 1956, **15**(3), 492–511.
- 54 The Environmental Protection Agency, *Water Treatment Manual: Disinfection*, 2011.
- 55 K. J. Livak and T. D. Schmittgen, *Methods*, 2001, **25**(4), 402–408.

## **9 Anhang**

### 9.1 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. Tim Maisch für die Möglichkeit, gemeinsam ein Dissertationsthema zu entwickeln, die hervorragende Betreuung und die Unterstützung und Mitarbeit bei der anschließenden Publikation. Der unermüdliche Einsatz, das Vertrauen sowie die fachliche und menschliche Expertise in den zahlreichen Gesprächen waren mir eine große Hilfe. Seine Betreuung ist ein herausragendes Beispiel dafür, wie eine Promotionsbetreuung sein sollte.

Ferner möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungsteams der Klinik für Dermatologie der Universitätsklinik Regensburg bedanken. Ohne deren Unterstützung wäre die tägliche Arbeit weder so erfolgreich noch so unterhaltsam gewesen.

Ich bedanke mich bei dem Forschungsrat der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg, der mir durch die Bewilligung des Promotionsstipendiums finanzielle Abhilfe während der Promotion leistete und mir die Möglichkeit gab, meine Promotion erstmals vor einem fachlichen Gremium zu präsentieren.

Meinen Freunden, die mich im Studium begleitet haben und mit denen ich jede Minute in und außerhalb der Universität genossen habe. Danke für die Unterstützung in guten wie in schlechten Zeiten.

Meiner Freundin Josephine, mit der ich zusammen das gesamte Studium bestritten habe, die nun auch Ärztin ist und in Kürze ihre eigene Promotion abschließen wird. Danke für die Unterstützung und Liebe.

Meinem Bruder, cand. med. Schayan. F. Tabrizi, der in naher Zukunft selbst Arzt sein wird, für seine ständige Unterstützung zu jedem Zeitpunkt – nicht nur als Bruder, sondern auch als bester Freund.

Zuletzt und am meisten möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die für mich die größten Vorbilder sind und immer sein werden, die mir mein Medizinstudium ermöglicht und mich gelehrt haben, im Leben einen Fuß vor den anderen zu setzen. Danke für Eure bedingungslose Geduld, Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen.