

**Wirkmechanismen und molekulare Stressantwort
planktonischer Kulturen und bakterieller Biofilme
auf die antimikrobielle photodynamische Therapie**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Denise Mühler
aus
Grimma

im Jahr 2022

**Wirkmechanismen und molekulare Stressantwort
planktonischer Kulturen und bakterieller Biofilme
auf die antimikrobielle photodynamische Therapie**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Denise Mühler
aus
Grimma

im Jahr 2022

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

Betreuer: Prof. Dr. Wolfgang Buchalla

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2022

„Für einen Forscher sind die unvergessenen Momente seines Lebens jene seltenen, die nach Jahren mühsamer Arbeit entstanden sind, wenn das Geheimnis um die Natur plötzlich gelüftet ist und wenn das, was dunkel und chaotisch war, in einem klaren und schönen Licht und Muster erscheint.“

Gerty Cori

Meinem Opa

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	BIOFILME	1
1.1.1	Entdeckung und Bildung.....	1
1.1.2	Resistenzentwicklung im Biofilm	2
1.2	DER GOLDSTANDARD CHLORHEXIDIN	4
1.3	DIE ANTIMIKROBIELLE PHOTODYNAMISCHE THERAPIE	5
1.3.1	Entdeckung und Prinzip	5
1.3.2	aPDT in der Zahnmedizin.....	7
1.3.3	Der Photosensibilisator SAPYR	8
1.4	ZIEL DIESER ARBEIT	10
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	MATERIAL	12
2.1.1	Geräte.....	12
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.1.3	Chemikalien	13
2.1.4	Kommerziell erhältliche Kits	15
2.1.5	Software	15
2.1.6	Verwendete Organismen.....	16
2.1.7	Lösungen und Puffer.....	16
2.1.8	Kultivierungsmedien	20
2.1.8.1	Festmedium.....	20
2.1.8.2	Flüssigmedium.....	20
2.1.9	Testsubstanzen.....	21
2.1.9.1	Photosensibilisatoren (PS) SAPYR und SA-PN-05.....	21
2.1.9.2	Chlorhexidindigluconat (CHX).....	21
2.1.10	Verwendete Primer.....	21
2.1.11	Verwendete Antikörper	22
2.1.11.1	Primäre Antikörper	22
2.1.11.2	Sekundäre Antikörper	22
2.2	METHODEN	23
2.2.1	Kultivierung der Bakterien.....	23
2.2.2	Kultivierung der Biofilme	23
2.2.3	Behandlung der Biofilme	23
2.2.4	Untersuchung der Replikationsfähigkeit	24
2.2.5	Durchflusszytometrische Untersuchung der Membranintegrität.....	24

2.2.6	Mikroskopische Untersuchungen	25
2.2.6.1	Rasterelektronenmikroskopie	25
2.2.6.2	Transmissionselektronenmikroskopie	26
2.2.7	Untersuchung der Stoffwechselaktivität mittels ATP-Assay.....	26
2.2.8	Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies mittels DCF-Messung.....	27
2.2.9	Einsatz von Antioxidantien	27
2.2.10	Untersuchung der Proteinexpression.....	28
2.2.10.1	Bestimmung einer subletalen Konzentration von SAPYR nach aPDT und nach Behandlung mit CHX an planktonischen Kulturen von <i>E. coli</i> und <i>S. mutans</i>	28
2.2.10.2	Behandlung von <i>E. coli</i> für die Untersuchung der Proteinexpression	29
2.2.10.3	Lysieren der Bakterien.....	29
2.2.10.4	Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Assay	30
2.2.10.5	Trennung der Proteine nach Molekülmasse mit SDS-PAGE	30
2.2.10.6	Western Blot	30
2.2.11	Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung	32
2.2.11.1	Behandlung der Proben.....	32
2.2.11.2	RNA-Isolierung und -Sequenzierung.....	32
2.2.11.3	Auswertung der RNA-Sequenzierung.....	33
2.2.11.4	Umschreibung der RNA in cDNA	35
2.2.11.5	Validierung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung mit qRT-PCR.....	35
2.2.12	Zellkulturexperimente.....	36
2.2.12.1	Lagerung und Kultivierung.....	36
2.2.12.2	Bestimmung der Zellzahl	36
2.2.12.3	Zellaussaat	36
2.2.12.4	Behandlung der PDL-Zellen mit SAPYR und CHX	37
2.2.12.5	Bestimmung der Zellviabilität mit dem XTT-Assay	37
2.2.12.6	Bestimmung der Zellmasse mit dem KVT- Assay.....	38
2.2.13	Statistische Analyse	38
3	ERGEBNISSE	39
3.1	REPLIKATIONSFÄHIGKEIT	39
3.2	MEMBRANINTEGRITÄT	43
3.3	MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN	46
3.4	STOFFWECHSELAKTIVITÄT	50
3.5	INTRAZELLULÄRE REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES	50
3.6	EINFLUSS VON ANTIOXIDANTIEN AUF DIE REPLIKATIONSFÄHIGKEIT	53
3.7	BESTIMMUNG SUBLETALER KONZENTRATIONEN	58
3.8	PROTEINEXPRESSION IN <i>E. COLI</i>	59
3.9	TRANSKRIPTOMANALYSE VON <i>E. COLI</i> UND <i>S. MUTANS</i>	62
3.10	EXPRESSION DES GENS <i>RECA</i> BEI <i>E. COLI</i>	69
3.11	VALIDIERUNG DER ERGEBNISSE DER RNA-SEQUENZIERUNG MITTELS QRT-PCR	69

3.12	ZELLVIABILITÄT BEI HUMANEN PRIMÄREN PDL-ZELLEN	70
4	DISKUSSION	73
4.1	WIRKMECHANISMUS DER APDT AUF PATHOGENE BIOFILME	73
4.1.1	<i>Replikationsfähigkeit</i>	73
4.1.2	<i>Membranintegrität und morphologische Veränderungen</i>	75
4.1.3	<i>Stoffwechselaktivität</i>	76
4.1.4	<i>Intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies</i>	77
4.2	MOLEKULARE STRESSANTWORT PLANKTONISCHER KULTUREN NACH BEHANDLUNG MIT APDT IM VERGLEICH ZU CHX	80
4.2.1	<i>Molekulare Stressantwort bei E. coli</i>	81
4.2.3	<i>Molekulare Stressantwort bei S. mutans</i>	88
4.4	TOXIZITÄT DER APDT UND VON CHX GEGENÜBER PRIMÄREN PDL-ZELLEN	92
4.5	AUSBLICK	94
5	ZUSAMMENFASSUNG	95
6	ANHANG	97
6.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	104
6.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	106
6.3	TABELLENVERZEICHNIS	109
7	LITERATURVERZEICHNIS	111
8	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	IV
9	DANKSAGUNG	V
10	LEBENS LAUF	VII

1 Einleitung

1.1 Biofilme

1.1.1 Entdeckung und Bildung

Die ersten Beschreibungen des Biofilms stammen aus dem 17. Jahrhundert von dem Naturforscher Antoni van Leeuwenhoek, welcher mit einem der ersten Mikroskope mikrobielle Aggregate in von seinen Zähnen entnommenen Abstrichen entdeckte. Den Begriff Biofilm prägte Bill Costerton später im Jahre 1978 (Costerton et al., 1978; Høiby, 2017). Eine Definition aus dem Jahr 2002 von Donlan und Costerton beschreibt den Biofilm als „eine mikrobiell abgeleitete sessile Gemeinschaft, die durch Zellen gekennzeichnet ist, die irreversibel an ein Substrat oder eine Grenzfläche oder aneinandergebunden sind, eingebettet in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen, die sie selbst produziert haben, und die einen veränderten Phänotyp in Bezug auf Wachstumsrate und Gentranskription aufweisen“ (Donlan und Costerton, 2002). Diese extrazellulären Polysaccharide, auch als Glykokalyx bezeichnet, dienen als Schutzbarriere gegen äußere Umweltfaktoren (Costerton et al., 1978). Heutzutage weiß man, dass rund 95% aller Bakterien in Biofilmen organisiert sind (Overman, 2000). Die Bildung von Biofilmen geschieht durch die Regulierung der Genexpression, welche aufgrund sich ändernder Umweltsignale, wie beispielsweise des pH-Werts, der Temperatur oder der verfügbaren Nährstoffe beeinflusst wird (Jefferson, 2004). Im ersten Schritt der Biofilmbildung kommt es zu einer Anhaftung freischwebender, sogenannter planktonischer Bakterien an eine Oberfläche durch die Brown'sche Molekularbewegung, infolge von Strömung oder Sedimentation. Im zweiten Schritt folgt das Wachstum des Biofilms, welches zunächst lateral, danach vertikal abläuft. Begleitend wird durch die Bildung extrazellulärer polymerer Substanzen (EPS) die Anhaftung an die Oberfläche optimiert und eine starke interbakterielle Bindung aufgebaut. Es entsteht somit ein zäher, strukturierter Belag, der von einer extrazellulären Matrix ummantelt wird, die den Bakterien Nahrung und auch Schutz bietet. Im dritten Schritt lösen sich vereinzelt Bakterienkolonien vom gereiften Biofilm ab und können an einer anderen Stelle der Oberfläche wieder anhaften (Donlan, 2001) (Abbildung 1). Der Biofilm zeichnet sich durch zahlreiche Überlebensstrategien gegenüber planktonisch wachsenden Bakterien aus. Dies resultiert in etwa 1000-fach höheren Konzentrationen antimikrobieller Substanzen, die zur Abtötung von Bakterien in einem Biofilm nötig sind (Hoyle und Costerton, 1991; Ceri et al., 1999).

Diese erhöhte Toleranz wird neben dem Vorhandensein der EPS, die zu einer erschwerten Penetration von Substanzen führt (Hoyle et al., 1992; De Beer et al., 1994), auch durch eine Zell-Zell-Kommunikation, dem sogenannten „Quorum Sensing“, innerhalb des Biofilms begünstigt (Shigeta et al., 1997; Donlan, 2001; Podbielski und Kreikemeyer, 2004; Solano et al., 2014). Auch sogenannte „Persister“-Bakterien spielen dabei eine große Rolle (Lewis, 2005). Dabei handelt es sich um Bakterien, die aufgrund einer geringen Verfügbarkeit von Nährstoffen oder Sauerstoff im Biofilm einen herunterregulierten Stoffwechsel besitzen, was zu einer Unempfindlichkeit dieser Bakterien gegenüber antimikrobiellen Stoffen führen kann (Lewis, 2007; 2008).

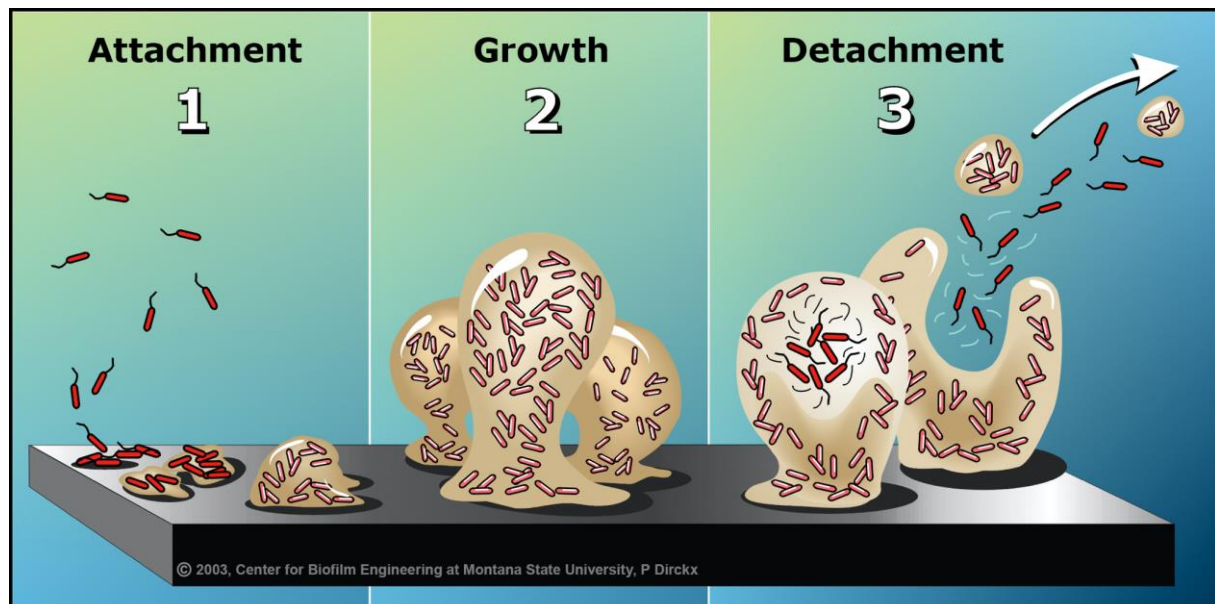


Abbildung 1: Bildung von Biofilmen

(1) Anhaftung (Attachment) (2) Wachstum (Growth) (3) Ablösung (Detachment), entnommen aus https://biofilm.montana.edu/biofilm-basics/what_are_biofilms.html (Dirckx, 2003)

1.1.2 Resistenzentwicklung im Biofilm

Eine Resistenz ist die Fähigkeit eines Bakteriums, in Gegenwart von antimikrobiellen Substanzen zu wachsen. Bei der Behandlung von Bakterien kann es demnach durch die interzelluläre Kommunikation zu Veränderungen der Genexpression kommen. Es wird angenommen, dass eine Bildung von Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Substanzen durch das Vorhandensein von Nährstoffen, die Wachstumsrate, Temperatur, pH-Wert und dem horizontalen Gentransfer zwischen Bakterienzellen beeinflusst wird (Donlan, 2001; Hostacká et al., 2010; Mathlouthi et al., 2018).

Bei der Bildung einer Resistenz wird unter anderem die Expression verschiedener Gene, welche eine Rolle in der Stressantwort spielen, reguliert (Hengge-Aronis, 1996; Brown und Barker, 1999; Mah und O'Toole, 2001). Auch die Expression von „Multidrug“-Effluxpumpen oder anderen Membranproteinen sowie die Regulation von Genen, welche durch Veränderungen in der bakteriellen Membran zu einer verbesserten Stabilität und Abwehr antimikrobieller Substanzen führen spielen eine Rolle bei der Bildung von Resistenzen (Jaffe et al., 1982; Liu und Ferenci, 1998; Mairal-Litrán et al., 2000; Mah und O'Toole, 2001; Kobayashi et al., 2007; Liu et al., 2017b; Mukherjee und Bassler, 2019; Willdigg und Helmann, 2021). Diese spezifischen Fähigkeiten der im Biofilm wachsenden Bakterien zu einer Resistenzentwicklung wirken sich stark auf die Entstehung multiresistenter Bakterien aus, die eine große Herausforderung vor allem im medizinischen Bereich darstellen. Im Jahr 2016 lag die Anzahl der Todesfälle aufgrund antimikrobieller Resistenzen (AMR) weltweit bei etwa 700.000 pro Jahr. Laut Hochrechnungen soll diese Zahl bis zum Jahr 2050 auf 10 Millionen pro Jahr steigen (Abbildung 2), wobei die Mortalität derzeit vor allem im afrikanischen und asiatischen Raum wächst (O'Neill, 2016). Die steigenden Infektionszahlen durch multiresistente Keime erhöht die Dringlichkeit der Entwicklung alternativer Behandlungsmethoden. Diese sollten jedoch so konzipiert sein, dass selbst keine Resistenzen induziert werden, indem sie beispielsweise nach einem Multi-Target-Wirkungsprinzip anstelle des üblichen Schlüssel-Schloss-Prinzips wirken, bei dem beispielsweise ein Antibiotikum an einer bestimmten Zielstruktur bindet und diese inaktiviert (Spellberg et al., 2013). Bei dem Multi-Target-Wirkungsprinzip kommt es dagegen zu einer unselektiven Zerstörung verschiedener bakterieller Strukturen (Wainwright et al., 2017).

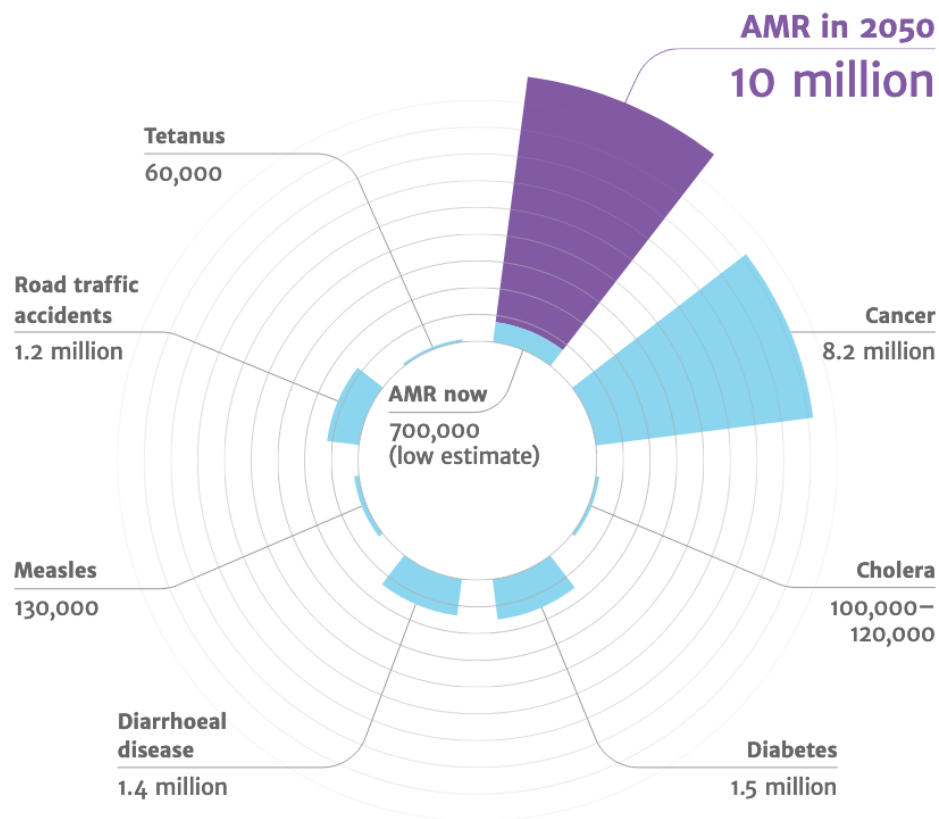


Abbildung 2: Vorhersage über Anzahl der Todesfälle aufgrund von AMR im Vergleich zu anderen Erkrankungen oder Risiken, entnommen aus (O'Neill, 2016)

1.2 Der Goldstandard Chlorhexidin

Zu einer unterstützenden Behandlung von bakteriell induzierten Erkrankungen wie beispielsweise Gingivitis oder Parodontitis wird in der Zahnmedizin vor allem das Antiseptikum Chlorhexidin (CHX) verwendet (Cieplik et al., 2019). Dabei handelt es sich um ein Bis-Biguanid, welches aus zwei Benzolringen besteht, die durch eine zentrale Hexamethylenkette spiegelsymmetrisch miteinander verbunden sind, und bei physiologischem pH-Wert zweifach positiv geladen ist (Abbildung 3). CHX wirkt als starke Base und ist in Verbindung mit Digluconat-Salzen wasserlöslich (Davies et al., 1954; Lim und Kam, 2008; Kampf, 2018). Das Antiseptikum wurde in den frühen 1950er Jahren in Großbritannien im Rahmen eines breit angelegten Screenings nach Wirkstoffen gegen Malaria synthetisiert (Lim und Kam, 2008; Kampf, 2016). Seitdem wurde CHX in verschiedenen medizinischen Bereichen wie beispielsweise in der Urologie, Gynäkologie und Augenheilkunde sowie zu der Desinfektion chirurgischer Bereiche eingesetzt, bevor es Ende der 1960er Jahre in der Zahnmedizin eingeführt wurde (Gjerme, 1974).

Beim Einsatz von niedrigen Konzentrationen wirkt CHX bakteriostatisch und hat einen Effekt auf die Integrität der Zytoplasmamembran sowie auf membrangebundene Proteine, während es bei höheren Konzentrationen bakterizid wirkt und es zum Austreten von Zytoplasma und schließlich zu einer Koagulation und Ausfällung intrazellulärer Bestandteile wie Proteine und Nukleinsäure kommt (Jones, 1997; Denyer und Stewart, 1998; McDonnell und Russell, 1999; Gilbert und Moore, 2005). In vielen Studien konnte bereits eine phänotypische Adaptation von Bakterien gegenüber CHX beobachtet werden (Tattawasart et al., 2000a; Tattawasart et al., 2000b; Fraud et al., 2008; Cieplik et al., 2019; Schwarz et al., 2021). Dabei kam es beispielsweise bei *Pseudomonas stutzeri* zur Anpassung der bakteriellen Membran durch die Regulation von Proteinen und der Lipopolysaccharide der äußeren Membran (Tattawasart et al., 2000b). Bei *Pseudomonas aeruginosa* führte die Regulation des „Multidrug“-Efflux-Systems MexCD-OprJ zu einer Adaptation gegenüber CHX (Fraud et al., 2008).

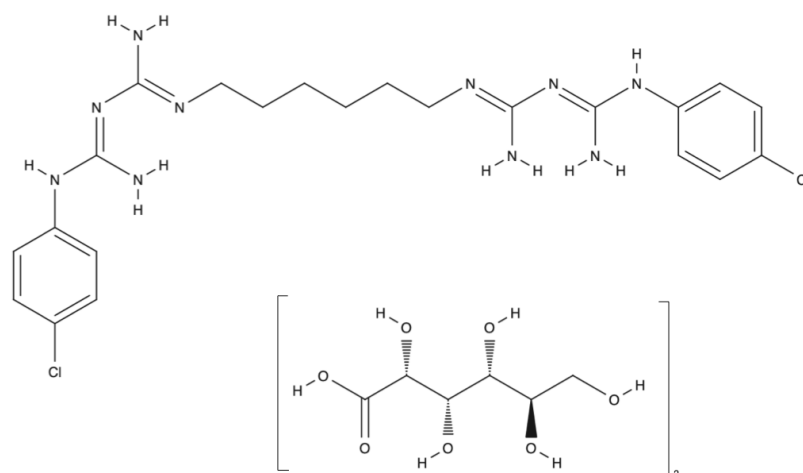


Abbildung 3: Strukturformel von Chlorhexidindigluconat, entnommen aus (Muehler et al., 2020)

1.3 Die antimikrobielle photodynamische Therapie

1.3.1 Entdeckung und Prinzip

Eine Alternative oder auch unterstützende Therapie zu der herkömmlichen Anwendung von Antibiotika und Antiseptika bietet die antimikrobielle photodynamische Therapie (aPDT). 1900 zeigte Oskar Raab als Student erstmals die Inaktivierung von *Paramecium caudatum* nach Behandlung mit unterschiedlichen Farbstoffen unter Bestrahlung mit Sonnenlicht (Raab, 1900). Die Resultate seiner Experimente mit Acridin waren anfangs inkonsistent und nicht reproduzierbar.

Er und sein Doktorvater Hermann von Tappeiner fanden jedoch heraus, dass die Toxizität der Farbstoffe von der Tageszeit und der Intensität des Tageslichts abhängig war, da dies der einzige sich ändernde Parameter war (Szeimies et al., 2001). Von Tappeiner prägte somit den Begriff "photodynamisches Phänomen" (von Tappeiner, 1909). Die erste erfolgreiche Inaktivierung von Protozoa und Bakterien wurde 1904 von Jodlbauer und von Tappeiner und 1905 von Huber beschrieben (Jodlbauer und von Tappeiner, 1904; Huber, 1905). Die aPDT basiert auf der Behandlung mit einem *per se* nicht-toxischem Farbstoff, dem sogenannten Photosensibilisator (PS), und der anschließenden Bestrahlung mit sichtbarem Licht in einer geeigneten Wellenlänge in Gegenwart von molekularem Sauerstoff (Wainwright et al., 2017; Cieplik et al., 2018a). Das Prinzip der aPDT ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Kombination von PS, Licht und molekularem Sauerstoff führt zu einer Absorption eines Photons durch ein PS-Molekül, wodurch ein angeregter Singulett-Grundzustand erreicht wird. Eine Rückkehr in den Grundzustand kann durch die Emission von Fluoreszenz oder durch Wärme erfolgen. Alternativ kann das Molekül durch inter-system-crossing (ISC) in einen langlebigeren Triplett-Zustand übergehen. Anschließend wird entweder Ladung auf umliegende Substrate übertragen (Typ-I-Mechanismus), wodurch Superoxidradikale ($O_2^{\bullet-}$) entstehen, die weiter zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und hochreaktiven freien Hydroxylradikalen (HO^{\bullet}) reagieren können, oder es wird direkt Energie auf molekularen Sauerstoff übertragen (Typ-II-Mechanismus), was zu einer Entstehung von Singulett-Sauerstoff (1O_2) führt, der als die wichtigste reaktive Spezies im photodynamischen Prozess gilt (Maisch et al., 2007; Cieplik et al., 2018a). Der relative Anteil des Typ-II-Mechanismus wird durch die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_Δ beschrieben (Maisch et al., 2007; Alves et al., 2014; Wainwright et al., 2017). Durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) werden bakterielle Strukturen unselektiv zerstört. Daher ist eine Induktion einer Resistenz in Bakterienzellen nach einer Behandlung mit aPDT sehr unwahrscheinlich (Almeida et al., 2015; Wainwright et al., 2017; Cieplik et al., 2018a). Um jedoch die Möglichkeit bakterieller Resistenzen gegen aPDT definitiv auszuschließen, ist es wichtig, den jeweiligen Wirkmechanismus eines bestimmten PS zu verstehen.

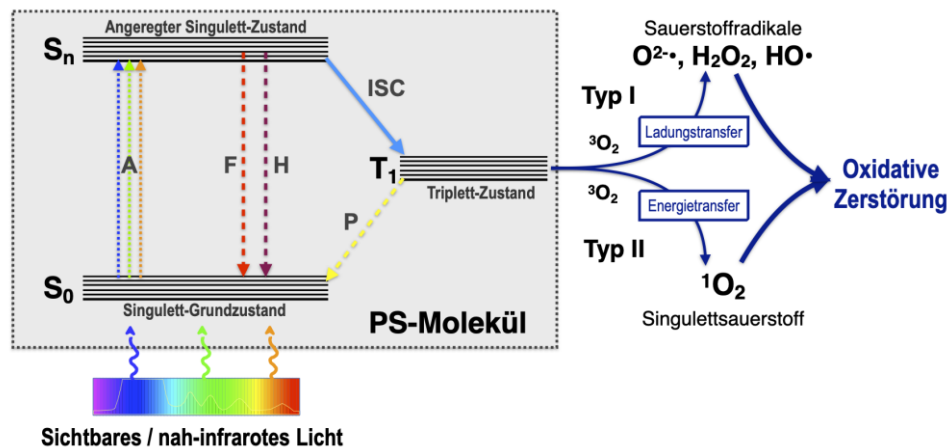


Abbildung 4: Modifiziertes Jablonski-Diagramm, modifiziert nach (Cieplik et al., 2018a)

A: Photon; PS: Photosensibilisator; S_0 : Singulett-Grundzustand; S_n : angeregter Singulett-Zustand; F: Fluoreszenz; H: Hitzeabgabe; ISC: inter-system-crossing; P: Phosphoreszenz; T_1 : Triplett-Zustand; 3O_2 : Sauerstoff im Grundzustand; 1O_2 : Singulett-Sauerstoff; $O_2^{\bullet-}$: Superoxidradikal; H_2O_2 : Wasserstoffperoxid; HO^{\bullet} : Hydroxylradikal

1.3.2 aPDT in der Zahnmedizin

Aufgrund der steigenden Resistenzen gegenüber Antibiotika und Antiseptika besteht in der Zahnmedizin ein zunehmendes Interesse für die Anwendung der aPDT. Die aPDT hat bereits vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung der oralen Candidose gezeigt (Scwingel et al., 2012). Dies konnte in einer *in vitro* Studie nachgewiesen werden, in der Photofrin®-vermittelte PDT erfolgreich zur Bekämpfung verschiedener *Candida*-Arten eingesetzt wurde (Bliss et al., 2004; Du et al., 2021). Zur Behandlung von Läsionen in der Mundhöhle, die durch das Herpes-simplex-Virus (HSV) verursacht werden, konnte die aPDT ebenfalls erfolgreich eingesetzt werden (Marotti et al., 2009). Bei der Behandlung von Herpes labialis mit Methylenblau zeigten die Ergebnisse einen Rückgang der Bläschen und eine schnellere Abheilung der Läsionen (Lotufo et al., 2020). In der Parodontologie gibt es klinische Studien zu den Auswirkungen der aPDT als unterstützende Therapie auf die Heilungsprozesse bei chronischer Parodontitis (Sgolastra et al., 2013; Arweiler et al., 2014; Tabenski et al., 2017). Jedoch konnten hier nur eine kurzzeitige Besserung beobachtet werden. Für die klinische Langzeitwirkung der aPDT als adjuvanten Therapie bei Parodontitis ist derzeit keine ausreichende Evidenz vorhanden. Auch in der Endodontie wurde die aPDT bereits zur Abtötung von Mikroorganismen in Wurzelkanälen *in vitro* und *in vivo* in Betracht gezogen und untersucht. (Seal et al., 2002; Garcez et al., 2006; Garcez et al., 2010; Tennert et al., 2014; Cieplik et al., 2016).

Beispielsweise konnten Cieplik et al. zeigen, dass es bei der aPDT mit TMPyP und Methylenblau gegen *E. faecalis* in Wurzelkanälen zu einer Reduktion des Wachstums um $\geq 5 \log_{10}$ -Stufen kam (Cieplik et al., 2016). In einer Studie von Tennert et al. erwies sich die aPDT mit Toluidinblau in Kombination mit Natriumhypochlorit als eine wirksame Behandlung (Tennert et al., 2014). Diese Studien unterstreichen das Potenzial der aPDT als ergänzende Therapie zur konventionellen endodontischen Behandlung zur Optimierung der mikrobiellen Reduktion in Wurzelkanäle. Außerdem zeigt sich eine Tendenz zur schnelleren Heilung intraossärer Läsionen nach Behandlung mit aPDT. Der PS Methylenblau wird bereits zur gezielten Bekämpfung von Gram-positiven und Gram-negativen Mikroorganismen in der Endodontie eingesetzt (Garcez und Hamblin, 2017; Er Karaoğlu et al., 2020). Die Hydrophilie von Methylenblau sowie sein geringes Molekulargewicht und seine positive Ladung ermöglichen die Passage durch die Porin-Protein-Kanäle in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien (Wainwright et al., 1997; Usacheva et al., 2003). Darüber hinaus kann der PS auch in die Dentintubuli eindringen, in denen sich Bakterien vermehrt ansiedeln (Absi et al., 1987). Jedoch gibt es für den Einsatz von MB, neben dem Nachteil der blauen Verfärbung der behandelten Stelle, wenige Hinweise auf eine effektive Wirkung gegenüber Biofilmen (Cieplik et al., 2015).

1.3.3 Der Photosensibilisator SAPYR

In vorangegangenen Projekten unserer Arbeitsgruppe wurde eine neu entwickelte Klasse von PS untersucht. Dabei handelt es sich um von Phytoalexinen abgeleitete Phenalen-1-on-Derivate (PN), die sowohl gegen planktonische Kulturen als auch gegen Biofilme Wirksamkeit zeigten (Cieplik et al., 2013; Späth et al., 2014; Tabenski et al., 2016; Muehler et al., 2017; Cieplik et al., 2018a; Cieplik et al., 2018b). Diese PS erreichen Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten von $\Phi_{\Delta} > 0,9$ und reagieren damit fast ausschließlich nach dem Typ-II-Mechanismus (Cieplik et al., 2013; Späth et al., 2014; Tabenski et al., 2016). Dies steht in deutlichem Gegensatz zu anderen derzeit bekannten positiv geladenen PS wie dem Porphyrin-Derivat TMPyP, das Φ_{Δ} -Werte um 0,7 erreicht (Wilkinson et al., 1993). Da diese PN-Derivate in der Lage waren, planktonische Bakterien innerhalb von Sekunden wirksam zu inaktivieren, wurde zunächst die Hypothese aufgestellt, dass der Hauptwirkungsmechanismus der aPDT mit PN-Derivaten in der Schädigung der bakteriellen Zytoplasmamembranen liegen könnte (Cieplik et al., 2013; Späth et al., 2014; Muehler et al., 2017).

Der bisherige Leadkandidat dieser PN-basierten PS ist [(1-oxo-1H-phenalen-2-yl)methyl]-pyridiniumchlorid (SAPYR, Abbildung 5A). Dieser weist neben einer Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute von $\Phi_{\Delta}=0,99$ auch eine hohe Wasserlöslichkeit und Photostabilität sowie eine positive Ladung für die bessere Anhaftung an negativ geladene Zellwände pathogener Mikroorganismen auf. Mit seiner nahezu neutralen Farbe eignet er sich außerdem besonders für den Einsatz in der Zahnmedizin (Späth et al., 2014). In einer früheren Studie wurde die antimikrobielle Wirksamkeit von SAPYR gegenüber einem Polyspezies-Biofilm aus Parodontitis-assoziierten Bakterien *in vitro* untersucht (Cieplik et al., 2018b). Insbesondere wurde hier evaluiert, ob der Mechanismus der antimikrobiellen Wirkung von aPDT mit SAPYR auf einer Schädigung der zytoplasmatischen Membran beruht. Die durchflusszytometrische Analyse in Kombination mit einer Propidiumiodid (PI)-Färbung zeigte jedoch keine Schädigung der Zytoplasmamembranen nach aPDT mit SAPYR. Darüber hinaus wurde spektrophotometrisch keine Aufnahme von SAPYR durch die Bakterien festgestellt (Cieplik et al., 2018b). Der genaue Wirkmechanismus von aPDT mit SAPYR ist daher noch unklar. Bei einem weiteren Phenalen-1-on-Derivat, [(1-oxo-1H-phenalen-2-yl)methyl]dodecan-1-aminiumchlorid (SA-PN-05, Abbildung 5B), konnte in einer Studie auch ohne Belichtung eine ausgeprägte antimikrobielle Wirksamkeit beobachtet werden, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die vorhandene lange Alkylkette ($12 \times \text{C}_n\text{H}_{2n+1}$) ähnlich wie bei quaternären Ammoniumverbindungen (QACs), wie Benzalkoniumchlorid (BAC), bakterielle Membranschäden verursacht (Muehler et al., 2017).

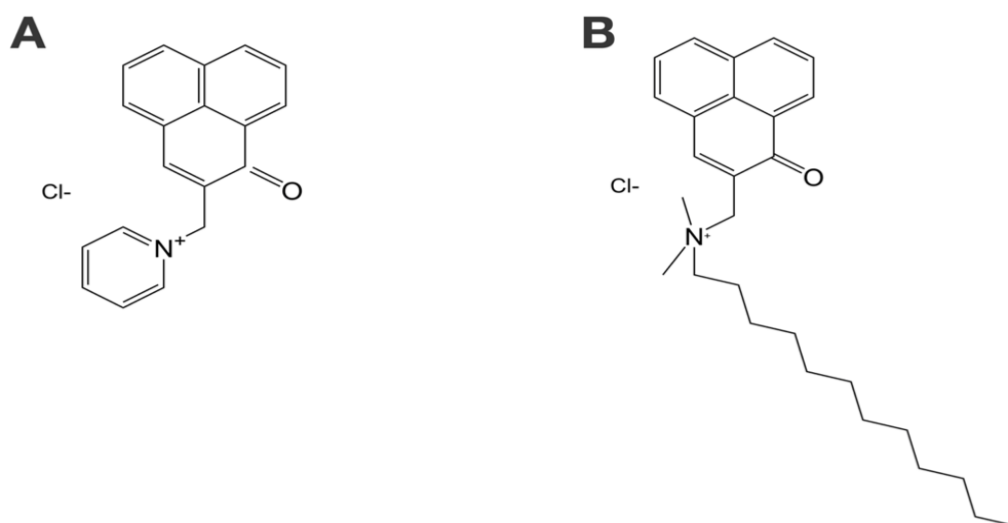


Abbildung 5: Strukturformeln von (A) SAPYR und (B) SA-PN-05, entnommen aus (Muehler et al., 2020)

1.4 Ziel dieser Arbeit

Weltweit stellt die zunehmende Verbreitung multiresistenter Mikroorganismen im medizinischen Bereich ein großes Problem dar. Die vermehrte Entstehung von Resistenzen ist unter anderem eine Folge der übermäßigen und unkontrollierten Anwendung von Antibiotika und Antiseptika. Daher ist es erforderlich, neue antimikrobielle Verfahren mit dem Ziel zu etablieren, die Anwendung systemischer wie auch lokaler Antibiotika so weit wie möglich ersetzen zu können.

Eine mögliche Alternative hierbei stellt die aPDT mit dem PS SAPYR dar. Die genauen Wirkmechanismen und Zielstrukturen der aPDT mit SAPYR sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Vor allem bei Biofilmpopulationen ist die Frage nach dem Wirkmechanismus und der spezifischen Stressantwort nach Anwendung antimikrobieller Verfahren von entscheidender Bedeutung. Erkenntnisse über mögliche Zielstrukturen können zu einer verbesserten Therapie führen und auch bei der Entwicklung neuer antimikrobieller Stoffe helfen. Zudem lässt sich so das Risiko einer Induktion von Resistenzen gegenüber diesen antimikrobiellen Verfahren abschätzen.

Ziel dieses Projektes war es daher, den Wirkmechanismus der aPDT mit SAPYR besser zu verstehen. Dabei wurde die Anwendung der bereits in der Arbeitsgruppe untersuchten PS SAPYR und SA-PN-05 zunächst auf pathogene Mikroorganismen in Biofilmen betrachtet. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass bei aPDT mit SAPYR keine Schädigung der Zytoplasmamembran auftritt (Cieplik et al., 2018b). Daher lässt sich eine Einschränkung der Stoffwechselaktivität und Zellteilung vermuten. Bei SA-PN-05 konnte im Gegensatz zum SAPYR eine ausgeprägte Dunkeltoxizität beobachtet werden, welche vermutlich aufgrund seiner langen Alkylkette (C12) auf einer Schädigung der Zytoplasmamembran beruht (Muehler et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit wurden Vertreter aus den Gruppen der Gram-positiven (*Actinomyces naeslundii*, *Streptococcus mutans*) und Gram-negativen (*Escherichia coli*) Bakterien in Monospezies-Biofilmen (Kulturdauer 48 h) kultiviert und mit den oben genannten PS unter verschiedenen Bedingungen beispielsweise der Variation der Inkubationsdauer, Bestrahlungsdauer und Konzentration des PS behandelt. Mit der Durchflusszytometrie und den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen Propidiumiodid (PI) und SYBR Green (SG) wurde die Membranfähigkeit untersucht. Entsprechende morphologische Änderungen wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop und Transmissionselektronenmikroskop visualisiert.

Anschließend erfolgte die Untersuchung der Stoffwechselaktivität mittels eines ATP-Assays. Für die Messung intrazellulärer ROS, die während der Behandlung mit aPDT gebildet werden, wurde ein H₂DCF-DA-Assay angewandt. Zudem wurde eine Änderung der Proteinexpression verschiedener Stressmarker mittels Western Blot in planktonischen Kulturen untersucht. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung der regulatorischen Mechanismen nach Behandlung mit aPDT mittels RNA-Sequenzierung in planktonischen Kulturen, welche anschließend durch qRT-PCR validiert wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Sofern nicht anders beschrieben, wurden die in den Tabellen 1-9 aufgelisteten Materialien für die im Abschnitt 2.2 beschriebenen Methoden verwendet.

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Biometra TRIO-Thermoblock	Analytik Jena, Jena
Biovision 3000	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen
FACS Canto Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Gelelektrophorese-Apparaturen	Bio-Rad, München; Biometra, Göttingen
HI 2211 pH/ORP-Meter	Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA
Illumina NextSeq 500/600	Illumina, San Diego, CA, USA
Inkubatoren	Heraeus Instruments, Nürnberg
Lampe PIB3000	Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen
LYNX-Mikroskopie-Gewebeprozessor	Reichert-Jung, Wetzlar
Mikroskop DM IL	Leica, Wetzlar
Mikrowelle DAEWOO KOR-63Y5G	Daewoo, Seoul, Südkorea
Photospektrometer Ultrospec3300 pro	Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
Plattenphotospektrometer Infinite F200	TECAN GmbH, Männedorf, Schweiz
QuantStudio 3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rasterelektronenmikroskop FEI Quanta 400 FEG	FEI Company, Hillsboro, OR, USA
Reichert Ultracut S-Mikrotom	Leica-Reichert, Wetzlar
Scanner CanoScan LiDE220	Canon, Tokio, Japan
SCD 005 Sputter Coater	Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein
Schüttler Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Schwingmühle MM400	Retsch GmbH, Haan
Sterilbänke LaminAir®, Thermomixer Compact	Heraeus Instruments, Nürnberg
Transmissionselektronenmikroskop LEO 912AB	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallwasserbad Sonorex	Zeiss, Oberkochen
Zentrifuge Rotina 420R	Bandelin, Berlin
Zentrifuge Universal 320	Hettich, Tuttlingen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
96-Well-Platten	Costar, Corning Inc., NY, USA
Acrodisc Filter 5 µm, 1,2 µm, 0,45 µm	Pall Life Sciences, NY, USA
Cryobank	Mast Diagnostica, Merseyside, UK
Deckgläser, 24x24 mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Filterpipettenspitzen	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt
Filtropur 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Impfeschlingen	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturflaschen CELLSTAR®, 250 ml, 75 cm ²	Greiner, Frickenhausen
MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer Zählkammer	Laboroptik Ltd, Lancing, UK
Nunc® Lab-Tek® Permanox®, 4,2 cm ² /Well	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nunc® Thermanox® 24 x 30 mm Objektträger	Science Services, München
Optical Adhesive Covers	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PCR Kühlblock	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reservoirs 50 ml	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt
Röhrchen 15 ml; 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Rundbodenröhrchen 5 ml	Costar, Corning Inc., NY, USA
Stripetten CELLSTAR®	Greiner, Frickenhausen
Zirkonia-Glas-Kügelchen	Roth, Karlsruhe

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H ₂ DCF-DA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Acrylamid; 30% Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ammoniumperoxidsulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Antibiotika-Antimykotika-Lösung (100x)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bacto™ Proteose Pepton	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto™ Soyton	Becton Dickinson, Heidelberg
bis-(1,3 dibutylbarbiturat) trimethan oxonol (DiBAC ₄ (3))	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bleicitratlösung	Leica-Reichert, Wetzlar
Cacodylat	Science Services, München
Chlorhexidine-Digluconat-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

D(+)-Glucose Monohydrat	Roth, Karlsruhe
D-Mannitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Essigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GelRed™Nucleic Acid Gel Stain 10000x	Biotium, CA, USA
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Heminchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kaliumnitrat	Merck, Darmstadt
Kristallviolett-Pulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Cystein-hydrochlorid Monohydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
L-Glutamin Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Laemmli (6x)	Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Menadion	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
N-acetyl-cystein	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumazid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	VWR Chemicals, Radnor, PA, USA
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Nuklease-freies Wasser	Qiagen, Hilden
Osmiumtetroxid	Science Services, München
PageRuler Prestained Protein	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Paraformaldehyd	Science Services, München
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS Dulbecco)	Merck, Darmstadt
Ponceau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Propidiumiodid-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
rATP	Promega, Fitchburg, WI, USA
Redoxgreen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNAprotect® Bacteria Reagent	Qiagen, Hilden
Saccharose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Salzsäure	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SDS-Pellets	Roth, Karlsruhe
SeaKem LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, hess. Oldendorf
SYBR Green	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SYBR™ Select Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TrackIt™ 50 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trizma R base (Tris)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypton	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tween® 20	Roth, Karlsruhe
Uranylacetat-Lösung	Fluka, Buchs, Schweiz

2.1.4 Kommerziell erhältliche Kits

Tabelle 4: Verwendete Kits

Name	Hersteller
BCA-Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay	Promega, Fitchburg, WI, USA
Entwicklungslösung Western Blot	Bio-Rad, München
CellLytic™ B plus	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EMbed-812 Kit (EPON)	Science Services, München
High Output Kit v2 5	Illumina, San Diego, CA, USA
Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit	Illumina, San Diego, CA, USA
Quantitect Reverse Transcriptase Kit	Qiagen, Hilden
Quick-RNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit	Zymo Research Europe, Freiburg
RNA Clean & Concentrator-5 Kit	Zymo Research Europe, Freiburg
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
XTT Proliferation Kit	Panreac Applichem, Darmstadt

2.1.5 Software

Tabelle 5: Verwendete Software

Name	Quelle
Beacon Designer, Free Edition	PREMIER Biosoft International, San Francisco, CA, USA
BioRender.com	BioRender, Toronto, Kanada
FACSDiva 5.0.2	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
FlowJo, Version 10	FlowJo, LLC.
Pathway Tools, Version 25.0	SRI International, CA, USA
Primer3, Version 4.1.0	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA
QuantStudio, Version	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

SigmaPlot, Version 8.0

Systat Software. San Jose, CA, USA

SPSS, Version 26.0

SPSS, Chicago, IL, USA

TECAN Magellan – Data Analysis Software,
Version 7.1.0

TECAN GmbH, Männedorf, Schweiz

2.1.6 Verwendete Organismen

Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme wurden von der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, bezogen und bei -80 °C in Kryoröhrchen gelagert.

Tabelle 6: Verwendete Bakterienspezies

Bakterienspezies	DSM-Nummer	ATCC-Nummer
<i>Actinomyces naeslundii</i>	DSM 43013	ATCC 12104
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1103	ATCC 25955
<i>Streptococcus mutans</i>	DSM 20523	ATCC 25175

Zelllinie

Primäre Zellen des humanen parodontalen Ligaments (PDL) wurden von Frau PD Dr. Agnes Schröder (Poliklinik für Kieferorthopädie, UKR) zur Verfügung gestellt. Das Alter der Spender lag zwischen 14 und 22 Jahren. Die Zellen wurden aus extrahierten Weisheitszähnen gewonnen, welche keinerlei entzündliche und kariöse Läsionen aufwiesen und deren Entfernung medizinisch indiziert war. Die Genehmigung wurde von der Ethikkommission an der Universität Regensburg eingeholt (Ref. 13-170-0150).

2.1.7 Lösungen und Puffer

Steril filtrierter Speichel

Zur Herstellung von steril filtriertem Speichel wurde zunächst unstimulierter Speichel von Mitarbeitern und Studierenden im Labor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie gesammelt. Die Genehmigung wurde von der Ethikkommission an der Universität Regensburg eingeholt (Ref. 17-782_1-101). Die Speichelabgabe geschah nüchtern zwischen 9:00 und 11:00 Uhr. Der Speichel wurde bis zur nächsten Verwendung in 50 ml Falcon-Röhrchen bei -20 °C aufbewahrt. Für die Filtration wurde der Speichel aufgetaut und bei 4500 rpm für 45 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde dann mit Filtern verschiedener Porengröße filtriert (5 µm, 1,2 µm, 0,45 µm, 0,2 µm) (Ruhl et al., 2011). Der erhaltene sterile Speichel wurde mit einer 0,225%-igen NaCl-Lösung 1:1 verdünnt, erneut steril filtriert und bei -20 °C aufbewahrt.

RTF-Lösung I

di-Kaliumhydrogenphosphat	6 g
demin. Wasser	1000 ml

RTF-Lösung II

Natriumchlorid	12 g
Ammoniumsulfat	2 g
Kaliumdihydrogenphosphat	6 g
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	2,5 g
demin. Wasser	1000 ml

RTF-Lösung I und II wurden nach Herstellung steril filtriert (0,22 µm Filter).

Menadion-Lösung

Menadion	55 mg
Ethanol	100 ml

Hemin-Lösung

Hemin	200 mg
Kaliumhydroxid (0,1 N)	100 ml
Ethanol	50 ml
demin. Wasser	50 ml

Lösung A

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Kaliumnitrat	1 g
Natriumchlorid	2 g
Hemin-Lösung	1 ml
Sørensen-Puffer	800 ml

Lösung A wurde nach Herstellung bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Lösung B

Glukose	300 mg
Saccharose	300 mg
L-Cystein-hydrochlorid	100 mg
Monohydrat	
Natriumcarbonat	100 mg
Sørensen-Puffer	10 ml

Lösung B wurde nach der Herstellung steril filtriert (0,22 µm).

Sørensen-Puffer

Lösung I:

Kaliumdihydrogenphosphat 9 g/l H₂O

Lösung II:

di-Natriumhydrogenphosphat 12 g/l H₂O

Dihydrat

Für die Herstellung von Sørensen-Puffer wurden 330 ml von Lösung I und 670 ml von Lösung II gemischt und steril filtriert.

Sammelgel (5% Acrylamid)

Acrylamid-Mix (%)	333,5 µl
Tris-HCL, pH 6,8 (1 M)	250 µl
H ₂ O	1,38 ml
SDS (10%)	20 µl
APS (10%)	15 µl
TEMED	1,5 µl

Trenngel (10% Acrylamid)

Acrylamid-Mix (%)	1,834 ml
Tris-HCL, pH 8,8 (1,5 M)	1,375 ml
H ₂ O	2,21 ml
SDS (10%)	55 µl
APS (10%)	27,5 µl
TEMED	2,75 µl

Laufpuffer 10x

Glycin	144,13 g
Tris	30,28 g
SDS	10 g

demin. Wasser	1000 ml
---------------	---------

Transferpuffer

Glycin (1 M)	192 ml
Tris-HCL, pH 8,3	25 ml
Methanol	200 ml
demin. Wasser	583 ml

TBS

Natriumchlorid (1 M)	150 ml
Tris-HCL, pH 7,6	25 ml
demin. Wasser	825 ml

TBS-T (TBS mit 0,1% Tween)

Natriumchlorid (1 M)	150 ml
Tris-HCL, pH 7,6	25 ml
Tween	0,5 ml
demin. Wasser	824,5 ml

PBS 10x

PBS-Pulver	
demin. Wasser	1000 ml

Ponceau-Lösung

Ponceau	0,1 g
Essigsäure	2,5 ml
demin. Wasser	47 ml

Blocking-Lösung

Milchpulver	2,5 g
TBS-T	50 ml

Tris-Acetat-EDTA-Puffer 50x (TAE, pH 8,2)

Tris	121 g
Essigsäure	28,55 ml
EDTA (0,5 M)	50 ml
demin. Wasser	1000 ml

2.1.8 Kultivierungsmedien

2.1.8.1 Festmedium

Müller-Hinton- und Schaedler-Agarplatten wurden vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg bezogen.

2.1.8.2 Flüssigmedium

Trypto-Soyton-Bouillion (TSB)

Trypton	17 g
Soyton	3 g
D(+)-Glukose-Monohydrat	2,5 g
Natriumchlorid	5 g
di-Kaliumhydrogenphosphat	2,5 g
demin. Wasser	1000 ml

TSB + 1% Glukose

TSB	100 ml
Glukose	1 g

Modified Fluid Universal medium (mFUM)

Lösung A	160 ml
Lösung B	10 ml
RTF-Lösung I	15 ml
RTF-Lösung II	15 ml
Menadion-Lösung	0,4 ml

mFUM+ steril filtrierter Speichel (mFumS)

mFum	50 ml
Steril filtrierter Speichel	40 ml
Fetal Bovine Serum	10 ml

Zellkulturmedium

DMEM	500 ml
L-Glutamin	5 ml
Antibiotisch-Antimykotische Lösung	5 ml
Fetales Kälberserum	55 ml
Ascorbinsäure	5 ml

2.1.9 Testsubstanzen

2.1.9.1 Photosensibilisatoren (PS) SAPYR und SA-PN-05

SAPYR und SA-PN-05 wurden von der Firma TriOptoTec GmbH, Regensburg, bezogen. Von beiden PS wurden Stammlösungen mit der Konzentration von 1 mM hergestellt. Dazu wurden 3,08 mg SAPYR oder 4,42 mg SA-PN-05 abgewogen und in je 10 ml H₂O gelöst und im Kühlschrank dunkel aufbewahrt. Für die Versuche wurden Lösungen der verwendeten Konzentrationen alle 4 Wochen frisch hergestellt.

2.1.9.2 Chlorhexidindigluconat (CHX)

Chlorhexidindigluconat wurde von der Firma Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, bezogen. Für die Herstellung einer 0,2%-igen CHX-Lösung wurden 0,1 ml der 20%-igen CHX-Lösung mit 9,9 ml H₂O gemischt. Die Lösung wurde alle 4 Wochen frisch hergestellt.

2.1.10 Verwendete Primer

Tabelle 7: Primerpaare für qRT-PCR

Spezies	Zielgen	Sequenz 5´- 3´ (V=vorwärts; R=rückwärts)	Produktlänge
<i>E. coli</i>	16srRNA	V: AACACATGCAAGTCGAACGG R: TTCCCAGACATTACTCACCCG	81
	<i>cpxP</i>	V: TGGCATCCGGGTGAAGAACT R: GCTGACGCTGATGTTCCGGTT	85
	<i>marA</i>	V: TGGCTTCGAGTCGCAACAAA R: CGATTCGCCCTGCATATTGGT	97
	<i>gadE</i>	V: TGGCAGTTGAAAGATAATCACGA R: CCTTGAAGGGTTTATTGCCTACT	82
	<i>hdeA</i>	V: GGACCTGTGAAGATTTCTTGGC R: TGGTTTATCTTTGTTGTTTCAGCGC	89
	<i>recA</i>	V: ATCGGCGACTCTCACATGGG R: GATCAGCAGCGTGTTGGACT	96
<i>S. mutans</i>	<i>gyrB</i>	V: GCACAAGAGTACGATGCCAGT R: TCCCAAACAAGGTGATGCAGC	119
	RS03005	V: CGTGGTTATCAAGTATCGTGTGA R: AAAGAATTGGTCCTGCATCCA	148
	RS09005	V: CAGTAGGTGCCGCTCAAAC R: AAGTCCGCCGCCAAACATAT	128
	<i>glgA</i>	V: GTGCCTTGCCCAAATCCCTT R: ACATATTCACGACGCCAGCC	145
	<i>ssrS</i>	V: CGGAAGCAACTAAAGTCAGAGCG R: TGGCACCGATGATTCACGTT	80

2.1.11 Verwendete Antikörper

2.1.11.1 Primäre Antikörper

Tabelle 8: Primäre Antikörper für Western Blot

Antikörper	Firma	Detektierte Größe	Verdünnung
AtpB (monoclonal; 7E3F2)	Abcam, Cambridge, UK	54 kDa	1:3000
DnaK (monoclonal; 8E2/2)	Enzo Life Science AG, Lausen, Schweiz	70 kDa	1:20000
KatG (polyclonal; AS08 374)	Agrisera (Biozol), Vännäs, Schweden	84 kDa	1:3000
RecA (monoclonal; ARM193)	Enzo Life Science AG, Lausen, Schweiz	40 kDa	1:10000
GapDH (polyclonal; orb555879)	Biorbyt (Biozol), Cambridge, UK	39 kDa	1:10000

2.1.11.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper für Western Blot

Antikörper	Firma	Verdünnung
Anti-Maus IgG F(ab') ₂ (polyclonal; HRP)	Enzo Life Science AG, Lausen, Schweiz	1:2500
Anti-Hase IgG (polyclonal; HRP)	Enzo Life Science AG, Lausen, Schweiz	1:2500

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der Bakterien

Bakterienkulturen wurden in Kryoröhrchen bei -80 °C aufbewahrt. Für die Experimente wurde ein Kügelchen der Kryokulturen auf eine Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. In Tabelle 10 sind die Bakterien mit den dazugehörigen Nährmedien dargestellt:

Tabelle 10: Medien für *A. naeslundii*, *E. coli* und *S. mutans*

	Festmedium	Flüssigmedium (planktonisch)	Flüssigmedium (Biofilm)
<i>A. naeslundii</i>	Schaedler	mFUM + FBS	mFUMS
<i>E. coli</i>	Müller-Hinton	TSB	TSB + 1% Glukose
<i>S. mutans</i>	Schaedler	mFUM + FBS	mFUMS

2.2.2 Kultivierung der Biofilme

Für die Kultivierung der Biofilme wurden zunächst planktonische Kulturen angesetzt. Dazu wurde mit einer Impföse eine Bakterienkolonie von einer bewachsenen Agarplatte gepickt und in einem Röhrchen in 5 ml Flüssigmedium gegeben (Tabelle 10). Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C unter statischen, aeroben Bedingungen bebrütet. Am nächsten Tag wurden die Übernachtkulturen zentrifugiert, die Pellets in PBS gelöst und die optische Dichte (600 nm) auf 0,1 eingestellt. Die Suspension wurde anschließend im Verhältnis 1:9 mit dem für die Biofilme hergestelltem Flüssigmedium (Tabelle 10) gemischt. In die Wells einer 96-Well-Platte wurden je 200 µl der Bakteriensuspension gegeben. Die Kultivierung der Biofilme erfolgte für 48 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen. Das Flüssigmediums wurde nach 24 h gewechselt.

2.2.3 Behandlung der Biofilme

Die Behandlung der Biofilme erfolgte mit den PS SAPYR, SA-PN-05 oder dem Antiseptikum Chlorhexidindigluconat (CHX) wie im Folgenden beschrieben. Nach einer Kultivierungsdauer von 48 h wurde das Medium von den Biofilmen abgezogen und jeweils 50 µl der PS oder CHX in unterschiedlichen Konzentrationen (SAPYR oder SA-PN-05: 0, 50, 100, 500 µM; CHX: 0,2%) hinzugegeben und für verschiedene Inkubationsdauern (5, 10, 20, 30 min) inkubiert.

Anschließend erfolgte die Bestrahlung der Proben mit einer blaues Licht emittierenden Lichtquelle (Waldmann PIB3000; em: 360-600 nm; 50 mW/cm²; 30 J/cm²) für 10 min bei Raumtemperatur (RT). Parallel dazu wurde eine Versuchsgruppe mit den gleichen Bedingungen nicht bestrahlt, sondern für weitere 10 min im Dunkeln inkubiert (Dunkelkontrolle). Als Negativkontrolle diente H₂O. CHX wurde als Positivkontrolle verwendet und in allen Versuchen nur im Dunkeln inkubiert. Für die weiteren Untersuchungen wurden die 96-Well-Platten für 1 min bei 3000 rpm zentrifugiert, um vom Pipettieren abgelöste Biofilmenteile wieder zu sedimentieren. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgezogen und verworfen.

2.2.4 Untersuchung der Replikationsfähigkeit

Zur Untersuchung der Replikationsfähigkeit wurden Koloniebildender Einheiten (KBE) gemessen. Zunächst wurden die behandelten Biofilme einmal mit PBS gewaschen und mechanisch durch wiederholtes Auf- und Ab-Pipettieren in PBS gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß übertragen. Anschließend wurden die Bakterien durch 10 min Behandlung in einem Ultraschallwasserbad vereinzelt. Nach einem seriellen Verdünnen der Proben in PBS (10⁻¹-10⁻⁷) wurden die einzelnen Verdünnungen ausplattiert, für 24 h bei 37 °C bebrütet und anschließend ausgezählt (Miles et al., 1938). Mittels der Ergebnisse aus dem KBE-Assay konnte eine Aussage über die Replikationsfähigkeit nach Behandlung getroffen werden. Eine Reduktion der Zahl der KBE um $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen ist gemäß den Richtlinien zur Flächendesinfektion und Handhygiene als „antimikrobielle Wirkung“, eine Reduktion der Anzahl der KBE um $\geq 5 \log_{10}$ -Stufen als „desinfizierende Wirkung“ definiert (Pearson et al., 1980; Bloomfield et al., 1991). Der Versuch wurde dreimal in Duplikaten durchgeführt.

2.2.5 Durchflusszytometrische Untersuchung der Membranintegrität

Nach Behandlung der Biofilme wurden diese mit PBS gewaschen, mechanisch aufgelöst und im Ultraschallbad für 10 min vereinzelt. Die Proben wurden bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert, einmal in PBS gewaschen und anschließend in 500 µl PBS resuspendiert. Von diesen Einzelzellsuspensionen wurden 10 µl entnommen, mit dem jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff in PBS gefärbt (Gesamtvolumen 1 ml) und im Dunkeln inkubiert. Dafür wurde SYBR Green (10000x) und eine Propidiumiodid (PI) - Lösung (1 mg/ml) verwendet. SYBR Green wurde für *E. coli* 1:10 und für *A. naeslundii* und *S. mutans* 1:100 in DMSO verdünnt und lichtgeschützt bei -20 °C gelagert.

Die PI-Lösung wurde unverdünnt verwendet und lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt. Nach der Vorbereitung der Proben wurde diese mit 1 µl der verdünnten SYBRGreen-Lösung angefärbt und für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden 5 µl PI (*A. naeslundii* und *S. mutans*) oder 7 µl PI (*E. coli*) hinzugegeben, die Proben für weitere 5 min inkubiert und anschließend vermessen. Die Aufnahme der Fluoreszenzsignale erfolgte mittels Durchflusszytometer FACS Canto II. Dieses Durchflusszytometer ist mit einem 488 nm Laser mit sechs Kanälen (FL1-6) ausgestattet. Bei den Untersuchungen wurden bei einer langsamen Flussrate (500-1000 Events/s) jeweils 10.000 Ereignisse evaluiert. Die Datenerfassung erfolgte mit FACSDiva Analyse-Software. Die Datenanalyse der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte mit FlowJo-Analyse-Software V10. Hierzu wurden die Proben zunächst im FSC/SSC-Dotplot dargestellt und ein Gate um die Bakterienpopulation (ROI) festgelegt. Anschließend wurde der jeweilige Fluoreszenzkanal gegen FSC dargestellt und die ROI quantifiziert. Der Versuch wurde dreimal in Duplikaten durchgeführt.

2.2.6 Mikroskopische Untersuchungen

2.2.6.1 Rasterelektronenmikroskopie

Um mögliche Veränderungen der Bakterienmembran zu visualisieren, wurden rasterelektronische Aufnahmen angefertigt. Dafür wurden Biofilme auf Permanox®-Kammerobjektträgern kultiviert und wie oben beschrieben behandelt (2.2.3). Für *A. naeslundii* wurde eine Inkubationszeit von 20 min und für *E. coli* und *S. mutans* eine Inkubationszeit von 5 min gewählt. Nach der Behandlung wurden die Biofilme einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 2,5% Glutaraldehyd, gepuffert mit Sørensens Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4), bei RT für 2 h fixiert. Jeder Objektträger wurde für jeweils 15 min zweimal mit PBS und dreimal mit H₂O gewaschen. Anschließend wurden die fixierten Proben zusätzlich in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe dehydriert. Nach dem Trocknen an der Luft über Nacht in einem Exsikkator wurden die Wachstumskammern entfernt und die Objektträger an REM-Stubs (Ø 25 mm) befestigt. Zur Beschichtung wurden die Proben mit Argon gespült und 30 s mit einem SCD 005 Sputter Coater mit Platin gesputtert. Die Proben wurden mit einem Quanta 400 FEG-Rasterelektronenmikroskop mit Everhart-Thornley-Detektor im Hochvakuummodus bei 2 kV mit 6–7 mm Arbeitsabstand untersucht.

Neigungswinkel der Proben und Fokus wurden angepasst, um eine optimale Anzeige zu gewährleisten. Repräsentative Bilder der Biofilme wurden aus zufällig ausgewählten Feldern aufgenommen.

2.2.6.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Für die transmissionselektronenmikroskopische Visualisierung wurden Biofilme auf 2 mm² Thermanox®-Objektträgern kultiviert und behandelt. Für *A. naeslundii* wurde eine Inkubationszeit von 20 min und für *E. coli* und *S. mutans* eine Inkubationszeit von 5 min gewählt. Nach der Behandlung wurden die Thermanox®-Stücke mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Biofilme erfolgte für *S. mutans* und *A. naeslundii* mit Karnovsky-Lösung (2,5% Glutaraldehyd und 2% Paraformaldehyd, gepuffert mit Cacodylat (0,1 M; pH 7,4)). Für *E. coli* wurde stattdessen aufgrund auftretender osmotischer Effekte 4% Glutaraldehyd, gepuffert mit Cacodylat (0,1 M; pH 7.4) verwendet. Die weitere Bearbeitung und Auswertung erfolgte im Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg durch Herrn Prof. Dr. Christoph Brochhausen-Delius und Herrn Heiko Siegmund. Alle Proben wurden in 4% niedrigschmelzender Agarose eingebettet. Für den Einbettungsprozess (Nachfixierung mit Osmiumtetroxid, Dehydrierung, Infiltration mit EPON) wurde der LYNX-Mikroskopie-Gewebeprozessor verwendet. Halbdünne Schnitte (75 µm) zur Auswahl relevanter Bereiche und ultradünne Schnitte (80 nm) wurden mit einem Reichert Ultracut S-Mikrotoms hergestellt. Ultradünne Schnitte wurden dann jeweils 10 min mit wässriger 2%-iger Uranylacetat- und 2%-iger Bleicitratlösung kontrastiert. Die TEM-Analyse wurde mit einem Elektronenmikroskop LEO 912AB durchgeführt.

2.2.7 Untersuchung der Stoffwechselaktivität mittels ATP-Assay

Der Nachweis der ATP-Konzentration nach Behandlung der Biofilme erfolgte durch eine Lumineszenzmessung mit dem BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay. Der in dem Kit enthaltene Puffer lysiert die Zellen, sodass es zu einer Extraktion von ATP kommt, welches durch die Reaktion mit Luciferase luminesziert. Das Kit wurde bei -20 °C gelagert und vor Verwendung bei RT aufgetaut und gemischt. Die Biofilme wurden nach der Behandlung mit PBS gewaschen, in 200 µl PBS durch Pipettieren aufgelöst und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Davon wurden je 100 µl in eine schwarze 96-Well-Platte pipettiert.

Anschließend wurden 100 µl der BacTiter-Glo™ -Lösung hinzugefügt und die Platte wurde für 5 min bei RT und lichtgeschützt auf einem Schüttler bei 175 rpm inkubiert. Die Lumineszenzmessung erfolgte mittels Plattenspektrometer. Eine ATP-Standardkurve (5 nM - 1 µM; in H₂O) von rATP (10 mM) wurde parallel zu den behandelten Biofilmpuben gemessen und diente zur Berechnung der ATP-Konzentrationen. Nach der Behandlung wurde außerdem zur Bestimmung der Zellzahl die optische Dichte der einzelnen Proben bei 600 nm gemessen und auf die berechnete ATP-Konzentration bezogen (ATP nM/OD₆₀₀). Der Versuch wurde viermal in Duplikaten durchgeführt.

2.2.8 Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies mittels DCF-Messung

Das Level an intrazellulären ROS wurde mittels 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA) untersucht. Durch die vermehrte Bildung von ROS wird H₂DCF-DA zu 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF) oxidiert, welches fluorometrisch gemessen werden kann. Zunächst wurde eine H₂DCF-DA Stammlösung von 2,4 mg/ml in Ethanol hergestellt. Diese wurde für die Versuche 1:10 in PBS verdünnt. Die Biofilme wurden wie bereits beschrieben behandelt, in PBS aufgelöst und im Ultraschallbad vereinzelt. Anschließend wurden 100 µl der Bakteriensuspension in eine schwarze 96-Well-Platte überführt und 100 µl einer 500 µM H₂DCF-DA-Lösung hinzugegeben.

Die Proben wurden für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mittels Plattenspektrometer bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 535 nm vermessen. Als Blank wurden 100 µl Bakteriensuspension mit 100 µl einer 1:10 Ethanol-PBS-Lösung ohne H₂DCF-DA vermessen, welcher bei der Auswertung von der dazugehörigen H₂DCF-DA-Probe subtrahiert wurde. Die Δ DCF-Fluoreszenz wurde in *Fluorescence Unit* (FU) ausgedrückt. Der Versuch wurde viermal in Duplikaten durchgeführt.

2.2.9 Einsatz von Antioxidantien

Zur Überprüfung der Auswirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf die Replikationsfähigkeit wurden verschiedene Antioxidantien eingesetzt, welche spezifische Sauerstoffspezies inaktivieren (Tabelle 11). Die Versuche wurden mit *S. mutans* und *E. coli* und dem PS SAPYR durchgeführt. Die Biofilme wurden wie beschrieben kultiviert (2.2.2). Die Behandlung erfolgte unterschiedlich für zwei Versuchsgruppen.

Bei der ersten Gruppe wurden die Antioxidantien vor der photodynamischen Behandlung, zusammen mit SAPYR hinzugegeben. Nach Behandlung wurde der Überstand abgezogen und der Biofilm in PBS aufgelöst. Bei der zweiten Gruppe erfolgte die Behandlung wie bereits beschrieben (2.2.3). Nach Abziehen des Überstands wurden anstelle von PBS die jeweiligen Antioxidantien gelöst in PBS für hinzugeben und für 10 min inkubiert. Für diesen Versuch wurden die Biofilme für 5 min mit 0, 25 und 50 μM SAPYR inkubiert und anschließend für 10 min bestrahlt. Die Ermittlung der KBE erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Der Versuch wurde dreimal in Duplikaten durchgeführt.

Tabelle 11: Verwendete Antioxidantien und eingesetzte Konzentrationen

ROS: reaktive Sauerstoffspezies, H_2O_2 : Wasserstoffperoxid, $\text{HO}\bullet$: Hydroxylradikale, $\text{O}_2\bullet^-$: Superoxidradikale, $^1\text{O}_2$: Singulett-Sauerstoff

Antioxidantien	ROS	Konzentrationen (mM)		
N-Acetylcystein	H_2O_2 , $\text{HO}\bullet$, $\text{O}_2\bullet^-$	0,5	1	5
Natriumpyruvat	H_2O_2	0,5	1	5
D-Mannitol	$\text{HO}\bullet$	10	25	50
Natriumazid	$^1\text{O}_2$	50	100	150

2.2.10 Untersuchung der Proteinexpression

2.2.10.1 Bestimmung einer subletalen Konzentration von SAPYR nach aPDT und nach Behandlung mit CHX an planktonischen Kulturen von *E. coli* und *S. mutans*

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der aPDT mit SAPYR und von CHX auf die Proteinexpression untersucht. Dafür wurden zunächst subletale Konzentrationen von SAPYR und CHX ermittelt, welche eine Reduktion der KBE von maximal 1 \log_{10} -Stufe bewirken sollte. Übernachtskulturen *E. coli* und *S. mutans* wurden angesetzt, welche am darauffolgenden Tag nach zweimaligem Waschen in PBS auf eine OD von 2,0 eingestellt wurden. Ein Milliliter der Suspension wurde in jeweils ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß gegeben und bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Pellets in 100 μl PBS gelöst und die Proben in eine 48-Well-Platte pipettiert. Nach Hinzufügen von SAPYR in unterschiedlichen Konzentrationen (Endkonzentrationen: 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16 und 32 μM) wurden die Proben zunächst für 5 min im Dunkeln inkubiert und anschließend für weitere 10 min bestrahlt.

Für die Behandlung mit CHX wurden unterschiedliche Konzentrationen des Antiseptikums (Endkonzentrationen: 0; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2%) hinzugegeben und die Proben für 5 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Proben bei 13000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zu jeder Probe 1 ml PBS hinzugegeben. Die Ermittlung der KBE erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. Die Experimente wurden dreimal in Duplikaten durchgeführt.

2.2.10.2 Behandlung von *E. coli* für die Untersuchung der Proteinexpression

Für die Untersuchung der Proteinexpression wurde für *E. coli* zunächst für SAPYR eine subletale Konzentration von 1 µM und für CHX eine Konzentration von 0,025% gewählt. Die Bakterien wurden wie in Abschnitt 2.2.10.1 behandelt und anschließend für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Bakterienpellet in 500 µl vorgewärmtem Kulturmedium gelöst. Die Proben wurden direkt geerntet oder für 30 oder 60 min bei 37 °C inkubiert, um Änderungen der Proteinexpression zu gewährleisten. Für nähere Untersuchungen der Proteinexpression wurden im weiteren Verlauf mehrere Konzentrationen für SAPYR (0; 0,25; 0,5 und 1 µM) und CHX (0; 0,0125; 0,025 und 0,05%) ausgewählt.

2.2.10.3 Lysieren der Bakterien

Für die Lyse der Bakterien wurden die behandelten Proben bei 13000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und Proben in 2 ml-Eppendorf-Gefäße transferiert. Nach einem zweiten Waschen in PBS wurde das Pellet in 100 µl Lysepuffer gelöst. Zum Schutz der Proteine wurden 2 µl Protease-Inhibitor-Cocktail hinzugefügt. Nach Zugabe von etwa 120 mg Zirkonia-Beads wurde die Suspension gevortext und mittels Schwingmühle bei 30 Hz mechanisch für 5 min lysiert. Die Adapter der Schwingmühle wurden zuvor bei -20 °C gelagert, damit es während des Lysierens zu keiner Erhitzung und somit Schädigung der Proteine kommt. Anschließend wurden die Proben bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zu der weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Experimente wurden dreimal durchgeführt.

2.2.10.4 Quantitative Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit verwendet. Der BCA-Assay beruht hauptsächlich auf zwei Reaktionen: Zunächst reduzieren die Peptidbindungen im Protein Cu^{2+} -Ionen aus dem Kupfer(II)-Sulfat zu Cu^{1+} . Die Menge des reduzierten Cu^{2+} ist proportional zur Menge des in der Probe vorhandenen Proteins. Anschließend verbinden sich zwei Moleküle Bicinchoninsäure mit je einem Cu^{1+} -Ion und bilden einen violettfarbenen Komplex, der Licht absorbiert (Smith et al., 1985). Vor jeder Bestimmung wurde die BCA-Lösung frisch hergestellt. Dazu wurden 50 Teile Lösung A und ein Teil Lösung B gemischt und dunkel gelagert. Von den Lysaten der Bakterien wurden jeweils 25 μl in eine 96-Well-Platte pipettiert. Aus dem im Kit enthaltenem Albuminstandard (BSA) wurde eine Standardreihe von 0 – 800 $\mu\text{g/ml}$ hergestellt und ebenfalls 25 μl auf die 96-Well-Platte gegeben. Anschließend wurden 200 μl von der BCA-Lösung hinzugegeben und die Proben bei 37 °C für 30 min im Dunklen inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Absorption bei 540 nm mittels Plattenspektrometer.

2.2.10.5 Trennung der Proteine nach Molekülmasse mit SDS-PAGE

Die SDS-PAGE und Western Blot-Versuche wurden aufgrund der Bakterien-spezifischen Antikörper nur mit *E. coli* durchgeführt. Für die Auftrennung der Proteine wurden zunächst die Lösungen für das Sammel- und Trenngel auf Eis hergestellt und dann als Gel gegossen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde berechnet und mit H_2O verdünnt. Nach der Zugabe von 6x Laemmli-Puffer, wurden die Proben zunächst bei 95 °C für 5 min inkubiert und anschließend erfolgte die Lagerung auf Eis für 10 min gekühlt. Nach dem Beladen des Gels mit den entsprechenden Proben und einem Proteinstandard wurden die Proteine für 15 min bei 70 V gesammelt und danach für 60 min bei 110 V aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde die Detektion einzelner Proteine mittels Western Blot detektiert.

2.2.10.6 Western Blot

Nach Auftrennen der Proteine mittels SDS-PAGE wurde das Gel in Transferpuffer gelagert. Die Blotting-Apparatur wurde wie in Abbildung 6 dargestellt montiert. Schwämme, Filterpapiere und die Membran wurden vor dem Zusammenbau ebenfalls für mindestens 15 min in Transferpuffer gelagert. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 0,35 A.

Anschließend wurde die Membran aus der Blotting-Apparatur entfernt und für 5 min bei RT in Ponceau-Lösung geschwenkt. Nach Waschen in H₂O wurde die Membran mit einem Scanner dokumentiert. Durch 5-minütiges Waschen in TBS wurde die Farbe der Ponceau-Lösung entfernt und die Membran wurde zum Blocken für 1 h in 20 ml Milchpulver-Lösung (5%) geschwenkt. Anschließend wurde der primäre Antikörper in Milchpulver-Lösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf die Membran gegeben. Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper entfernt und die Membran zweimal für je 10 min in TBS-T (TBS + Tween) gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde in Milchpulver-Lösung gelöst, auf die Membran gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach Abkippen des sekundären Antikörpers wurde die Membran zweimal für 10 min in TBS-T und einmal für 10 min in PBS gewaschen. Die Entwicklung der Membran erfolgte mit der Lösung BIORAD ECL, welche davor 1:1 verdünnt wurde, für 90 s auf einem Schüttler. Anschließend wurde die Membran gescannt. Für weitere Nachweise wurden gebundene Antikörper von der Membran durch Schwenken in ReBlot-Lösung (1 ml ReBlot + 9 ml H₂O) für 15 min entfernt. Nach dem Waschen mit PBS (dreimal für je 10 min) wurde die Membran erneut für 1 h in Milchpulver-Lösung geschwenkt und mit dem nächsten primären Antikörper inkubiert. Eine Membran wurde maximal zweimal gestrippt. Die Versuche wurden zweimal durchgeführt.

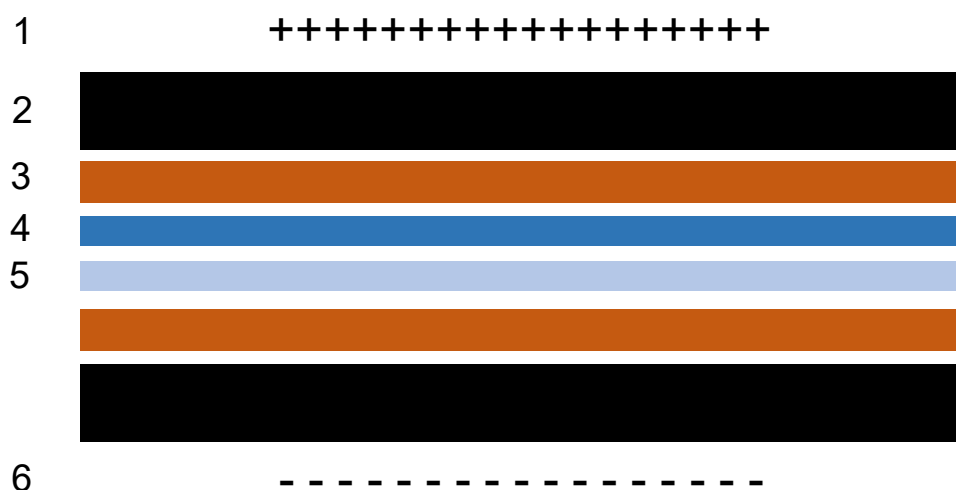


Abbildung 6: Aufbau des Transfers

1: Anode; 2: Schwamm; 3: Filterpapier; 4: Membran; 5: Gel; 6: Kathode

2.2.11 Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung

2.2.11.1 Behandlung der Proben

Um Änderungen in der Genexpression nach Behandlung der Bakterien mit SAPYR oder CHX feststellen zu können, wurde für beide Substanzen eine Konzentration gewählt, welche eine Reduktion um maximal 1 log₁₀-Stufe und eine veränderte Expression des Proteins RecA bewirkte. Für SAPYR wurde demnach eine Konzentration von 0,5 µM und für CHX eine Konzentration von 0,0125% gewählt. Übernachtskulturen von *S. mutans* und *E. coli* wurden nach zweimaligem Waschen in PBS auf eine OD von 2,0 eingestellt. Ein Milliliter der Suspension wurde in jeweils ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß gegeben und bei 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert und die Proben in eine 48-Well-Platte pipettiert. Nach Hinzufügen von H₂O (Negativkontrolle) oder SAPYR (0,5 µM) erfolgte die Inkubation der Proben für 5 min im Dunkeln und die anschließende Bestrahlung für weitere 10 min. Eine Kontrollgruppe wurde während der Bestrahlung im Dunkeln inkubiert. Proben mit CHX (0,0125%) wurden ebenfalls für 5 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Proben für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Bakterienpellet in 500 µl vorgewärmtem Kulturmedium gelöst. Die Proben wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert, um Änderungen der Genexpression zu gewährleisten. Anschließend wurde 1 ml RNaprotect Bacteria Reagent hinzugeben, um die RNA zu stabilisieren. Die Proben wurden für 5 min bei RT inkubiert und dann für weitere 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das erhaltene Pellet bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert. Der Versuch wurde fünfmal durchgeführt.

2.2.11.2 RNA-Isolierung und -Sequenzierung

Die Isolierung und Sequenzierung der RNA wurden durch NCCT (NGS Competence Center Tübingen), dem Sequenzierpartner des Zentrums für Quantitative Biologie (QBiC), Tübingen durchgeführt. Dort wurde die RNA der Proben mit dem RNeasy® Mini-Kit (*E. coli*) und mit dem Quick-RNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (*S. mutans*) isoliert. Danach wurde die DNA mit dem DNase I recombinant Kit entfernt und die mit dem RNA Clean & Concentrator-5 Kit aufgereinigt und konzentriert. Die Bibliotheken wurden mit dem Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit präpariert.

Die Sequenzierung der Proben wurde auf dem NextSeq 500/600 von Illumina mit einem HighOutput Kit v2.5 (75 Zyklen) mit 1% PhiX Spike-in durchgeführt.

2.2.11.3 Auswertung der RNA-Sequenzierung

Das Datenmanagement und die bioinformatische Analyse wurden im QBiC mit Dr. Stefan Czernel durchgeführt. Für die bioinformatische Analyse der RNA-Sequenzierung wurde die Nextflow-basierte nf-core-Pipeline rnaseq verwendet (Version 1.4.2; <https://github.com/nf-core/rnaseq>). Um die Qualität der RNA-Sequenzierungs-Dateien zu untersuchen, wurde FASTQC verwendet (Andrews, 2010) (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Anschließend erfolgte ein Adapter-„Trimming“ mit Trim Galore (Version 0.6.4; https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/). Zur Analyse von *S. mutans*-Proben wurde STAR (Version 2.6.1) (Dobin et al., 2012) verwendet. Dabei wurden die Reads, die die Qualitätskontrolle bestanden haben, gegen die neueste Assemblierung (RefSeq Assembly Accession GCF_000347875.1) des Stammes ATCC 25175, die vom NCBI heruntergeladen wurde, abgeglichen. Bei der Analyse von *E. coli*-Proben wurde ebenfalls STAR als Aligner verwendet. Die Reads, die die Qualitätskontrolle bestanden haben, wurden gegen das Referenzgenom für den *E. coli*-Stamm K-12, DH10B (Build EB1), welches für den Workflow nf-core/rnaseq automatisch über iGenomes verfügbar war, abgeglichen. Die Annotationsdateien für beide Genome im gtf-Dateiformat wurden von denselben Ressourcen heruntergeladen wie die Referenz-Fasta-Dateien. Die Qualitätskontrolle der RNA-Sequenzierungs-Daten wurde mit RSeQC (Version 3.0.1) (Wang et al., 2012) und die der Read Counts (Anzahl der Transkripte) der einzelnen Gene mit featureCounts (Version 1.6.4) durchgeführt (Liao et al., 2014). Die Qualitätskontrolle für die RNASeq-Analyse wurde mit MultiQC (Version 1.7; <http://multiqc.info/>) durchgeführt (Ewels et al., 2016).

Die Analyse der differentiellen Genexpression wurde mit dem Programm R (Version 3.5.1) und dem Paket DESeq2 (Version 1.22) durchgeführt. Gene wurden als differentiell exprimiert eingestuft, wenn der adjustierte p-Wert kleiner als 0,05 war ($p_{adj} < 0,05$). Gene wurden außerdem als differentiell exprimiert eingestuft, wenn der \log_2 Fold Change (FC) in der Expression zwischen den beiden betrachteten Gruppen ≥ 1 oder ≤ -1 war. Der adjustierte p-Wert wurde mit dem DESeq2-Paket mittels Benjamini-Hochberg-Methode berechnet (Benjamini und Hochberg, 1995).

Darstellungen der Hauptkomponentenanalyse wurden in RStudio mit R (Version 3.5.1; 2018-07-02) mit dem R-Paket ggplot2 (Version 3.3.0) erstellt. Heatmaps zur Darstellung der Unterschiede der Transkriptomanalyse zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit dem R-Paket edgeR (Version 3.26.5) erstellt. Die finalen Ergebnisse wurden mit dem R-Paket rmarkdown (Version 2.1), mit den R-Paketen knitr (Version 1.28) und DT (Version 0.13) erzielt. Die Software Pathway Tools und die Datenbank Biocyc wurden für Pathway-Analysen verwendet (Keseler et al., 2017; Karp et al., 2019). Für die Bestimmung der Pathways wurden alle differentiell exprimierten Gene einbezogen und erfolgte mittels exaktem Fisher-Test und der Benjamini-Hochberg-Methode ($p_{\text{adj}} \leq 0,05$). Eine Übersicht der Auswertung der RNA-Sequenzierung ist in Abbildung 7 dargestellt.

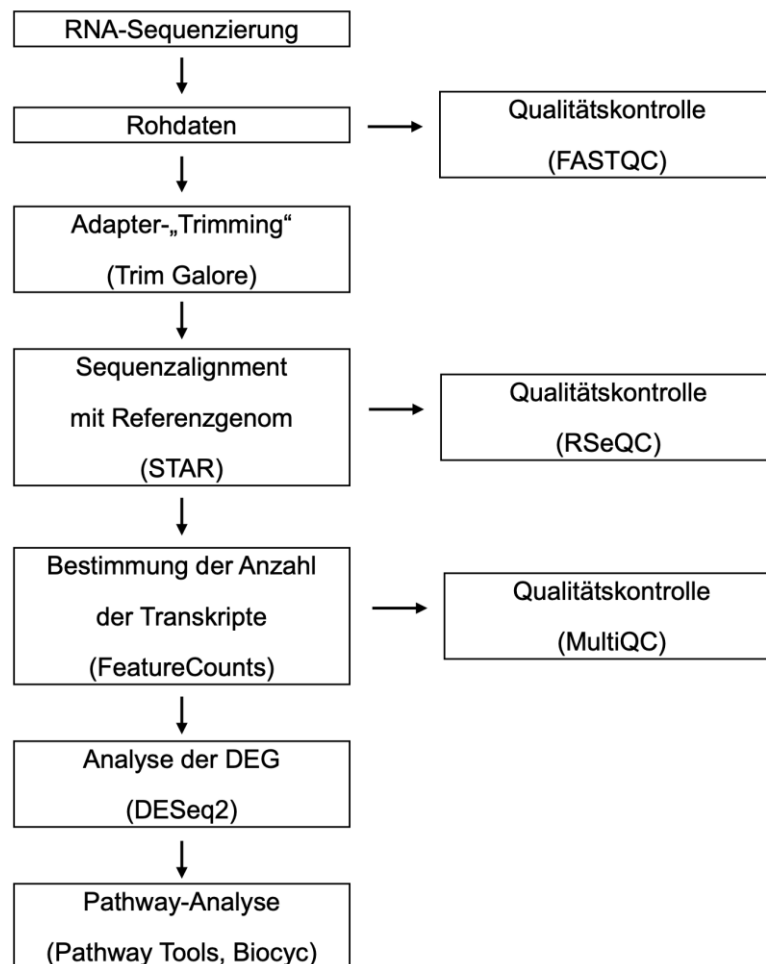


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ablaufs der bioinformatischen Auswertung der RNA-Sequenzierung

Dargestellt sind die einzelnen Arbeitsschritte der bioinformatischen Analyse mit der jeweils verwendeten Software. DEG: Differentiell exprimierte Gene.

2.2.11.4 Umschreibung der RNA in cDNA

Für die Durchführung der qRT-PCR, wurde die am QBIC isolierte RNA mit dem Quantitect Reverse Transcriptase Kit nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Dabei wurden für *E. coli* 1000 ng RNA, für *S. mutans* 200 ng pro Ansatz eingesetzt. Zunächst erfolgte ein Verdau von noch vorhandener genomischer DNA. Anschließend wurde mittels Random Primer die cDNA synthetisiert. Diese wurde für die Versuche verdünnt (0,2 ng) und bei -80 °C gelagert.

2.2.11.5 Validierung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung mit qRT-PCR

Zur Validierung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung wurden dort signifikant regulierte Zielgene ausgewählt, welche bei *E. coli* und *S. mutans* nach Behandlung mit CHX eine Expressionsrate von $\geq 3,0$ oder $\leq -3,0$ aufwiesen. Das Primerdesign erfolgte mit Hilfe der Software Primer3 (Whitehead Institute for Biomedical Research Cambridge, MA, USA) und Beacon Designer (PREMIER Biosoft International, San Francisco, CA, USA). Zusätzlich wurde die Expression des Gens *recA* in *E. coli* untersucht, da dieses durch die RNA-Sequenzierung nicht detektiert wurde. Die q-RT-PCR wurde mit 20 pmol jedes Primers (Tabelle 7), 5 µl cDNA (0,2 ng) in einer 1:5-Verdünnung sowie dem SYBR® Select Master Mix in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Nach einer Anfangsdenaturierung der Proben bei 95 °C für 10 min folgten 40 Zyklen mit jeweils 95 °C für 15 s und Annealing und Elongation bei 60 °C für 1 min in einem QuantStudio 3 Real-time PCR Gerät (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

Zur Berechnung der Genexpression wurden die Ergebnisse der Zielgene gemäß der vergleichenden CT (*cycle threshold*)-Methode ($2^{-\Delta\Delta CT}$) auf die „Housekeeping“-Gene normalisiert und in Bezug zur unbehandelten Kontrolle gesetzt (Schmittgen und Livak, 2008). Die relative Genexpression wurde auf Grundlage von fünf unabhängigen Versuchen in Triplikaten berechnet.

Zur Kontrolle der PCR-Reaktion und Abschätzung der Amplifikatgrößen wurden je 8 µl amplifizierter Reaktionsansatz in 2 µl Cyan/Orange Ladepuffer auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Als Größenstandard wurde die TrackIt™ 50 bp DNA-Leiter und als Laufpuffer 1x TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 V für 90 min. Durch das im Agarosegel enthaltene GelRed™ Nucleic Acid Stain (10000x) wurden die Amplifikationsprodukte mit Hilfe des Biovision3000 visualisiert und dokumentiert.

2.2.12 Zellkulturexperimente

2.2.12.1 Lagerung und Kultivierung

Zunächst wurden für die Versuche Arbeitskopien der PDL-Zellen hergestellt. Dafür wurden die Zellen ($1,6 \times 10^6$) in eine Zellkulturflasche (75 cm^2) überführt und für 8 d bei 37°C und 5% CO_2 in DMEM High Glucose Medium und 10% FBS plus 1% L-Glutamin, 1% Antibiotisch-antimykotische Lösung und 1% Ascorbinsäure kultiviert. Nach der Kultivierung wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 6 ml PBS gewaschen und danach in 3 ml Trypsin-EDTA für 1 min bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Klopfen von der Kulturflasche abgelöst, mit einer Pipette in 10 ml Medium im Falconröhrchen überführt und für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 5 ml Medium resuspendiert. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen ($0,8 \times 10^6$ pro Kryoröhrchen) aliquotiert, DMSO (Endkonzentration: 10%) zugegeben und über flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Versuche wurde jeweils ein Aliquot der Zellen aufgetaut und in 10 ml Medium bei 800 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 10 ml Medium gelöst und in einer Zellkulturflasche für 8 d bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

2.2.12.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt (1:4) und mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Blaue Zellen galten dabei als tot und wurden nicht mitgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnung wurde die Zellzahl bestimmt und damit das für die Experimente einzusetzende Volumen der Zellsuspension berechnet.

2.2.12.3 Zellaussaat

Für die Zellaussaat wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, nach der Kultivierung mit 6 ml PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Nach der Zugabe von 10 ml Medium, wurden die Zellen in ein Falcon-Gefäß übertragen und bei 800 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml frischem Medium gelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension mit Medium verdünnt und jeweils 200 μl mit jeweils 5000 Zellen pro Well auf 96-Well-Platten verteilt. Die separaten Zellkulturen wurden für 48 h bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

2.2.12.4 Behandlung der PDL-Zellen mit SAPYR und CHX

Die PDL-Zellen wurden mit SAPYR oder mit CHX behandelt. Für beide Substanzen wurden zu Beginn Stammlösungen hergestellt (SAPYR: 1 mM, CHX: 1%, beide in H₂O gelöst) und im Kühlschrank gelagert. Vor jedem Versuch wurden Verdünnungsreihen aus Stammlösungen hergestellt. Für SAPYR wurden die Konzentrationen 6,25, 12,5, 25, 50 und 100 µM verwendet, und CHX wurde als 0,00625%, 0,0125%, 0,025%, 0,05% und 0,1% eingesetzt. Um die Auswirkung des Lösungsmittels auf die Effektivität der aPDT mit SAPYR und CHX zu untersuchen, wurden Verdünnungen beider Substanzen entweder in PBS oder in Zellkulturmedium hergestellt. Dabei enthielt jede Verdünnung das gleiche Endvolumen H₂O. Als Kontrollen dienten entweder PBS (+H₂O) oder Medium (+H₂O). Für die Behandlung mit SAPYR wurde das Medium über den Zellkulturen entfernt und mit jeweils 50 µl der einzelnen Verdünnungen ersetzt. Nach Inkubationszeiten von 5 oder 10 min wurden die Zellkulturen für weitere 10 min bestrahlt. Als Kontrolle der Wirkung der Bestrahlung wurden Zellkulturen separat auf einer zweiten Kulturplatte unter ansonsten identischen Bedingungen für 10 min im Dunkeln inkubiert.

Für die Behandlung mit CHX wurden Zellkulturen ebenfalls je 50 µl der einzelnen Verdünnungen hinzugegeben und für 5 oder 10 min exponiert. Nach der Behandlung erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität mit einem XTT-Assay und die der Zellmasse mit einem KVT-Assay.

2.2.12.5 Bestimmung der Zellviabilität mit dem XTT-Assay

Für die Bestimmung der Zellviabilität wurde das XTT Proliferation Kit verwendet. XTT ist ein Tetrazoliumsalz, welches durch Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen zu einem farbigen Formazan reduziert wird (Paull et al., 1988).

Die Behandlung der Zellkulturen mit SAPYR oder CHX wurden mit dem Entfernen der Expositionslösungen beendet und die Platten wurden auf Papiertüchern kurz ausgeklopft. Danach wurden die Zellkulturen in jeweils 100 µl frischem Medium mit 50 µl XTT-Lösung inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ mittels Plattenspektrometers bei 495 nm. Die optischen Dichten in den mit SAPYR oder CHX behandelten Kulturen wurden auf diejenigen unbehandelter Kontrollkulturen normiert (100%). Der auf diese Weise mit dem XTT-Assay ermittelte Ausdruck der Zellviabilität wurde schließlich auf die in den entsprechenden Kulturen mit dem KVT-Assay bestimmte Zellmasse bezogen.

Für CHX wurden 4 unabhängige Versuche in Duplikaten durchgeführt. Für SAPYR wurden 3 unabhängige Versuche in Duplikaten durchgeführt.

2.2.12.6 Bestimmung der Zellmasse mit dem KVT- Assay

Die Messung der verbleibenden Zellmasse nach aPDT und Behandlung mit CHX erfolgte mit dem KVT-Assay. Der Farbstoff Kristallviolett färbt Proteine und zeigt damit die relative Proteinmenge oder Zellmasse einer Zellkultur (Flick und Gifford, 1984). Nach der Behandlung der Zellkulturen mit SAPYR oder CHX wurden die Überstände entfernt und die Platten auf Papiertüchern ausgeklopft. Die Zellen wurden dann mit 100 µl Glutaraldehyd (2,5%) für 30 min bei RT fixiert. Anschließend wurde das Glutaraldehyd entfernt, die Zellen mit 200 µl PBS/Well gewaschen und schließlich mit 150 µl Kristallviolett-Lösung für 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Kristallviolett-Lösung entfernt, die Wells unter fließendem Leitungswasser vorsichtig ausgewaschen und Reste der Feuchtigkeit in den Wells wurden auf einem Papiertuch abgetropft und getrocknet. Nach der Zugabe von 180 µl Ethanol pro Well wurden die Platten für 2 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert.

Dieses Vorgehen löste das an die fixierte Zellmasse gebundene Kristallviolett und die optischen Dichten der so erzeugten Farblösungen wurden mittels Plattenspektrometer bei 600 nm bestimmt. Die optische Dichte in den mit SAPYR oder CHX behandelten Kulturen wurden auf diejenigen unbehandelter Kontrollkulturen normiert (100%). Für CHX wurden 4 unabhängige Versuche in Duplikaten durchgeführt. Für SAPYR wurden 3 unabhängige Versuche in Duplikaten durchgeführt.

2.2.13 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche wurden mit Hilfe der IBM Software SPSS V26 ausgewertet. Wenn nicht anders beschrieben, wurden individuelle Messwerte zu Medianen und 25%- und 75%-Perzentilen zusammengefasst und dargestellt. Die Daten wurden nichtparametrisch behandelt und Unterschiede zwischen Medianen wurden paarweise mit dem Mann-Whitney *U*-Test auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ getestet.

3 Ergebnisse

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits 2020 in dem Journal „*Frontiers in Microbiology*“ publiziert (Muehler et al., 2020). Die Versuche zur Replikationsfähigkeit wurden zusammen mit dem zahnmedizinischen Doktoranden Herrn Sercan Keceli durchgeführt. Die Versuche zur Stoffwechselaktivität und der Bildung intrazellulärer ROS erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. dent. Christina Rupp und wurden bereits in der Dissertation mit dem Titel „Änderung der Stoffwechselaktivität und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Einsatz der antimikrobiellen photodynamischen Therapie gegenüber bakteriellen Biofilmen *in vitro*“ beschrieben (Rupp, 2021).

3.1 Replikationsfähigkeit

Die bakterielle Replikationsfähigkeit wurde für Biofilme der drei Bakterienspezies nach aPDT oder nach Behandlung mit CHX für verschiedene Inkubationsdauern (5 min, 10 min, 20 min und 30 min) mittels KBE-Assay untersucht. Die absoluten KBE-Werte unbehandelter Biofilme (UK L-) von *A. naeslundii*, *S. mutans* und *E. coli* lagen bei $4,9 \times 10^7$ bis $3,6 \times 10^8$ (*A. naeslundii*), $5,4 \times 10^8$ bis $1,2 \times 10^9$ (*S. mutans*) und $9,5 \times 10^6$ bis $1,7 \times 10^7$ (*E. coli*). Tabelle 12 zeigt die \log_{10} -Reduktionsstufen behandelter Kulturen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen für SAPYR, SA-PN-05 und CHX nach Bestrahlung und im Dunkeln. Die aPDT mit SAPYR bewirkte konzentrationsabhängige antimikrobielle Effekte in *A. naeslundii* und *S. mutans*. Die KBE von *A. naeslundii* und *S. mutans* wurden um 1,0 bis mehr als 6,0 \log_{10} -Stufen und 5,3 bis mehr als 6,0 \log_{10} -Stufen reduziert. Die KBE von *E. coli* wurden nach der Behandlung mit SAPYR um 2,1 bis 2,9 \log_{10} -Stufen reduziert. In allen Fällen war die Behandlung mit dem jeweiligen PS ohne Bestrahlung oder mit Licht allein nicht wirksam.

Die aPDT mit SA-PN-05 reduzierte die KBE bis 2,4 \log_{10} -Stufen in Kulturen von *A. naeslundii*, von 0,8 bis mehr als 6,0 \log_{10} -Stufen in *S. mutans* und von 0,6 bis 3,5 \log_{10} -Stufen in *E. coli*. Die Behandlung mit SA-PN-05 im Dunkeln verringerte die Zahl der KBE von 1,5 bis mehr als 6,0 \log_{10} -Stufen in *A. naeslundii*, von 1,9 bis mehr als 6,0 \log_{10} -Stufen in *S. mutans* und von 0,1 bis mehr als 6,0 \log_{10} -Stufen in *E. coli*. Nach der Behandlung mit CHX wurden die KBE der drei Bakterienspezies um mehr als 6,0 \log_{10} -Stufen unter die Nachweisgrenze reduziert (Tabelle 12).

Abbildung 8 zeigt beispielhaft die Reduktion der Zahl der KBE nach Behandlung mit SAPYR und SA-PN-05 (A-C) für ausgewählte Inkubationszeiten (20 min für *A. naeslundii* und 5 min für *S. mutans* und *E. coli*). Relative KBE-Daten (KBE (%)) mit unbehandelten Kontrollen (Gruppe UK L-), die auf 100% gesetzt wurden, sind für jede Bakterienspezies separat dargestellt. Alle weiteren Experimente wurden mit den ausgewählten Inkubationszeiten durchgeführt, da unter diesen Bedingungen eine Reduktion der Zahl der KBE um 3 \log_{10} -Stufen und somit eine antimikrobielle Wirkung erreicht wurde (Pearson et al., 1980). Im weiteren Verlauf wurde die Membranintegrität für alle drei Bakterienspezies nach aPDT mit SAPYR oder SA-PN-05 und nach Behandlung mit CHX untersucht.

Tabelle 12: Log₁₀-Stufen Reduktion nach aPDT mit SAPYR oder SA-PN-05 und nach Behandlung mit CHX gegenüber Biofilmen von *A. naeslundii*, *S. mutans* und *E. coli*
Dargestellt sind photodynamische Inaktivierungsraten von SAPYR, SA-PN-05 und CHX gegen *A. naeslundii*, *S. mutans* und *E. coli* für alle angewandten Inkubationszeiten im Vergleich zu unbehandelten, nicht bestrahlten Kontrollen (UK L-). L-: nicht bestrahlte Gruppen; L+: bestrahlte Gruppen; -: keine Reduzierung der Zahl der KBE. Der Grenzwert für die Bewertung der Replikationsfähigkeit war eine Inaktivierungsrate von $\geq 6,0 \log_{10}$ -Stufen.

	Inkubationszeit (min)	UK	SAPYR 50 µM		SAPYR 100 µM		SAPYR 500 µM		SA-PN-05 50 µM		SA-PN-05 100 µM		SA-PN-05 500 µM		CHX 0,2%
		L+	L+	L-	L+	L-	L+	L-	L+	L-	L+	L-	L+	L-	L-
		L+	L+	L-	L+	L-	L+	L-	L+	L-	L+	L-	L+	L-	L-
<i>S. mutans</i>	5	-	$\geq 6,0$	0,1	5,3	-	$\geq 6,0$	0,71	0,8	1,8	0,9	4,8	4,8	$\geq 6,0$	$\geq 6,0$
	10	0,3	$\geq 6,0$	1,5	$\geq 6,0$	1,4	$\geq 6,0$	2,0	1,8	2,2	1,5	4,1	4,6	$\geq 6,0$	$\geq 6,0$
	20	0,3	$\geq 6,0$	0,4	$\geq 6,0$	0,3	$\geq 6,0$	2,3	1,4	1,8	1,9	3,8	3,8	$\geq 6,0$	$\geq 6,0$
	30	-	5,7	-	5,5	0,2	$\geq 6,0$	0,9	1,8	1,5	1,9	3,8	$\geq 6,0$	$\geq 6,0$	$\geq 6,0$
<i>A. naeslundii</i>	5	0,2	2,5	0,1	3	0,2	5,4	0,4	1,6	4,8	0,8	$\geq 6,0$	2,4	$\geq 6,0$	4,7
	10	-	1,0	-	1,4	-	2,3	-	1,0	2,4	1,4	$\geq 6,0$	2,2	$\geq 6,0$	$\geq 6,0$
	20	0,2	1,3	-	2,0	-	4,3	-	1,2	1,9	0,9	$\geq 6,0$	1,7	$\geq 6,0$	$\geq 6,0$
	30	0,1	4,4	0,1	4,7	-	$\geq 6,0$	0,3	0,2	4,4	-	$\geq 6,0$	1,6	$\geq 6,0$	$\geq 6,0$
<i>E. coli</i>	5	0,7	2,6	0,1	2,4	0,2	2,9	0,4	0,9	0,1	0,6	0,6	1,5	3,7	$\geq 6,0$
	10	0,7	2,2	0,1	2,5	0,1	2,5	0,4	1,5	0,3	2,0	0,7	1,8	3,8	$\geq 6,0$
	20	0,2	2,1	-	2,3	-	2,6	-	1,4	0,6	1,4	1,2	3,5	$\geq 6,0$	$\geq 6,0$
	30	0,6	2,2	0,1	2,3	0,2	2,7	-	2,1	0,6	1,6	1,2	3,1	4,3	$\geq 6,0$

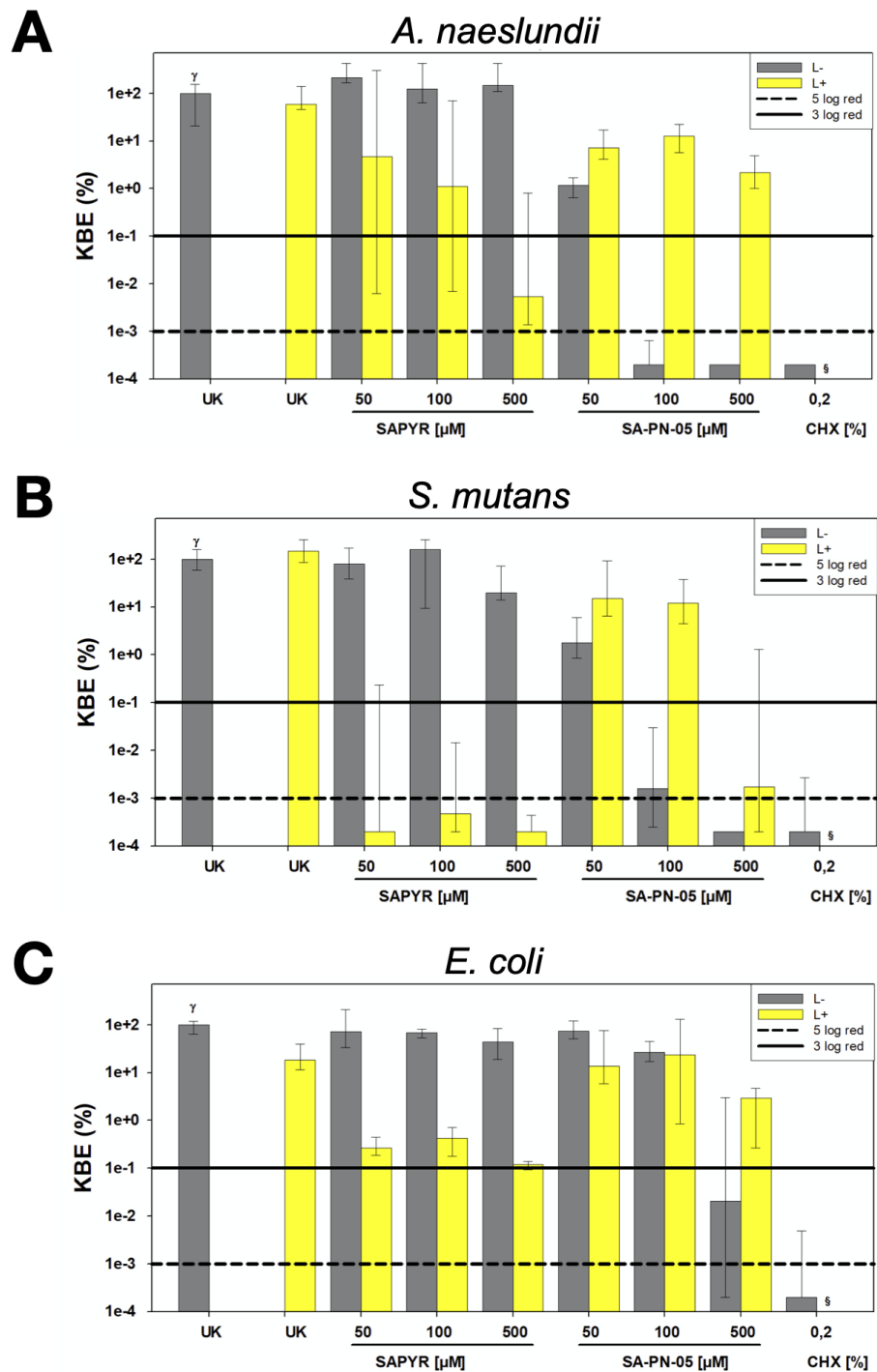


Abbildung 8: Antimikrobielle Effektivität von aPDT mit SAPYR oder SA-PN-05 und von CHX gegenüber Biofilmen von *A. naeslundii*, *S. mutans* und *E. coli*

Alle Ergebnisse sind als Mediane mit 25%- und 75%-Perzentil auf einer \log_{10} -skalierten Ordinate dargestellt.

L-: im Dunkeln inkubierte Gruppen; L+: bestrahlte Gruppen. Relative KBE-Daten (KBE (%)) mit unbehandelter Kontrollgruppe (UK L-), die für alle Bakterien auf 100% gesetzt wurde. Horizontale durchgezogene und gestrichelte Linien stellen KBE-Reduktionen von 3 \log_{10} oder 5 \log_{10} dar. **(A)** *A. naeslundii* nach Behandlung mit SAPYR oder SA-PN-05 für 20 min Inkubation und 10 min Bestrahlung oder mit CHX für 30 min Inkubation ($100\% \sim 2,3 \cdot 10^8$); **(B)** *S. mutans* nach Behandlung mit SAPYR oder SA-PN-05 für 5 min Inkubation und 10 min Bestrahlung oder mit CHX für 15 min Inkubation ($100\% \sim 7,9 \cdot 10^8$); **(C)** *E. coli* nach Behandlung mit SAPYR oder SA-PN-05 für 5 min Inkubation und 10 min Bestrahlung oder mit CHX für 15 min Inkubation ($100\% \sim 1,5 \cdot 10^7$); §: nicht gemessen. n=6.

3.2 Membranintegrität

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid (PI) und SYBR Green (SG) verwendet, um mögliche Schäden der Membran zu messen. SG wird als Farbstoff verwendet, der alle Bakterienzellen grün färbt, während PI membrangeschädigte oder tote Zellen mit einer beeinträchtigten Membran rot färbt. Beide Farbstoffe interkalieren dabei in die DNA (Joux und Lebaron, 2000; Feng et al., 2014). Abbildung 9 zeigt die ermittelte *Region of Interest* (ROI) in unbehandelten Kontrollen für alle drei Bakterienspezies auf FSC/SSC-Dotplots. Der FSC stellt die Größe der Bakterien dar, der SSC dagegen die Granularität. Außerdem sind zusammengefasste Prozentsätze von ungefärbten, SG-gefärbten, doppelt gefärbten sowie PI-gefärbten Bakterienzellen für alle mit SAPYR, SA-PN-05 oder CHX behandelten Gruppen dargestellt (Abbildung 9). SG-gefärbte Bakterien besitzen eine intakte Membran, wobei PI-gefärbte Bakterien eine Membranschädigung aufweisen. Bei doppelt gefärbten Populationen kann es sich beispielsweise um Bakterien in der Zellteilung handeln, bei denen eine der Bakterienzellen geschädigte Membran aufweist, die Membran der anderen Bakterienzelle jedoch intakt ist. Da SG und PI in die DNA der Bakterien interkalieren, kann das Vorkommen von ungefärbten Bakterien auf DNA-Schäden hindeuten.

Für *A. naeslundii* zeigten die unbehandelten Biofilme (UK L-) einen Anteil PI-positiver Zellen von 0,5%. Weder die Behandlung mit PS oder Licht allein noch die aPDT mit SAPYR in allen getesteten Konzentrationen führte zu einer signifikanten Erhöhung der Zahl PI-positiver Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Median der PI-positiven Zellen: 0,5 bis 1,6%). Im Gegensatz dazu stieg die Zahl der ungefärbten Zellen nach aPDT signifikant (6 bis 39%). Außerdem erhöhte sich die Zahl PI-positiver Zellen nach der Behandlung mit SA-PN-05 mit und ohne Licht auf 13,4% respektive 27,8% signifikant (Abbildung 9A). Für *S. mutans* lag der Median der PI-positiven Zellen in unbehandelten Kulturen (UK L-) bei 3,2%. Nach aPDT mit SAPYR nahm die Zahl PI-positiver Zellen signifikant zu (13,2%). Der Anteil ungefärbter Zellen stieg nach aPDT mit SAPYR von 8,2 bis 23%. Die Zahl PI-positiver Zellen nach aPDT mit SA-PN-05 stieg auf 31,4% und in den nicht belichteten Kontrollen noch mehr auf 86,4% (Abbildung 9B). Für unbehandelte Kontrollen (UK L-) von *E. coli* wurde ein Median an PI-positiven Zellen von 6,4% ermittelt. Nach Behandlung gegen SAPYR stieg der Anteil PI-positiver Zellen signifikant auf 36,2% an.

Die Exposition gegen SA-PN-05 und Licht erhöhte die Zahl PI-positiver Zellen signifikant auf 39,2%, während die Behandlung ohne Licht zu einem Anstieg auf 56,8% führte (Abbildung 9C). Nach der Inkubation mit CHX stieg der Anteil PI-positiver Zellen von 67,9 auf 95,2% für alle Bakterienspezies (Abbildung 9A-C). Nach der Untersuchung der Membranintegrität wurde im Folgenden mögliche Änderungen der Zellmorphologie nach aPDT und Behandlung mit CHX mittels REM und TEM visualisiert.

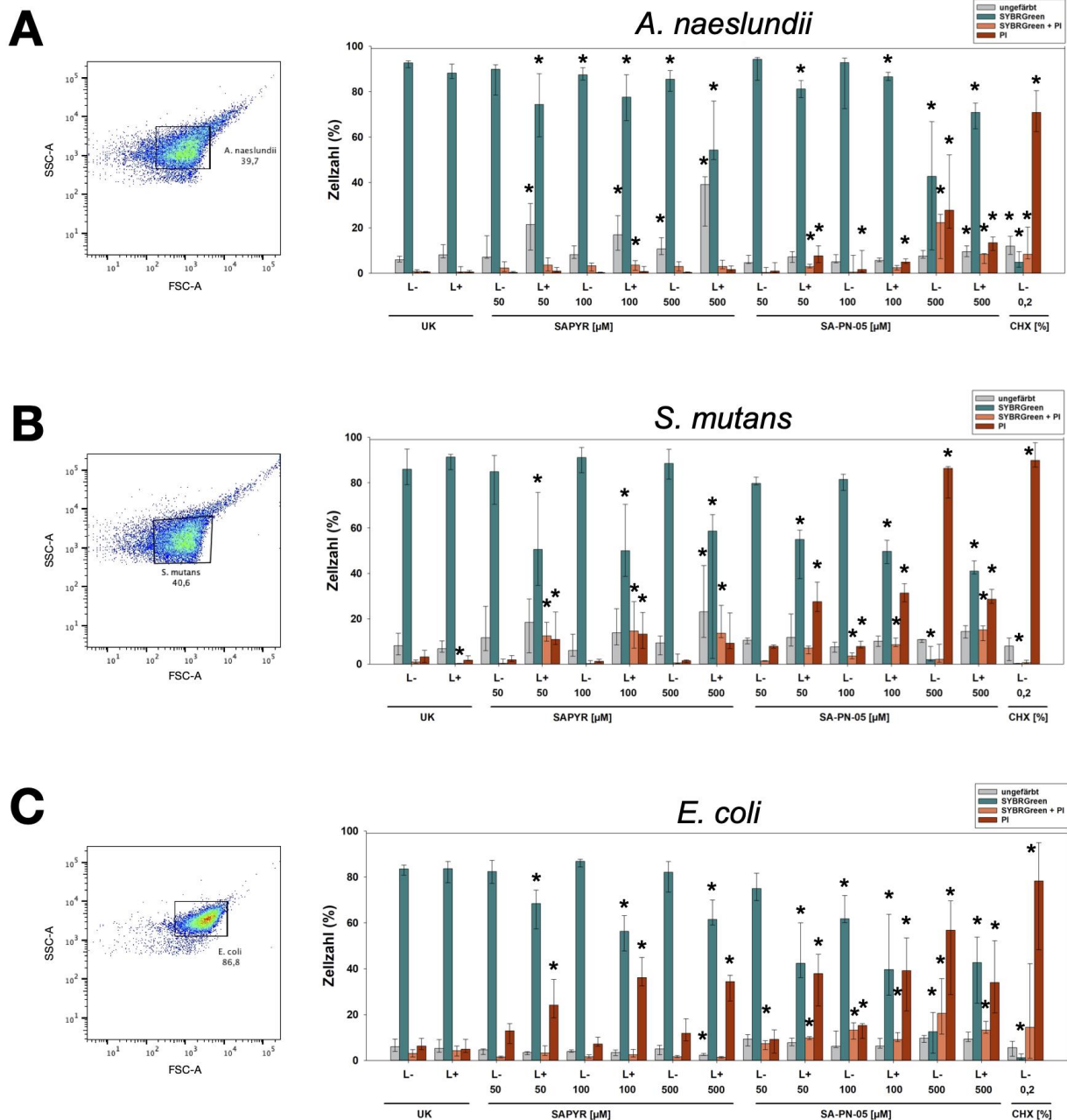


Abbildung 9: Durchflusszytometrische Messungen der Membranintegrität nach aPDT unter Verwendung von SAPYR oder SA-PN-05 und nach Behandlung mit CHX

Durchflusszytometrische Analyse zytoplasmatischer Membranschäden. Bakterienpopulationen im FSC/SSC-Dotplot mit P1, der die gewählte Region of interest (ROI) für **(A)** *A. naeslundii*, **(B)** *S. mutans* und **(C)** *E. coli* zeigt. **(A-C)** Zusammengefasste Median-Prozentsätze sowie 25%- und 75%-Perzentil von ungefärbten (grau), SG-gefärbten (türkis, intakte Membran), doppelt gefärbten (orange) sowie PI-gefärbten bakteriellen Zellen (rot, geschädigte Membran) sind für alle Versuchsgruppen dargestellt. **(A)** *A. naeslundii* nach Behandlung mit SAPYR oder SA-PN-05 für 20 min Inkubation und 10 min Bestrahlung oder mit CHX für 30 min Inkubation, **(B)** *S. mutans* nach Behandlung mit SAPYR oder SA-PN-05 für 5 min Inkubation und 10 min Bestrahlung oder mit CHX für 15 min Inkubation, **(C)** *E. coli* nach Behandlung mit SAPYR oder SA-PN-05 für 5 min Inkubation und 10 min Bestrahlung oder mit CHX für 15 min Inkubation. * zeigt statistischen Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen UK L- und behandelten Gruppen an. L-: unbelichtet, L+: belichtet. n=6.

3.3 Morphologische Veränderungen

Morphologische Veränderungen der Bakterien in Biofilmen wurden mittels REM und TEM visualisiert. Abbildung 10 zeigt exemplarische REM-Aufnahmen von zufällig ausgewählten Feldern unbehandelter Biofilme (Gruppe UK L-), mittels aPDT behandelter Biofilme mit SAPYR (L+; 100 µM) sowie den mit SA-PN-05 (L-, 100 µM) und CHX (L-, 0,2%) behandelten Positivkontrollen. Da es bei den Dunkelkontrollen von SA-PN-05 zu einer höheren Wirksamkeit im Vergleich zu der aPDT mit SA-PN-05 kommt, wurden ausschließlich Abbildungen von Bakterien behandelt mit SA-PN-05 L- dargestellt. Unbehandelte Zellen aller drei Bakterienarten zeigten eine intakte Morphologie mit einer regelmäßigen, glatten Zelloberfläche (Abbildungen 9A, 9B und 9C). Nach der Behandlung mit aPDT und SAPYR blieb die Morphologie der Zellen von *S. mutans* und *A. naeslundii* unverändert (Abbildungen 9E, 9F). Die Oberflächen von *E. coli*-Zellen erscheinen geriffelt, und es konnten offensichtlich lysierte Zellen beobachtet werden (Abbildung 9D). Nach der Behandlung mit SA-PN-05 oder CHX erschienen zahlreiche Blasen auf der Zelloberfläche von *A. naeslundii* (Abbildungen 9I, 9L). Behandelte *S. mutans*-Zellen zeigten häufig Vertiefungen in ihrer Oberfläche (Abbildungen 9H, 9K), während *E. coli*-Zellen Blasen und Zelltrümmer aufwiesen (Abbildungen 9G, 9J).

Abbildung 11 zeigt exemplarische TEM-Aufnahmen unbehandelter Biofilme (Gruppe UK L-) und mit aPDT behandelter Biofilme mit SAPYR (L+; 100 µM) oder SA-PN-05 (L-; 100 µM) oder CHX (L-; 0,2%). In allen Fällen zeigten die unbehandelten Bakterien intakte Zellwände und definierte Membranen (Abbildungen 10A, 10B, 10C). Bei *S. mutans* und *A. naeslundii*, die mit aPDT und SAPYR behandelt wurden, konnte keine Schädigung der Zellmembran festgestellt werden (Abbildungen 10E, 10F). Nach Inkubation mit SA-PN-05 oder CHX ohne Bestrahlung wiesen beide Spezies Zellwandschäden und ein Austreten von zytoplasmatischem Inhalt auf (Abbildungen 10H, 10I, 10K, 10L). In *E. coli*-Zellen, die mit aPDT und SAPYR behandelt wurden, löste sich mitunter die zytoplasmatische Membran von der Zellwand (Abbildung 10D). Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen kam es durch die Behandlung mit SA-PN-05 im Dunkeln zu Zellverformungen (Abbildung 10G). Nach der Exposition gegen CHX wurden in *E. coli* Membranvesikeln gebildet (Abbildung 10J).

Da weder Änderungen der Membranintegrität noch der Zellmorphologie nach aPDT mit SAPYR für *S. mutans* und *A. naeslundii* festgestellt werden konnten, wurden im nächsten Schritt die Stoffwechselaktivität sowie die Bildung von ROS untersucht. CHX wurde weiterhin als vergleichende Behandlung verwendet.

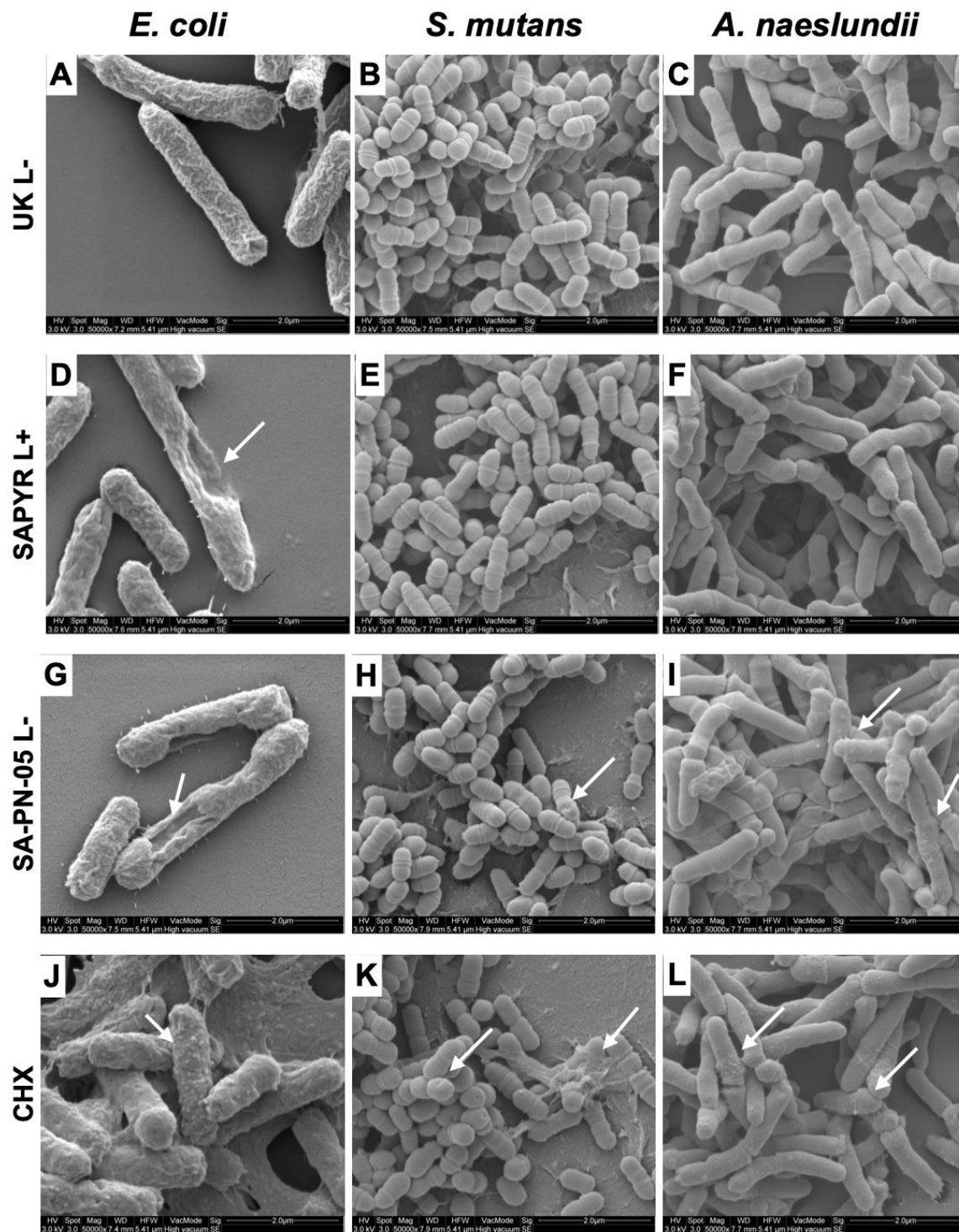


Abbildung 10: Visualisierung von Monospezies-Biofilmen mit Rasterelektronenmikroskopie

Visualisierung von Monospezies-Biofilmen (A, D, G, J) *E. coli*, (B, E, H, K) *S. mutans* und (C, F, I, L) *A. naeslundii* (48 h), entweder unbehandelt (UK L-) oder behandelt mit aPDT und SAPYR (L+; 100 µM) oder behandelt mit SA-PN-05 (L-; 100 µM) und mit CHX (L-; 0,2%), 20 min Inkubation bei *A. naeslundii*, 5 min Inkubation bei *S. mutans* und *E. coli*, 10 min Bestrahlung. L-: unbelichtet, L+: belichtet. Originalvergrößerung: 50.000-fach (Maßstab ~ 2 µm). Weiße Pfeile zeigen Veränderungen in der Membranstruktur.

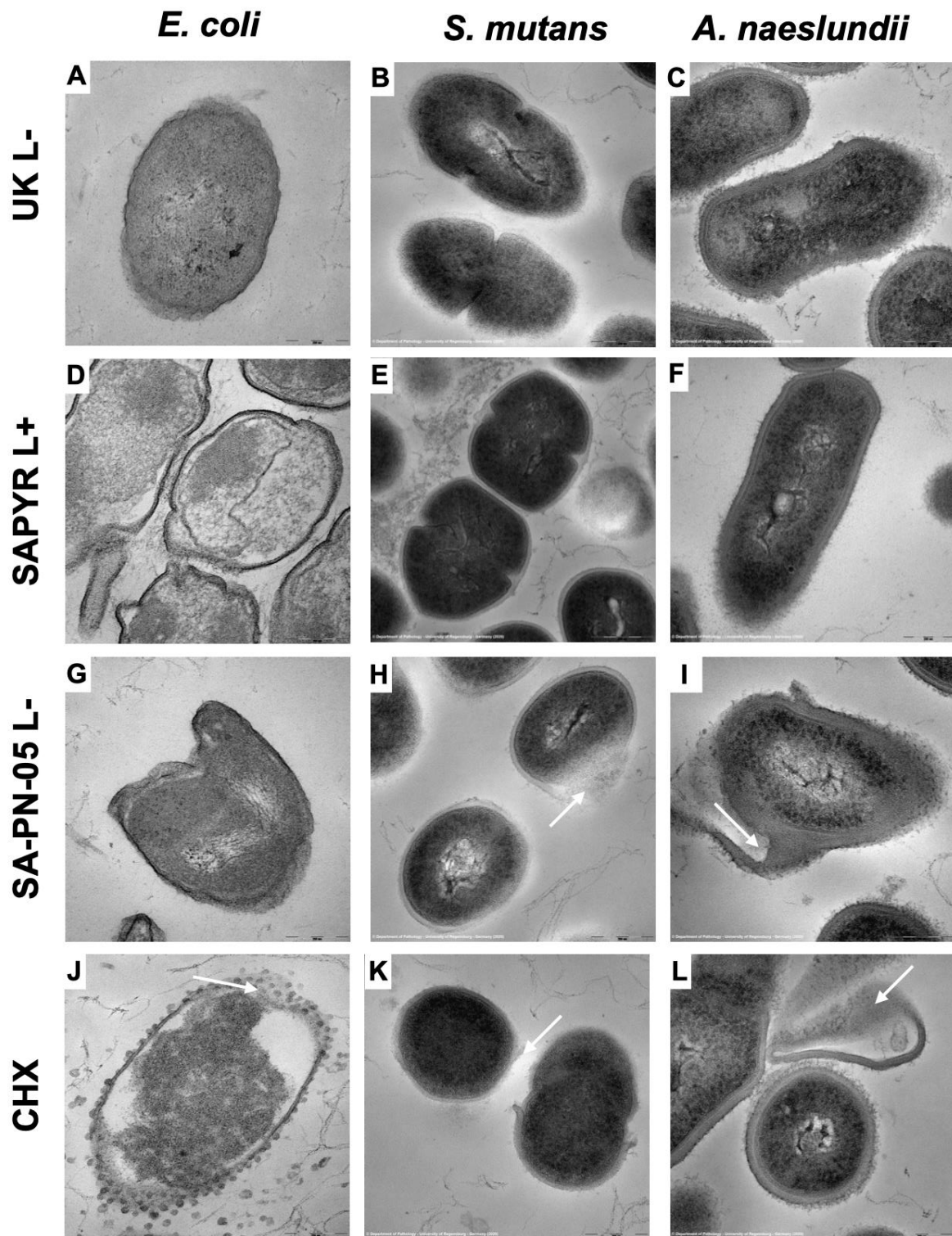


Abbildung 11: Visualisierung von Zellen in einem Biofilm einzelner Bakterienspezies mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Visualisierung von Monospezies-Biofilmen (A, D, G, J) *E. coli*, (B, E, H, K) *S. mutans* und (C, F, I, L) *A. naeslundii* (48 h), unbehandelt (UK L-) oder behandelt mit aPDT und SAPYR (L+; 100 μ M) oder behandelt mit SA-PN-05 (L-; 100 μ M) und CHX (L-; 0,2%), 20 bzw. 5 min Inkubation. L-: unbelichtet, L+: belichtet. Originalvergrößerung: 100.000-fach (Maßstabsbalken ~ 200 nm). Weiße Pfeile zeigen Veränderungen in der Membranstruktur.

3.4 Stoffwechselaktivität

Die ATP-Konzentration wurde durch Messung der Lumineszenz mit dem BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay Reagent und die Berechnung mit einem ATP-Standard (rATP) bestimmt. Die endgültigen Konzentrationen wurden normalisiert, indem sie durch die optische Dichte jeder Probe dividiert wurden, die nach der Behandlung gemessen wurde. Im Dunkeln behandelte Proben zeigten keine signifikanten Veränderungen der ATP-Konzentration. Lediglich in *S. mutans* sank nach der Behandlung mit 500 µM SAPYR die Konzentration von ATP um 33 nM/OD₆₀₀ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (UK L-) (Abbildung 12B). Darüber hinaus war nach Lichtexposition ohne SAPYR die ATP-Konzentration um 20, 121 und 67 nM/OD₆₀₀ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle für *S. mutans*, *E. coli* und *A. naeslundii* reduziert. Die Lichtexposition mit PS verringerte den ATP-Gehalt um 60, 121 bzw. 300 nM/OD₆₀₀ in *S. mutans*, *E. coli* und *A. naeslundii*. Die intrazelluläre ATP-Konzentration verringerte sich ebenfalls signifikant für alle Bakterien nach der Behandlung mit CHX (Abbildung 12).

3.5 Intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies

Wie durch Fluoreszenzmessungen von DCF nachgewiesen wurde, stieg die Menge intrazellulärer ROS in allen Bakterienspezies 30 min nach Behandlung mit aPDT (Abbildung 13). SAPYR bewirkte ohne Bestrahlung einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Fluoreszenzintensität mit Maximalwerten von 833 FU, 1541 FU und 833 FU nach Exposition gegen 500 µM im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen für *S. mutans*, *E. coli* und *A. naeslundii*. Die Behandlung mit SAPYR und Bestrahlung führte zu einem signifikanten konzentrationsabhängigen Anstieg der Fluoreszenzintensität bis auf 2551 FU, 8602 FU und 2664 FU für *S. mutans*, *E. coli* und *A. naeslundii*. In allen Fällen zeigte sich kein signifikanter Effekt der Behandlung nur mit Licht. Die Messungen nach Behandlung mit CHX zeigten keine Veränderungen für *S. mutans*, aber einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität um 2206 FU für *A. naeslundii* und um 938 FU für *E. coli*.

Aufgrund der signifikant erhöhten Bildung von intrazellulären ROS nach Behandlung mit aPDT und SAPYR wurde im Folgenden der Einfluss dieser ROS auf die Replikationsfähigkeit mit dem Einsatz von spezifischen Antioxidantien nach aPDT bei *S. mutans* und *E. coli* untersucht.

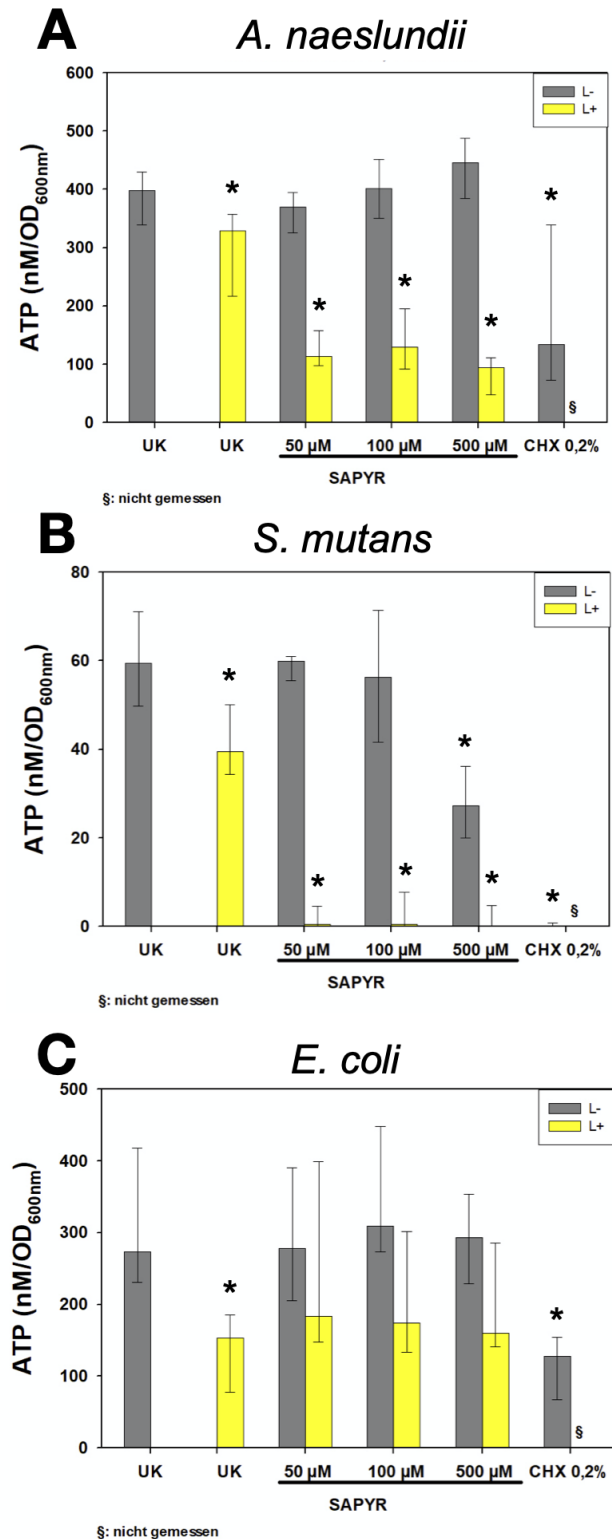


Abbildung 12: ATP-Konzentrationen nach aPDT mit SAPYR oder Behandlung mit CHX

Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Perzentil der mit SAPYR oder CHX behandelten Bakterien. Die ATP-Konzentration wurde auf die entsprechenden OD-Messungen der Proben nach der Behandlung normalisiert und als ATP (nM/OD₆₀₀) ausgedrückt. **(A)** *A. naeslundii* nach 20 min Inkubation. **(B)** *S. mutans* nach 5 min Inkubation. **(C)** *E. coli* nach 5 min Inkubation. Gelbe Balken (L+) stellen Gruppen dar, die mit SAPYR behandelt und 10 min lang bestrahlt wurden. Graue Balken (L-) stellen im Dunkeln inkubierte Kontrollen bzw. CHX dar. * zeigt den statistischen Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen UK L- und behandelten Gruppen. §: nicht gemessen. n=4.

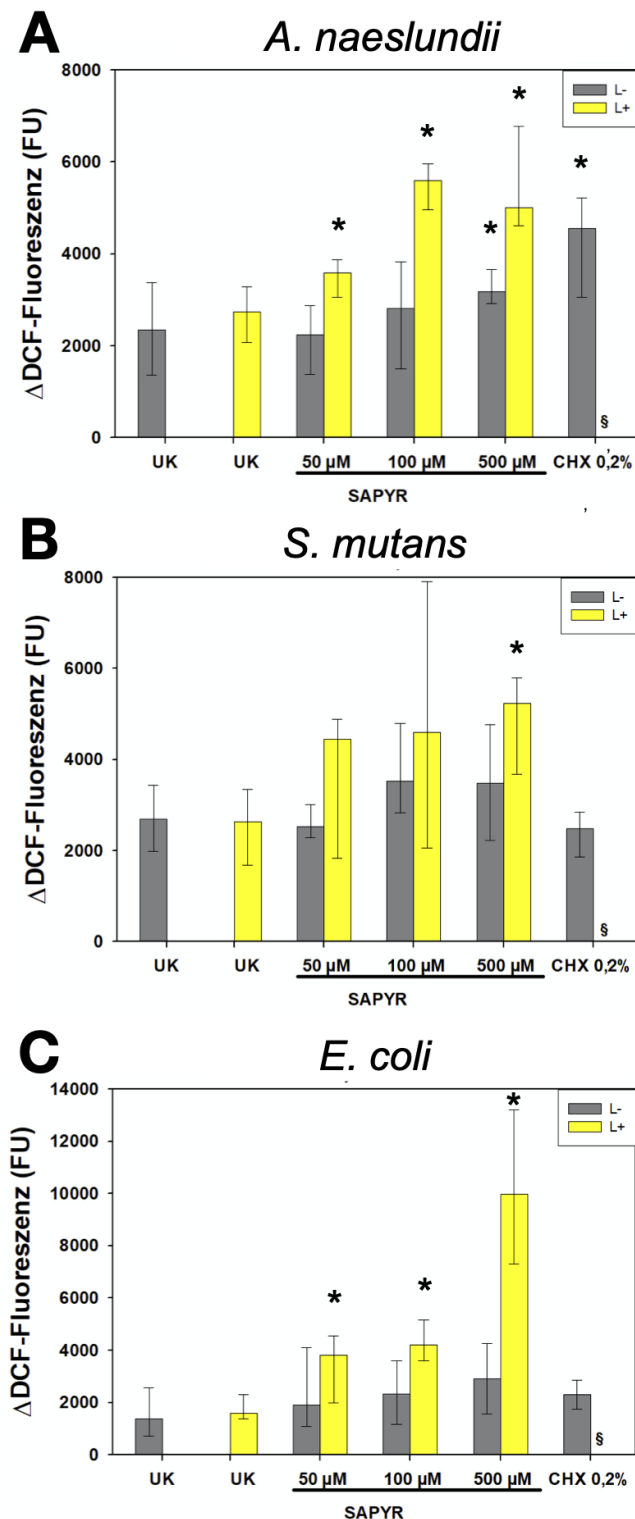


Abbildung 13: Fluoreszenzmessungen der Bildung von intrazellulären ROS nach aPDT mit SAPYR oder Behandlung mit CHX

Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Perzentil der mit SAPYR oder CHX behandelten Bakterien. Die Autofluoreszenz der Bakterien wurde von der gemessenen Fluoreszenzintensität subtrahiert und als Δ DCF-Fluoreszenz (FU) ausgedrückt. **(A)** *A. naeslundii* nach 20 min Inkubation. **(B)** *S. mutans* nach 5 min Inkubation. **(C)** *E. coli* nach 5 min Inkubation. Gelbe Balken (L+) stellen Gruppen dar, die mit aPDT behandelt und für 10 min bestrahlt wurden. Graue Balken (L-) stellen im Dunkeln inkubierte Kontrollen bzw. CHX dar. FU: Fluorescence Unit. * zeigt den statistischen Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen UK L- und behandelten Gruppen. §: nicht gemessen. n=6.

3.6 Einfluss von Antioxidantien auf die Replikationsfähigkeit

Um den Einfluss intrazellulärer ROS auf die Replikationsfähigkeit zu untersuchen, wurden spezifische Antioxidantien während oder nach der Behandlung von *S. mutans* und *E. coli* mit aPDT eingesetzt und anschließend die KBE bestimmt. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Behandlung mit aPDT und SAPYR bei *E. coli* und *S. mutans*. Diese Proben wurden ohne die Zugabe von Antioxidantien behandelt und als Kontrollen verwendet. Die Behandlung mit 25 und 50 μM SAPYR verringerte in *E. coli* die Zahl der KBE um 1,0-1,9 \log_{10} -Stufen und in *S. mutans* um 1,1-2,0 \log_{10} -Stufen. Für die folgenden Versuche wurden die Werte zu 100% gesetzt und mit 0 mM (Konzentration der Antioxidantien) beschrieben.

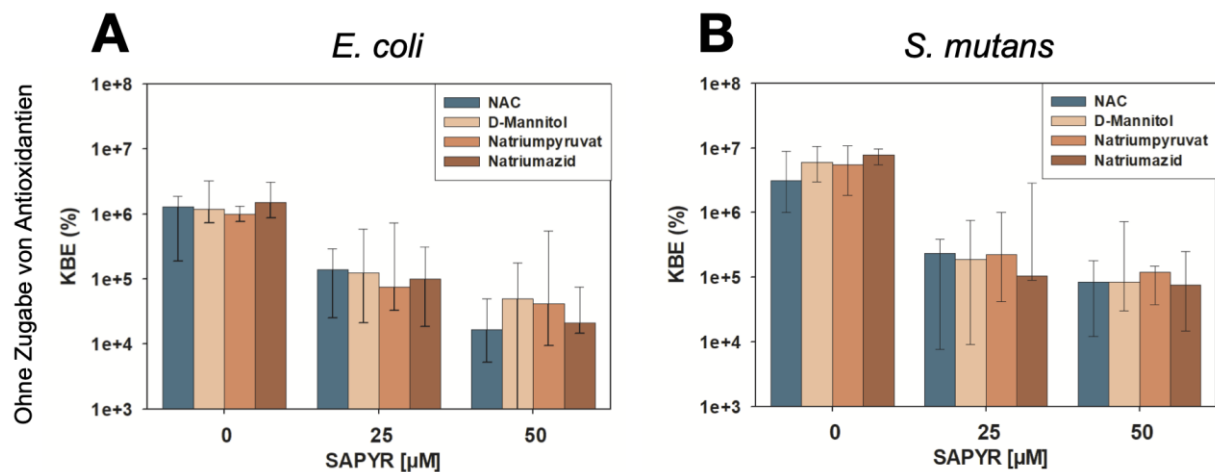


Abbildung 14: 100%-Werte der KBE von *E. coli* und *S. mutans* für die eingesetzten Antioxidantien

Alle Ergebnisse sind als Mediane mit 25%- und 75%-Perzentil auf einer \log_{10} -skalierten Ordinate dargestellt. **(A)** 100%-Werte der Versuche mit *E. coli*. **(B)** 100%-Werte der Versuche mit *S. mutans*. Inkubationsdauer: 5 min, Bestrahlungsdauer: 10 min. n=6.

In *S. mutans* führte die Zugabe von NAC während der Behandlung mit aPDT zu einem Anstieg der Zahl der KBE (Behandlung mit SAPYR ohne Zugabe von Antioxidantien) um 0,8-1,2 \log_{10} -Stufen im Vergleich zur Kontrolle. In *E. coli* nahm die Zahl der KBE bei der Behandlung mit SAPYR und NAC um 1,0-2,2 \log_{10} -Stufen zu. Die Zugabe von NAC nach Behandlung erzeugte in beiden Organismen keinen Anstieg der KBE (Abbildung 15).

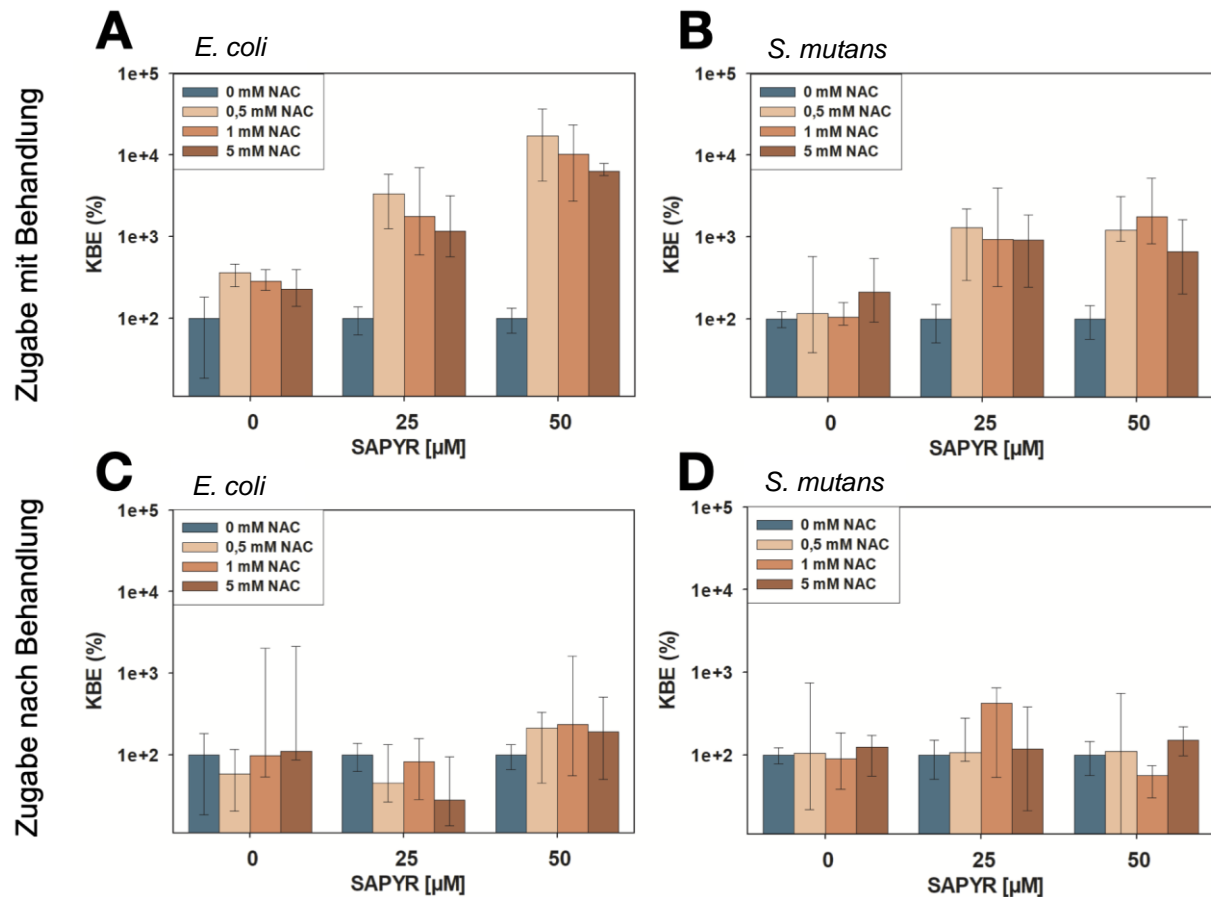


Abbildung 15: KBE von *E. coli* und *S. mutans* nach Zugabe von N-Acetylcystein (NAC) vor und nach Behandlung mit aPDT mit SAPYR

Alle Ergebnisse sind als Mediane mit 25%- und 75%-Perzentil auf einer \log_{10} -skalierten Ordinate dargestellt. Relative KBE-Daten (KBE (%)) mit Kontrollgruppe ohne Antioxidantien (0 mM), die für alle Gruppen auf 100% gesetzt wurde. **(A)** Zugabe von NAC mit der Behandlung bei *E. coli*. **(B)** Zugabe von NAC mit der Behandlung bei *S. mutans*. **(C)** Zugabe von NAC nach der Behandlung bei *E. coli*. **(D)** Zugabe von NAC nach der Behandlung bei *S. mutans*. Inkubationsdauer: 5 min, Bestrahlungsdauer: 10 min. n=6.

Mit Natriumpyruvat vor der Behandlung mit aPDT stieg in *S. mutans* die Zahl der KBE im Vergleich zur Kontrolle um 0,4-1,0 \log_{10} -Stufen. In *E. coli* führte die Behandlung mit aPDT und Natriumpyruvat zu einem Anstieg der KBE um 0,7-1,2 \log_{10} -Stufen. Die Zugabe von Natriumpyruvat nach Behandlung mit aPDT zeigte wiederum in beiden Organismen keinen Effekt auf die KBE (Abbildung 16).

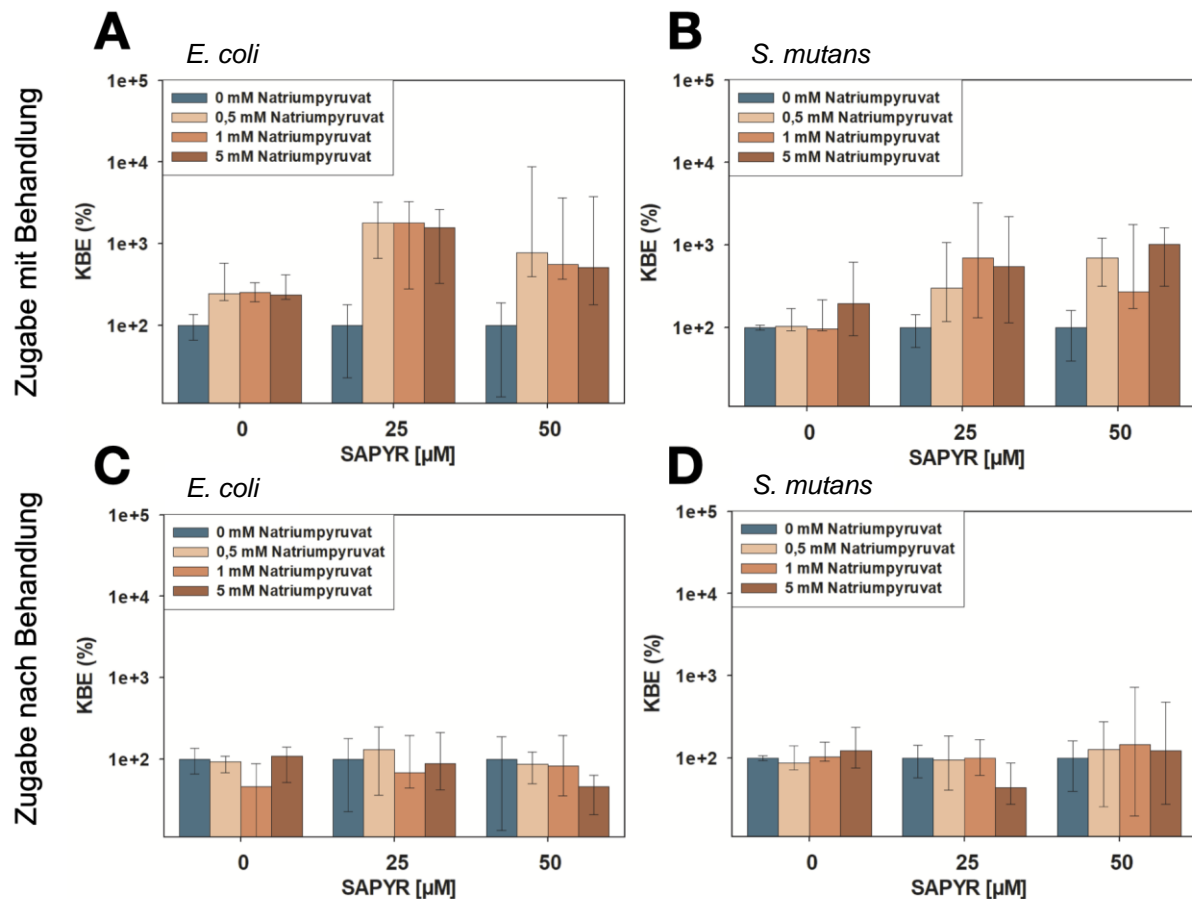


Abbildung 16: KBE von *E. coli* und *S. mutans* nach Zugabe von Natriumpyruvat vor und nach Behandlung mit aPDT mit SAPYR

Alle Ergebnisse sind als Mediane mit 25%- und 75%-Perzentil auf einer \log_{10} -skalierten Ordinate dargestellt. Relative KBE-Daten (KBE (%)) mit Kontrollgruppe ohne Antioxidation (0 mM), die für alle Gruppen auf 100% gesetzt wurde. **(A)** Zugabe von Natriumpyruvat mit der Behandlung bei *E. coli*. **(B)** Zugabe von Natriumpyruvat mit der Behandlung bei *S. mutans*. **(C)** Zugabe von Natriumpyruvat nach der Behandlung bei *E. coli*. **(D)** Zugabe von Natriumpyruvat nach der Behandlung bei *S. mutans*. Inkubationsdauer: 5 min, Bestrahlungsdauer: 10 min. n=6.

Die Zugabe von D-Mannitol mit Behandlung der aPDT erhöhte in *S. mutans* die Zahl der KBE im Vergleich zur Kontrolle um 0,5-0,9 \log_{10} -Stufen bei allen eingesetzten Konzentrationen (5, 10, 20 mM). In *E. coli* führte die Behandlung mit aPDT und D-Mannitol zu einem Anstieg der KBE um 0,7-1,7 \log_{10} -Stufen. Die Zugabe von D-Mannitol nach Behandlung mit aPDT bewirkte in beiden Organismen unter den getesteten Bedingungen keinen Anstieg der KBE (Abbildung 17).

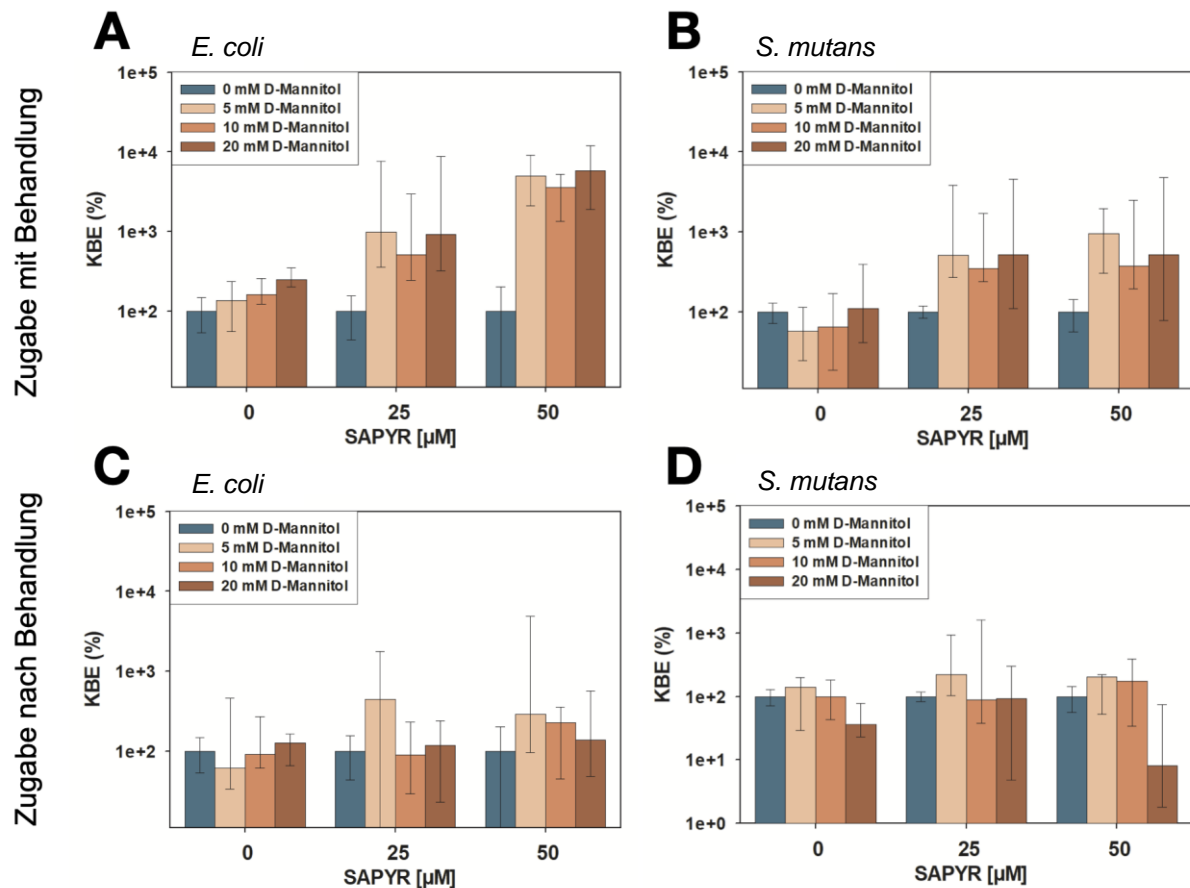


Abbildung 17: KBE von *E. coli* und *S. mutans* nach Zugabe von D-Mannitol vor und nach Behandlung mit aPDT mit SAPYR

Alle Ergebnisse sind als Mediane mit 25%- und 75%-Perzentil auf einer \log_{10} -skalierten Ordinate dargestellt. Relative KBE-Daten (KBE (%)) mit Kontrollgruppe ohne Antioxidation (0 mM), die für alle Gruppen auf 100% gesetzt wurde. **(A)** Zugabe von D-Mannitol mit der Behandlung bei *E. coli*. **(B)** Zugabe von D-Mannitol mit der Behandlung bei *S. mutans*. **(C)** Zugabe von D-Mannitol nach der Behandlung bei *E. coli*. **(D)** Zugabe von D-Mannitol nach der Behandlung bei *S. mutans*. Inkubationsdauer: 5 min, Bestrahlungsdauer: 10 min. n=6.

In *E. coli* führte die Zugabe von 50 mM Natriumazid mit der Behandlung mit aPDT (50 μ M) zu einem Anstieg der KBE um 0,8 \log_{10} -Stufen im Vergleich zur Kontrolle. Durch die Zugabe von 50 mM Natriumazid nach Behandlung mit aPDT kam es in *E. coli* zu einem Anstieg von 0,5-0,6 \log_{10} -Stufen. Natriumazid reduzierte während der Behandlung mit aPDT in *S. mutans* die Zahl der KBE um 0,9-1,4 \log_{10} -Stufen. Die Zugabe nach Behandlung zeigte keinen Effekt (Abbildung 18).

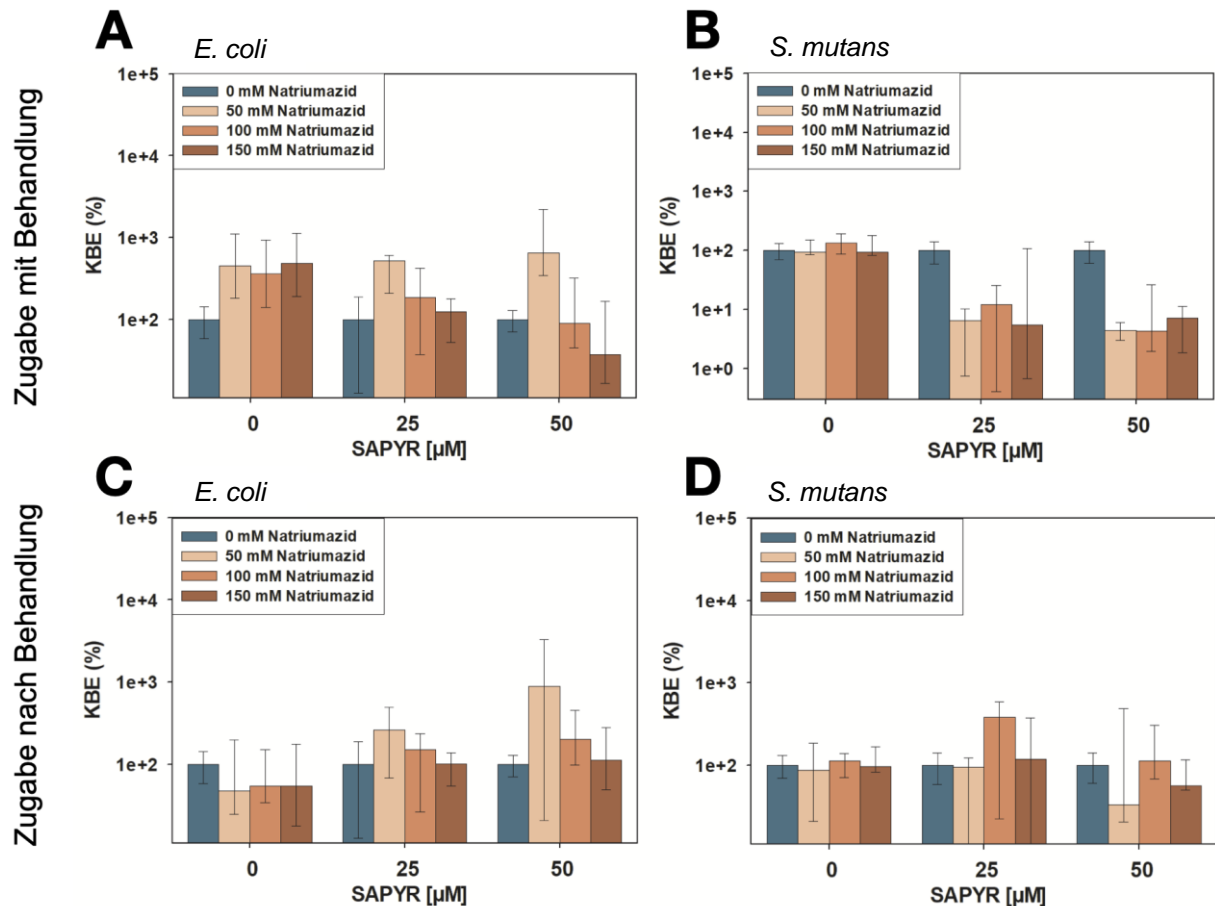


Abbildung 18: KBE von *E. coli* und *S. mutans* nach Zugabe von Natriumazid vor und nach Behandlung mit aPDT mit SAPYR

Alle Ergebnisse sind als Mediane mit 25%- und 75%-Perzentil auf einer \log_{10} -skalierten Ordinate dargestellt. Relative KBE-Daten (KBE (%)) mit Kontrollgruppe ohne Antioxidation (0 mM), die für alle Gruppen auf 100% gesetzt wurde. **(A)** Zugabe von Natriumazid mit der Behandlung bei *E. coli*. **(B)** Zugabe von Natriumazid mit der Behandlung bei *S. mutans*. **(C)** Zugabe von Natriumazid nach der Behandlung bei *E. coli*. **(D)** Zugabe von Natriumazid nach der Behandlung bei *S. mutans*. Inkubationsdauer: 5 min, Bestrahlungsdauer: 10 min. n=6.

3.7 Bestimmung subletaler Konzentrationen

Für die Western Blot-Versuche zur Untersuchung der Proteinexpression von *E. coli* nach aPDT und SAPYR oder der Behandlung mit CHX mussten davon zunächst die subletale Konzentration bestimmt werden. Dazu wurden planktonische Kulturen von *E. coli* und *S. mutans* mit SAPYR oder CHX behandelt und anschließend die KBE bestimmt. Abbildung 19 zeigt die konzentrationsabhängige Abnahme der KBE nach aPDT mit SAPYR und nach Behandlung mit CHX. Eine Konzentration wurde als subletal eingestuft, wenn die Reduktion der Replikationsfähigkeit weniger als 1 \log_{10} -Stufe betrug (Grinholc et al., 2015b). Für die Western Blot-Versuche wurde für *E. coli* für die aPDT und SAPYR eine subletale Konzentration von 1 μM gewählt. Für die Behandlung mit CHX wurde als subletale Konzentration 0,025% bestimmt.

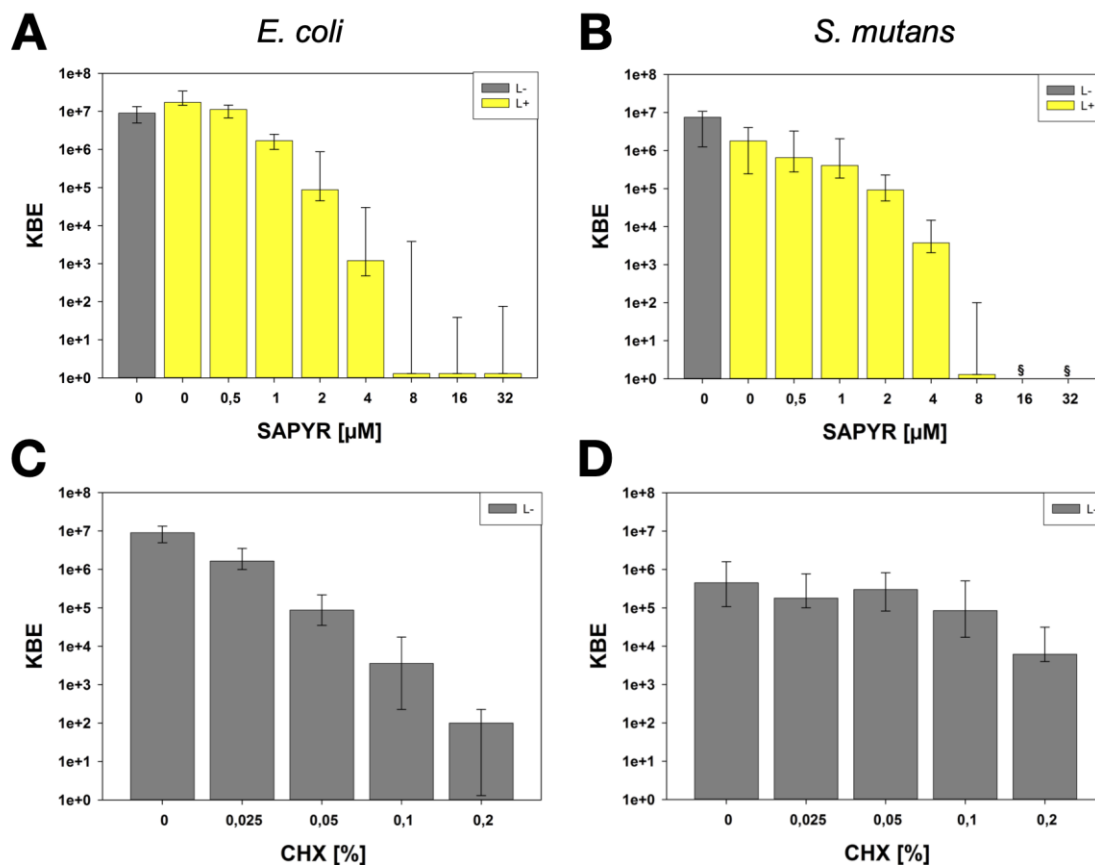


Abbildung 19: Reduktion der KBE planktonischer Kulturen von *E. coli* und *S. mutans* nach aPDT mit SAPYR und nach Behandlung mit CHX

SAPYR (Inkubationsdauer: 5 min, Bestrahlungsdauer: 10 min) und CHX (Inkubationsdauer: 5 min); dargestellt sind Median mit 25%- und 75%-Perzentil. Gelbe Balken (L+) stellen Gruppen dar, die mit SAPYR behandelt und 10 min lang bestrahlt wurden. Graue Balken (L-) stellen im Dunkeln inkubierte Kontrollen oder CHX dar. §: nicht gemessen, n=6.

3.8 Proteinexpression in *E. coli*

Die Western Blot-Versuche wurden aufgrund der spezifischen Antikörper nur mit *E. coli* durchgeführt. Die Untersuchungen der Proteinexpression zeigten, dass das Hitzeschockprotein DnaK und die Untereinheit der ATP-Synthase AtpB nach Behandlung mit aPDT und SAPYR keine veränderte Expression aufweisen. Die Expression der Katalase KatG und von GapDH war 1 h nach Behandlung mit aPDT und SAPYR (SAPYR 1 μ M L+ t1h), SAPYR ohne Belichtung (SAPYR 1 μ M L- t1h), oder auch nach Belichtung ohne PS (Kontrolle L+ t1h) leicht erhöht verglichen mit Proben, welche direkt nach der Behandlung geerntet wurden (SAPYR 1 μ M L+ t0h, SAPYR 1 μ M L- t0h, Kontrolle L+ t0h). RecA, welches unter anderem bei einer Schädigung der DNA aktiviert wird, war 1 h nach Behandlung mit aPDT und SAPYR (SAPYR 1 μ M L+ t1h) deutlich stärker exprimiert als in den anderen Behandlungsgruppen.

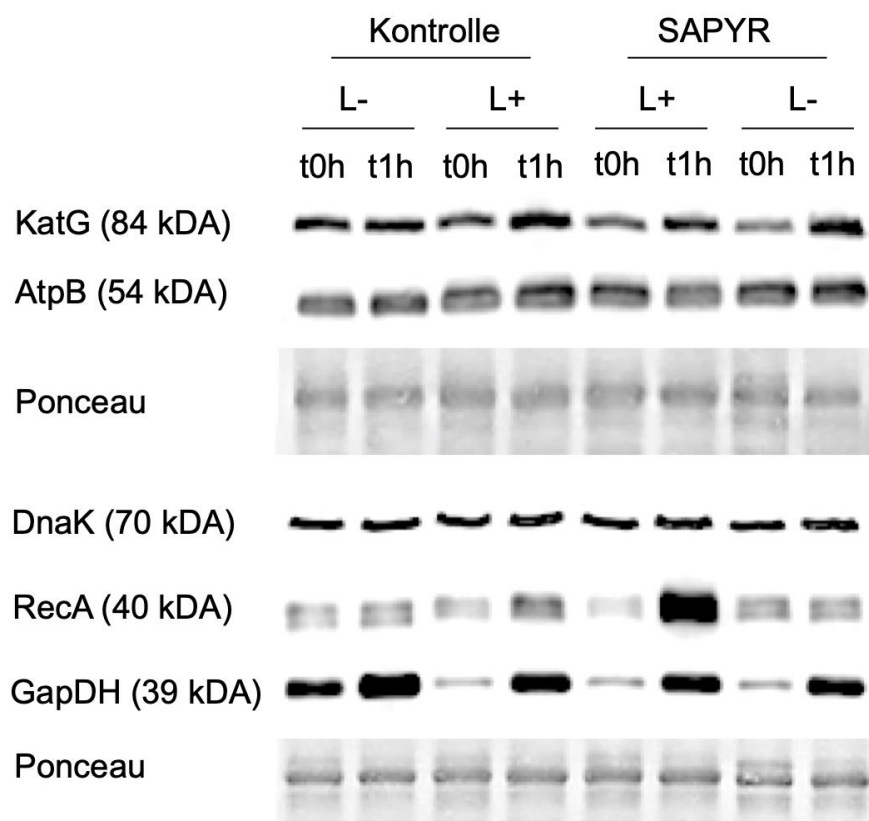


Abbildung 20: Änderung der Proteinexpression von KatG, AtpB, DnaK, RecA und GapDH nach Behandlung planktonischer Kulturen von *E. coli* mit aPDT und SAPYR

Behandelt wurde mit 1 μ M SAPYR, Inkubationsdauer: 5 min, Bestrahlungsdauer: 10 min. K: Kontrolle, L+: belichtet, L-: unbelichtet, t0h: direkt nach Behandlung, t1h: 1 h nach Behandlung. Ponceau-Färbung zur Visualisierung der Proteinmenge (Graustufendarstellung).

Eine genauere Untersuchung der Expression des Proteins RecA zeigte, dass es nach der Behandlung mit Konzentrationen von 0,25 und 0,5 μM SAPYR bereits nach 0,5 h zu einer erhöhten Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Kontrolle L-) kommt (Abbildung 21). Diese war auch nach 1 h zu sehen. Die Behandlung mit 1 μM SAPYR führte, wie bereits in Abbildung 20 dargestellt, auch hier zu einer erhöhten Expression von RecA im Vergleich zu K L-. Nach 5 h war die Expression von RecA bei 0,25 μM vergleichbar mit der unbehandelten Kontrolle (Kontrolle L-). Die Behandlung mit 0,5 und 1 μM SAPYR zeigte nach 5 h eine erhöhte Expression.

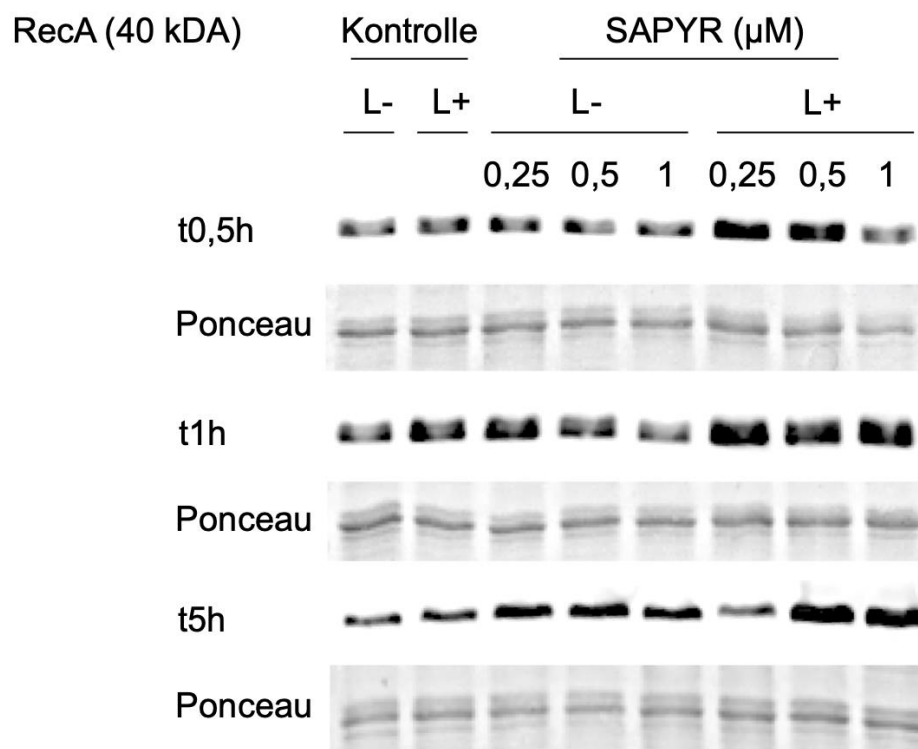


Abbildung 21: Änderung der Proteinexpression von RecA nach Behandlung planktonischer Kulturen von *E. coli* mit aPDT und SAPYR

Behandelt wurde mit 0,25; 0,5 und 1 μM SAPYR, Inkubationsdauer: 5 min, Bestrahlungsdauer: 10 min. K: Kontrolle, L+: belichtet, L-: unbelichtet, t0h: direkt nach Behandlung, t0,5h: 0,5 h nach Behandlung, t1h: 1 h nach Behandlung. Ponceau-Färbung zur Visualisierung der Proteinmenge (Graustufendarstellung).

Nach der Behandlung planktonischer Kulturen von *E. coli* mit CHX zeigte sich keine Änderung in der Expression der Katalase KatG. Eine Zunahme der Bandenstärke nach Behandlung mit CHX konnte bei dem Hitzeschockprotein DnaK beobachtet werden. Im Vergleich zu der Behandlung mit SAPYR, führte CHX zu einer Abnahme der Expression von RecA (Abbildung 22).

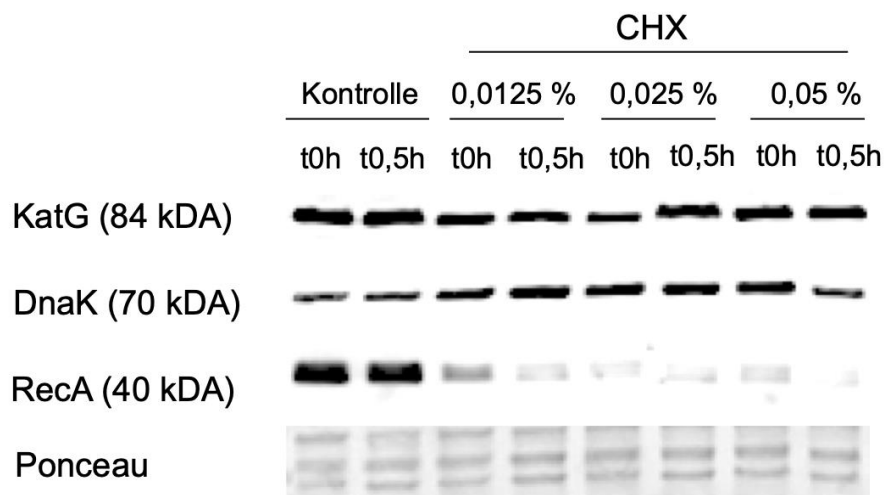


Abbildung 22: Änderung der Proteinexpression von KatG, DnaK und RecA nach Behandlung planktonischer Kulturen von *E. coli* mit CHX

Behandelt wurde mit 0,0125%; 0,025% und 0,05% CHX für 5 min. K: Kontrolle, t0h: direkt nach Behandlung, t0,5h: 0,5 h nach Behandlung. Ponceau-Färbung zur Visualisierung der Proteinmenge (Graustufendarstellung).

3.9 Transkriptomanalyse von *E. coli* und *S. mutans*

Um die molekulare Stressantwort der Bakterien auf die aPDT und die Behandlung mit CHX zu untersuchen, wurden neben den Western Blot-Versuchen eine RNA-Seq von unbehandelten und behandelten Gruppen durchgeführt. Dafür wurden *E. coli* und *S. mutans* mit SAPYR (0,5 μ M) oder mit CHX (0,0125%) behandelt. Daraus ergaben sich folgende Behandlungsgruppen: Kontrolle unbelichtet (Kontrolle L-), Kontrolle belichtet (Kontrolle L+), SAPYR unbelichtet (SAPYR L-), SAPYR belichtet (SAPYR L+) und CHX. Die in Abbildung 23 und Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse der Hauptkomponentenanalysen zeigen die Varianz zwischen den behandelten Gruppen. Dabei ist für *E. coli* und *S. mutans* zu erkennen, dass die mit aPDT und CHX behandelten Proben sich in Bezug auf ihre Genexpression deutlich von der unbehandelten Kontrolle unterscheiden (Abbildung 22A, 23A). Die Heatmap zeigt ebenfalls deutliche Unterschiede in der Genexpression zwischen diesen Gruppen (Abbildung 22B, 23B).

Bei *E. coli* wurden nach der Behandlung mit aPDT und SAPYR insgesamt 1675 und nach der Behandlung mit CHX 1606 differentiell exprimierte Gene identifiziert (Tabelle 13). Bei *S. mutans* konnten nach der Behandlung mit aPDT und SAPYR insgesamt 46 differentiell exprimierte Gene gefunden werden; nach der Behandlung mit CHX waren es 669 Gene (Tabelle 17). Die Top 20 differentiell exprimierten Gene sind in den Tabellen 15, 16, 19 und 20 dargestellt. Die Expressionsrate im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle werden im Folgenden als *Fold Change* (FC) bezeichnet.

In die Pathway-Analyse (Signalweg-Anreicherungs-Analyse) wurden mit Hilfe der Software Pathway Tools alle differentiell exprimierten Gene einbezogen. Die Ergebnisse der hinterlegten funktionellen Pathways wurden zusammengefasst (Tabelle 14, 18). Bei *E. coli* kam es nach aPDT und CHX beispielsweise zu einer erhöhten Expression von Genen, welche eine Rolle in der Biosynthese von Exopolysacchariden, L-Arginin oder L-Ornithin und in dem Abbau von Fettsäuren und L-Ascorbat spielen. Gene, involviert in der Atmung, der Fermentation oder der Purin-Nukleotid-Biosynthese waren herunterreguliert (Tabelle 14).

Bei *S. mutans* kam es nach aPDT oder Behandlung mit CHX zu einer erhöhten Expression von Genen, welche in die Biosynthese von L-Arginin, Purin-Nukleotiden oder Glykanen involviert sind. Pathways, welche eine Rolle im Abbau von Laktose oder Galaktose spielen, wurden nach der Behandlung mit CHX herunterreguliert (Tabelle 18).

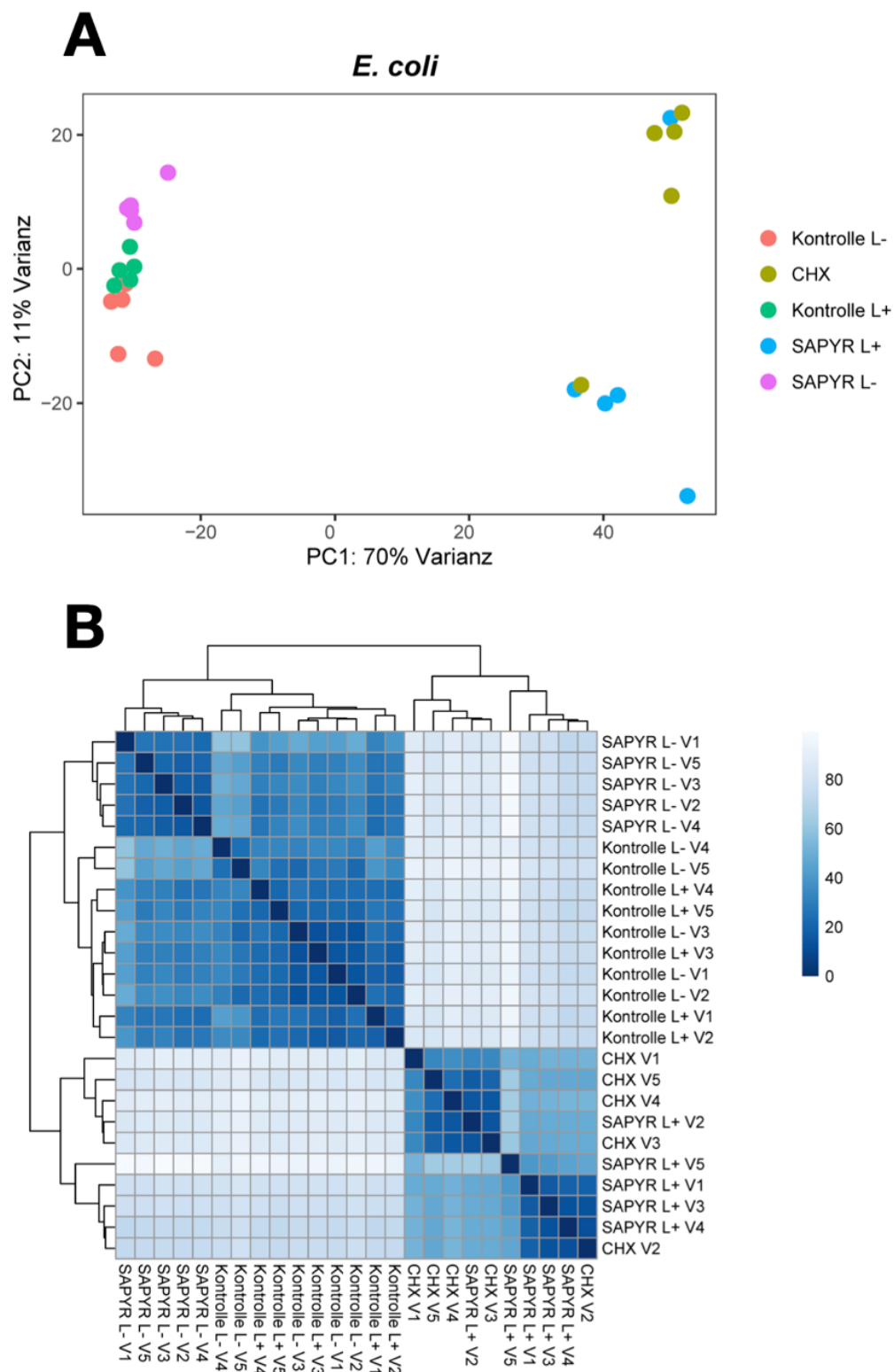


Abbildung 23: (A) Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung bei *E. coli*. (B) Heatmap der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung bei *E. coli*

(A) PCA-Darstellung von *E. coli*-Bakterien unbehandelt (Kontrolle L-, orange), behandelt mit Bestrahlung (Kontrolle L+, grün), mit SAPYR ohne Bestrahlung (SAPYR L-, blau) oder mit aPDT (SAPYR L+, blau) oder mit CHX (olivgrün) mit zwei Hauptkomponenten (PC1 und PC2), welche 70% und 11% der Varianz darstellen. **(B)** Expressionswerte, die keine Veränderung der Genexpression in Bezug auf das Kontrollexperiment repräsentieren, werden durch eine Blaufärbung der entsprechenden Zelle gekennzeichnet. Bei einer Änderung des Expressionswertes in Bezug auf das Kontrollexperiment, ist die Zelle mit einer Farbe aus dem Gradienten von Blau nach Weiß eingefärbt. Pro Gruppe sind jeweils 5 biologische Replikate dargestellt. V: Versuch (Replikat); L+: belichtet; L-: unbelichtet.

Tabelle 13: Anzahl der differentiell exprimierten Gene der behandelten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe in *E. coli*

K: Kontrolle; L+: belichtet; L-: unbelichtet; -: herunterreguliert; +: hochreguliert.

<i>E. coli</i>	-	+	Gesamt
K L+	0	4	4
SAPYR L-	234	178	412
SAYPR L +	715	960	1675
CHX	763	843	1606

Tabelle 14: Ergebnisse der Pathway-Analyse mit differentiell exprimierten Genen in *E. coli* behandelt mit aPDT und SAPYR oder CHX

Dargestellt sind Pathways, welche durch aPDT oder Behandlung mit CHX signifikant reguliert wurden ($p_{adj} < 0,05$).

L+: belichtet; -: herunterreguliert; +: hochreguliert.

	-	+
SAPYR L+	Aerobe Atmung	Carboxylat-Abbau
	Anaerobe Atmung	Elektronentransfer
	ATP-Biosynthese	(Cytochrome)
	D-Mannose-Abbau	Exopolysaccharid-
	Elektronentransfer (H ₂)	Biosynthese
	Elektronentransfer (NADH)	Fettsäure-Abbau
	Fermentation	L-Arginin-Biosynthese
	Glykolyse und Entner-Doudoroff-Pathway	L-Ascorbat-Abbau
	Histidin-Biosynthese	L-Ornithin-Biosynthese
	Nitrat-Reduktion	Oleate- und β -Oxidation
	Purin-Nukleotid-Biosynthese	
	Pyrimidin-Nukleotid-Biosynthese	
CHX	Aerobe Atmung	Elektronentransfer
	Anaerobe Atmung	(Cytochrome)
	ATP-Biosynthese	Fettsäure-Abbau
	D-Mannose-Abbau	L-Arginin-Biosynthese
	Elektronentransfer (H ₂)	L-Ascorbat-Abbau
	Elektronentransfer (NADH)	Oleate- und β -Oxidation
	Fermentation	
	Glykolyse und Entner-Doudoroff-Pathway	
	Histidin-Biosynthese	
	Nitrat-Reduktion	
	Purin-Nukleotid-Biosynthese	
	Pyrimidin-Nukleotid-Biosynthese	

Tabelle 15: Top 20 differentiell exprimierte Gene in *E. coli* nach Behandlung mit aPDT und SAPYR

Fold Changes (FC) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Gene sind sortiert nach dem niedrigsten bis höchsten p_{adj} und Log₂ FC. p_{adj} : adjustierter p-Wert mittels Benjamini und Hochberg-Korrektur. -: herunterreguliert.

Genname	Produkt	Log ₂ FC	p_{adj}
<i>hdeB</i>	Periplasmatisches Säurestress-Chaperon	-6,6	0,00
<i>hdeA</i>	Periplasmatisches Säurestress-Chaperon	-6,5	0,00
<i>hycA</i>	Regulator des Transkriptionsregulators FhlA	-6,3	0,00

<i>hycB</i>	Formiatdehydrogenase Untereinheit 2	-6,0	0,00
<i>hdeD</i>	Membranprotein (Säureresistenz)	-5,6	0,00
<i>hydN</i>	Putatives Elektronentransportprotein	-5,4	0,00
<i>hycF</i>	Formiatdehydrogenase H // Hydrogenase 3	-5,3	0,00
<i>hycC</i>	Formiatdehydrogenase H // Hydrogenase 3	-5,2	0,00
<i>hycE</i>	Formiatdehydrogenase H // Hydrogenase 3	-5,1	0,00
<i>fdhF</i>	Formiatdehydrogenase H // Hydrogenase 3	-5,0	0,00
<i>nrdf</i>	Flavodoxin (Aufrechterhaltung des Dimangan-Tyrosyl-Radikal-Kofaktors)	4,5	0,00
<i>nhaA</i>	Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ Antiporter	4,6	0,00
<i>artJ</i>	L-Arginin ABC-Transporter	4,7	0,00
<i>alx</i>	Putativer membrangebundener Redoxmodulator	4,8	0,00
<i>htpX</i>	Protease	4,9	0,00
<i>ldrA</i>	Toxisches Polypeptid	5,1	0,00
<i>chaA</i>	Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ Antiporter	5,2	0,00
<i>ibpB</i>	Hitzeschockprotein	5,5	0,00
<i>spy</i>	ATP-unabhängiges periplasmatisches Chaperon	6,0	0,00
<i>cpxP</i>	Periplasmatisches Protein	6,9	0,00

Tabelle 16: Top 20 differentiell exprimierte Gene in *E. coli* nach Behandlung mit CHX

Fold Changes (FC) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Gene sind sortiert nach dem niedrigsten bis höchsten p_{adj} und $\log_2 FC$. p_{adj} : adjustierter p-Wert mittels Benjamini und Hochberg-Korrektur. -: herunterreguliert.

Genname	Produkt	$\log_2 FC$	p_{adj}
<i>hdeB</i>	Periplasmatisches Säurestress-Chaperon	-7,6	0,00
<i>hdeA</i>	Periplasmatisches Säurestress-Chaperon	-7,5	0,00
<i>hycA</i>	Regulator des Transkriptionsregulators FhlA	-7,1	0,00
<i>gadE</i>	DNA-bindender Transkriptionsaktivator	-6,6	0,00
<i>hdeD</i>	Membranprotein (Säureresistenz)	-6,3	0,00
<i>hycB</i>	Formiatdehydrogenase H // Hydrogenase 3	-6,1	0,00
<i>gadB</i>	Glutamat-Decarboxylase B	-6,1	0,00
<i>hydN</i>	Putatives Elektronentransportprotein	-5,7	0,00
<i>flgC</i>	Flagellum	-5,5	0,00
<i>yagU</i>	Membranprotein (Säureresistenz)	-5,4	0,00
<i>htpX</i>	Protease	5,0	0,00
<i>dgcZ</i>	Diguanylatcyclase	5,1	0,00
<i>mgtA</i>	Mg ⁽⁺²⁾ -importierende P-Typ ATPase	5,1	0,00
<i>artJ</i>	L-Arginin ABC transporter	5,3	0,00
<i>chaA</i>	Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ Antiporter	5,4	0,00
<i>marR</i>	DNA-bindender Transkriptionsrepressor	5,4	0,00
<i>nhaA</i>	Na ⁽⁺⁾ /H ⁽⁺⁾ Antiporter	5,5	0,00
<i>alx</i>	Putativer membrangebundener Redoxmodulator	6,2	0,00
<i>spy</i>	ATP-unabhängiges periplasmatisches Chaperon	6,6	0,00
<i>cpxP</i>	Periplasmatisches Protein	7,6	0,00

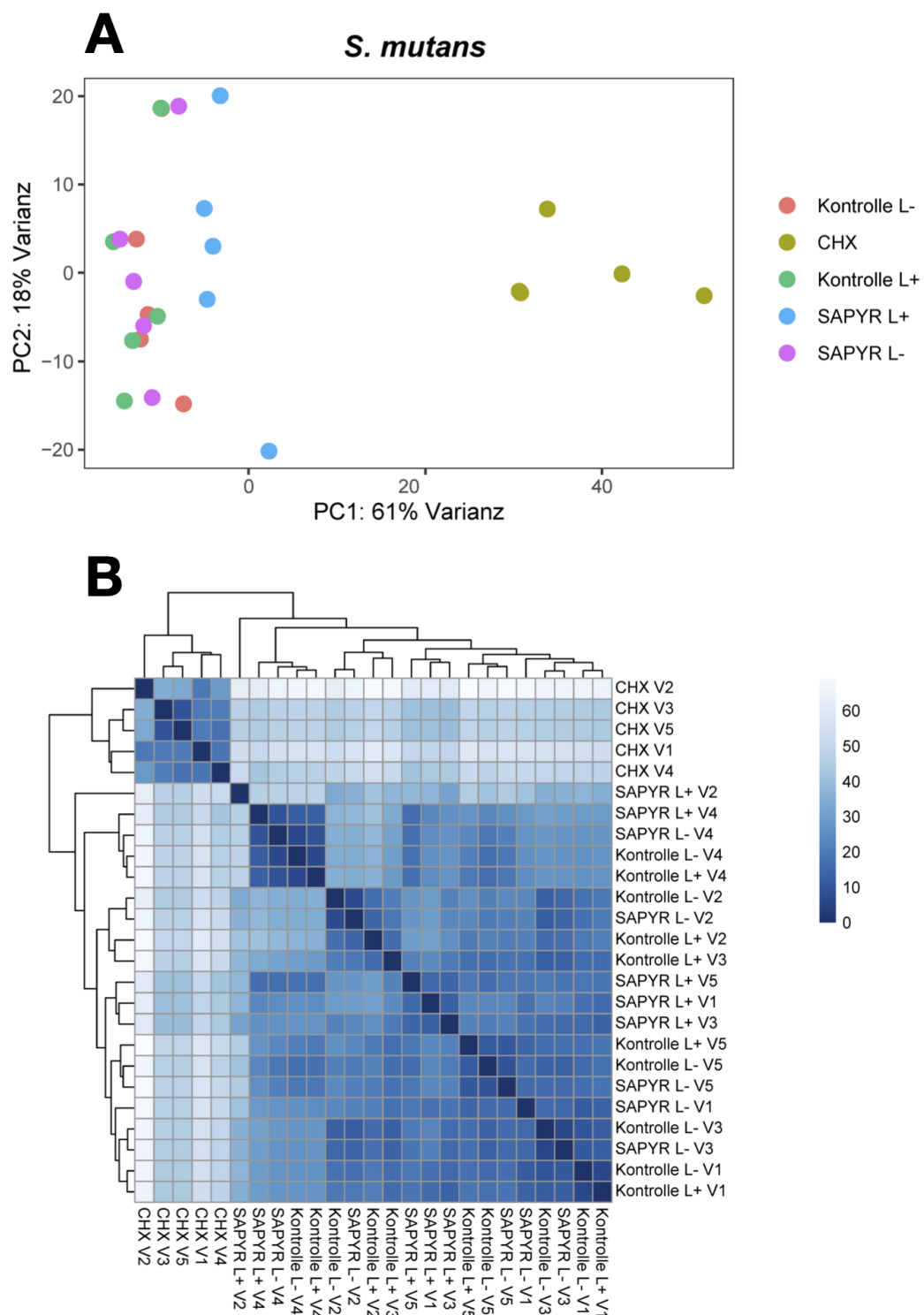


Abbildung 24: (A) Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung bei *S. mutans*. (B) Heatmap der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung bei *S. mutans*

(A) PCA-Darstellung von *S. mutans*-Bakterien unbehandelt (Kontrolle L-, orange), behandelt mit Bestrahlung (Kontrolle L+, grün), mit SAPYR ohne Bestrahlung (SAPYR L-, pink), mit aPDT (SAPYR L+, blau) oder mit CHX (olivgrün) mit zwei Hauptkomponenten (PC1 und PC2), welche 61% und 18% der Varianz darstellen. **(B)** Expressionswerte, die keine Veränderung der Genexpression in Bezug auf das Kontrollexperiment repräsentieren, werden durch eine Blaufärbung der entsprechenden Zelle gekennzeichnet. Bei einer Änderung des Expressionswertes in Bezug auf das Kontrollexperiment, ist die Zelle mit einer Farbe aus dem Gradienten von Blau nach Weiß eingefärbt.

Tabelle 17: Anzahl der differentiell exprimierten Gene der behandelten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe in *S. mutans*

K: Kontrolle; L+: belichtet; L-: unbelichtet; -: herunterreguliert; +: hochreguliert.

<i>S. mutans</i>	-	+	Gesamt
K L+	0	1	1
SAPYR L-	0	0	0
SAPYR L +	5	41	46
CHX	264	405	669

Tabelle 18: Ergebnisse der Pathway-Analyse mit differentiell exprimierten Genen in *S. mutans* behandelt mit aPDT und SAPYR oder CHX

Dargestellt sind Pathways, welche durch aPDT oder Behandlung mit CHX signifikant reguliert wurden ($p_{adj} < 0,05$).

L+: belichtet; -: herunterreguliert; +: hochreguliert. n.a.: nicht gegeben.

	-	+
SAPYR L+	n.a.	5-Aminoimidazol-Ribonukleotide-Biosynthese Adenosin-Biosynthese Inosine-5'-phosphat-Biosynthese L-Arginin-Biosynthese L-Ornithin-Biosynthese Purin-Nukleotid-Biosynthese
CHX	Aminosäuren-Biosynthese Galaktose-Abbau Laktose-Abbau	5-Aminoimidazol-Ribonukleotide-Biosynthese Carboxylat-Abbau Fermentation Glykan-Biosynthese Glykogen-Biosynthese Inosine-5'-phosphat-Biosynthese L-Ascorbat-Abbau L-Histidin-Biosynthese Purin-Nukleotid-Biosynthese

Tabelle 19: Top 20 differentiell exprimierte Gene in *S. mutans* nach Behandlung mit aPDT und SAPYR

Fold Changes (FC) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Gene sind sortiert nach dem niedrigsten bis höchsten

p_{adj} . p_{adj} : adjustierter p-Wert mittels Benjamini und Hochberg-Korrektur. -: herunterreguliert.

Gen-ID	Produkt	Log ₂ FC	p_{adj}
D820_RS03120	Hypothetisches Protein	2,2	0,00
D820_RS04785	Formiat-Tetrahydrofolat-Ligase	1,5	0,00
D820_RS09010	Thiaminpyrophosphat-abhängige Dehydrogenase E1 Untereinheit alpha	1,5	0,00
D820_RS09005	Alpha-Ketosäuredehydrogenase Untereinheit beta	1,5	0,00
D820_RS06955	ATP-abhängige Clp-Protease ATP-bindende Untereinheit	1,5	0,00
D820_RS06510	Acetylornithin-Aminotransferase (argD)	1,3	0,00

D820_RS09000	2-Oxosäure-Dehydrogenase Untereinheit E2	1,3	0,00
D820_RS06115	Alkyl-Hydroperoxid-Reduktase Untereinheit F (ahpF)	1,3	0,00
D820_RS07050	DNA-Schutzprotein bei Nährstoffmangel und stationärer Phase	1,6	0,00
D820_RS05250	Acyl-CoA-Dehydrogenase	1,5	0,00
D820_RS09300	Phosphoribosylamine-Glycin-Ligase (purD)	1,4	0,00
D820_RS06525	N-Acetyl-Gamma-Glutamylphosphat- Reduktase	1,1	0,00
D820_RS09250	Adenylosuccinat-Lyase	1,2	0,00
D820_RS0109600	Peptidase M20	1,3	0,00
D820_RS05270	ATP-abhängige Clp-Protease ATP- bindende Untereinheit	1,1	0,00
D820_RS07045	Protein mit unbekannter Funktion	1,1	0,00
D820_RS09505	16S ribosomale RNA	6,3	0,00
D820_RS05255	Carboxymuconolacton-Decarboxylase	1,7	0,00
D820_RS06120	Peroxiredoxin	1,3	0,00

Tabelle 20: Top 20 differentiell exprimierte Gene in *S. mutans* nach Behandlung mit CHX

Fold Changes (FC) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Gene sind sortiert nach dem niedrigsten bis höchsten p_{adj} und \log_2 FC. p_{adj} : adjustierter p-Wert mittels Benjamini und Hochberg-Korrektur. -: herunterreguliert.

Gen-ID	Produkt	\log_2 FC	p_{adj}
D820_RS00745	50S ribosomales Protein L36	-2,0	0,00
D820_RS07990	50S ribosomales Protein L34	-1,8	0,00
D820_RS06165	SprT Protein	-1,8	0,00
D820_RS04210	Protein mit unbekannter Funktion	-1,7	0,00
D820_RS01860	Transkriptionaler Regulator	-1,6	0,00
D820_RS00735	Adenylat-Kinase	-1,5	0,00
D820_RS06280	Natrium-Symporter	-1,5	0,00
D820_RS00760	DNA-gesteuerte RNA-Polymerase Untereinheit Alpha	-1,5	0,00
D820_RS01400	"N utilization substance Protein B" (nusB)	-1,5	0,00
D820_RS05825	RgpFc Protein	-1,4	0,00
D820_RS02800	Glucose-1-Phosphat-Adenylyltransferase Untereinheit (GlgD)	3,7	0,00
D820_RS04690	ABC-Transporter Permease	3,7	0,00
D820_RS08960	Malatpermease	3,8	0,00
D820_RS02805	Glycogensynthase	3,9	0,00
D820_RS04685	ABC Transporter	4,0	0,00
D820_RS06900	Hypothetisches Protein	4,0	0,00
D820_RS02745	ABC Transporter ATP-bindendes Protein	4,2	0,00
D820_RS02750	ABC Transporter Permease	4,2	0,00
D820_RS06905	Anti-Holin	4,4	0,00
D820_RS07700	Format-C-Acetyltransferase	4,5	0,00

3.10 Expression des Gens *recA* bei *E. coli*

Da eine erhöhte Proteinexpression von RecA bei *E. coli* nach Behandlung mit aPDT gefunden wurde, das Gen *recA* jedoch mittels RNA-Sequenzierung nicht detektiert werden konnte, wurden Untersuchungen der RNA-Isolate zur Expression nach aPDT oder Behandlung mit CHX mittels qRT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse der Genexpression zeigten in den behandelten Gruppen im Vergleich zu den Ergebnissen der Proteinexpression keine signifikante Änderung der Expressionsrate (Tabelle 21).

Tabelle 21: Fold Change des Gens *recA* der behandelten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in *E. coli*

L+: belichtet, L-: unbelichtet, -: herunterreguliert.

	CHX	Kontrolle L+	SAPYR L+	SAPYR L-
<i>recA</i>	-0,7	0,6	0,0	0,8

3.11 Validierung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung mittels qRT-PCR

Um die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung zu validieren, wurden verschiedene differentiell exprimierte Gene nach Behandlung mit CHX für beide Bakterienspezies ausgewählt. In Tabelle 22 und Tabelle 23 sind die insgesamt 8 Gene aufgeführt, die mittels qRT-PCR validiert wurden. Die erhaltenen FC wurden mit den Werten aller Gruppen (CHX, Kontrolle L+, SAPYR L +, SAPYR L-) der RNA-Sequenzierung verglichen. Für alle getesteten Gene konnte eine Übereinstimmung aller Behandlungsgruppen zwischen RNA-Seq und qRT-PCR festgestellt werden. Beispielsweise lag für *E. coli* der FC des Gens *hdeA* nach der Behandlung mit CHX im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei der Durchführung der RNA-Sequenzierung bei -7,5; bei der qRT-PCR lag sie bei -5,3. Bei *S. mutans* lag der FC des Gens RS03005 nach Behandlung mit CHX im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach Durchführung der RNA-Sequenzierung bei -3,2; nach qRT-PCR lag die Expressionsrate bei -2,4.

Tabelle 22: Vergleich der Fold Changes der Gene *hdeE*, *gadE*, *marA* und *cpxP* in *E. coli* zwischen RNA-Seq und qRT-PCR

L+: belichtet, L-: unbelichtet. -: herunterreguliert.

<i>E. coli</i>	<i>hdeA</i>		<i>gadE</i>		<i>marA</i>		<i>cpxP</i>	
	RNA-Seq	qRT-PCR	RNA-Seq	qRT-PCR	RNA-Seq	qRT-PCR	RNA-Seq	qRT-PCR
CHX	-7,5	-5,3	-6,6	-6,5	5,0	5,3	7,6	7,2
Kontrolle L+	-0,5	-1,1	-0,6	-1,2	0,1	-0,5	0,5	-0,9
SAPYR L+	-6,5	-5,6	-4,7	-5,8	3,7	2,4	6,9	5,5
SAPYR L-	-3,8	-3,4	-3,3	-4,4	0,3	0,0	0,3	-1,0

Tabelle 23: Vergleich der Fold Changes der Gene RS03005, RS09005, *ssrS* und *glgA* in *S. mutans* zwischen RNA-Seq und qRT-PCR

L+: belichtet, L-: unbelichtet. -: herunterreguliert.

<i>S. mutans</i>	RS03005		RS09005		<i>ssrS</i>		<i>glgA</i>	
	RNA-Seq	qRT-PCR	RNA-Seq	qRT-PCR	RNA-Seq	qRT-PCR	RNA-Seq	qRT-PCR
CHX	-3,2	-2,4	3,3	3,4	3,4	2,5	3,9	4,0
Kontrolle L+	0,0	-0,3	0,0	0,2	0,6	-0,4	-0,2	-0,5
SAPYR L+	-0,5	-0,4	1,5	1,3	1,0	0,2	0,8	0,3
SAPYR L-	-0,2	-0,1	-0,1	-0,3	0,9	-0,6	0,1	-0,2

3.12 Zellviabilität bei humanen primären PDL-Zellen

Die Zellviabilität nach Behandlung mit aPDT und SAPYR oder von CHX wurde mittels XTT-Assay bestimmt. Die Messung der Zelldichte nach Behandlung erfolgte mit einem KVT-Assay. Die endgültigen Werte wurden normalisiert, indem die gemessenen Absorptionen des XTT-Assays durch die gemessenen Werte des KVT-Assays dividiert wurden.

Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse der Zellviabilität nach aPDT und SAPYR mit 5 min Inkubation und 10 min Bestrahlung und nach Behandlung mit CHX mit 15 min Inkubation. SAPYR in PBS gelöst zeigte nach Belichtung eine konzentrationsabhängige signifikante Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle (UK L+) um 58,4-100% (Abbildung 24A). Bei der Behandlung mit SAPYR gelöst in Zellkulturmedium kam es zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität um 39,6-69,2% (Abbildung 24C). Im Dunkeln behandelte Proben zeigten eine signifikante Abnahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (UK L-) bei einer Konzentration von 100 µM, sowohl für SAPYR in PBS (30,6%) als auch SAPYR in Zellkulturmedium gelöst (32,5%) (Abbildungen 20A, C).

Nach der Behandlung mit CHX kam es unter beiden Bedingungen zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität ab einer Konzentration von 0,0125% um 43-82% (PBS) und 21,7-78,6% (Medium) (Abbildungen 24B, D).

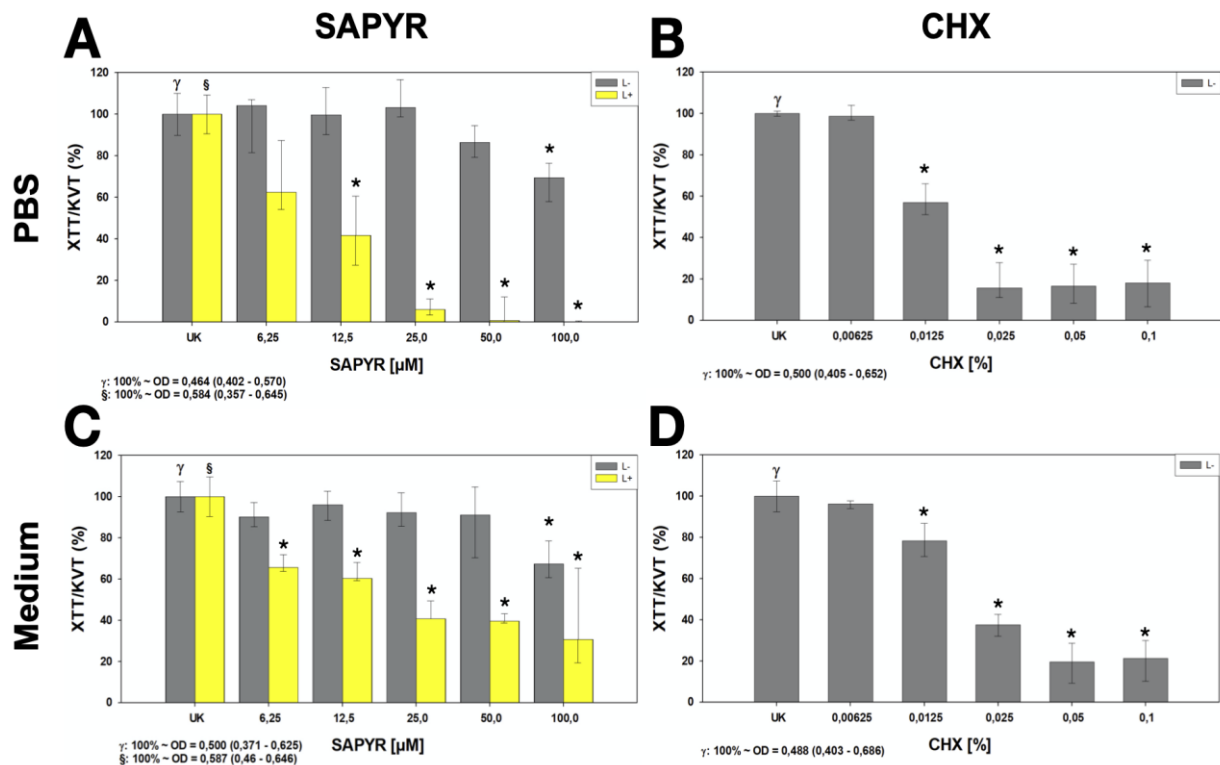


Abbildung 25: Zellviabilität nach aPDT und SAPYR mit 5 min Inkubation und 10 min Bestrahlung und nach Behandlung mit CHX mit 5 min Inkubation

Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Perzentil der mit SAPYR oder CHX behandelten Zellen. Die XTT-Absorption wurde auf die entsprechenden KVT-Messungen der Proben nach der Behandlung normalisiert und als XTT/KVT (%) ausgedrückt. L-: im Dunkeln inkubierte Gruppen; L+: bestrahlte Gruppen. Relative KBE-Daten mit unbehandelten Kontrollgruppen (UK L- und UK L+), die für alle Gruppen auf 100% gesetzt wurde (A) Zellen behandelt mit SAPYR gelöst in PBS; (B) Zellen behandelt mit CHX gelöst in PBS; (C) Zellen behandelt mit SAPYR gelöst in Zellkulturmedium; (D) Zellen behandelt mit CHX gelöst in Zellkulturmedium. Behandlung mit SAPYR für 5 min Inkubation und 10 min Bestrahlung oder mit CHX für 5 min Inkubation. n=4 (SAPYR); n=8 (CHX).

Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der Zellviabilität nach aPDT und SAPYR mit 10 min Inkubation und 10 min Bestrahlung und nach Behandlung mit CHX mit 20 min Inkubation. SAPYR in PBS gelöst zeigte nach Belichtung ab 6,25 µM eine signifikante Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle (UK L+) um 61,6-100% (Abbildung 25A). Bei der Behandlung mit SAPYR gelöst in Zellkulturmedium kam es zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität ab einer Konzentration von 12,5 µM um 33-76,1% (Abbildung 25C). Im Dunkeln behandelte Proben zeigten keine signifikante Abnahme im Vergleich zur Kontrolle (UK L-) bei einer Konzentration von 100 µM, sowohl für SAPYR in PBS als auch SAPYR in Zellkulturmedium gelöst (Abbildungen 25A, C).

Nach der Behandlung mit CHX kam es unter beiden Bedingungen ab einer Konzentration von 0,00625% zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität um 16,8-84,6% (PBS) und 13-72% (Medium) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle UK L- (Abbildungen 25B, D).

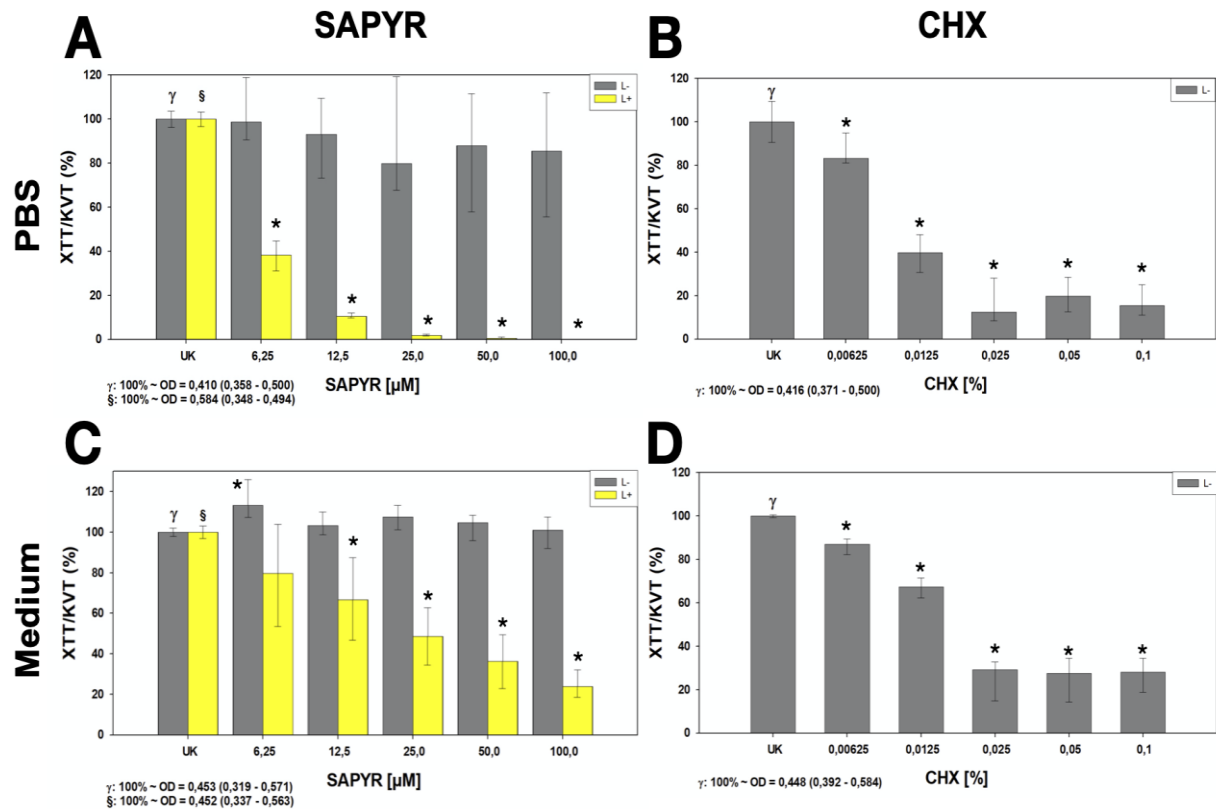


Abbildung 26: Zellviabilität nach aPDT und SAPYR für 10 min Inkubation und 10 min Bestrahlung und nach Behandlung mit CHX mit 10 min Inkubation

Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Perzentil der mit SAPYR oder CHX behandelten Zellen. Die XTT-Absorption wurde auf die entsprechenden KVT-Messungen der Proben nach der Behandlung normalisiert und als XTT/KVT (%) ausgedrückt. L-: im Dunkeln inkubierte Gruppen; L+: bestrahlte Gruppen. Relative KBE-Daten mit unbehandelten Kontrollgruppen (UK L- und UK L+), die für alle Gruppen auf 100% gesetzt wurde (A) Zellen behandelt mit SAPYR gelöst in PBS; (B) Zellen behandelt mit CHX gelöst in PBS; (C) Zellen behandelt mit SAPYR gelöst in Zellkulturmedium; (D) Zellen behandelt mit CHX gelöst in Zellkulturmedium. Behandlung mit SAPYR für 10 min Inkubation und 10 min Bestrahlung oder mit CHX für 10 min Inkubation. n=4 (SAPYR); n=8 (CHX).

4 Diskussion

Antimikrobielle Resistenzen stellen eines der aktuell größten Herausforderungen weltweit in der Medizin dar und werden unter anderem durch den unsachgemäßen Einsatz von antimikrobiellen Substanzen verursacht (Bebell und Muir, 2014; Roca et al., 2015). Bakterien haben verschiedene Mechanismen gegen herkömmliche antimikrobielle Wirkstoffe entwickelt, zum Beispiel vermittelt durch natürlich vorhandene intrinsische Resistenz, Mutation oder horizontalen Gentransfer (Ali et al., 2018). Daher ist es nicht nur notwendig, alternative antimikrobielle Ansätze zu finden, sondern genauso wichtig, deren jeweilige Wirkungsweise zu untersuchen und zu verstehen, um eine weitere Ausbreitung von Resistenzen zu verhindern.

4.1 Wirkmechanismus der aPDT auf pathogene Biofilme

In der vorliegenden Studie wurden Untersuchungen zur bakteriellen Replikationsfähigkeit, Membranintegrität, intrazellulären ATP-Konzentration und Bildung von intrazellulären ROS kombiniert, um den Wirkmechanismus des photodynamischen Prozesses bei Anwendung auf Biofilme zu untersuchen. Dafür wurde der PS SAPYR verwendet, der bereits in früheren Studien eine ausgeprägte antimikrobielle Wirksamkeit gegen planktonische Kulturen und Biofilme gezeigt hat (Cieplik et al., 2013; Tabenski et al., 2016; Muehler et al., 2017; Cieplik et al., 2018b; Cieplik et al., 2018c). Als Positivkontrolle für die antimikrobielle Wirksamkeit wurde CHX als Goldstandard-Antiseptikum in einer typischen, in der Zahnmedizin eingesetzten Konzentration (0,2%) verwendet (Cieplik et al., 2019). Als Positivkontrolle für den Verlust der Membranintegrität wurde SA-PN-05 verwendet, welcher die identische chemische Grundstruktur wie SAPYR aufweist, aber aufgrund seiner Alkylkette eine Schädigung der zytoplasmatischen Membran bewirkt (Muehler et al., 2017).

4.1.1 Replikationsfähigkeit

Um zunächst die Verringerung der bakteriellen Replikationsfähigkeit nach den verschiedenen getesteten Behandlungen in Monospezies-Biofilmen zu beurteilen, wurde ein KBE-Assay verwendet. Die Behandlung mit CHX führte zu Reduktionen der KBE von mehr als 6 log₁₀-Stufen bei *A. naeslundii*, *S. mutans* und *E. coli* nach einer Inkubationszeit von 20 oder 5 min. Eine ähnliche antimikrobielle Wirksamkeit wurde für die aPDT mit SAPYR als PS gefunden.

Die photodynamische Wirkung von SA-PN-05 (bis 4,8 log₁₀-Stufen Reduktion) war im Vergleich zu SAPYR (>6,0 log₁₀-Stufen Reduktion) deutlich geringer, was auch in einer früheren Studie zur Inaktivierung von planktonischen Bakterien festgestellt wurde (Muehler et al., 2017). Andererseits zeigte SA-PN-05 im Gegensatz zu SAPYR aufgrund seiner chemischen Struktur eine Dunkeltoxizität. Die positiv geladene quartäre Ammoniumgruppe und die lange Alkylkette (12xC_nH_{2n+1}) ermöglichen es SA-PN-05, die bakterielle Membran zu durchdringen und auch ohne Bestrahlung Membranschäden zu verursachen (Muehler et al., 2017). Im Gegensatz dazu enthält SAPYR eine positiv geladene Methyl-Pyridinium-Gruppe als jeweilige Kopfgruppe und keine Alkylkette. Daher haftet SAPYR aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung der positiv geladenen Kopfgruppe mit den negativ geladenen Zelloberflächen potenziell nur an den Lipidmembranen der bakteriellen Zelloberfläche. Daher lässt sich vermuten, dass keine Diffusion in tiefere Bereiche der Lipidmembran stattfinden kann, was erklären würde, dass die Behandlung ohne Bestrahlung zu keiner Dunkeltoxizität führt (Muehler et al., 2017). Dementsprechend zeigten Reddi *et al.*, dass die Dunkeltoxizität durch Hinzufügen einer längeren Alkylkette (bis zu 14x C_nH_{2n+1}) zum Porphyrin-basierten PS T₄MPyP zunahm (Reddi et al., 2002). Für die vorliegende Studie können die höheren KBE-Reduktionsraten für SA-PN-05 im Dunkeln im Vergleich zu den bestrahlten Gruppen auf einen teilweisen Bruch dieses Moleküls nach einer Bestrahlung von 10 min zurückgeführt werden, wie eine HPLC-Analyse bestätigte (Daten nicht gezeigt). Entsprechend fand Bauer, dass 74% der SA-PN-05-Moleküle nach einer Bestrahlung für 20 min (122 J) abgebaut wurden (Bauer, 2016). Die geringere Reduktion der Zahl der KBE, die für *E. coli* gefunden wurde, könnte auf die generelle unterschiedliche Empfindlichkeit von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien gegenüber aPDT zurückzuführen sein (Cieplik et al., 2018a). *S. mutans* und *A. naeslundii* sind Gram-positive Bakterien, die eine Zytoplasmamembran aufweisen, welche von einer dicken Peptidoglykanschicht bedeckt ist. Beide Bakterienspezies sind anfälliger als *E. coli*, ein Gram-negatives Bakterium, das eine viel dünnere Peptidoglykanschicht besitzt, aber zusätzlich zur Zytoplasmamembran und der Peptidoglykanschicht eine äußere Membran, die Lipopolysaccharide enthält (Nikaido, 2003; Martínez de Tejada et al., 2012; Spagnul et al., 2015). Aufgrund der Unterschiede in der Zellwandzusammensetzung kann es auch einen Unterschied in der Akkumulation des PS und damit einen Einfluss auf die Reduzierung der bakteriellen Replikationsfähigkeit geben (Misba et al., 2017).

4.1.2 Membranintegrität und morphologische Veränderungen

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Wirkung der aPDT auf die Membranintegrität mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Für die Analyse wurden SG und PI als Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. SG wird als Farbstoff verwendet, der alle Bakterienzellen grün färbt, während PI membrangeschädigte oder tote Zellen mit einer beeinträchtigten Membran rot färbt (Joux und Lebaron, 2000; Feng et al., 2014). CHX und SA-PN-05 wurden dabei als Positivkontrollen für Membranschäden verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass aPDT mit SAPYR zu keinem Anstieg der PI-positiven Zellen für *A. naeslundii* und *S. mutans* führte. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einer früheren Studie (Cieplik et al., 2018). Bei *A. naeslundii* und *S. mutans* kam es jedoch zu einem Anstieg der nicht gefärbten Bakterien. Da SG und PI mit intakter DNA interkalieren und Bakterien anfärben, könnte die Zunahme an ungefärbten Bakterien auf einen Bruch der DNA nach der Behandlung mit aPDT und SAPYR hindeuten, der durch die Bildung von ROS verursacht werden kann. Brüche in einzel- und doppelsträngiger DNA und auch das Verschwinden der Plasmid-Supercoiled-Fraktion nach aPDT-Behandlung wurden auch in anderen Studien berichtet (Fiel et al., 1981; Bertoloni et al., 2000; Hamblin und Hasan, 2004). Im Gegensatz zu den beiden Gram-positiven Bakterienspezies zeigte *E. coli* nach der Behandlung mit aPDT eine Zunahme der PI-positiven Zellen (36%), obwohl die KBE nur um 2 log₁₀-Stufen reduziert wurde. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellwand von Gram-negativen Bakterien Lipopolysaccharide enthält und daher eine stärkere negative Ladung besitzt als Gram-positive Bakterien. Der Aufbau der Zellwand könnte die Adhäsion von positiv geladenen antimikrobiellen Substanzen an der äußeren Zellmembran verstärken, was zu einer Membranschädigung führen kann, während Gram-positive Bakterien, die eine dickere Zellwand haben, weniger anfällig für Membranschäden sind (Yin et al., 2015). Wie erwartet zeigte die Durchflusszytometrie einen Anstieg der PI-positiven Zellen für alle drei getesteten Bakterienspezies nach der Behandlung mit CHX und SA-PN-05, welche beide als Positivkontrollen für Membranschäden dienten.

Die Ergebnisse zur Membranintegrität stehen im Einklang mit den Visualisierungen mittels REM und TEM. Die Analyse der bakteriellen Oberfläche zeigte nur für *E. coli* Veränderungen nach der Behandlung mit aPDT mittels SAPYR. Im Gegensatz dazu konnten für *A. naeslundii* und *S. mutans* keine Veränderungen beobachtet werden, was mit den Ergebnissen einer früheren Studie übereinstimmt (Cieplik et al., 2018b).

Die REM-Aufnahmen zeigten, dass die Behandlung mit SA-PN-05 und CHX bei allen drei Bakterienspezies zu Zelltrümmern und Bläschen auf den Zelloberflächen führte, was auf eine bakterielle Membranschädigung hindeutet. Dies ist auch im Einklang mit den Daten der durchflusszytometrischen Analysen zur Membranintegrität. Die TEM-Aufnahmen zeigten die Bildung von Bläschen an der äußeren Membran bei *E. coli* nach der Behandlung mit CHX. Dieses Phänomen stimmt mit einer früheren Studie überein, die ebenfalls Bläschen auf der äußeren Membran bei *Pseudomonas stutzeri* nach Behandlung mit CHX zeigte (Tattawasart et al., 2000a). Eine Erklärung könnte die Bildung von sogenannten bakteriellen Membranvesikeln sein, die durch verschiedene Stressfaktoren wie osmotischen Stress, Hitzeschock, Antibiotika oder andere antimikrobielle Wirkstoffe induziert werden (Baumgarten et al., 2012; Maredia et al., 2012; Anand und Chaudhuri, 2016).

4.1.3 Stoffwechselaktivität

Neben der Membranschädigung kann auch ein Verlust der Stoffwechselaktivität eine Ursache für die verminderte Replikationsfähigkeit sein. Als Maß für die Stoffwechselaktivität wurden Veränderungen intrazellulärer ATP-Konzentrationen gemessen. ATP ist ein essenzielles Molekül in allen lebenden Organismen im Hinblick auf Überleben, Wachstum und Replikation und spielt eine Rolle bei der Speicherung und Bereitstellung von Energie im Stoffwechsel und bei enzymatischen Reaktionen (Mempin et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Lumineszenz-Assay zur Messung der ATP-Konzentration nach aPDT mit SAPYR und nach Behandlung mit CHX verwendet. In allen Fällen konnte eine Reduktion der ATP-Konzentrationen nach aPDT und CHX gemessen werden. Dies könnte sich entweder mit einem erhöhten Verbrauch von ATP zur Anpassung an die sich ändernde Umgebung erklären oder aber mit einer Störung der Elektronentransportkette der bakteriellen Membran, welche an der Produktion von ATP beteiligt ist (Cole, 2016). Nach der Bestrahlung ohne SAPYR wurde bei allen drei Bakterienspezies eine Reduktion der ATP-Konzentration festgestellt, obwohl es keine Reduktion der KBE gab, was bedeutet, dass die bakterielle Replikationsfähigkeit nicht beeinflusst wurde. Dies könnte ebenfalls auf eine höhere Stoffwechselaktivität und damit einen höheren ATP-Verbrauch zurückzuführen sein, beispielsweise durch eine veränderte Regulation der Genexpression als Reaktion auf die Bestrahlung (Keyer und Imlay, 1996).

Eine Reduktion der intrazellulären ATP-Konzentration nach Bestrahlung mit blauem Licht wurde auch in einer Arbeit von Abana *et al.* gezeigt, in der verschiedene *E. coli*-Stämme mit blauem Licht (455 nm) behandelt wurden (Abana et al., 2017). Dabei kam es zu keiner Reduktion des Wachstums, jedoch aber zu einer Abnahme des intrazellulären ATP ohne eine Erhöhung des extrazellulären ATP (Abana et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit zeigten die mit aPDT behandelten *E. coli* eine Reduktion der ATP-Konzentration von nur ca. 50%, während es zu einer Reduktion von 2 bis 3 log₁₀-Stufen der KBE kam. Es gibt einen Zustand von Bakterien, der als lebensfähig, aber nicht kultivierbar („viable but nonculturable“; VBNC) beschrieben wird und durch Stressoren wie Nährstoffmangel, niedrige Temperaturen oder Antibiotika verursacht werden kann (Biosca et al., 1996). Im Vergleich zu toten Zellen haben VBNC-Zellen eine intakte Zellmembran und einen zwar aktiven, aber stark reduzierten Stoffwechsel (Del Mar Lleò et al., 2007; Oliver, 2010). Einige Studien untersuchten diesen VBNC-Zustand in *E. coli* (Asakura et al., 2008; Muela et al., 2008; Zhao et al., 2016; Abana et al., 2017). Zhao *et al.* fanden beispielsweise heraus, dass der VBNC-Zustand nicht nur zu einem Verlust der bakteriellen Replikationsfähigkeit (gemessen an der Kultivierbarkeit) und einer geringen Stoffwechselaktivität führt, sondern auch zu einer herunterregulierten Gen- und Proteinexpression, DNA-Replikation, Zellteilung und niedrigen ATP-Konzentrationen (Zhao et al., 2016). In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass die hier verwendete Methode zum Nachweis von ATP einige Einschränkungen aufweist, da ATP nicht direkt nach der Behandlung, sondern 15 min danach gemessen werden konnte. Akovah *et al.* zeigten, dass es innerhalb von 10 min nach der Behandlung mit Antibiotika zu einem vorübergehenden Anstieg von ATP kam, der mit der Induktion antioxidativer Gen-Regulons und einer Wachstumshemmung aufgrund einer Akkumulation von ATP durch die Hemmung von energieverbrauchenden Prozessen einhergeht. Dies könnte zu Nebenreaktionen führen, wie beispielsweise zur Bildung von intrazellulären ROS nach der Behandlung (Akhova und Tkachenko, 2014).

4.1.4 Intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies

Im weiteren Verlauf wurde daher eine Messung intrazellulärer ROS mittels H₂DCF-DA-Assay durchgeführt, einem nicht-fluoreszierenden Farbstoff, der in Gegenwart von intrazellulären ROS in den fluoreszierenden Farbstoff DCF umgewandelt wird.

Hier kam es in allen drei Bakterienspezies zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der DCF-Fluoreszenz 30 min nach aPDT und auch zu einem leichten Anstieg in den Dunkelkontrollen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls einen Anstieg der intrazellulären ROS in Bakterien nach aPDT mit Phenothiazinen zeigten (Misba et al., 2017; Parasuraman et al., 2019). Normalerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen der Bildung und dem Abbau intrazellulärer ROS. Wenn Zellen gestresst sind oder die Elektronentransportkette geschädigt ist, wird dieses Gleichgewicht gestört und vermehrt ROS gebildet, was wiederum zu sogenanntem oxidativem Stress führt. Oxidativer Stress kann im weiteren Verlauf zu einer nachfolgenden Schädigung von DNA, Lipiden oder Proteinen führen (Gonzalez-Flecha und Demple, 1995; Keyer und Imlay, 1996; Liang und Zhou, 2007). Darüber hinaus hemmt oxidativer Stress eher die bakterielle Replikation, als dass er die Bakterien direkt abtötet (Imlay, 2015). Folglich könnte die Bildung von intrazellulären ROS den in dieser Arbeit gefundenen Verlust der Replikationsfähigkeit nach der Behandlung mit aPDT erklären. Zudem wurde die Bildung der ROS 30 min nach der Behandlung mit CHX gemessen. Die Ergebnisse zeigten einen Anstieg der DCF-Fluoreszenz für *A. naeslundii* und *E. coli*. Dementsprechend berichteten Biswas et al., dass die Wirkungsweise von CHX nicht nur in der Schädigung der Bakterienmembran besteht, sondern auch in der Produktion von ROS (Biswas et al., 2019). Die Bildung von intrazellulären ROS nach der Behandlung könnte ein wichtiger Faktor sein, wenn es um die Entwicklung einer Toleranz geht. In diesem Zusammenhang kann die subletale Bildung von ROS zu einer Anpassung von Bakterienzellen an antimikrobielle Substanzen führen. Dies geschieht beispielsweise durch die Aktivierung allgemeiner Gene der Stressantwort wie dem rpoS-Gen-Regulon oder die Aktivierung von Genen, die für „Multidrug“-Efflux-Pumpen kodieren (Dodd et al., 2007; Fraud und Poole, 2011). Um den Einfluss der ROS auf die Replikationsfähigkeit zu untersuchen, wurden Antioxidantien während und nach der Behandlung mit aPDT und SAPYR auf die Biofilme von *E. coli* und *S. mutans* gegeben und die Effektivität dieser Behandlung mittels KBE-Assay ermittelt. Um zu überprüfen, ob es sich bei dem Typ von ROS um Singulett-Sauerstoff handelt, welcher für den Verlust der Replikationsfähigkeit nach aPDT im Biofilm verantwortlich ist, wurden spezifische Antioxidantien gewählt, die unterschiedliche ROS inhibieren. NAC diente dabei als Radikalfänger und Antioxidans für Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale und Superoxidanionen⁻ (Zhitkovich, 2019).

Es wird angenommen, dass die antioxidative Wirkung von NAC durch das Einbringen von Cystein in die Zelle und die damit verbundene Erhöhung des intrazellulären Glutathion-Spiegels resultiert (Cotgreave, 1997; Zafarullah et al., 2003; Ezeriņa et al., 2018). Bei Natriumpyruvat handelt es sich dagegen um ein Antioxidans, welches spezifisch bei der Neutralisation von H_2O_2 eine Rolle spielt (Giandomenico et al., 1997; Asmus et al., 2015). Die antioxidative Wirkung von Natriumpyruvat konnte bereits in mehreren Studien bestätigt werden (Giandomenico et al., 1997; Jagtap et al., 2003; Goswami et al., 2006; Wang et al., 2007). Beispielsweise konnte durch die Zugabe von 100 μ M Natriumpyruvat während einer 3- und 6-stündigen Bestrahlung (405 nm) von planktonisch wachsenden *S. epidermidis* eine signifikante Verringerung der antimikrobiellen Wirkung festgestellt werden (Ramakrishnan et al., 2016).

Für die Neutralisierung von Hydroxylradikalen wurde in der vorliegenden Arbeit D-Mannitol verwendet (Shen et al., 1997; Santos et al., 2012). In einer Studie von Sabbahi et al. wurde der Mechanismus der aPDT mit Methylenblau auf *S. aureus* unter Verwendung von Natriumazid zur Inaktivierung von Singulett-Sauerstoff und D-Mannitol als Radikalfänger freier Hydroxylradikale untersucht. Die Anwesenheit von Natriumazid und Tryptophan zeigte keinen Schutz vor der photodynamischen Aktivität. In Gegenwart von D-Mannitol wurde die antimikrobielle Wirkung der aPDT jedoch gehemmt, was darauf schließen ließ, dass die aPDT mit Methylenblau teilweise über einen Typ-I-Mechanismus erfolgt (Sabbahi et al., 2008). Die Zugabe von D-Mannitol konnte außerdem eine Verringerung von Schäden der DNA und von Proteinen in Bakterien nach UV-B-Exposition beobachtet werden (Santos et al., 2012).

In der selben Studie konnte auch gezeigt werden, dass die Zugabe von Natriumazid, welcher für die Inaktivierung von Singulett-Sauerstoff verwendet wird, zu einer Verringerung der antimikrobiellen Wirkung von UV-B durch den Schutz vor einer Lipidperoxidation führte (Santos et al., 2012). Auch in weiteren Studien konnte durch die Zugabe von Natriumazid eine Abnahme der Effektivität der aPDT gezeigt werden (Maisch et al., 2005; Tavares et al., 2011; Huang et al., 2012b). In der vorliegenden Arbeit führte der Einsatz von NAC, Natriumpyruvat und D-Mannitol während der Behandlung mit aPDT im Vergleich zur Behandlung ohne Einsatz der Antioxidantien zu einer Verringerung der antimikrobiellen Wirkung, wohingegen beim Einsatz von Natriumazid eine zusätzliche Reduktion der Zahl der KBE zu beobachten war.

Die Verstärkung der aPDT durch Zugabe von Natriumazid konnte ebenfalls in einer Studie von *Huang et al.* gezeigt werden, wobei aPDT mit Methylenblau und Natriumazid zu einer zusätzlichen Inaktivierung von 1 log₁₀-Stufe bei *E. coli* und *S. aureus* führte, was mit der Bildung von Azidradikalen begründet wurde (Huang et al., 2012a). Die Reduktion der antimikrobiellen Wirkung durch die Zugabe der Antioxidantien während der aPDT in der vorliegenden Arbeit könnte darauf hindeuten, dass die Produktion intrazellulärer ROS und die damit verbundene Schädigung intrazellulärer Strukturen bereits während der Behandlung stattfindet und nicht anschließend. Es könnte jedoch auch zur Neutralisierung der entstehenden ROS durch die aPDT außerhalb der Zelle kommen, wodurch es gar nicht erst zur Bildung intrazellulärer ROS kommt.

Zur Optimierung der Methodik könnten in zukünftigen Versuchen die Bakterien bereits mehrere Minuten vor der Behandlung mit aPDT mit den Antioxidantien inkubiert werden, um eine intrazelluläre Anreicherung und somit einen besseren Rückschluss auf die Inaktivierung intrazellulärer ROS zu ermöglichen (Santos et al., 2012). Außerdem könnte bei Zugabe von Antioxidantien neben der Untersuchung der KBE auch eine Untersuchung der Expression verschiedener Stressmarker mittels Western Blot oder qRT-PCR durchgeführt werden, um die Auswirkung der ROS auf molekularbiologischer Ebene zu ermitteln.

4.2 Molekulare Stressantwort planktonischer Kulturen nach Behandlung mit aPDT im Vergleich zu CHX

Zur Vorbereitung der Western Blot-Versuche von planktonisch wachsenden *E. coli*-Kulturen wurde zunächst eine subletale Konzentration nach aPDT mit SAPYR und nach Behandlung mit CHX mittels KBE-Assay bestimmt. Für die Untersuchung der Proteine KatG, DnaK, AtpB, GroEL, RecA und GapDH wurde schließlich eine Konzentration von 1 µM für SAPYR gewählt, da es unter dieser Bedingung zu einer Reduktion der Replikationsfähigkeit unter 1 log₁₀-Stufe kam und somit eine Änderung der Proteinexpression durch überlebende Bakterien gewährleistet war (Grinholc et al., 2015b). Für die genauere Untersuchung der Expression des Proteins RecA erfolgte die aPDT mit 0,25 µM, 0,5 µM und 1 µM SAPYR sowie die Messung der Expression nach 0,5 h, 1 h und 5 h. Für die Behandlung mit CHX wurden die Konzentrationen von 0,0125%, 0,025% und 0,05% gewählt. Im Western Blot wurde anschließend die Expression von KatG, DnaK und RecA nach 0 h und 0,5 h untersucht.

Aufgrund der Ergebnisse der Western Blot Analysen, wurde zur Untersuchung der Expression des Transkriptoms mittels RNA-Seq für die aPDT mit SAPYR eine Konzentration von 0,5 μ M und für die Behandlung mit CHX eine Konzentration von 0,0125% für *E. coli* und *S. mutans* gewählt. Die Proben wurden 0,5 h nach Behandlung geerntet, die RNA isoliert und sequenziert.

4.2.1 Molekulare Stressantwort bei *E. coli*

Zur Kontrolle wurde das Protein GapDH bereits in mehreren Studien als Ladekontrolle für eine gleichmäßige Proteinmenge verwendet (Yu et al., 2011; Wu et al., 2012; Nie et al., 2017). Jedoch zeigte sich in der vorliegenden Studie bei 1 h nach Behandlung mit aPDT eine höhere Expression des Proteins im Vergleich zum Zeitpunkt direkt nach Behandlung. Aus diesem Grund wurde als Kontrolle für die Proteinmenge die Darstellung der Ponceau-Färbung gewählt (Romero-Calvo et al., 2010).

Die Ergebnisse der Western Blot Analysen für die Proteinexpression von KatG, AtpB und DnaK nach aPDT zeigten keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. KatG zählt zu der Enzymklasse der Katalasen, die von dem Regulator OxyR in Folge einer intrazellulären Anhäufung von H_2O_2 aktiviert werden, welches dann durch KatG zu Acetat, O_2 und H_2O zersetzt wird (Schellhorn, 1995). Da es weder nach aPDT noch nach der Behandlung mit CHX zu einer erhöhten Expression von KatG kam, kann vermutet werden, dass intrazellulär keine erhöhte Menge an H_2O_2 gebildet wird.

Dies lässt sich zum einen auch durch die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung, bei der ebenfalls keine erhöhte Expressionsrate von *katG* gemessen wurde, bestätigen (Tabelle 27). Zum anderen wurde, wie bereits oben beschrieben, kein Effekt auf die Replikationsfähigkeit durch den Einsatz von Natriumpyruvat beobachtet, welches zur Inaktivierung von H_2O_2 verwendet wurde.

Bei dem Protein AtpB handelt es sich um die Untereinheit a des F_0 -Protonenkanals der ATP-Synthase, welches in der Zellmembran eingelagert ist (Nakanishi-Matsui et al., 2010; Nakanishi-Matsui et al., 2016). Nach der aPDT und der Behandlung mit CHX konnte sowohl bei der Proteinexpression von AtpB als auch bei der RNA-Seq keine signifikant veränderte Expressionsrate bei *atpB* gemessen werden. Jedoch zeigte sich eine Verringerung der Expressionsraten bei weiteren Untereinheiten der ATP-Synthase (*atpA*, *atpC*, *atpD*, *atpE*, *atpF*, *atpG*, *atpH*) um -1,2 bis -1,5 \log_2 FC im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Tabelle 27), was auf eine Verringerung der ATP-Synthese aufgrund der aPDT und der Behandlung mit CHX hindeuten kann.

Die Herunterregulation von Genen, welche eine Rolle bei der ATP-Synthese spielen, konnte auch in einer Studie von Jozefczuk *et. al.* nach Behandlung von *E. coli* mit verschiedenen Stressoren (Hitze, Kälte, oxidativer Stress, Laktose-Diauxie und stationäres Wachstum) festgestellt werden (Jozefczuk et al., 2010).

Bei DnaK handelt sich um ein Hitzeschockprotein (HSP70), welches zusammen mit dem Co-Chaperon DnaJ und dem Regulator GrpE eine wichtige Rolle bei der *De-Novo*-Proteinfaltung spielt (Hartl et al., 2011; Calloni et al., 2012). Winter *et. al.* konnten zeigen, dass es durch die Bildung von ROS zur schnellen Inaktivierung von DnaK kommt. Dies scheint durch einen Rückgang der intrazellulären ATP-Konzentration verursacht zu werden (Winter et al., 2005). Unter diesen ATP-limitierenden Bedingungen werden andere ATP-unabhängige Chaperone wie beispielsweise das Hitzeschockprotein (HSP) 33 aktiviert und übernehmen die Schutzfunktion des DnaK-Systems. Die Rückfaltung von Proteinen durch das DnaK-System ist mit der Wiederherstellung des Normalzustandes der Zelle verbunden, bei dem ATP wieder reichlich vorhanden ist und DnaK reaktiviert wird (Winter et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass es in der vorliegenden Arbeit durch die Bildung von ROS während der aPDT zu einer Inaktivierung von DnaK kommt. Ergebnisse der RNA-Seq zeigten außerdem eine erhöhte Expression des *hsjO*-Gens nach aPDT im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Tabelle 27), durch welches das HSP 33 exprimiert wird. Im Vergleich dazu zeigte sich eine Erhöhung der Expression von DnaK als Stressantwort auf die Behandlung mit CHX. Dies könnte daran liegen, dass die Menge an gebildeten ROS nicht so hoch ist, wie bei Bakterien, die mit aPDT behandelt wurden. Die Erhöhung der Expression nach Behandlung mit CHX könnte somit mit vermehrten falsch gefalteten Proteinen zusammenhängen (Rema et al., 2016).

Eine Stunde nach der Behandlung von *E. coli* mit aPDT konnte im Western Blot eine erhöhte Expression des Proteins RecA gezeigt werden. Dabei handelt es sich um ein Protein, welches unter anderem eine Rolle in der SOS-Antwort bei der DNA-Reparatur spielt (Kreuzer, 2013). Dies könnte darauf hindeuten, dass es während der aPDT zu einer Schädigung der DNA kommt. Um die Expression von RecA genauer zu untersuchen, wurden unterschiedliche Zeitpunkte (0,5 h, 1 h, 5 h) nach Behandlung sowie unterschiedliche Konzentrationen (0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M) getestet. Dabei konnte verdeutlicht werden, dass die Expression von RecA sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig ist.

Eine veränderte Regulation als Antwort auf aPDT konnte auch in anderen Studien nachgewiesen werden (Grinholc et al., 2015b; Rapacka-Zdonczyk et al., 2019; Pieranski et al., 2020). Die Gruppe von Grinholc konnte beispielsweise zeigen, dass es bei *Staphylococcus aureus* nach aPDT mit verschiedenen PS (MB, TMPyP, Bengalrosa, Toluidinblau und Zink-Phthalocyanin) zu DNA-Schäden und zur erhöhten Expression von *recA* und RecA kam. Da das Gen *recA* bei der RNA-Sequenzierung nicht detektiert wurde, erfolgte eine Messung der Genexpression mittels qRT-PCR. Diese zeigte keinen Anstieg der Expression auf Transkriptionsebene. Jedoch konnte anhand der RNA-Seq-Daten eine erhöhte Expression des Gens *recX* um 1,6 log₂ FC im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach aPDT beobachtet werden (Tabelle 27). Bei *recX* handelt es sich um einen Inhibitor des Gens *recA* (Stohl et al., 2003; Drees et al., 2004). Da zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte Menge an dem Protein RecA detektiert wurde, könnte diese Menge ausreichend für die Behebung der möglichen DNA-Schäden gewesen sein, was somit zur Inaktivierung der Expression des Gens *recA* durch *recX* führte. Eine zeitabhängige Untersuchung der Expression auf Transkriptom- sowie auf Proteinebene könnte hier zu mehr Aufschluss führen. Nach der Behandlung mit CHX konnte mittels Western Blot eine Verringerung der Proteinmenge von RecA beobachtet werden. Möglicherweise könnte es durch das Eindringen von CHX in die Zelle zur Präzipitation von Proteinen kommen, wodurch diese nicht mehr detektierbar sind (McDonnell und Russell, 1999; Cieplik et al., 2019). Ein weiterer Grund könnte das Ausbleiben von DNA-Schäden sein, weshalb die Expression des Proteins nicht notwendig ist.

Um die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung zusammenzufassen, wurden Pathway-Analysen durchgeführt. Diese Analysen geben Informationen zu den Pathways, welche durch aPDT oder die Behandlung mit CHX am stärksten reguliert wurden (Keseler et al., 2017; Karp et al., 2019). Die belichteten Kontrollen zeigten nach Behandlung keine signifikant erhöhte Genexpression. Bei der Inkubation der *E. coli*-Bakterien mit SAPYR im Dunkeln wurden insgesamt 412 Gene differenziell exprimiert. Dabei handelte es sich unter anderem um Gene, welche in der Antwort auf Säurestress eine Rolle spielen und beispielsweise für die Synthese der periplasmatischen Chaperone HdeA, HdeB, HdeC und HdeD exprimiert werden (Tabelle 25). Diese sind in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle herunterreguliert. Auch bei den Proben, welche mit aPDT und CHX behandelt wurden, konnte diese Beobachtung gemacht werden.

Da es in diesem Versuch bei den Proben, welche mit SAPYR ohne Bestrahlung behandelt wurden, zu keiner Verringerung der Replikationsfähigkeit kam (Daten nicht gezeigt), kann vermutet werden, dass die Herunterregulation der Gene mit dem Wechsel der Umgebung einhergeht. Die Bakterien wurden aus Übernachtskulturen geerntet, behandelt und für 30 min in frischem Medium inkubiert, was eine Änderung des pH-Werts des Mediums zur Folge hat. Dies wiederum beeinflusst die Regulation der periplasmatischen Chaperone, welche normalerweise bei saurem pH-Wert hochreguliert sind (Gajiwala und Burley, 2000; Kern et al., 2007). Des Weiteren waren auch die Decarboxylase-Gene *gadA*, *gadB* und *gadC* herunterreguliert, welche ebenfalls eine Rolle bei Säurestress spielen (De Biase et al., 1999) (Tabelle 25). Die Wachstumsphase der Bakterien ist daher für die Durchführung der Experimente und die Auswertung von Expressionsdaten von großer Bedeutung. Für weitere Versuche könnten demnach exponentiell- und stationär-wachsende Bakterien verglichen werden, um eine genauere Aussage über die molekulare Stressantwort treffen zu können.

Durch die Bindung antimikrobieller Substanzen wie SAPYR mit anschließender Bestrahlung und die Bindung von CHX an die bakterielle Membran, kann es dort zu einer Zerstörung von Lipiden oder auch Proteinen kommen. Bei den bereits oben beschriebenen durchflusszytometrischen Analysen konnten wir zeigen, dass es bei *E. coli* nach beiden Behandlungen zu einer Schädigung der bakteriellen Membran kommt. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung wider. Das am höchsten exprimierte Gen nach beiden Behandlungen war *cpxP*. Dabei handelt es sich um ein Gen, welches für die Synthese des periplasmatischen Chaperons CpxP kodiert und ebenfalls als Inhibitor von CpxA im Zweikomponenten-System CpxRA dient. CpxRA aktiviert bei veränderten Umgebungsbedingungen, wie beispielsweise alkalischen pH-Wert, fehlgefalteten Proteinen, Chloridionen oder antimikrobiellen Substanzen die Expression verschiedener Gene, welche bei der Faltung und Degradation geschädigter Proteine, dem Schutz der bakteriellen Membran, der Chemotaxis oder Biofilmbildung mitwirken (Raivio und Silhavy, 1997; Dorel et al., 1999; Dorel et al., 2006; Rowley et al., 2006; Macritchie und Raivio, 2009; Thede et al., 2011; Kamenšek und Žgur-Bertok, 2013; Raivio et al., 2013; Hews et al., 2019).

Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, welche eine Hochregulierung von Chaperonen (*ibpA*, *ipbB*, *clpB*, *hslO*, *spy*, *cspI*) und Biofilm-assoziierten Genen (*bdm*) sowie die Herunterregulierung von Genen, die mit Respiration, Fermentation und der Chemotaxis (*flg*-Gene) zusammenhängen, bestätigen (Tabelle 27). Diese Regulationen lassen vermuten, dass aPDT und die Behandlung mit CHX zu einer Aktivierung von CpxRA führen. In einer Studie von Coquet *et. al.* wurde jedoch festgestellt, dass es zu gegensätzlichen Ergebnissen nach Behandlung von *E. coli* mit CHX kommt. Demnach waren Gene, welche in der Cpx-Antwort involviert sind, herunterreguliert (Coquet et al., 2017). Ein Grund dafür könnten die unterschiedlich gewählten Bedingungen sein, da in der Studie von Coquet *et. al.* eine Konzentration gewählt wurde, welche eine Reduktion von 3 log₁₀-Stufen bewirkte und die Inkubationsdauer 24 h betrug (Coquet et al., 2017). Da in der vorliegenden Arbeit keine differenzielle Expression von *cpxA* und *cpxR* festgestellt wurde, kann es infolge der erhöhten Expression von *cpxP* zu einer Inhibition von CpxRA gekommen sein, da zu diesem Zeitpunkt bereits alle nötigen Anpassungsmechanismen aktiviert wurden. Ein weiterer Grund könnte sein, dass es nach Behandlung zur vermehrten Bildung von fehlgefalteten oder geschädigten Proteinen gekommen ist. Um dies genauer zu untersuchen, ist es notwendig, die Genexpression zu verschiedenen Zeitpunkten während und nach der Behandlung zu messen.

Das CpxRA-System wird nicht nur durch die bereits genannten Stressoren aktiviert, sondern auch durch den Abbau von Fettsäuren (Jaswal et al., 2020), welcher in der vorliegenden Arbeit erhöht ist. Der Abbau von Fettsäuren dient hauptsächlich zur Gewinnung von Energie und als Kohlenstoffquelle (Weeks et al., 1969; Agrawal et al., 2017). Dabei werden während des aeroben Stoffwechsels NADH und FADH₂ durch NADH-Dehydrogenasen (Ndh und Nuo) oder Succinat-Dehydrogenase (Sdh) oxidiert und die Elektronen auf den lipidlöslichen Elektronenträger Ubichinon übertragen. Die reduzierte Form von Ubichinon, Ubichinol, gibt die Elektronen an die terminalen Oxidasen Cytochrom bo (Cyo) und Cytochrom bd (Cyd) ab, die wiederum Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen und diesen zu einem Wassermolekül reduzieren. Während des Elektronenflusses durch die Elektronentransportkette erzeugen Nuo-, Cyo- und Cyd-Systeme einen Protonenfluss, der wiederum die Synthese von ATP durch die ATP-Synthase antreibt (Aussel et al., 2014; Unden et al., 2014; Agrawal et al., 2017).

In der vorliegenden Arbeit konnten erhöhte Expressionen bei den Ndh-, Sdh-, Cyo und Cyd-Systemen gemessen werden, jedoch eine verringerte Expression des Nuo-Systems und der ATP-Synthasen (Tabelle 27). Somit scheint es trotz dem Abbau von Fettsäuren nicht zur Gewinnung von ATP zu kommen. Dies könnte möglicherweise infolge einer Störung in der Elektronentransportkette kommen, welche durch die aPDT und die Behandlung mit CHX entsteht. Aufgrund dieser Beobachtung wäre auch hier eine Untersuchung im Zeitverlauf nach Behandlung sinnvoll, um den genauen Vorgang aufzuklären. Der Prozess des Fettsäureabbaus ist ebenfalls eine Quelle von ROS und fördert somit die Bildung von oxidativem Stress (Doi et al., 2014; Agrawal et al., 2017). Durch beide Behandlungen wurde das Zweikomponentensystems SoxRS hochreguliert, welches durch die Bildung von Superoxiden aktiviert wird (Greenberg et al., 1990). Das Protein SoxS aktiviert als Antwort auf ROS die Expression von mehr als 100 Genen, darunter auch die des Membranporins *ompF*, welches in der Literatur als „Multidrug“-Effluxpumpe diskutiert wird (Chou et al., 1993; Pomposiello et al., 2001).

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte L-Arginin-Biosynthese gemessen werden. Es wird vermutet, dass durch das Vorhandensein von L-Arginin die Synthese von Polyaminen erhöht wird, welche in vielen wichtigen physiologischen Prozessen, wie beispielsweise in der Biofilmbildung, in Virulenzmechanismen oder auch bei dem Schutz der Zelle vor ROS, eine wichtige Rolle übernehmen (Shah und Swiatlo, 2008; Lee et al., 2009; Barrientos-Moreno et al., 2019). In *Pseudomonas putida* ist L-Arginin außerdem eine Komponente der Pyoverdine, eine Gruppe der Siderophore, welche Eisen in der Zelle binden. Dadurch kommt es zur Verringerung der Fenton-Reaktion, bei der H_2O_2 durch die Katalyse von Eisensalzen in Hydroxylradikale umgewandelt wird (Barrientos-Moreno et al., 2019). Die Gruppe konnte zeigen, dass eine gestörte L-Arginin-Synthese zu einem Anstieg intrazellulärer ROS führte (Barrientos-Moreno et al., 2019).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sowohl nach aPDT als auch nach der Behandlung mit CHX zu einem Stress an der bakteriellen Membran kommt. Dabei wird vermutlich das Zweikomponenten-System CpxRA aktiviert, das Prozesse wie beispielweise die Reparatur von Proteinen, die Umstrukturierung der Membran, den Metabolismus, den Bewegungsapparat sowie die Biofilmbildung, beeinflusst.

Außerdem kommt es zu einem erhöhten Abbau von Fettsäuren, was die Bildung von intrazellulären ROS bestärken kann. Eine Zusammenfassung der Stressantwort ist in Abbildung 26 dargestellt.

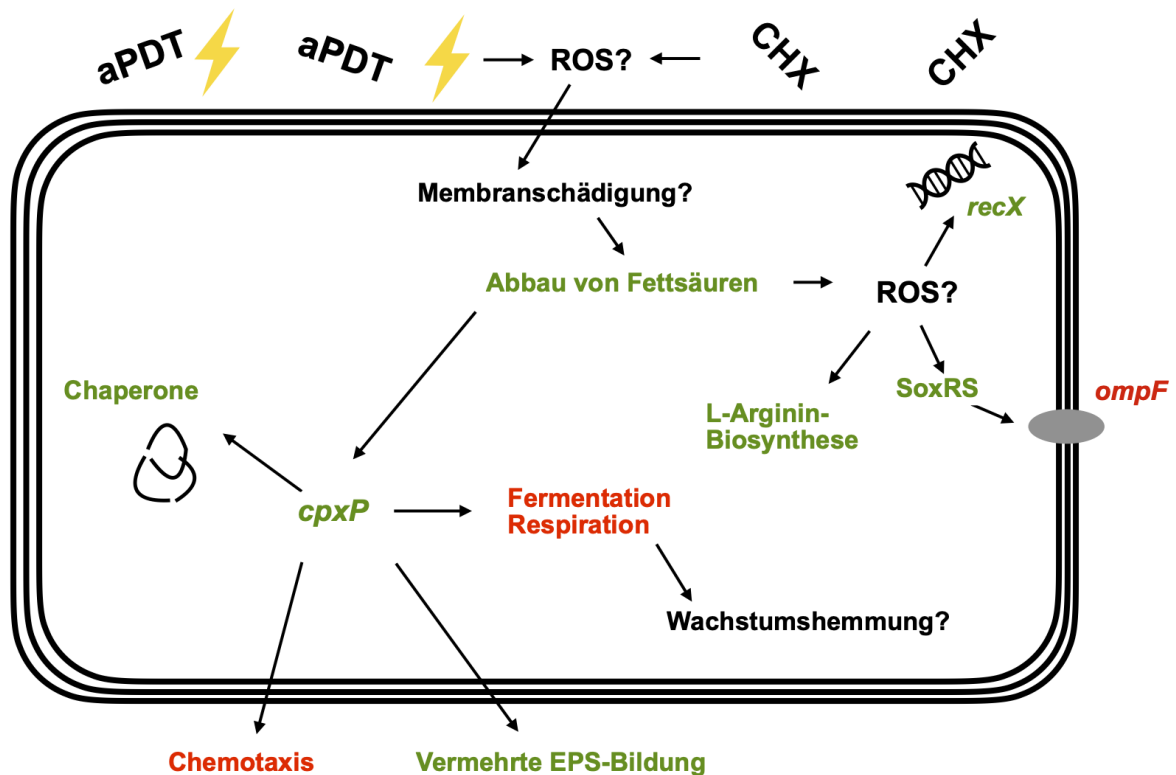


Abbildung 27: Schematische Darstellung einer möglichen Stressantwort bei *E. coli* auf aPDT oder CHX

Dargestellt sind die im Text beschriebenen Mechanismen als Antwort auf die aPDT und auf CHX. Grün: hochreguliert, Rot: herunterreguliert. Schwarze Pfeile stellen die Verbindung zwischen den einzelnen Mechanismen dar. *recX*: recA-Inhibitor, *ompF*: Membranporin, SoxRS: Transkriptionsregulator, *cpxP*: periplasmatisches Protein.

4.2.3 Molekulare Stressantwort bei *S. mutans*

Bei *S. mutans* zeigten die belichteten Kontrollen sowie die Bakterien, welche mit SAPYR im Dunkeln inkubiert wurden, keine signifikant erhöhte Genexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach Behandlung mit aPDT oder CHX kam es bei *S. mutans* im Gegensatz zu *E. coli* zu einer Erhöhung der Expression von Genen der Purin-Nukleotid-Synthese. Für die bakterielle Zelle dienen Purine in erster Linie der Zellteilung und der Synthese benötigter Energie und Kofaktoren (Pedley und Benkovic, 2017). Für die Bildung von Biofilmen werden Purine zum einen für die Produktion von extrazellulärer DNA benötigt (Thomas et al., 2008; Dengler et al., 2015), zum anderen werden aus Guanosinmonophosphat (GMP) und Adenosinmonophosphat (AMP) sekundäre Botenstoffe synthetisiert, welche darüber hinaus eine Rolle in der allgemeinen Stressantwort spielen (Fahmi et al., 2019). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Purin-Nukleotid-Biosynthese der am stärksten regulierte Pathway bei der Bildung von Biofilmen bei Gram-positiven Bakterien ist (Gélinas et al., 2020). In anderen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Purin-Nukleotid-Biosynthese und der Bildung von „Persister“-Bakterien und dem Auftreten von Antibiotikaresistenzen gefunden werden (Mongodin et al., 2003; Yee et al., 2015). Dies wird dadurch erklärt, dass es durch den Anstieg von Purinen zur Erhöhung der ATP-Konzentration kommt, was eine stärkere Ausbildung von Polymeren, wie zum Beispiel für den Aufbau der Peptidoglykanschicht, bewirkt (Mongodin et al., 2003).

Die aPDT und die Behandlung mit CHX resultierten in einer erhöhten Expression spezifischer Gene, welche für die Synthese der Enzyme Superoxidismutase (*sod*), Thioredoxin (*trxA*, *trxB*) und Peroxiredoxin (*tpx*, *ahpC*) und Alkylhydroperoxyreduktase (*ahpF*) exprimiert werden, was auf intrazellulären oxidativen Stress hindeutet (Kajfasz et al., 2017) (Tabelle 27). Aufgrund von oxidativem Stress kommt es häufig zur Schädigung von Proteinen oder der DNA (Cabiscol et al., 2000; Imlay, 2013). Einen Hinweis darauf gibt die erhöhte Expression von *groEL* und *groES*, welche Chaperone exprimieren und eines DNA-Schutz-Gens nach Behandlung mit aPDT oder CHX (Tabelle 27). Außerdem konnte eine erhöhte Expression von Genen der Clp-Proteasen beobachtet werden, welche eine große Rolle bei der dem Überleben der Zelle nach Stresseinwirkungen, wie beispielsweise Hitzeschock, Säurestress oder auch oxidativem Stress spielen (Lemos und Burne, 2002; Hou et al., 2014; Liu et al., 2015).

In einer Studie von Deng *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Gendeletion von *clpP* in *S. mutans* zu einer höheren Sensitivität gegenüber CHX führt (Deng et al., 2007). Zusätzlich konnte eine erhöhte Toleranz gegenüber H₂O₂ und CHX im Wildtyp-Stamm, jedoch nicht in der Knockout-Mutante festgestellt werden (Deng et al., 2007). Dementsprechend kann es auch die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Erhöhung der Regulation von Clp-Proteasen mit oxidativem Stress zusammenhängen. Nach der Behandlung mit aPDT kam es zusätzlich, wie schon bei *E. coli* beobachtet werden konnte, zu einer erhöhten L-Arginin-Biosynthese. Dies deutet darauf hin, dass es bei der aPDT im Vergleich zum CHX möglicherweise zu einer höheren Akkumulation von intrazellulären ROS kommt.

Nach der Behandlung mit CHX kam es zur Regulierung von ATP-bindenden Kassetten (ABC)-Transportern. Dabei handelt es sich um Transport-Systeme, die für die Aufnahme von beispielsweise Nährstoffen, Aminosäuren, Ionen oder Peptiden, und Abgabe von beispielsweise Lipiden, hydrophoben Substanzen oder Toxinen verantwortlich sind (Davidson et al., 2008). Zusätzlich spielen ABC-Transporter eine Rolle bei der DNA-Reparatur und der Translation von mRNA (Chakraborty, 2001; Goosen und Moolenaar, 2001). Die Regulation von ABC-Transportern wurde bereits in anderen Studien untersucht und in Verbindung mit der Bildung von Resistenzen gebracht (Reuter et al., 2003; Biswas und Biswas, 2011; Hassan et al., 2013; Liu et al., 2017a). Bei der Behandlung von *S. mutans* mit Methylviologen kam es zur Expression spezifischer ABC-Transporter, welche für erhöhte Toleranzen verantwortlich waren (Biswas und Biswas, 2011). In einer Studie von Lui *et al.* konnte außerdem gezeigt werden, dass es durch einen Knockout des Gens *ImrB*, welches für den ABC-Transporter LmrB exprimiert, zu einer verbesserten Biofilmbildung sowie einer höheren Resistenz gegenüber Säure, H₂O₂ und weiteren antimikrobiellen Substanzen gekommen ist (Liu et al., 2017b).

Eine weitere Gruppe von Transportern bildet das Phosphotransferase-System (PTS), welche in der vorliegenden Arbeit bei *S. mutans* nach der Behandlung mit CHX ebenfalls signifikant reguliert waren. Die Rolle dieser Transporter besteht hauptsächlich in der Aufnahme von Zuckerderivaten in die Zelle und deren Phosphorylierung (Vadeboncoeur und Pelletier, 1997; Deutscher et al., 2006). Die Regulierung des PTS kann demnach für den verringerten Laktose- und Galaktose-Abbau verantwortlich sein.

Zusätzlich kann sie ebenso mit der Hochregulierung der Glykan-Synthese in Zusammenhang stehen (Nobre dos Santos et al., 2002; Liu et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte diese Hochregulierung nach Behandlung mit CHX sowohl innerhalb als auch außerhalb der Bakterienmembran beobachtet werden. Die Akkumulation von intrazellulären Polysacchariden (IPS) kann durch Nährstoffmangel verstärkt werden und verhilft der Zelle zum Überleben, indem vermehrt „Persister“-Bakterien entstehen (Busuioc et al., 2009). Die Glykan-Synthese außerhalb der Zelle deutet auf die vermehrte Bildung von EPS hin, was zur Biofilmbildung führt (Colby und Russell, 1997). Die vermehrte Biofilmbildung nach Behandlung mit CHX konnte ebenfalls in einer Studie von Dong *et al.* nachgewiesen werden (Dong et al., 2012). Neben der Vermutung, dass die regulatorischen Änderungen der Genexpression aufgrund von oxidativem Stress geschehen, gibt es auch Hinweise auf einen intrazellulären Säurestress bei *S. mutans* nach Behandlung mit CHX, welcher durch den pH-Wert des Antiseptikums (5,5) erklärt werden kann. Um sich vor einem niedrigen pH-Wert zu schützen, versuchen orale Bakterien den intrazellulären pH-Wert durch Alkalisierung beizubehalten (Burne und Marquis, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde die Malatpermease (*mleP*), welche eine Rolle bei der malolaktischen Fermentation spielt, hochreguliert (Tabelle 27). Dabei wird L-Malat unter der Gewinnung von ATP und CO₂ zu L-Lactat umgewandelt, was zur Alkalisierung der Umgebung führt (Sheng und Marquis, 2007; Sheng et al., 2010). Außerdem konnten wir eine erhöhte Expression der Agmatin-Deiminase (*aguA*) feststellen (Tabelle 27). Bei Agmatin handelt es sich um ein decarboxyliertes Derivat von Arginin, welches durch die Zelle aufgenommen und über die AgDS abgebaut wird. Durch den Abbau entstehen ATP, CO₂ sowie NH₃, was schließlich zur Erhöhung des pH-Werts führt (Simon und Stalon, 1982; Griswold et al., 2006).

Zusammenfassend zeigte die Auswertung der RNA-Sequenzierung bei *S. mutans* nach aPDT eine erhöhte Expression von Genen, welche in Verbindung mit oxidativem Stress stehen. Dies stimmt mit den Ergebnissen der intrazellulären Bildung von ROS in *S. mutans*-Biofilmen überein. Auch nach Behandlung mit CHX kam es zur Expression dieser Gene. Biswas *et al.* konnten bereits zeigen, dass der membranschädigende Mechanismus von CHX in Verbindung mit der Bildung intrazellulärer ROS steht (Biswas et al., 2019). Nach Behandlung mit CHX kam es außerdem zur Regulation von Transportern und einer vermehrten Biofilmbildung, was, wie bereits beschrieben, eine Entwicklung von Resistenzen unterstützen könnte.

Durch den sauren pH-Wert von CHX, könnte es neben dem oxidativen Stress zu einem zusätzlichen Säurestress kommen. Weitere Untersuchungen der Genexpression sowie eine Messung des pH-Werts in den Bakterien nach Behandlung ist daher sinnvoll, um dieser Hypothese nachzugehen. Eine Zusammenfassung der Stressantwort von *S. mutans* auf die aPDT und auf CHX ist in Abbildung 27 dargestellt.

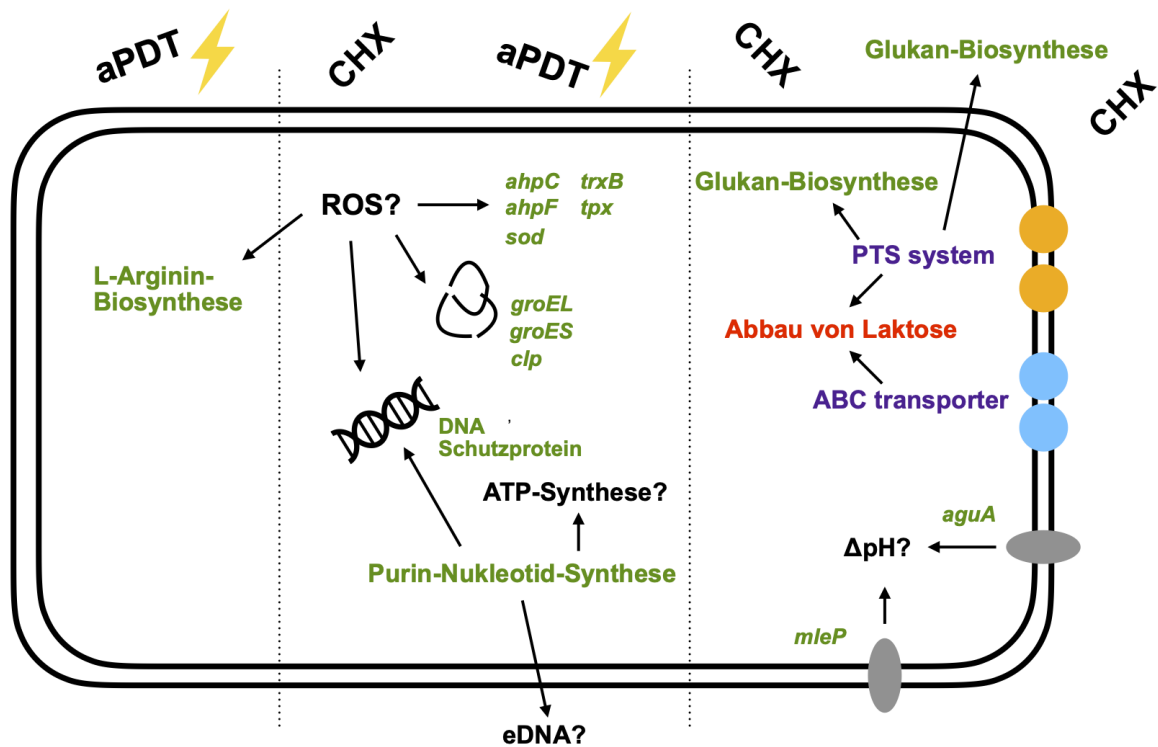


Abbildung 28: Schematische Darstellung einer möglichen Stressantwort bei *S. mutans* auf aPDT oder CHX

Dargestellt sind die im Text beschriebenen Mechanismen als Antwort auf die aPDT im linken und mittleren Abschnitt oder auf CHX im mittleren und rechten Abschnitt. Grün: hochreguliert, Rot: herunterreguliert, Violett: hoch- oder herunterreguliert. Schwarze Pfeile stellen die Verbindung zwischen den einzelnen Mechanismen dar. *aguA*: Agmatin-Deiminase, *mleP*: Malatpermease, *sod*: Superoxiddismutase, *ahp*: Alkylhydroperoxidreduktase, PTS: Phosphotransferase-System, ABC: ATP-bindende Kassette.

4.4 Toxizität der aPDT und von CHX gegenüber primären PDL-Zellen

Um die Toxizität der aPDT mit SAPYR und von CHX gegenüber primären PDL-Zellen zu untersuchen, wurde sowohl eine Messung der Zellviabilität mittels XTT-Assay durchgeführt als auch die Bestimmung der Biomasse mittels KVT-Assay. Die Werte des XTT-Assays wurden anschließend auf die Werte des KVT-Assays normiert.

Für die aPDT mit SAPYR und für CHX konnte nach Behandlung der PDL-Zellen eine konzentrations- und zeitabhängige Reduktion der Zellviabilität festgestellt werden. In einer früheren Studie kam es beim Einsatz von Konzentrationen zwischen 0 µM und 500 µM SAPYR auf NHEKs (Normale humane epidermale Keratinozyten) und einer gesamten Inkubations- und Bestrahlungsdauer von 70 Sekunden zu einer Reduktion von nur 20% der Zellviabilität (Muehler et al., 2017). Die Reduktion von 100% in der vorliegenden Arbeit könnte demnach durch die längeren Inkubationszeiten (5 min und 10 min plus 10 min Bestrahlung) erklärt werden, die ebenfalls für Inaktivierung von Biofilmen verwendet wurden.

Auch in anderen Studien wurde die Zytotoxizität der aPDT mit verschiedenen PS auf humane Zellen getestet (Zeina et al., 2002; Qiao et al., 2014; Grinholc et al., 2015a; Pourhajibagher et al., 2016). Bei der Untersuchung der Zytotoxizität eines Fulleren-Derivats auf Keratinozyten mittels MTT-Assay konnte eine Inaktivierung der Zellen um bis zu 80% (100 µM; 10 min Bestrahlung) festgestellt werden (Grinholc et al., 2015a). In einer Studie von Qiao *et al.* kam es nach Behandlung von PDL-Zellen mit 0,01% Methylenblau (60 s Bestrahlung) im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit sogar zu einem geringen Anstieg der Proliferation, was mittels MTT-Assay gemessen wurde (Qiao et al., 2014).

Auch die zytotoxische Wirkung von CHX wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht (Cline und Layman, 1992; Chang et al., 2001; Pourhajibagher et al., 2016), wobei es zu teils widersprüchlichen Ergebnissen kam. Pourhajibagher *et al.* zeigten keine Toxizität von CHX in Konzentrationen von 0,1% und 2% gegenüber Gingiva-Fibroblasten (Pourhajibagher et al., 2016). Andererseits wurde in humanen PDL-Zellen bei der Behandlung mit 0,0025% - 0,01% eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung festgestellt (Cline und Layman, 1992). Auch Chang *et al.* zeigten, dass die Behandlung mit CHX konzentrations- und zeitabhängig und mit der Hemmung der Proteinsynthese verbunden ist (Chang et al., 2001).

Beim Vergleich der Lösungsmittel PBS und Zellkulturmedium ist zu sehen, dass die Zellviabilität weniger stark reduziert war, wenn SAPYR und CHX in Medium und nicht in PBS gelöst wurden. Der Grund dafür könnten die vorhandenen Inhaltsstoffe im Zellkulturmedium, wie beispielsweise Ascorbinsäure oder fetales Kälberserum, sein, die die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies vermindern und deren Wirkung puffern (Hu et al., 2012; Mun et al., 2017).

Zusammenfassend spielt bei der Zytotoxizität der aPDT die Auswahl der Bedingungen wie Konzentration des PS, die Dauer der Bestrahlung sowie das Zellkulturmodell eine Rolle. Beispielsweise könnte in zukünftigen Experimenten die Verwendung eines dreidimensionalen (3D) Zellkulturmodells einen genaueren Einblick in die Wirkungsweise antimikrobieller Substanzen geben. 3D-Modelle stellen das natürliche Wachstum von Zellen dar und ermöglichen im Gegensatz zu zweidimensionalen Modellen mehr Zell-Zell-Kommunikation und eine höhere Resistenz gegenüber verschiedenen Substanzen (Imamura et al., 2015; Langhans, 2018; Jensen und Teng, 2020). Neben der Auswahl des Zellkulturmodells sollte zusätzlich auch eine Messung der Stoffwechselaktivität der behandelten Zellen nach einem gewissen Zeitraum von beispielsweise 24 oder 72 h stattfinden, um einen Rückschluss auf die Zytotoxizität zu ziehen (Qiao et al., 2014). Die gemessene Toxizität in der vorliegenden Arbeit sollte jedoch nicht unbeachtet bleiben und eine unbedenkliche Verwendung von SAPYR im medizinischen Bereich durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

4.5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zahlreiche Erkenntnisse über den Wirkmechanismus sowie die molekulare Stressantwort pathogener Bakterienspezies auf die aPDT mit dem PS SAPYR und der Behandlung mit CHX gewonnen. Durch weitere Versuche könnten diese Erkenntnisse vertieft werden.

Da in der vorliegenden Arbeit die einzelnen Parameter nur zu einem Zeitpunkt nach der Behandlung gemessen wurden, wäre es beispielsweise wichtig zu überprüfen, welche Rolle dieser Zeitpunkt der Messung spielt. Eine Idee wäre es, die Messungen zu mehreren Zeitpunkten durchzuführen, um den Wirkmechanismus und die molekulare Stressantwort im Zeitverlauf zu betrachten.

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem die molekulare Stressantwort ausschließlich in planktonisch wachsenden Bakterienkulturen untersucht. In Anbetracht der höheren Toleranzen gegenüber antimikrobiellen Substanzen in Biofilmen im Vergleich zu planktonisch wachsenden Kulturen, wäre zu untersuchen, welche Auswirkung die aPDT auf die molekulare Stressantwort in Biofilmen hat. Um tiefere Einblicke in die Stressantwort zu bekommen, wäre es sinnvoll, Überexpressions- oder Deletionsmutanten zu erstellen und eine mögliche Änderung der Sensitivität gegenüber der aPDT oder CHX zu untersuchen. Ein Beispiel hierfür wäre das Zweikomponenten-System CpxRA in *E. coli*, welches den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge einen Einfluss auf die Genexpression haben könnte.

Des Weiteren zeigten die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung die veränderte Regulation von Genen, welche eine Rolle in der Entwicklung von Resistenzen spielen. Daher sollte im nächsten Schritt eine wiederholte Exposition der Bakterien gegen die aPDT oder CHX durchgeführt und die Entstehung möglicher Resistenzen untersucht werden.

Die so gewonnenen Informationen über den Wirkmechanismus und die molekulare Stressantwort pathogener Bakterienspezies auf SAPYR könnten zur Entwicklung neuer PS sowie zur Vermeidung der Bildung von bakteriellen Resistenzen beitragen. Die in der vorliegenden Arbeit gemessene Toxizität der aPDT auf humane PDL-Zellen sollte im weiteren Verlauf in unterschiedlichen Zellkulturmodellen wie beispielsweise in *in vitro* 3D-Zellkulturen abgeklärt werden, um eine bedenkenlose medizinische Anwendung zu garantieren.

5 Zusammenfassung

Angesichts der zunehmenden Zahl bakterieller Resistenzen gegen Antibiotika ist es erforderlich, neue antimikrobielle Verfahren mit dem Ziel zu etablieren, die Anwendung systemischer wie auch lokaler Antibiotika so weit wie möglich ersetzen zu können. Eine vielversprechende Alternative hierbei stellt die antimikrobielle photodynamische Therapie (aPDT) dar. Frühere Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine neue Klasse von Photosensibilisatoren (PS), aus pflanzlichen Phytoalexinen synthetisierte Phenalen-1-on(PN)-Derivate, eine antimikrobielle Effektivität gegenüber planktonischen Kulturen und Biofilmen zeigt. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Wirkmechanismus und die Zielstrukturen der aPDT mit SAPYR als PS zu untersuchen.

Dazu wurden zunächst Monospezies-Biofilme von den Gram-positiven, zahnmedizinisch relevanten Bakterienspezies *Actinomyces naeslundii* und *Streptococcus mutans* sowie dem Gram-negativen Modellorganismus *Escherichia coli* kultiviert und anschließend mit aPDT und SAPYR in verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlichen Inkubationszeiten behandelt und anschließend bestrahlt. Die Negativkontrollen wurden mit H₂O behandelt. Als Positivkontrollen für eine Schädigung der bakteriellen Membran wurden das Antiseptikum Chlorhexidindigluconat und das Phenalen-1-on(PN)-Derivat SA-PN-05 verwendet. Die Replikationsfähigkeit der Bakterien nach aPDT wurde mit Hilfe eines KBE-Assays ermittelt. Die Integrität der Zytoplasmamembran wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von SYBR Green und Propidiumiodid gemessen und mit Hilfe der Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie visualisiert. Weiterhin wurden mit Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen die Stoffwechselaktivität sowie die Bildung und intrazellulärer ROS untersucht. Im weiteren Verlauf wurden Änderungen auf Protein- und Transkriptomebene mit Hilfe von Western Blot und RNA-Sequenzierung bei planktonisch wachsenden *E. coli*- und *S. mutans*-Kulturen nach aPDT und Behandlung mit CHX untersucht. Des Weiteren erfolgte eine Untersuchung der Toxizität der aPDT auf humane primäre PDL-Zellen mittels KVT und XTT-Assay.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Membranintegrität nach aPDT mit SAPYR mit verringerter Replikationsfähigkeit bei *E. coli*, nicht aber bei *S. mutans* und *A. naeslundii* abgenommen hat. Lumineszenz- und Fluoreszenzmessungen zeigten nach aPDT mit SAPYR, dass die Stoffwechselaktivität verringert und die Bildung intrazellulärer ROS in allen drei Bakterienspezies erhöht war.

Aufgrund dieser Ergebnisse ergab sich die Hypothese, dass es in Biofilmen durch die vermehrte Bildung intrazellulärer ROS zu einem Verlust der Replikationsfähigkeit nach aPDT mit SAPYR kommt. Eine weitere Untersuchung der Replikationsfähigkeit zeigte mit dem Einsatz spezifischer Antioxidantien während der aPDT eine geringe Zunahme der koloniebildenden Einheiten. Die Proteinexpressionsanalysen mit planktonischen *E. coli*-Kulturen ergaben eine erhöhte Expression des Proteins RecA, welches bei der Schädigung der DNA aktiviert wird. Die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung mit *E. coli* zeigten, dass es sowohl nach aPDT mit SAPYR als auch nach der Behandlung mit CHX zu einer veränderten Expression von Genen an der bakteriellen Membran kam. Außerdem kam es zu einem erhöhten Abbau von Fettsäuren, was die Bildung von intrazellulären ROS bestärken kann. Die Auswertung der RNA-Sequenzierung mit *S. mutans* nach aPDT mit SAPYR und Behandlung mit CHX ergab eine erhöhte Expression von Genen, welche in Verbindung mit oxidativem Stress stehen sowie von Genen, welche eine Rolle in der Biofilmbildung spielen. Nach der Behandlung mit CHX kam es außerdem zur Regulation des PTS-Systems und von ABC-Transportern sowie der erhöhten Expression von Genen, welche mit der Antwort auf Säurestress zusammenhängen. Die Untersuchung der Toxizität der aPDT mit SAPYR auf humane PDL-Zellen zeigte, dass die Stoffwechselaktivität der Zellen konzentrations- und zeitabhängig signifikant abgenommen hat. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen und verdeutlichen, dass die Aufklärung der Wirkmechanismen antimikrobieller Substanzen ebenso wichtig ist, wie die antimikrobielle Effektivität.

6 Anhang

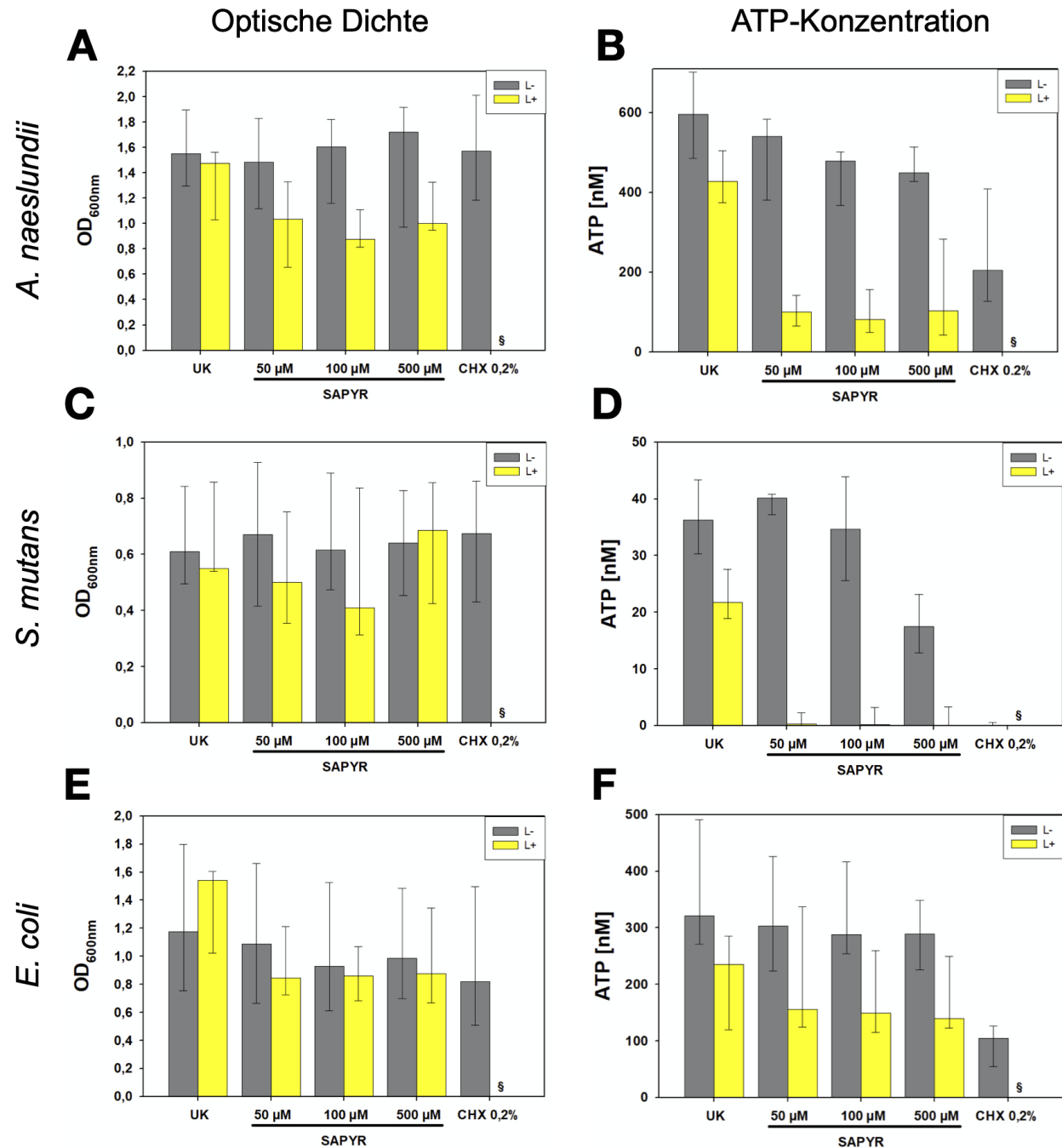


Abbildung 29: Messung der optischen Dichte (OD_{600nm}) und Lumineszenzmessungen von ATP-Konzentrationen nach aPDT mit SAPYR oder Behandlung mit CHX

Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Perzentil der mit SAPYR oder CHX behandelten Bakterien. **(A)** OD_{600nm} von *A. naeslundii* nach 20 min Inkubation. **(B)** ATP-Konzentration von *A. naeslundii* nach 20 min Inkubation **(C)** OD_{600nm} von *S. mutans* nach 5 min Inkubation. **(D)** ATP-Konzentration von *S. mutans* nach 5 min Inkubation **(E)** OD_{600nm} von *E. coli* nach 5 min Inkubation. **(F)** ATP-Konzentration von *E. coli* nach 5 min Inkubation. Gelbe Balken (L+) stellen Gruppen dar, die mit SAPYR behandelt und für 10 min bestrahlt wurden. Graue Balken (L-) stellen im Dunkeln inkubierte Kontrollen bzw. CHX dar. \$: nicht gemessen. n=4.

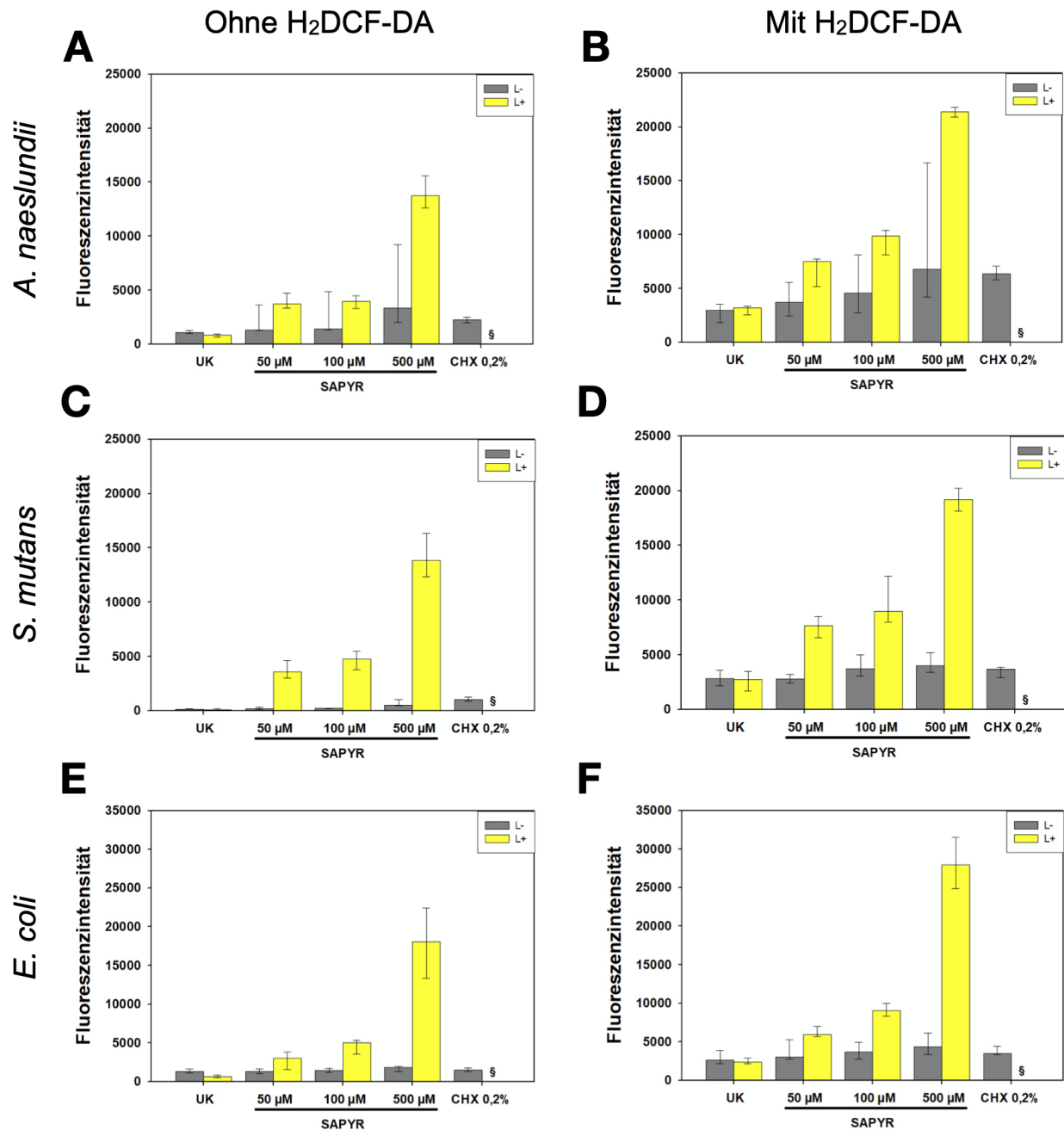


Abbildung 30: Auto- (ohne H₂DCF-DA) und DCF-Fluoreszenzmessungen (mit H₂DCF-DA) der Bildung von intrazellulären ROS nach aPDT SAPYR oder Behandlung mit CHX

Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Perzentil der mit SAPYR oder CHX behandelten Bakterien. **(A)** Autofluoreszenz von *A. naeslundii* nach 20 min Inkubation. **(B)** DCF-Fluoreszenz von *A. naeslundii* nach 20 min Inkubation. **(C)** Autofluoreszenz von *S. mutans* nach 5 min Inkubation. **(D)** DCF-Fluoreszenz von *S. mutans* nach 5 min Inkubation. **(E)** Autofluoreszenz von *E. coli* nach 5 min Inkubation. **(F)** DCF-Fluoreszenz von *E. coli* nach 5 min Inkubation. Gelbe Balken (L+) stellen Gruppen dar, die mit aPDT behandelt und für 10 min bestrahlt wurden. Graue Balken (L-) stellen im Dunkeln inkubierte Kontrollen bzw. CHX dar. §: nicht gemessen. n=6.

Tabelle 24: Differenziell exprimierte Gene in *E. coli* nach Behandlung mit Bestrahlung

Fold Changes (**FC**) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Gene sind sortiert nach dem niedrigsten bis höchsten Log₂ FC. *p*_{adj}: adjustierter p-Wert mittels Benjamini und Hochberg-Korrektur. -: herunterreguliert.

Genname	Produkt	Log ₂ FC	<i>p</i> _{adj}
<i>sbp</i>	Sulfat/Thiosulfat-ABC-Transporter	-2,7	0,03
<i>cbl</i>	DNA-bindender Transkriptionsaktivator	-2,5	0,03
<i>fliY</i>	Cystein-ABC-Transporter	-1,8	0,03
<i>argO</i>	L-Arginin-Exporter	-1,1	0,01

Tabelle 25: Top 20 differenziell exprimierte Gene in *E. coli* nach Behandlung mit SAPYR ohne Bestrahlung

Fold Changes (**FC**) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Gene sind sortiert nach dem niedrigsten bis höchsten *p*_{adj} und Log₂ FC. *p*_{adj}: adjustierter p-Wert mittels Benjamini und Hochberg-Korrektur. -: herunterreguliert.

Genname	Produkt	Log ₂ FC	<i>p</i> _{adj}
<i>gadB</i>	Glutamat-Decarboxylase B	-5,2	0,00
<i>slp</i>	Lipoprotein (Nährstoffmangel)	-4,9	0,00
<i>gadC</i>	L-Glutamat:4-aminobutyrat-Antiporter	-4,8	0,00
<i>gadA</i>	Glutamat-Decarboxylase A	-4,8	0,00
<i>hdeD</i>	Periplasmatisches Säurestress-Chaperon	-4,4	0,00
<i>hdeB</i>	Periplasmatisches Säurestress-Chaperon	-4,0	0,00
<i>hdeA</i>	Periplasmatisches Säurestress-Chaperon	-3,8	0,00
<i>yhiD</i>	Protein der inneren Membran	-3,7	0,00
<i>hyaB</i>	Hydrogenase 1	-3,5	0,00
<i>mdtE</i>	Multidrug-Effluxpumpe	-3,5	0,00
<i>hyaA</i>	Hydrogenase 1	-3,3	0,00
<i>raiA</i>	Ribosom-Inhibitor	-3,2	0,00
<i>mdtF</i>	Multidrug-Effluxpumpe	-3,0	0,00
<i>appC</i>	Cytochrom- <i>bdlI</i> -ubiquinol-oxidase	-3,0	0,00
<i>glsA</i>	Glutaminase 1	-2,9	0,00
<i>hyaC</i>	Hydrogenase 1	-2,9	0,00
<i>adiC</i>	Arginin-Agmatin-Antiporter	-2,7	0,00
<i>hyaF</i>	Hydrogenase 1	-2,6	0,00
<i>appB</i>	Cytochrom- <i>bdlI</i> -ubiquinol-oxidase	-2,5	0,00
<i>hyaE</i>	Chaperon	-2,4	0,00

Tabelle 26: Differenziell exprimierte Gene in *S. mutans* nach Behandlung mit Bestrahlung

Fold Changes (**FC**) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. *p*_{adj}: adjustierter p-Wert mittels Benjamini und Hochberg-Korrektur.

Ensembl-ID	Produkt	Log ₂ FC	<i>p</i> _{adj}
D820_RS08330	Hypothetisches Protein	1,1	0,01

Tabelle 27: Ergänzende Übersicht spezifischer Gene von *E. coli* und *S. mutans* mit den dazugehörigen Fold Changes nach aPDT und Behandlung mit CHX im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen

Übersicht über spezifische Gene, welche für die Diskussion der Ergebnisse herangezogen wurden. Fold Changes (FC) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. p_{adj} : adjustierter p-Wert mittels Benjamini und Hochberg-Korrektur. L+: belichtet, L-: unbelichtet, -: herunterreguliert. n.a.: nicht angegeben. *: aufgrund zu weniger *reads* nicht angegeben.

Organismus	Ensembl-ID	Genname	Produkt	CHX		Kontrolle L+		SAYPR L+		SAYPR L-	
				Log ₂ FC	p_{adj}	Log ₂ FC	p_{adj}	Log ₂ FC	p_{adj}	Log ₂ FC	p_{adj}
<i>E. coli</i>	ECDH10B_3921	<i>atpA</i>	ATP-Synthase	-1,5	0,00	-0,2	0,71	-1,4	0,00	-0,1	0,67
	ECDH10B_3925	<i>atpB</i>	ATP-Synthase	-0,1	0,57	-0,1	0,81	-0,5	0,00	-0,2	0,37
	ECDH10B_3918	<i>atpC</i>	ATP-Synthase	-1,4	0,00	0,0	1,00	-1,4	0,00	0,1	0,88
	ECDH10B_3919	<i>atpD</i>	ATP-Synthase	-1,5	0,00	-0,1	0,85	-1,5	0,00	0,0	0,95
	ECDH10B_3924	<i>atpE</i>	ATP-Synthase	-1,2	0,00	-0,2	0,65	-1,3	0,00	-0,3	0,27
	ECDH10B_3923	<i>atpF</i>	ATP-Synthase	-1,1	0,00	-0,2	0,69	-1,3	0,00	-0,2	0,55
	ECDH10B_3920	<i>atpG</i>	ATP-Synthase	-1,6	0,00	-0,2	0,72	-1,5	0,00	-0,1	0,78
	ECDH10B_3922	<i>atpH</i>	ATP-Synthase	-1,1	0,00	-0,1	0,86	-1,2	0,00	0,1	0,78
	ECDH10B_3926	<i>atpI</i>	ATP-Synthase	1,7	0,00	0,2	0,79	0,6	0,04	0,6	0,11
	ECDH10B_1612	<i>bdm</i>	Biofilm-abhängiges Modulationsprotein	1,6	0,03	0,4	*	2,3	0,00	-0,2	0,93
	ECDH10B_2760	<i>clpB</i>	ClpB80	1,7	0,00	-0,5	0,23	1,7	0,00	-2,0	0,00
	ECDH10B_1684	<i>cspl</i>	Kälteschockprotein Cspl	4,6	0,00	-0,6	*	3,3	0,00	-2,4	0,07
	ECDH10B_0956	<i>cydC</i>	Glutathion-L-cystein ABC Exporter CydDC	0,3	0,10	0,1	0,79	0,6	0,00	0,5	0,01
	ECDH10B_0957	<i>cydD</i>	Glutathion-L-cystein ABC Exporter CydDC	1,2	0,00	0,4	0,12	1,0	0,00	0,6	0,00
	ECDH10B_0388	<i>cyoA</i>	Cytochrom- <i>bo</i> ₃ -ubiquinol-oxidase	1,7	0,00	-0,3	0,69	2,0	0,00	0,5	0,27
	ECDH10B_0387	<i>cyoB</i>	Cytochrom- <i>bo</i> ₃ -ubiquinol-oxidase	1,3	0,00	-0,2	0,71	1,5	0,00	1,0	0,00
	ECDH10B_0386	<i>cyoC</i>	Cytochrom- <i>bo</i> ₃ -ubiquinol-oxidase	0,9	0,00	-0,3	0,50	1,3	0,00	0,8	0,00
	ECDH10B_0385	<i>cyoD</i>	Cytochrom- <i>bo</i> ₃ -ubiquinol-oxidase	0,9	0,00	0,0	0,94	1,5	0,00	1,1	0,00
	ECDH10B_0384	<i>cyoE</i>	Häm-o-synthase	1,1	0,00	-0,1	0,85	1,4	0,00	0,7	0,00

ECDH10B_1143	<i>flgA</i>	Flagellum	-2,7	0,00	0,6	0,35	-2,8	0,00	0,5	0,33
ECDH10B_1144	<i>flgB</i>	Flagellum	-5,2	0,00	0,4	0,65	-4,4	0,00	-0,1	0,92
ECDH10B_1145	<i>flgC</i>	Flagellum	-5,5	0,00	0,3	0,72	-4,6	0,00	0,0	1,00
ECDH10B_1146	<i>flgD</i>	Flagellum	-4,3	0,00	0,3	0,69	-4,3	0,00	-0,2	0,78
ECDH10B_1147	<i>flgE</i>	Flagellum	-4,7	0,00	0,3	0,77	-4,4	0,00	-0,4	0,40
ECDH10B_1148	<i>flgF</i>	Flagellum	-4,3	0,00	0,3	0,73	-3,9	0,00	-0,1	0,93
ECDH10B_1149	<i>flgG</i>	Flagellum	-3,7	0,00	0,5	0,55	-3,5	0,00	-0,1	0,94
ECDH10B_1150	<i>flgH</i>	Flagellum	-3,2	0,00	0,4	0,66	-3,2	0,00	-0,2	0,75
ECDH10B_1151	<i>flgI</i>	Flagellum	-2,9	0,00	0,4	0,61	-2,4	0,00	-0,4	0,42
ECDH10B_1152	<i>flgJ</i>	Peptidoglykan-hydrolase FlgJ	-2,3	0,00	0,5	0,46	-2,0	0,00	0,0	0,98
ECDH10B_1153	<i>flgK</i>	Flagellum	-1,8	0,00	0,4	0,63	-1,4	0,00	-0,3	0,60
ECDH10B_1154	<i>flgL</i>	Flagellum	-1,8	0,00	0,1	0,94	-1,5	0,00	-0,9	0,01
ECDH10B_1142	<i>flgM</i>	Anti-Sigmafaktor für FliA	-2,0	0,00	0,4	0,45	-2,0	0,00	0,2	0,57
ECDH10B_1141	<i>flgN</i>	Flagellum	-1,3	0,00	0,1	0,86	-1,1	0,00	0,1	0,84
ECDH10B_3576	<i>hslO</i>	Chaperon Hsp33	3,8	0,00	0,2	0,30	4,0	0,00	0,0	0,93
ECDH10B_3873	<i>ibpA</i>	kleines Hitzeschockprotein IbpA	3,1	0,00	-0,6	0,21	3,6	0,00	-1,7	0,00
ECDH10B_3872	<i>ibpB</i>	kleines Hitzeschockprotein IbpB	4,6	0,00	-0,5	0,34	5,5	0,00	-1,1	0,00
ECDH10B_4131	<i>katG</i>	Katalase, Hydroperoxidase	-1,9	0,00	0,5	0,30	-1,5	0,00	0,1	0,88
ECDH10B_1181	<i>ndh</i>	NADH:quinon- oxidoreduktase II	2,6	0,00	1,0	0,06	2,4	0,00	1,0	0,00
ECDH10B_2450	<i>nuoA</i>	NADH:quinon- oxidoreduktase II	-1,0	0,00	0,0	0,98	-0,6	0,06	-0,1	0,93
ECDH10B_2449	<i>nuoB</i>	NADH:quinon- oxidoreduktase II	-1,8	0,00	-0,1	0,94	-1,1	0,00	-0,1	0,89
ECDH10B_2448	<i>nuoC</i>	NADH:quinon- oxidoreduktase II	-1,8	0,00	0,1	0,89	-1,1	0,00	0,4	0,44
ECDH10B_2447	<i>nuoE</i>	NADH:quinon- oxidoreduktase II	-2,0	0,00	0,2	0,85	-1,3	0,00	0,4	0,40
ECDH10B_2446	<i>nuoF</i>	NADH:quinon- oxidoreduktase II	-2,0	0,00	0,1	0,95	-1,4	0,00	0,3	0,53

ECDH10B_2445	<i>nuoG</i>	NADH:quinon-oxidoreduktase II	-2,1	0,00	0,1	0,88	-1,4	0,00	0,4	0,40
ECDH10B_2444	<i>nuoH</i>	NADH:quinon-oxidoreduktase II	-2,0	0,00	0,2	0,80	-1,4	0,00	0,5	0,26
ECDH10B_2443	<i>nuoI</i>	NADH:quinon-oxidoreduktase II	-2,2	0,00	0,1	0,85	-1,5	0,00	0,3	0,48
ECDH10B_2442	<i>nuoJ</i>	NADH:quinon-oxidoreduktase II	-2,1	0,00	0,1	0,90	-1,5	0,00	0,3	0,57
ECDH10B_2441	<i>nuoK</i>	NADH:quinon-oxidoreduktase II	-2,0	0,00	0,0	0,97	-1,2	0,00	0,2	0,61
ECDH10B_2440	<i>nuoL</i>	NADH:quinon-oxidoreduktase II	-1,9	0,00	0,3	0,70	-1,3	0,00	0,6	0,13
ECDH10B_2439	<i>nuoM</i>	NADH:quinon-oxidoreduktase II	-2,4	0,00	0,2	0,79	-1,6	0,00	0,4	0,40
ECDH10B_2438	<i>nuoN</i>	NADH:quinon-oxidoreduktase II	-2,4	0,00	0,3	0,67	-1,6	0,00	0,6	0,22
ECDH10B_0999	<i>ompF</i>	Membranporin OmpF	-1,0	0,00	-0,3	0,66	-1,0	0,00	-0,1	0,79
ECDH10B_2866	<i>recX</i>	RecA Inhibitor RecX	1,6	0,00	0,2	0,73	1,2	0,00	0,3	0,29
ECDH10B_0790	<i>sdhA</i>	Succinat:quinon-oxidoreduktase Subcomplex	2,3	0,00	-0,1	0,81	1,9	0,00	0,1	0,90
ECDH10B_0791	<i>sdhB</i>	Succinat:quinon-oxidoreduktase Subcomplex	2,0	0,00	-0,2	0,72	1,7	0,00	-0,3	0,40
ECDH10B_0788	<i>sdhC</i>	Succinat:quinon-oxidoreduktase Subcomplex	3,3	0,00	0,0	*	2,6	0,00	-0,2	0,77
ECDH10B_0789	<i>sdhD</i>	Succinat:quinon-oxidoreduktase Subcomplex	2,8	0,00	-0,3	*	2,2	0,00	-0,4	0,69
ECDH10B_4252	<i>soxR</i>	DNA-bindender Transkriptionsregulator SoxR	2,2	0,00	-0,1	0,90	1,4	0,00	-0,1	0,91

	ECDH10B_4251	<i>soxS</i>	DNA-bindender Transkriptionsregulator SoxS	2,8	0,00	0,0	0,99	3,3	0,00	-0,5	0,60
<i>S. mutans</i>	D820_RS06120	<i>ahpC</i>	Peroxiredoxin	1,1	0,00	0,6	1,00	1,3	0,00	0,0	1,00
		<i>ahpF</i>	Alkyl- hydroperoxidreduktase Untereinheit F	1,8	0,00	0,3	1,00	1,3	0,00	0,0	1,00
	D820_RS06115										
	D820_RS06685	<i>sod</i>	Superoxiddismutase	1,6	0,00	0,6	1,00	1,4	0,01	0,1	1,00
	D820_RS01300	<i>trxA</i>	Thioredoxin	0,2	0,80	0,1	1,00	1,6	0,07	0,0	1,00
	D820_RS07435	<i>trxB</i>	Thioredoxin- disulfidreduktase	1,1	0,01	0,2	1,00	1,6	0,00	0,1	1,00
	D820_RS05415	<i>tpx</i>	2-Cys-peroxiredoxin	1,0	0,02	0,5	1,00	1,2	0,03	0,2	1,00
	D820_RS07050	n.a.	DNA Schutzprotein	1,9	0,00	0,4	1,00	1,6	0,00	0,1	1,00
	D820_RS00990	<i>groES</i>	Co-Chaperon GroES	1,1	0,00	0,2	1,00	0,9	0,01	0,0	1,00
	D820_RS00995	<i>groEL</i>	Chaperon GroEL	1,5	0,00	0,0	1,00	1,2	0,00	0,0	1,00
	D820_RS08310	<i>aguA</i>	Agmatin-deiminase	1,3	0,00	0,6	1,00	0,4	0,34	0,2	1,00
	D820_RS08960	<i>mleP</i>	Malatpermease	3,8	0,00	-0,2	1,00	0,9	0,06	0,2	1,00

6.1 Abkürzungsverzeichnis

®	Registered Trade Mark
TM	Trademark
©	Copyright
%	Prozent
°C	Grad Celsius
AG	Aktiengesellschaft
aPDT	Antimikrobielle photodynamische Therapie
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
CHX	Chlorhexidindigluconat
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
em	Emission
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Fötale bovines Serum
FL	Fluoreszenz
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
H ₂ O	Demineralisiertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
J	Joule
KBE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
kHz	Kilohertz
kV	Kilovolt
Log ₁₀	Dekadischer Logarithmus
M	Molar
mA	Milliamper
mFUM	Modified Fluid Universal Medium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

mM	Millimolar
mm	Millimeter
KVT	Kristallviolett
mW	Milliwatt
n	Anzahl der Stichproben (Versuche)
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pH	pondus Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PS	Photosensibilisator
qRT-PCR	Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction
rATP	ATP-Standard
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region Of Interest
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RTF	Reduced Transport Fluid
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SG	SYBR Green
SSC	Side Scatter
TBS	Tris-gepufferte Sälzlösung
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TSB	Trypton-Soja-Bouillon
v/v	Volumen/Volumen
XTT	Na-3,3'-[1-(phenylamino)carbonyl-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitrobenzol)-sulfonsäurehydrat
α	Signifikanzniveau
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bildung von Biofilmen	2
Abbildung 2: Vorhersage über Anzahl der Todesfälle aufgrund von AMR im Vergleich zu anderen Erkrankungen oder Risiken, entnommen aus (O'Neill, 2016).....	4
Abbildung 3: Strukturformel von Chlorhedixindigluconat, entnommen aus (Muehler et al., 2020)	5
Abbildung 4: Modifiziertes Jablonski-Diagramm, modifiziert nach (Cieplik et al., 2018a)	7
Abbildung 5: Strukturformeln von (A) SAPYR und (B) SA-PN-05, entnommen aus (Muehler et al., 2020)	9
Abbildung 6: Aufbau des Transfers	31
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Ablaufs der bioinformatischen Auswertung der RNA-Sequenzierung	34
Abbildung 8: Antimikrobielle Effektivität von aPDT mit SAPYR oder SA-PN-05 und von CHX gegenüber Biofilmen von <i>A. naeslundii</i> , <i>S. mutans</i> und <i>E. coli</i>	42
Abbildung 9: Durchflusszytometrische Messungen der Membranintegrität nach aPDT unter Verwendung von SAPYR oder SA-PN-05 und nach Behandlung mit CHX	45
Abbildung 10: Visualisierung von Monospezies-Biofilmen mit Rasterelektronenmikroskopie.....	48
Abbildung 11: Visualisierung von Zellen in einem Biofilm einzelner Bakterienspezies mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	49
Abbildung 12: ATP-Konzentrationen nach aPDT mit SAPYR oder Behandlung mit CHX	51
Abbildung 13: Fluoreszenzmessungen der Bildung von intrazellulären ROS nach aPDT mit SAPYR oder Behandlung mit CHX	52
Abbildung 14: 100%-Werte der KBE von <i>E. coli</i> und <i>S. mutans</i> für die eingesetzten Antioxidantien	53
Abbildung 15: KBE von <i>E. coli</i> und <i>S. mutans</i> nach Zugabe von N-Acetylcystein (NAC) vor und nach Behandlung mit aPDT mit SAPYR	54

Abbildung 16: KBE von <i>E. coli</i> und <i>S. mutans</i> nach Zugabe von Natriumpyruvat vor und nach Behandlung mit aPDT mit SAPYR	55
Abbildung 17: KBE von <i>E. coli</i> und <i>S. mutans</i> nach Zugabe von D-Mannitol vor und nach Behandlung mit aPDT mit SAPYR	56
Abbildung 18: KBE von <i>E. coli</i> und <i>S. mutans</i> nach Zugabe von Natriumazid vor und nach Behandlung mit aPDT mit SAPYR	57
Abbildung 19: Reduktion der KBE planktonischer Kulturen von <i>E. coli</i> und <i>S. mutans</i> nach aPDT mit SAPYR und nach Behandlung mit CHX	58
Abbildung 20: Änderung der Proteinexpression von KatG, AtpB, DnaK, RecA und GapDH nach Behandlung planktonischer Kulturen von <i>E. coli</i> mit aPDT und SAPYR.....	59
Abbildung 21: Änderung der Proteinexpression von RecA nach Behandlung planktonischer Kulturen von <i>E. coli</i> mit aPDT und SAPYR	60
Abbildung 22: Änderung der Proteinexpression von KatG, DnaK und RecA nach Behandlung planktonischer Kulturen von <i>E. coli</i> mit CHX.....	61
Abbildung 23: (A) Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung bei <i>E. coli</i> . (B) Heatmap der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung bei <i>E. coli</i>	63
Abbildung 24: (A) Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung bei <i>S. mutans</i> . (B) Heatmap der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung bei <i>S. mutans</i>	66
Abbildung 25: Zellviabilität nach aPDT und SAPYR mit 5 min Inkubation und 10 min Bestrahlung und nach Behandlung mit CHX mit 5 min Inkubation.....	71
Abbildung 26: Zellviabilität nach aPDT und SAPYR für 10 min Inkubation und 10 min Bestrahlung und nach Behandlung mit CHX mit 10 min Inkubation.....	72
Abbildung 27: Schematische Darstellung einer möglichen Stressantwort bei <i>E. coli</i> auf aPDT oder CHX	87
Abbildung 28: Schematische Darstellung einer möglichen Stressantwort bei <i>S. mutans</i> auf aPDT oder CHX	91

Abbildung 29: Messung der optischen Dichte (OD_{600nm}) und Lumineszenzmessungen von ATP-Konzentrationen nach aPDT mit SAPYR oder Behandlung mit CHX	97
Abbildung 30: Auto- (ohne $H_2DCF-DA$) und DCF-Fluoreszenzmessungen (mit $H_2DCF-DA$) der Bildung von intrazellulären ROS nach aPDT SAPYR oder Behandlung mit CHX.....	98

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	12
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	13
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	13
Tabelle 4: Verwendete Kits.....	15
Tabelle 5: Verwendete Software.....	15
Tabelle 6: Verwendete Bakterienspezies.....	16
Tabelle 7: Primerpaare für qRT-PCR	21
Tabelle 8: Primäre Antikörper für Western Blot.....	22
Tabelle 9: Sekundäre Antikörper für Western Blot.....	22
Tabelle 10: Medien für <i>A. naeslundii</i> , <i>E. coli</i> und <i>S. mutans</i>	23
Tabelle 11: Verwendete Antioxidantien und eingesetzte Konzentrationen	28
Tabelle 12: Log ₁₀ -Stufen Reduktion nach aPDT mit SAPYR oder SA-PN-05 und nach Behandlung mit CHX gegenüber Biofilmen von <i>A. naeslundii</i> , <i>S. mutans</i> und <i>E. coli</i>	41
Tabelle 13: Anzahl der differentiell exprimierten Gene der behandelten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe in <i>E. coli</i>	64
Tabelle 14: Ergebnisse der Pathway-Analyse mit differentiell exprimierten Genen in <i>E. coli</i> behandelt mit aPDT und SAPYR oder CHX	64
Tabelle 15: Top 20 differentiell exprimierte Gene in <i>E. coli</i> nach Behandlung mit aPDT und SAPYR.....	64
Tabelle 16: Top 20 differentiell exprimierte Gene in <i>E. coli</i> nach Behandlung mit CHX	65
Tabelle 17: Anzahl der differentiell exprimierten Gene der behandelten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe in <i>S. mutans</i>	67
Tabelle 18: Ergebnisse der Pathway-Analyse mit differentiell exprimierten Genen in <i>S. mutans</i> behandelt mit aPDT und SAPYR oder CHX	67
Tabelle 19: Top 20 differentiell exprimierte Gene in <i>S. mutans</i> nach Behandlung mit aPDT und SAPYR.....	67

Tabelle 20: Top 20 differentiell exprimierte Gene in <i>S. mutans</i> nach Behandlung mit CHX	68
Tabelle 21: Fold Change des Gens <i>recA</i> der behandelten Gruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in <i>E. coli</i>	69
Tabelle 22: Vergleich der Fold Changes der Gene <i>hdeE</i> , <i>gadE</i> , <i>marA</i> und <i>cpxP</i> in <i>E. coli</i> zwischen RNA-Seq und qRT-PCR	70
Tabelle 23: Vergleich der Fold Changes der Gene RS03005, RS09005, <i>ssrS</i> und <i>glgA</i> in <i>S. mutans</i> zwischen RNA-Seq und qRT-PCR.....	70
Tabelle 24: Differentiell exprimierte Gene in <i>E. coli</i> nach Behandlung mit Bestrahlung	99
Tabelle 25: Top 20 differentiell exprimierte Gene in <i>E. coli</i> nach Behandlung mit SAPYR ohne Bestrahlung.....	99
Tabelle 26: Differentiell exprimierte Gene in <i>S. mutans</i> nach Behandlung mit Bestrahlung.....	99
Tabelle 27: Ergänzende Übersicht spezifischer Gene von <i>E. coli</i> und <i>S. mutans</i> mit den dazugehörigen Fold Changes nach aPDT und Behandlung mit CHX im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.....	100

7 Literaturverzeichnis

- Abana, C.M., Brannon, J.R., Ebbott, R.A., Dunigan, T.L., Guckes, K.R., Fuseini, H., et al. (2017). Characterization of blue light irradiation effects on pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen* 6(4), e00466.
- Absi, E.G., Addy, M. und Adams, D. (1987). Dentine hypersensitivity. A study of the patency of dentinal tubules in sensitive and non-sensitive cervical dentine. *J Clin Periodontol* 14(5), 280-284.
- Agrawal, S., Jaswal, K., Shiver, A.L., Balecha, H., Patra, T. und Chaba, R. (2017). A genome-wide screen in *Escherichia coli* reveals that ubiquinone is a key antioxidant for metabolism of long-chain fatty acids. *J Biol Chem* 292(49), 20086-20099.
- Akhova, A.V. und Tkachenko, A.G. (2014). ATP/ADP alteration as a sign of the oxidative stress development in *Escherichia coli* cells under antibiotic treatment. *FEMS Microbiology Letters* 353(1), 69-76.
- Ali, J., Rafiq, Q.A. und Ratcliffe, E. (2018). Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. *Future science OA* 4(4), FSO290-FSO290.
- Almeida, A., Faustino, M.A.F. und Tome, J.P.C. (2015). Photodynamic inactivation of bacteria: finding the effective targets. *Future Medicinal Chemistry* 7(10), 1221-1224.
- Alves, E., Faustino, M.A., Neves, M.G., Cunha, A., Tome, J. und Almeida, A. (2014). An insight on bacterial cellular targets of photodynamic inactivation. *Future Med Chem* 6(2), 141-164.
- Anand, D. und Chaudhuri, A. (2016). Bacterial outer membrane vesicles: New insights and applications. *Molecular Membrane Biology* 33(6-8), 125-137.
- Andrews, S. (2010). FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data.
- Arweiler, N.B., Pietruska, M., Pietruski, J., Skurska, A., Dolińska, E., Heumann, C., et al. (2014). Six-month results following treatment of aggressive periodontitis with antimicrobial photodynamic therapy or amoxicillin and metronidazole. *Clin Oral Investig* 18(9), 2129-2135.
- Asakura, H., Kawamoto, K., Haishima, Y., Igimi, S., Yamamoto, S. und Makino, S.-i. (2008). Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Research in Microbiology* 159(9), 709-717.
- Asmus, C., Mozziconacci, O. und Schöneich, C. (2015). Low-temperature NMR characterization of reaction of sodium pyruvate with hydrogen peroxide. *The journal of physical chemistry. A* 119(6), 966-977.
- Aussel, L., Pierrel, F., Loiseau, L., Lombard, M., Fontecave, M. und Barras, F. (2014). Biosynthesis and physiology of coenzyme Q in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1837(7), 1004-1011.
- Barrientos-Moreno, L., Molina-Henares, M.A., Pastor-García, M., Ramos-González, M.I. und Espinosa-Urgel, M. (2019). Arginine Biosynthesis Modulates Pyoverdine Production and Release in *Pseudomonas putida* as Part of the Mechanism of Adaptation to Oxidative Stress. *J Bacteriol* 201(22).
- Baumgarten, T., Sperling, S., Seifert, J., von Bergen, M., Steiniger, F., Wick, L.Y., et al. (2012). Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 78(17), 6217-6224.
- Bebell, L.M. und Muiru, A.N. (2014). Antibiotic use and emerging resistance: how can resource-limited countries turn the tide? *Global heart* 9(3), 347-358.

- Benjamini, Y. und Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)* 57(1), 289-300.
- Bertoloni, G., Lauro, F.M., Cortella, G. und Merchat, M. (2000). Photosensitizing activity of hematoporphyrin on *Staphylococcus aureus* cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1475(2), 169-174.
- Biosca, E.G., Amaro, C., Marco-Noales, E. und Oliver, J.D. (1996). Effect of low temperature on starvation-survival of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2. *Applied and environmental microbiology* 62(2), 450-455.
- Biswas, D., Tiwari, M. und Tiwari, V. (2019). Molecular mechanism of antimicrobial activity of chlorhexidine against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PloS one* 14(10), e0224107-e0224107.
- Biswas, S. und Biswas, I. (2011). Role of VltAB, an ABC Transporter Complex, in Viologen Tolerance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(4), 1460-1469.
- Bliss, J.M., Bigelow, C.E., Foster, T.H. und Haidaris, C.G. (2004). Susceptibility of *Candida* Species to Photodynamic Effects of Photofrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(6), 2000-2006.
- Bloomfield, S.F., Arthur, M., Looney, E., Begun, K. und Patel, H. (1991). Comparative testing of disinfectant and antiseptic products using proposed European suspension testing methods. *Letters in Applied Microbiology* 13(5), 233-237.
- Brown, M.R. und Barker, J. (1999). Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends Microbiol* 7(1), 46-50.
- Burne, R.A. und Marquis, R.E. (2000). Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett* 193(1), 1-6.
- Busuioc, M., Mackiewicz, K., Buttaro, B.A. und Piggot, P.J. (2009). Role of intracellular polysaccharide in persistence of *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology* 191(23), 7315-7322.
- Cabiscol, E., Tamarit, J. und Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3(1), 3-8.
- Calloni, G., Chen, T., Schermann, Sonya M., Chang, H.-c., Genevaux, P., Agostini, F., et al. (2012). DnaK Functions as a Central Hub in the *E. coli* Chaperone Network. *Cell Reports* 1(3), 251-264.
- Ceri, H., Olson, M., Stremick, C., Read, R., Morck, D. und Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of clinical microbiology* 37(6), 1771-1776.
- Chakraborty, K. (2001). Translational regulation by ABC systems. *Res Microbiol* 152(3-4), 391-399.
- Chang, Y.C., Huang, F.M., Tai, K.W. und Chou, M.Y. (2001). The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 92(4), 446-450.
- Chou, J., Greenberg, J. und Dimple, B. (1993). Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: positive control of the micF antisense RNA by the soxRS locus. *Journal of Bacteriology* 175(4), 1026-1031.
- Cieplik, F., Deng, D.M., Crielaard, W., Buchalla, W., Hellwig, E., Al-Ahmad, A., et al. (2018a). Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. *Critical Reviews in Microbiology* 44(5), 571-589.

- Cieplik, F., Jakubovics, N.S., Buchalla, W., Maisch, T., Hellwig, E. und Al-Ahmad, A. (2019). Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria - Is There Cause for Concern? *Frontiers in microbiology* 10, 587-587.
- Cieplik, F., Pummer, A., Leibl, C., Regensburger, J., Schmalz, G., Buchalla, W., et al. (2016). Photodynamic Inactivation of Root Canal Bacteria by Light Activation through Human Dental Hard and Simulated Surrounding Tissue. *Front Microbiol* 7, 929.
- Cieplik, F., Pummer, A., Regensburger, J., Hiller, K.A., Späth, A., Tabenski, L., et al. (2015). The impact of absorbed photons on antimicrobial photodynamic efficacy. *Front Microbiol* 6, 706.
- Cieplik, F., Spath, A., Tabenski, L., Hiller, K.A., Baumler, W. und Maisch, T. (2013). Photosensitizer SAPYR: super antimicrobial photodynamic reduction of *Enterococcus faecalis* in mono- and polyspecies biofilms. *International Journal of Medical Microbiology* 303, 41-41.
- Cieplik, F., Steinwachs, V.S., Muehler, D., Hiller, K.A., Thurnheer, T., Belibasakis, G.N., et al. (2018b). Phenalen-1-one-Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy: Antimicrobial Efficacy in a Periodontal Biofilm Model and Flow Cytometric Evaluation of Cytoplasmic Membrane Damage. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Cieplik, F., Wimmer, F., Muehler, D., Thurnheer, T., Belibasakis, G.N., Hiller, K.A., et al. (2018c). Phenalen-1-One-Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy and Chlorhexidine Applied to a Novel Caries Biofilm Model. *Caries Research* 52(6), 447-453.
- Cline, N.V. und Layman, D.L. (1992). The effects of chlorhexidine on the attachment and growth of cultured human periodontal cells. *J Periodontol* 63(7), 598-602.
- Colby, S.M. und Russell, R.R. (1997). Sugar metabolism by mutans streptococci. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 26, 80s-88s.
- Cole, L.A. (2016). "Adenosine Triphosphate Energetics," in *Biology of Life*, ed. L.A. Cole. Academic Press), 65-77.
- Coquet, L., Obry, A., Borghol, N., Hardouin, J., Mora, L., Othmane, A., et al. (2017). Impact of chlorhexidine digluconate and temperature on curli production in *Escherichia coli*-consequence on its adhesion ability. *AIMS microbiology* 3(4), 915-937.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G. und Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Sci Am* 238(1), 86-95.
- Cotgreave, I.A. (1997). N-acetylcysteine: pharmacological considerations and experimental and clinical applications. *Adv Pharmacol* 38, 205-227.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C. und Chen, J. (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 72(2), 317-364, table of contents.
- Davies, G.E., Francis, J., Martin, A.R., Rose, F.L. und Swain, G. (1954). 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 9(2), 192-196.
- De Beer, D., Srinivasan, R. und Stewart, P.S. (1994). Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 60(12), 4339-4344.
- De Biase, D., Tramonti, A., Bossa, F. und Visca, P. (1999). The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Mol Microbiol* 32(6), 1198-1211.

- Del Mar Lleò, M., Benedetti, D., Tafi, M.C., Signoretto, C. und Canepari, P. (2007). Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environmental Microbiology* 9(9), 2313-2320.
- Deng, D.M., Ten Cate, J.M. und Crielaard, W. (2007). The adaptive response of *Streptococcus mutans* towards oral care products: involvement of the ClpP serine protease. *European Journal of Oral Sciences* 115(5), 363-370.
- Dengler, V., Foulston, L., DeFrancesco, A.S. und Losick, R. (2015). An electrostatic net model for the role of extracellular DNA in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* 197(24), 3779-3787.
- Denyer, S.P. und Stewart, G. (1998). Mechanisms of action of disinfectants. *International biodeterioration & biodegradation* 41(3-4), 261-268.
- Deutscher, J., Francke, C. und Postma, P.W. (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70(4), 939-1031.
- Dirckx, P. (2003). *An introduction to the biofilm life cycle* [Online]. Verfügbar: https://biofilm.montana.edu/biofilm-basics/what_are_biofilms.html [Zuletzt abgerufen 15.11. 2021].
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., et al. (2012). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29(1), 15-21.
- Dodd, C.E.R., Richards, P.J. und Aldsworth, T.G. (2007). Suicide through stress: A bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. *International Journal of Food Microbiology* 120(1), 46-50.
- Doi, H., Hoshino, Y., Nakase, K. und Usuda, Y. (2014). Reduction of hydrogen peroxide stress derived from fatty acid beta-oxidation improves fatty acid utilization in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* 98(2), 629-639.
- Dong, L., Tong, Z., Linghu, D., Lin, Y., Tao, R., Liu, J., et al. (2012). Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 39(5), 390-395.
- Donlan, R.M. (2001). Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases* 33(8), 1387-1392.
- Donlan, R.M. und Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews* 15(2), 167-193.
- Dorel, C., Lejeune, P. und Rodrigue, A. (2006). The Cpx system of *Escherichia coli*, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Res Microbiol* 157(4), 306-314.
- Dorel, C., Vidal, O., Prigent-Combaret, C., Vallet, I. und Lejeune, P. (1999). Involvement of the Cpx signal transduction pathway of *E. coli* in biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* 178(1), 169-175.
- Drees, J.C., Lusetti, S.L. und Cox, M.M. (2004). Inhibition of RecA protein by the *Escherichia coli* RecX protein: modulation by the RecA C terminus and filament functional state. *J Biol Chem* 279(51), 52991-52997.
- Du, M., Xuan, W., Zhen, X., He, L., Lan, L., Yang, S., et al. (2021). Antimicrobial photodynamic therapy for oral *Candida* infection in adult AIDS patients: A pilot clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 34, 102310.
- Er Karaoğlu, G., Uğur Ydın, Z., Erdönmez, D., Göl, C. und Durmuş, M. (2020). Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy administered using methylene blue, toluidine blue and tetra 2-mercaptopyridine substituted zinc phthalocyanine in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 32, 102038.

- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. und Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* 32(19), 3047-3048.
- Ezeriņa, D., Takano, Y., Hanaoka, K., Urano, Y. und Dick, T.P. (2018). N-Acetyl Cysteine Functions as a Fast-Acting Antioxidant by Triggering Intracellular H(2)S and Sulfane Sulfur Production. *Cell Chem Biol* 25(4), 447-459.e444.
- Fahmi, T., Faozia, S., Port, G.C. und Cho, K.H. (2019). The second messenger c-di-AMP regulates diverse cellular pathways involved in stress response, biofilm formation, cell wall homeostasis, SpeB expression, and virulence in *Streptococcus pyogenes*. *Infection and immunity* 87(6), e00147-00119.
- Feng, J., Wang, T., Zhang, S., Shi, W. und Zhang, Y. (2014). An Optimized SYBR Green I/PI Assay for Rapid Viability Assessment and Antibiotic Susceptibility Testing for *Borrelia burgdorferi*. *PLOS ONE* 9(11), e111809.
- Fiel, R.J., Datta-Gupta, N., Mark, E.H. und Howard, J.C. (1981). Induction of DNA Damage by Porphyrin Photosensitizers. *Cancer Research* 41(9 Part 1), 3543.
- Flick, D.A. und Gifford, G.E. (1984). Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J Immunol Methods* 68(1-2), 167-175.
- Fraud, S., Campigotto, A.J., Chen, Z. und Poole, K. (2008). MexCD-OprJ Multidrug Efflux System of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement in Chlorhexidine Resistance and Induction by Membrane-Damaging Agents Dependent upon the AlgU Stress Response Sigma Factor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(12), 4478-4482.
- Fraud, S. und Poole, K. (2011). Oxidative stress induction of the MexXY multidrug efflux genes and promotion of aminoglycoside resistance development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55(3), 1068-1074.
- Gajiwala, K.S. und Burley, S.K. (2000). HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistance in pathogenic enteric bacteria. *J Mol Biol* 295(3), 605-612.
- Garcez, A.S. und Hamblin, M.R. (2017). Methylene Blue and Hydrogen Peroxide for Photodynamic Inactivation in Root Canal - A New Protocol for Use in Endodontics. *Eur Endod J* 2(1).
- Garcez, A.S., Nuñez, S.C., Hamblin, M.R., Suzuki, H. und Ribeiro, M.S. (2010). Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod* 36(9), 1463-1466.
- Garcez, A.S., Núñez, S.C., Lage-Marques, J.L., Jorge, A.O. und Ribeiro, M.S. (2006). Efficiency of NaOCl and laser-assisted photosensitization on the reduction of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 102(4), e93-98.
- Gélinas, M., Museau, L., Milot, A. und Beaugerard, P.B. (2020). Cellular adaptation and the importance of the purine biosynthesis pathway during biofilm formation in Gram-positive pathogens. *bioRxiv*, 2020.2012.2011.422287.
- Giandomenico, A.R., Cerniglia, G.E., Biaglow, J.E., Stevens, C.W. und Koch, C.J. (1997). The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 23(3), 426-434.
- Gilbert, P. und Moore, L.E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J Appl Microbiol* 99(4), 703-715.
- Gjerme, P. (1974). Chlorhexidine in dental practice. *J Clin Periodontol* 1(3), 143-152.
- Gonzalez-Flecha, B. und Demple, B. (1995). Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270(23), 13681-13687.

- Goosen, N. und Moolenaar, G.F. (2001). Role of ATP hydrolysis by UvrA and UvrB during nucleotide excision repair. *Res Microbiol* 152(3-4), 401-409.
- Goswami, M., Mangoli, S.H. und Jawali, N. (2006). Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50(3), 949-954.
- Greenberg, J.T., Monach, P., Chou, J.H., Josephy, P.D. und Demple, B. (1990). Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(16), 6181-6185.
- Grinholc, M., Nakonieczna, J., Fila, G., Taraszkiewicz, A., Kawiak, A., Szewczyk, G., et al. (2015a). Antimicrobial photodynamic therapy with fulleropyrrolidine: photoinactivation mechanism of *Staphylococcus aureus*, in vitro and in vivo studies. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(9), 4031-4043.
- Grinholc, M., Rodziejewicz, A., Forsys, K., Rapacka-Zdonczyk, A., Kawiak, A., Domachowska, A., et al. (2015b). Fine-tuning recA expression in *Staphylococcus aureus* for antimicrobial photoinactivation: importance of photo-induced DNA damage in the photoinactivation mechanism. *Applied microbiology and biotechnology* 99(21), 9161-9176.
- Griswold, A.R., Jameson-Lee, M. und Burne, R.A. (2006). Regulation and physiologic significance of the agmatine deiminase system of *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol* 188(3), 834-841.
- Hamblin, M.R. und Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 3(5), 436-450.
- Hartl, F.U., Bracher, A. und Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475(7356), 324-332.
- Hassan, K.A., Jackson, S.M., Penesyan, A., Patching, S.G., Tetu, S.G., Eijkelkamp, B.A., et al. (2013). Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(50), 20254-20259.
- Hengge-Aronis, R. (1996). Regulation of gene expression during entry into stationary phase. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, 1497-1511.
- Hews, C.L., Cho, T., Rowley, G. und Raivio, T.L. (2019). Maintaining Integrity Under Stress: Envelope Stress Response Regulation of Pathogenesis in Gram-Negative Bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9(313).
- Høiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis* 125(4), 272-275.
- Hostacká, A., Ciznár, I. und Stefkovicová, M. (2010). Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiol (Praha)* 55(1), 75-78.
- Hou, X.H., Zhang, J.Q., Song, X.Y., Ma, X.B. und Zhang, S.Y. (2014). Contribution of ClpP to stress tolerance and virulence properties of *Streptococcus mutans*. *J Basic Microbiol* 54(11), 1222-1232.
- Hoyle, B.D., Alcantara, J. und Costerton, J.W. (1992). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother* 36(9), 2054-2056.
- Hoyle, B.D. und Costerton, J.W. (1991). Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques*, 91-105.

- Hu, J., Cheng, D., Gao, X., Bao, J., Ma, X. und Wang, H. (2012). Vitamin C enhances the in vitro development of porcine pre-implantation embryos by reducing oxidative stress. *Reprod Domest Anim* 47(6), 873-879.
- Huang, L., St Denis, T.G., Xuan, Y., Huang, Y.Y., Tanaka, M., Zadlo, A., et al. (2012a). Paradoxical potentiation of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation by sodium azide: role of ambient oxygen and azide radicals. *Free Radic Biol Med* 53(11), 2062-2071.
- Huang, L., Xuan, Y., Koide, Y., Zhiyentayev, T., Tanaka, M. und Hamblin, M.R. (2012b). Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers in surgery and medicine* 44(6), 490-499.
- Huber, H. (1905). *Weitere Versuche mit photodynamischen, sensibilisierenden Farbstoffen (Eosin, Erythrosin): Prüfung der Wirkung des Tageslichtes auf Lebensfähigkeit und Virulenz von Bakterien, auf Toxine und Antitoxine und auf das Labferment.*
- Imamura, Y., Mukohara, T., Shimono, Y., Funakoshi, Y., Chayahara, N., Toyoda, M., et al. (2015). Comparison of 2D-and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology reports* 33(4), 1837-1843.
- Imlay, J.A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol* 11(7), 443-454.
- Imlay, J.A. (2015). Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Current Opinion in Microbiology* 24, 124-131.
- Jaffe, A., Chabbert, Y.A. und Semonin, O. (1982). Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 22(6), 942-948.
- Jagtap, J.C., Chandele, A., Chopde, B.A. und Shastry, P. (2003). Sodium pyruvate protects against H₂O₂ mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line-SK-N-MC. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 26(2), 109-118.
- Jaswal, K., Shrivastava, M., Roy, D., Agrawal, S. und Chaba, R. (2020). Metabolism of long-chain fatty acids affects disulfide bond formation in Escherichia coli and activates envelope stress response pathways as a combat strategy. *PLOS Genetics* 16(10), e1009081.
- Jefferson, K.K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* 236(2), 163-173.
- Jensen, C. und Teng, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences* 7(33).
- Jodlbauer, A. und von Tappeiner, H. (1904). Über die Wirkung photodynamischer (fluoreszierender) Stoffe auf Bakterien. *Munch Med Wochenschr* 51, 1096-1097.
- Jones, C.G. (1997). Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol* 2000 15, 55-62.
- Joux, F. und Lebaron, P. (2000). Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection* 2(12), 1523-1535.
- Jozefczuk, S., Klie, S., Catchpole, G., Szymanski, J., Cuadros-Inostroza, A., Steinhäuser, D., et al. (2010). Metabolomic and transcriptomic stress response of Escherichia coli. *Molecular Systems Biology* 6(1), 364.
- Kajfasz, J.K., Ganguly, T., Hardin, E.L., Abranches, J. und Lemos, J.A. (2017). Transcriptome responses of Streptococcus mutans to peroxide stress: identification of novel antioxidant pathways regulated by Spx. *Scientific reports* 7(1), 16018-16018.

- Kamenšek, S. und Žgur-Bertok, D. (2013). Global transcriptional responses to the bacteriocin colicin M in *Escherichia coli*. *BMC microbiology* 13, 42-42.
- Kampf, G. (2016). Acquired resistance to chlorhexidine - is it time to establish an 'antiseptic stewardship' initiative? *J Hosp Infect* 94(3), 213-227.
- Kampf, G. (2018). Antiseptic stewardship. *Cham: Springer*, 643-650.
- Karp, P.D., Billington, R., Caspi, R., Fulcher, C.A., Latendresse, M., Kothari, A., et al. (2019). The BioCyc collection of microbial genomes and metabolic pathways. *Brief Bioinform* 20(4), 1085-1093.
- Kern, R., Malki, A., Abdallah, J., Tagourti, J. und Richarme, G. (2007). *Escherichia coli* HdeB is an acid stress chaperone. *J Bacteriol* 189(2), 603-610.
- Keseler, I.M., Mackie, A., Santos-Zavaleta, A., Billington, R., Bonavides-Martínez, C., Caspi, R., et al. (2017). The EcoCyc database: reflecting new knowledge about *Escherichia coli* K-12. *Nucleic acids research* 45(D1), D543-D550.
- Keyer, K. und Imlay, J.A. (1996). Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(24), 13635-13640.
- Kobayashi, R., Suzuki, T. und Yoshida, M. (2007). *Escherichia coli* phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. *Mol Microbiol* 66(1), 100-109.
- Kreuzer, K.N. (2013). DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(11), a012674.
- Langhans, S.A. (2018). Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in pharmacology* 9, 6.
- Lee, J., Sperandio, V., Frantz, D.E., Longgood, J., Camilli, A., Phillips, M.A., et al. (2009). An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* 284(15), 9899-9907.
- Lemos, J.A. und Burne, R.A. (2002). Regulation and Physiological Significance of ClpC and ClpP in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 184(22), 6357-6366.
- Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry (Moscow)* 70(2), 267-274.
- Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 5(1), 48-56.
- Lewis, K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 322, 107-131.
- Liang, Q. und Zhou, B. (2007). Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. *Molecular biology of the cell* 18(12), 4741-4749.
- Liao, Y., Smyth, G.K. und Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30(7), 923-930.
- Lim, K.S. und Kam, P.C. (2008). Chlorhexidine--pharmacology and clinical applications. *Anaesth Intensive Care* 36(4), 502-512.
- Liu, C., Niu, Y., Zhou, X., Zheng, X., Wang, S., Guo, Q., et al. (2015). *Streptococcus mutans* copes with heat stress by multiple transcriptional regulons modulating virulence and energy metabolism. *Scientific reports* 5, 12929-12929.
- Liu, J., Guo, L., Liu, J., Zhang, J., Zeng, H., Ning, Y., et al. (2017a). Identification of an Efflux Transporter LmrB Regulating Stress Response and Extracellular Polysaccharide Synthesis in *Streptococcus mutans*. *Frontiers in Microbiology* 8(962).

- Liu, J., Zhang, J., Guo, L., Zhao, W., Hu, X. und Wei, X. (2017b). Inactivation of a putative efflux pump (LmrB) in *Streptococcus mutans* results in altered biofilm structure and increased exopolysaccharide synthesis: implications for biofilm resistance. *Biofouling* 33(6), 481-493.
- Liu, X. und Ferenci, T. (1998). Regulation of porin-mediated outer membrane permeability by nutrient limitation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180(15), 3917-3922.
- Lotufo, M.A., Tempestini Horliana, A.C.R., Santana, T., de Queiroz, A.C., Gomes, A.O., Motta, L.J., et al. (2020). "Efficacy of photodynamic therapy on the treatment of herpes labialis: A systematic review". *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 29, 101536.
- Macritchie, D.M. und Raivio, T.L. (2009). Envelope Stress Responses. *EcoSal Plus* 3(2).
- Mah, T.F. und O'Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9(1), 34-39.
- Maira-Litrán, T., Allison, D.G. und Gilbert, P. (2000). Expression of the multiple antibiotic resistance operon (mar) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. *J Appl Microbiol* 88(2), 243-247.
- Maisch, T., Baier, J., Franz, B., Maier, M., Landthaler, M., Szeimies, R.M., et al. (2007). The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(17), 7223-7228.
- Maisch, T., Bosl, C., Szeimies, R.-M., Lehn, N. und Abels, C. (2005). Photodynamic Effects of Novel XF Porphyrin Derivatives on Prokaryotic and Eukaryotic Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(4), 1542-1552.
- Maredia, R., Devineni, N., Lentz, P., Dallo, S.F., Yu, J., Guentzel, N., et al. (2012). Vesiculation from *Pseudomonas aeruginosa* under SOS. *ScientificWorldJournal* 2012, 402919.
- Marotti, J., Aranha, A.C.C., Eduardo, C.D.P. und Ribeiro, M.S. (2009). Photodynamic Therapy Can Be Effective as a Treatment for Herpes Simplex Labialis. *Photomedicine and Laser Surgery* 27(2), 357-363.
- Martínez de Tejada, G., Sánchez-Gómez, S., Rázquin-Olazarán, I., Kowalski, I., Kaconis, Y., Heinbockel, L., et al. (2012). Bacterial cell wall compounds as promising targets of antimicrobial agents I. Antimicrobial peptides and lipopolyamines. *Current drug targets* 13(9), 1121-1130.
- Mathlouthi, A., Pennacchietti, E. und De Biase, D. (2018). Effect of Temperature, pH and Plasmids on In Vitro Biofilm Formation in *Escherichia coli*. *Acta naturae* 10(4), 129-132.
- McDonnell, G. und Russell, A.D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 12(1), 147-179.
- Mempin, R., Tran, H., Chen, C., Gong, H., Kim Ho, K. und Lu, S. (2013). Release of extracellular ATP by bacteria during growth. *BMC microbiology* 13, 301-301.
- Miles, A.A., Misra, S.S. und Irwin, J.O. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg (Lond)* 38(6), 732-749.
- Misba, L., Zaidi, S. und Khan, A.U. (2017). A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 18, 24-33.
- Mongodin, E., Finan, J., Climo, M.W., Rosato, A., Gill, S. und Archer, G.L. (2003). Microarray transcription analysis of clinical *Staphylococcus aureus* isolates resistant to vancomycin. *J Bacteriol* 185(15), 4638-4643.

- Muehler, D., Rupp, C.M., Keceli, S., Brochhausen, C., Siegmund, H., Maisch, T., et al. (2020). Insights Into Mechanisms of Antimicrobial Photodynamic Action Toward Biofilms Using Phenalen-1-One Derivatives as Photosensitizers. *Frontiers in Microbiology* 11(2594).
- Muehler, D., Sommer, K., Wennige, S., Hiller, K.A., Cieplik, F., Maisch, T., et al. (2017). Light-activated phenalen-1-one bactericides: efficacy, toxicity and mechanism compared with benzalkonium chloride. *Future Microbiology* 12(14), 1297-1310.
- Muela, A., Seco, C., Camafeita, E., Arana, I., Orruño, M., López, J.A., et al. (2008). Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiology Ecology* 64(1), 28-36.
- Mukherjee, S. und Bassler, B.L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology* 17(6), 371-382.
- Mun, S.-E., Sim, B.-W., Yoon, S.-B., Jeong, P.-S., Yang, H.-J., Choi, S.-A., et al. (2017). Dual effect of fetal bovine serum on early development depends on stage-specific reactive oxygen species demands in pigs. *PLOS ONE* 12(4), e0175427.
- Nakanishi-Matsui, M., Sekiya, M. und Futai, M. (2016). ATP synthase from *Escherichia coli*: Mechanism of rotational catalysis, and inhibition with the ϵ subunit and phytopolyphenols. *Biochim Biophys Acta* 1857(2), 129-140.
- Nakanishi-Matsui, M., Sekiya, M., Nakamoto, R.K. und Futai, M. (2010). The mechanism of rotating proton pumping ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797(8), 1343-1352.
- Nie, X., Li, C., Hu, S., Xue, F., Kang, Y.J. und Zhang, W. (2017). An appropriate loading control for western blot analysis in animal models of myocardial ischemic infarction. *Biochemistry and biophysics reports* 12, 108-113.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 67(4), 593-656.
- Nobre dos Santos, M., Melo dos Santos, L., Francisco, S.B. und Cury, J.A. (2002). Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res* 36(5), 347-352.
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Ro A, ed. Resistance* 84.
- Oliver, J.D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 34(4), 415-425.
- Overman, P.R. (2000). Biofilm: a new view of plaque. *J Contemp Dent Pract* 1(3), 18-29.
- Parasuraman, P., Antony, A.P., B, S.L.S., Sharan, A., Siddhardha, B., Kasinathan, K., et al. (2019). Antimicrobial photodynamic activity of toluidine blue encapsulated in mesoporous silica nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Biofouling* 35(1), 89-103.
- Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R., Parsons, J.L., Risbood, P.A., Barbera, W.A., et al. (1988). The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bioreducible to a water-soluble formazan. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 25(3), 911-914.
- Pearson, R.D., Steigbigel, R.T., Davis, H.T. und Chapman, S.W. (1980). Method of reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 18(5), 699-708.
- Pedley, A.M. und Benkovic, S.J. (2017). A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. *Trends in biochemical sciences* 42(2), 141-154.

- Pieranski, M., Sitkiewicz, I. und Grinholc, M. (2020). Increased photoinactivation stress tolerance of *Streptococcus agalactiae* upon consecutive sublethal phototreatments. *Free Radic Biol Med* 160, 657-669.
- Podbielski, A. und Kreikemeyer, B. (2004). Cell density--dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int J Infect Dis* 8(2), 81-95.
- Pomposiello, P.J., Bennik, M.H. und Demple, B. (2001). Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. *J Bacteriol* 183(13), 3890-3902.
- Pourhajibagher, M., Chiniforush, N., Parker, S., Shahabi, S., Ghorbanzadeh, R., Kharazifard, M.J., et al. (2016). Evaluation of antimicrobial photodynamic therapy with indocyanine green and curcumin on human gingival fibroblast cells: An in vitro photocytotoxicity investigation. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 15, 13-18.
- Qiao, J., Wang, S., Wen, Y. und Jia, H. (2014). Photodynamic effects on human periodontal-related cells in vitro. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 11(3), 290-299.
- Raab, O. (1900). Über die wirkung Fluorescirender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.* 39, 524-546.
- Raivio, T.L., Leblanc, S.K.D. und Price, N.L. (2013). The *Escherichia coli* Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity. *Journal of bacteriology* 195(12), 2755-2767.
- Raivio, T.L. und Silhavy, T.J. (1997). Transduction of envelope stress in *Escherichia coli* by the Cpx two-component system. *Journal of bacteriology* 179(24), 7724-7733.
- Ramakrishnan, P., Maclean, M., MacGregor, S.J., Anderson, J.G. und Grant, M.H. (2016). Cytotoxic responses to 405nm light exposure in mammalian and bacterial cells: Involvement of reactive oxygen species. *Toxicology in Vitro* 33, 54-62.
- Rapacka-Zdonczyk, A., Wozniak, A., Pieranski, M., Woziwodzka, A., Bielawski, K.P. und Grinholc, M. (2019). Development of *Staphylococcus aureus* tolerance to antimicrobial photodynamic inactivation and antimicrobial blue light upon sublethal treatment. *Scientific Reports* 9(1), 9423.
- Reddi, E., Ceccon, M., Valduga, G., Jori, G., Bommer, J.C., Elisei, F., et al. (2002). Photophysical properties and antibacterial activity of meso-substituted cationic porphyrins. *Photochem Photobiol* 75(5), 462-470.
- Rema, T., Medihala, P., Lawrence, J.R., Vidovic, S., Leppard, G.G., Reid, M., et al. (2016). Proteomic Analyses of Chlorhexidine Tolerance Mechanisms in *Delftia acidovorans* Biofilms. *mSphere* 1(1).
- Reuter, G., Janvilisri, T., Venter, H., Shahi, S., Balakrishnan, L. und van Veen, H.W. (2003). The ATP binding cassette multidrug transporter LmrA and lipid transporter MsbA have overlapping substrate specificities. *Journal of Biological Chemistry* 278(37), 35193-35198.
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., et al. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New microbes and new infections* 6, 22-29.
- Romero-Calvo, I., Ocón, B., Martínez-Moya, P., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin, O., et al. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical Biochemistry* 401(2), 318-320.
- Rowley, G., Spector, M., Kormanec, J. und Roberts, M. (2006). Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 4(5), 383-394.

- Ruhl, S., Berlenbach, P., Langenfelder, S., Hörl, D., Lehn, N., Hiller, K.-A., et al. (2011). Integrity of proteins in human saliva after sterilization by gamma irradiation. *Applied and environmental microbiology* 77(3), 749-755.
- Rupp, C.M. (2021). Änderung der Stoffwechselaktivität und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Einsatz der antimikrobiellen photodynamischen Therapie gegenüber bakteriellen Biofilmen in vitro. *Universität Regensburg*.
- Sabbahi, S., Alouini, Z., Jemli, M. und Boudabbous, A. (2008). The role of reactive oxygen species in Staphylococcus aureus photoinactivation by methylene blue. *Water Science and Technology* 58(5), 1047-1054.
- Santos, A.L., Gomes, N.C., Henriques, I., Almeida, A., Correia, A. und Cunha, Â. (2012). Contribution of reactive oxygen species to UV-B-induced damage in bacteria. *J Photochem Photobiol B* 117, 40-46.
- Schellhorn, H.E. (1995). Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in Escherichia coli. *FEMS Microbiol Lett* 131(2), 113-119.
- Schmittgen, T.D. und Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3(6), 1101-1108.
- Schwarz, S.R., Hirsch, S., Hiergeist, A., Kirschneck, C., Muehler, D., Hiller, K.A., et al. (2021). Limited antimicrobial efficacy of oral care antiseptics in microcosm biofilms and phenotypic adaptation of bacteria upon repeated exposure. *Clin Oral Investig* 25(5), 2939-2950.
- Swingel, A.R., Barcessat, A.R., Núñez, S.C. und Ribeiro, M.S. (2012). Antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of oral candidiasis in HIV-infected patients. *Photomed Laser Surg* 30(8), 429-432.
- Seal, G.J., Ng, Y.L., Spratt, D., Bhatti, M. und Gulabivala, K. (2002). An in vitro comparison of the bactericidal efficacy of lethal photosensitization or sodium hypochlorite irrigation on Streptococcus intermedius biofilms in root canals. *Int Endod J* 35(3), 268-274.
- Sgolastra, F., Petrucci, A., Severino, M., Graziani, F., Gatto, R. und Monaco, A. (2013). Adjunctive photodynamic therapy to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol* 40(5), 514-526.
- Shah, P. und Swiatlo, E. (2008). A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol Microbiol* 68(1), 4-16.
- Shen, B., Jensen, R.G. und Bohnert, H.J. (1997). Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. *Plant physiology* 115(2), 527-532.
- Sheng, J., Baldeck, J.D., Nguyen, P.T.M., Quivey, R.G., Jr. und Marquis, R.E. (2010). Alkali production associated with malolactic fermentation by oral streptococci and protection against acid, oxidative, or starvation damage. *Canadian journal of microbiology* 56(7), 539-547.
- Sheng, J. und Marquis, R.E. (2007). Malolactic fermentation by Streptococcus mutans. *FEMS Microbiol Lett* 272(2), 196-201.
- Shigeta, M., Tanaka, G., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suginaka, H. und Usui, T. (1997). Permeation of antimicrobial agents through Pseudomonas aeruginosa biofilms: a simple method. *Chemotherapy* 43(5), 340-345.
- Simon, J.P. und Stalon, V. (1982). Enzymes of agmatine degradation and the control of their synthesis in Streptococcus faecalis. *J Bacteriol* 152(2), 676-681.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1), 76-85.
- Solano, C., Echeverz, M. und Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* 18, 96-104.

- Spagnul, C., Turner, L.C. und Boyle, R.W. (2015). Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 150, 11-30.
- Späth, A., Leibl, C., Cieplik, F., Lehner, K., Regensburger, J., Hiller, K.A., et al. (2014). Improving photodynamic inactivation of bacteria in dentistry: highly effective and fast killing of oral key pathogens with novel tooth-colored type-II photosensitizers. *J Med Chem* 57(12), 5157-5168.
- Spellberg, B., Bartlett, J.G. und Gilbert, D.N. (2013). The future of antibiotics and resistance. *The New England journal of medicine* 368(4), 299-302.
- Stohl, E.A., Brockman, J.P., Burkle, K.L., Morimatsu, K., Kowalczykowski, S.C. und Seifert, H.S. (2003). Escherichia coli RecX inhibits RecA recombinase and coprotease activities in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 278(4), 2278-2285.
- Szeimies, R.-M., Dräger, J., Abels, C. und Landthaler, M. (2001). "Chapter 1 History of photodynamic therapy in dermatology," in *Comprehensive Series in Photosciences*, eds. P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies & B. Ortel. Elsevier), 3-15.
- Tabenski, I., Cieplik, F., Tabenski, L., Regensburger, J., Hiller, K.A., Buchalla, W., et al. (2016). The impact of cationic substituents in phenalen-1-one photosensitizers on antimicrobial photodynamic efficacy. *Photochem Photobiol Sci* 15(1), 57-68.
- Tabenski, L., Moder, D., Cieplik, F., Schenke, F., Hiller, K.A., Buchalla, W., et al. (2017). Antimicrobial photodynamic therapy vs. local minocycline in addition to non-surgical therapy of deep periodontal pockets: a controlled randomized clinical trial. *Clin Oral Investig* 21(7), 2253-2264.
- Tattawasart, U., Hann, A.C., Maillard, J.-Y., Furr, J.R. und Russell, A.D. (2000a). Cytological changes in chlorhexidine-resistant isolates of *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45(2), 145-152.
- Tattawasart, U., Maillard, J.Y., Furr, J.R. und Russell, A.D. (2000b). Outer membrane changes in *Pseudomonas stutzeri* resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride. *Int J Antimicrob Agents* 16(3), 233-238.
- Tavares, A., Dias, S.R., Carvalho, C.M., Faustino, M.A., Tomé, J.P., Neves, M.G., et al. (2011). Mechanisms of photodynamic inactivation of a gram-negative recombinant bioluminescent bacterium by cationic porphyrins. *Photochem Photobiol Sci* 10(10), 1659-1669.
- Tennert, C., Feldmann, K., Haamann, E., Al-Ahmad, A., Follo, M., Wrbas, K.T., et al. (2014). Effect of photodynamic therapy (PDT) on *Enterococcus faecalis* biofilm in experimental primary and secondary endodontic infections. *BMC Oral Health* 14, 132.
- Thede, G.L., Arthur, D.C., Edwards, R.A., Buelow, D.R., Wong, J.L., Raivio, T.L., et al. (2011). Structure of the periplasmic stress response protein CpxP. *Journal of bacteriology* 193(9), 2149-2157.
- Thomas, V.C., Thurlow, L.R., Boyle, D. und Hancock, L.E. (2008). Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *Journal of bacteriology* 190(16), 5690-5698.
- Uden, G., Steinmetz, P.A. und Degreif-Dünnwald, P. (2014). The Aerobic and Anaerobic Respiratory Chain of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: Enzymes and Energetics. *EcoSal Plus* 6(1).
- Usacheva, M.N., Teichert, M.C. und Biel, M.A. (2003). The interaction of lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers Surg Med* 33(5), 311-319.

- Vadeboncoeur, C. und Pelletier, M. (1997). The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of oral streptococci and its role in the control of sugar metabolism. *FEMS Microbiol Rev* 19(3), 187-207.
- von Tappeiner, H. (1909). Die photodynamische Erscheinung (Sensibilisierung durch fluoreszierende Stoffe). *Ergebnisse der Physiologie* 8(1), 698-741.
- Wainwright, M., Maisch, T., Nonell, S., Plaetzer, K., Almeida, A., Tegos, G.P., et al. (2017). Photoantimicrobials-are we afraid of the light? *Lancet Infect Dis* 17(2), e49-e55.
- Wainwright, M., Phoenix, D.A., Marland, J., Wareing, D.R. und Bolton, F.J. (1997). A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunol Med Microbiol* 19(1), 75-80.
- Wang, L., Wang, S. und Li, W. (2012). RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics* 28(16), 2184-2185.
- Wang, X., Perez, E., Liu, R., Yan, L.-J., Mallet, R.T. und Yang, S.-H. (2007). Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain research* 1132(1), 1-9.
- Weeks, G., Shapiro, M., Burns, R.O. und Wakil, S.J. (1969). Control of fatty acid metabolism. I. Induction of the enzymes of fatty acid oxidation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 97(2), 827-836.
- Wilkinson, F., Helman, W.P. und Ross, A.B. (1993). Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 22(1), 113-262.
- Willdigg, J.R. und Helmann, J.D. (2021). Mini Review: Bacterial Membrane Composition and Its Modulation in Response to Stress. *Frontiers in Molecular Biosciences* 8(338).
- Winter, J., Linke, K., Jatzek, A. und Jakob, U. (2005). Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Mol Cell* 17(3), 381-392.
- Wu, Y., Wu, M., He, G., Zhang, X., Li, W., Gao, Y., et al. (2012). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a universal internal control for Western blots in prokaryotic and eukaryotic cells. *Anal Biochem* 423(1), 15-22.
- Yee, R., Cui, P., Shi, W., Feng, J. und Zhang, Y. (2015). Genetic Screen Reveals the Role of Purine Metabolism in *Staphylococcus aureus* Persistence to Rifampicin. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 4(4), 627-642.
- Yin, R., Agrawal, T., Khan, U., Gupta, G.K., Rai, V., Huang, Y.-Y., et al. (2015). Antimicrobial photodynamic inactivation in nanomedicine: small light strides against bad bugs. *Nanomedicine (London, England)* 10(15), 2379-2404.
- Yu, H.-R., Kuo, H.-C., Huang, H.-C., Huang, L.-T., Tain, Y.-L., Chen, C.-C., et al. (2011). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a reliable internal control in Western blot analysis of leukocyte subpopulations from children. *Analytical Biochemistry* 413(1), 24-29.
- Zafarullah, M., Li, W.Q., Sylvester, J. und Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60(1), 6-20.
- Zeina, B., Greenman, J., Corry, D. und Purcell, W.M. (2002). Cytotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on keratinocytes in vitro. *Br J Dermatol* 146(4), 568-573.
- Zhao, F., Wang, Y., An, H., Hao, Y., Hu, X. und Liao, X. (2016). New Insights into the Formation of Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 Induced by High-Pressure CO₂. *mBio* 7(4), e00961-00916.

-
- Zhitkovich, A. (2019). N-Acetylcysteine: Antioxidant, Aldehyde Scavenger, and More. *Chemical Research in Toxicology* 32(7), 1318-1319.

8 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Denise Mühler, geboren am 10.04.1991 in Grimma, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

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

Regensburg, 01.12.21

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. Wolfgang Buchalla** für seine Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft, sowie der kritischen Durchsicht meiner Manuskripte und für das Verfassen des Erstgutachtens.

Herrn **PD Dr. Fabian Cieplik** danke ich für seine unglaubliche Unterstützung, seine Geduld und vor allem für seine Freundschaft über all die Jahre.

Ich danke Herrn **Prof. Dr. Tim Maisch** (Poliklinik für Dermatologie, Universitätsklinikum Regensburg) für seine Arbeit als Mentor und die Unterstützung und vielen Ratschläge für meine Arbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn **Dr. Karl-Anton Hiller** für die Durchführung der statistischen Auswertungen, die vielen hilfreichen Diskussionen und das Korrekturlesen aller Manuskripte, Zwischenberichte und dieser Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. Helmut Schweikl** danke ich ebenfalls für seine Arbeit als Mentor, für die vielen konstruktiven Gespräche und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn **Prof. Dr. Ali Al-Ahmad** (Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, Universitätsklinikum Freiburg) danke ich für seine Rolle als Mentor und die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke Herrn **Prof. Dr. Burkhard König** (Institut für organische Chemie, Universität Regensburg) für seine Hilfsbereitschaft in der Rolle als Mentor und die anregenden Diskussionen im Rahmen meiner Kolloquien.

Herrn **Prof. Dr. Christoph Brochhausen-Delius** (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Regensburg) und sowie Herrn **Dr. Stefan Czernmel** (QBIC, Tübingen) danke ich für die erfolgreiche Kooperation und die konstruktiven Diskussionen.

Frau **Gerlinde Ferstl** und Frau **Helga Ebensberger** danke ich für die Unterstützung am Rasterelektronenmikroskop, ihre freundliche Art und ihr immer offenes Ohr.

Ich danke Herrn **PD Dr. Matthias Widbiller**, Frau **Melanie Wölflick** und Herrn **Andreas Rosendahl** für Ihre Hilfe und die Einführung in die Methodik der qRT-PCR.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau **PD Dr. Agnes Schröder** (Poliklinik für Kieferorthopädie, Universitätsklinikum Regensburg) für die Bereitstellung der PDL-Zellen.

Frau **Carola Bolay** danke ich für ihr Hilfe und die Einarbeitung in die Methodik der Zellkultur.

Frau **Christine Petzel** danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Western Blots.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die Finanzierung dieser Dissertation.

Allen Mitarbeitern des Forschungslabors unserer Poliklinik danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft während des Laboralltags. Namentlich zu nennen sind an dieser Stelle noch Frau **Claudia Waha** und Frau **Heike Preuschl**.

Außerdem danke ich den ehemaligen Doktoranden unserer Arbeitsgruppe, die einen wichtigen Teil zu diesem Projekt beigesteuert haben: **Christina Rupp**, **Ümmühan Akyol** und **Sercan Keceli**. Danke für euren Einsatz und die lustigen Stunden im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meinen lieben Freunden **Stefanie**, **Franzi**, **Christina**, **Rebecca**, **Hao** und **David**, mit denen ich zu jeder Zeit den Kopf frei bekommen und neue Energie tanken konnte.

Zuletzt möchte ich mich bei **meiner Familie** und bei **Michael** bedanken, die mir gezeigt haben, dass man immer alles bewältigen kann, wenn man nur will. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Denise Mühler
Geburtsdatum: 10.04.1991
Geburtsort: 04668 Grimma
E-Mail: denise.muehler@web.de

Berufserfahrung

Seit 04/2018 **Universitätsklinikum Regensburg**
Abteilung: Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Wissenschaftliche Mitarbeiterin

10/2017 **Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam**
Laborpraktikum

09/2016 – 03/2018 **Universitätsklinikum Regensburg**
Abteilung: Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Biologisch-technische Assistentin

10/2015 – 09/2016 **Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung, Leipzig**
Abteilung: Umweltbiotechnologie
Studium-bezogenes Praktikum und Masterarbeit

03/2012 – 12/2014 **synlab Umweltinstitut GmbH, Leipzig - Markkleeberg**
Abteilung: Mikrobiologie
Werkstudent

Akademische Ausbildung

Seit 04/2018 **Universitätsklinikum Regensburg**
Promotion
Promotionsthema: Wirkmechanismen und molekulare Stressantwort planktonischer Kulturen und bakterieller Biofilme auf die antimikrobielle photodynamische Therapie

10/2014 – 09/2016 **Universität Leipzig**
Studiengang: Master of Science – Biologie
Abschlussnote: 2,1
Schwerpunkt: Biotechnologie
Masterarbeit: Der biologische Abbau von
Polyurethan-Monomeren durch
Pseudomonas putida und isolierte
Bakterien

10/2010 – 09/2014 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
Studiengang: Bachelor of Science – Biologie

10/2009 – 09/2010 **Universität Leipzig**
Studiengang: American Studies

08/2001 – 06/2009 **St. Augustin Gymnasium zu Grimma**
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Fortbildungen

03/2021 **Universitätsklinikum Regensburg**
Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte
für Biologische Sicherheit

02/2020 **EMBL, Heidelberg**
Analysis and Integration of Transcriptome and Proteome
Data

Stipendien

10/2020 **Verein ehemaliger Zahnmedizinstudenten,**
Reisestipendium

03/2020 **Deutscher Akademischer Austauschdienst,**
Reisestipendium

02/2019 **Förderung der Gleichstellung der Universität**
Regensburg, Reisestipendium

Publikationsliste

Muehler, D., Brandl E., Hiller, K.A., Cieplik, F., Maisch, T. (2021) Membrane damage as mechanism of photodynamic inactivation using Methylene blue and TMPyP in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Photochemical & Photobiological Sciences* 21(2):209-220.

Muehler, D., Rupp, C.M., Keceli, S., Brochhausen, C., Siegmund, H., Maisch, T., et al. (2020). Insights Into Mechanisms of Antimicrobial Photodynamic Action Toward Biofilms Using Phenalen-1-One Derivatives as Photosensitizers. *Frontiers in Microbiology* 11(2594).

Muehler, D., Sommer, K., Wennige, S., Hiller, K.A., Cieplik, F., Maisch, T., et al. (2017). Light-activated phenalen-1-one bactericides: efficacy, toxicity and mechanism compared with benzalkonium chloride. *Future Microbiology* 12(14), 1297-1310.

Schwarz, S.R., Hirsch, S., Hiergeist, A., Kirschneck, C., **Muehler, D.**, Hiller, K.A., et al. (2021). Limited antimicrobial efficacy of oral care antiseptics in microcosm biofilms and phenotypic adaptation of bacteria upon repeated exposure. *Clinical Oral Investigations* 25(5), 2939-2950.

Cieplik, F., Rupp, C.M., Hirsch, S., **Muehler, D.**, Enax, J., Meyer, F., et al. (2020). Ca(2)(+) release and buffering effects of synthetic hydroxyapatite following bacterial acid challenge. *BMC Oral Health* 20(1), 85.

Cieplik, F., Kara, E., **Muehler, D.**, Enax, J., Hiller, K.A., Maisch, T., et al. (2019). Antimicrobial efficacy of alternative compounds for use in oral care toward biofilms from caries-associated bacteria in vitro. *Microbiologyopen* 8(4), e00695.

Cieplik, F., Steinwachs, V.S., **Muehler, D.**, Hiller, K.A., Thurnheer, T., Belibasakis, G.N., et al. (2018a). Phenalen-1-one-Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy: Antimicrobial Efficacy in a Periodontal Biofilm Model and Flow Cytometric Evaluation of Cytoplasmic Membrane Damage. *Frontiers in Microbiology* 9.

Cieplik, F., Wimmer, F., **Muehler, D.**, Thurnheer, T., Belibasakis, G.N., Hiller, K.A., et al. (2018b). Phenalen-1-One-Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy and Chlorhexidine Applied to a Novel Caries Biofilm Model. *Caries Research* 52(6), 447-453

Konferenzbeiträge

- 01/2022 **Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Mainz**
Art des Beitrags: Vortrag
Titel: Stressantwort in *Streptococcus mutans* nach subletaler Behandlung mit Chlorhexidindigluconat – eine Transkriptomanalyse
- 02/2021 **Regensburger Symposium Zahnmedizin, Regensburg**
Art des Beitrags: Poster
Titel: Antimicrobial mechanism of Phenalen-1-one mediated antimicrobial photodynamic therapy in Gram-positive bacteria
- 01/2020 **Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Mainz**
Art des Beitrags: Vortrag
Titel: Schadensmechanismen der antimikrobiellen photodynamischen Therapie bei *A. naeslundii* und *S. mutans* Biofilmen
- 08/2019 **Congress of the European Society for Photobiology, Barcelona**
Art des Beitrags: Poster
Titel: Antimicrobial efficacy and mechanism of action of Phenalen-1-one mediated antimicrobial photodynamic therapy in bacterial biofilms
- 01/2019 **Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Mainz**
Art des Beitrags: Vortrag
Titel: Effektivität und Wirkmechanismen der photodynamischen Therapie bei *A. naeslundii* Biofilmen
- 01/2018 **Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Mainz**
Art des Beitrags: Vortrag
Titel: Antimikrobielle Wirkung und eukaryontische Toxizität von Phenalenon-Photosensibilisatoren im Dunkeln und nach Lichtaktivierung im Vergleich zu Benzalkoniumchlorid