

Aus dem  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
der  
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. habil. Dirk Schlüter)



Wechselwirkungen von *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*  
und *Candida albicans* im polymikrobiellen Biofilm

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von: Jan Krause  
geboren in: Aschersleben  
Magdeburg: 2018

**Meinen lieben Eltern**

# Dokumentationsblatt

## Bibliographische Beschreibung

Krause, Jan:

Wechselwirkungen von *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* im polymikrobiellen Biofilm. - 2018 - 60 Bl. : 27 Abb., 1 Tab., 25 Anh.

## Schlüsselwörter

*Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, polymikrobieller Biofilm, Prostaglandin E<sub>2</sub>, Farnesol, Tyrosol, Cystische Fibrose

## Kurzreferat

Während der Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* mit *Candida albicans* veränderten sich die Zellzahlen der Mikroorganismen deutlich. Für *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* konnten synergistische Effekte beobachtet werden, wohingegen eine Kombination mit *Pseudomonas aeruginosa* qualitativ und quantitativ kompetitive Folgen hatte. Im polymikrobiellen Biofilm stellt *Pseudomonas aeruginosa* den dominierenden Mikroorganismus dar. Gegenseitige intermikrobielle physische Wechselwirkungen und Quorum-sensing scheinen dabei eine Rolle zu spielen. In dualen *Candida albicans* - *Staphylococcus aureus* - Biofilmen konnte eine starke Zunahme von *Staphylococcus aureus* - Zellen beobachtet werden. Prostaglandin E<sub>2</sub> wurde hierbei als ein Schlüsselmolekül für die stimulierende Wirkung auf das Wachstum und die Biofilmbildung von *Staphylococcus aureus* identifiziert. Subinhibitorische Konzentrationen von Farnesol bewirkten einen ähnlichen Effekt jedoch in deutlich geringerer Ausprägung. Tyrosol hingegen zeigte keine Wirkung. Mit dem unspezifischen Cyclooxygenasehemmer Indometacin konnte die PGE<sub>2</sub>-Produktion von *Candida albicans* in dualen Biofilmen wirkungsvoll inhibiert werden, wodurch eine Hemmung des überproportionalen Wachstums von *Staphylococcus aureus* erreicht werden konnte. Der gleiche Effekt wurde bei gleichzeitiger Inkubation von *S. aureus* mit einem PGE<sub>2</sub>-defizienten *C. albicans* beobachtet.

## Publikation

Krause J, Geginat G, Tammer I. Prostaglandin E<sub>2</sub> from *Candida albicans* Stimulates the Growth of *Staphylococcus aureus* in Mixed Biofilms. *PLoS ONE*, 2015 Aug 11;10(8):e0135404

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Biofilme . . . . .	1
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . . . . .	3
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> . . . . .	4
1.4. <i>Candida albicans</i> . . . . .	6
1.5. Zell-Zell-Kommunikation in Biofilmen . . . . .	7
1.6. Cystische Fibrose . . . . .	9
1.6.1. Biofilm bei Cystischer Fibrose . . . . .	10
1.7. Fragestellung . . . . .	10
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1. Material . . . . .	12
2.1.1. Geräte . . . . .	12
2.1.2. Verbrauchsmaterialien . . . . .	13
2.1.3. Mikroorganismen . . . . .	13
2.1.4. Kulturmedien und -platten . . . . .	14
2.1.5. Chemikalien . . . . .	15
2.2. Methoden . . . . .	16
2.2.1. Anlegen von Stockkulturen . . . . .	16
2.2.2. Anzucht der Stämme aus Stockkulturen . . . . .	16
2.2.3. Kultivierung von Biofilmen . . . . .	17
2.2.4. Methoden zur Quantifizierung von Biofilmen . . . . .	18
2.2.4.1. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten . . . . .	18
2.2.4.2. Kristallviolett-Färbung . . . . .	19
2.2.4.2.1. Färbung . . . . .	19
2.2.4.2.2. Quantifizierung der Biofilmdicke . . . . .	20
2.2.4.3. XTT-Reduktionstest . . . . .	20

2.2.5.	Methoden zur Untersuchung der Biofilmstruktur . . . . .	21
2.2.5.1.	Calcofluor-white-Färbung . . . . .	21
2.2.5.2.	FUN-1-Färbung . . . . .	22
2.2.5.3.	Fluoreszenz-Doppel-Färbung . . . . .	22
2.2.6.	Mikroskopie . . . . .	23
2.2.6.1.	Phasenkontrastmikroskopie . . . . .	23
2.2.6.2.	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie . . . . .	23
2.2.7.	Quorum-sensing-Moleküle . . . . .	23
2.2.7.1.	Bestimmung der Prostaglandin E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> )-Konzentration . .	23
2.2.7.1.1.	PGE <sub>2</sub> -ELISA . . . . .	24
2.2.7.1.2.	PGE <sub>2</sub> -Metabolite-ELISA . . . . .	24
2.2.7.1.3.	Zugabe von PGE <sub>2</sub> -Reinsubstanz zu monomikrobiellen <i>S. aureus</i> - Biofilmen . . . . .	24
2.2.7.1.4.	Hitzebehandlung von Überständen . . . . .	25
2.2.7.2.	Farnesol und Tyrosol . . . . .	25
2.2.7.3.	Indometacin . . . . .	25
2.2.8.	Statistische Auswertung . . . . .	26
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1.	Teil 1 - polymikrobielle Biofilme . . . . .	27
3.1.1.	Bestimmung der Adhäsionszeit . . . . .	27
3.1.2.	Einfluss verschiedener Mikroorganismen auf die Adhäsion . . . . .	28
3.1.2.1.	Ergebnisse des XTT-Tests . . . . .	30
3.1.3.	Einfluss verschiedener Mikroorganismen auf die Biofilmbildung . . . . .	30
3.1.3.1.	Zeitliche Entwicklung der Biofilm-Dicke . . . . .	30
3.1.3.2.	Quantitative Beurteilung der Biofilmproduktion anhand der OD/OD <sub>c</sub> -Ratio . . . . .	31
3.1.3.3.	Veränderungen der quantitativen Zusammensetzungen in Biofilmen . . . . .	32
3.1.3.3.1.	<i>C. albicans</i> in mono- und polymikrobiellen Biofilmen	32
3.1.3.3.2.	<i>S. aureus</i> und <i>P. aeruginosa</i> in mono- und polymikrobiellen Biofilmen . . . . .	33
3.1.3.3.3.	Einfluss des Mediumwechsels auf die Biofilmbildung	35
3.1.3.4.	Veränderungen in der Biofilm-Architektur . . . . .	35
3.1.3.4.1.	Adhäsionsphase . . . . .	35
3.1.3.4.2.	Frühphase der Biofilmbildung . . . . .	36
3.1.3.4.3.	Intermediärphase . . . . .	38
3.1.3.4.4.	Reifephase . . . . .	38

## INHALTSVERZEICHNIS

---

3.2. Teil 2: <i>S. aureus</i> - <i>C. albicans</i> - Biofilm . . . . .	40
3.2.1. Biofilm . . . . .	40
3.2.1.1. Wachstumskinetik . . . . .	40
3.2.1.2. Beeinflussung des Wachstums . . . . .	41
3.2.2. Quorum-sensing-Moleküle von <i>C. albicans</i> . . . . .	43
3.2.2.1. Wirkung von Farnesol und Tyrosol auf die Biofilm-Bildung von <i>S. aureus</i> . . . . .	43
3.2.2.2. Einfluss von Prostaglandin E <sub>2</sub> auf die Biofilmbildung von <i>S.</i> <i>aureus</i> . . . . .	44
3.2.2.3. <i>C. albicans</i> - Mutator-Stämme . . . . .	46
3.2.2.4. Einfluss von Indometacin . . . . .	47
3.2.2.5. Einfluss von <i>S. aureus</i> auf die PGE <sub>2</sub> -Produktion von <i>C. albicans</i>	49
3.2.2.6. Ausschluss substanzspezifischer Wirkungen . . . . .	49
<b>4. Diskussion</b>	<b>50</b>
4.1. Adhäsion . . . . .	50
4.2. Biofilmbildung . . . . .	52
4.3. Quorum-sensing . . . . .	55
4.4. Klinischer Kontext . . . . .	57
4.4.1. Cystische Fibrose . . . . .	58
4.4.2. Ausblick . . . . .	59
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>60</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>61</b>
<b>Danksagung</b>	<b>81</b>
<b>Ehrenerklärung</b>	<b>82</b>
<b>Bildungsweg</b>	<b>83</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>84</b>
A.1. Abbildungen . . . . .	84

# Abbildungsverzeichnis

1.1. Phasen der Biofilmbildung . . . . .	2
2.1. Eindeckelungsanordnung . . . . .	22
3.1. Adhäsionszeiten . . . . .	27
3.2. Adhäsion von <i>C. albicans</i> . . . . .	28
3.3. Phasenkontrast-Fluoreszenz . . . . .	29
3.4. Absolute Quantifizierung der Biofilme mittels Kristallviolett . . . . .	30
3.5. Biofilmproduktion anhand der OD/OD <sub>c</sub> -Ratio . . . . .	31
3.6. KBE-Kinetik in Biofilmen: <i>C. albicans</i> . . . . .	32
3.7. KBE-Kinetik in Biofilmen: <i>S. aureus</i> und <i>P. aeruginosa</i> . . . . .	33
3.8. Biofilm-KBE mit Mediumwechsel . . . . .	34
3.9. Doppelfluoreszenzfärbung: mono- und polymikrobielle Biofilme nach 3 Stunden	36
3.10. Doppelfluoreszenzfärbung: mono- und polymikrobielle Biofilme nach 12 Stunden	37
3.11. Doppelfluoreszenzfärbung: <i>C. albicans</i> - Biofilm - 24 Stunden . . . . .	38
3.12. Doppelfluoreszenzfärbung: polymikrobieller Biofilm - 96 Stunden . . . . .	39
3.13. Wachstumskinetik des <i>S. aureus</i> - <i>C. albicans</i> - Biofilms . . . . .	40
3.14. Zeitkinetik der KBE im dualen Biofilm . . . . .	41
3.15. Wirkung von zellfreien Überständen . . . . .	42
3.16. Wirkung von zellfreien hitzebehandelten Überständen . . . . .	42
3.17. Farnesolwirkung . . . . .	43
3.18. Farnesolwirkung in Kulturüberständen . . . . .	44
3.19. PGE <sub>2</sub> - Wirkung . . . . .	44
3.20. PGE <sub>2</sub> - Wärmelabilität . . . . .	45
3.21. PGE <sub>2</sub> - Produktion von <i>C. albicans</i> . . . . .	46
3.22. PGE <sub>2</sub> - Produktion von genetisch veränderten <i>C. albicans</i> - Stämmen . . . . .	46
3.23. Wirkung von Überständen von genetisch veränderten <i>C. albicans</i> - Stämmen	47
3.24. Wirkung von Indometacin auf die PGE <sub>2</sub> - Produktion im dualen Biofilm . . .	48
3.25. Indometacin - verschiedene Applikationszeitpunkte . . . . .	48
A.1. Kristallviolettversuch - Konzentrationsermittlung . . . . .	84
A.2. Doppelfluoreszenzfärbung: Einschlusskörperchen . . . . .	85
A.3. Adhäsion von <i>S. aureus</i> und <i>P. aeruginosa</i> . . . . .	85

A.4. Relative Quantifizierung der Biofilme mittels Kristallviolett . . . . .	86
A.5. KBE im polymikrobiellen Biofilm: <i>C. albicans</i> . . . . .	86
A.6. KBE im polymikrobiellen Biofilm: <i>S. aureus</i> . . . . .	87
A.7. Small-colony-variants (SCV) . . . . .	87
A.8. KBE im polymikrobiellen Biofilm: <i>P. aeruginosa</i> . . . . .	88
A.9. Biofilm-KBE mit Mediumwechsel: <i>C. albicans</i> . . . . .	88
A.10. Biofilm-KBE mit Mediumwechsel: <i>S. aureus</i> und <i>P. aeruginosa</i> . . . . .	89
A.11. Doppelfluoreszenzfärbung: <i>C. albicans</i> - <i>S. aureus</i> - Biofilm - 3 Stunden . . .	89
A.12. Doppelfluoreszenzfärbung: <i>C. albicans</i> - <i>S. aureus</i> - Biofilm - 12 Stunden . . .	89
A.13. Doppelfluoreszenzfärbung: polymikrobieller Biofilm - 12 Stunden . . . . .	90
A.14. Doppelfluoreszenzfärbung: duale- und polymikrobielle Biofilme - 24 Stunden .	90
A.15. Doppelfluoreszenzfärbung: polymikrobieller Biofilm - 24 Stunden . . . . .	91
A.16. Doppelfluoreszenzfärbung: mono- und polymikrobielle Biofilme - 96 Stunden .	91
A.17. Wachstumskinetik des <i>S. aureus</i> - <i>C. albicans</i> - Biofilms . . . . .	92
A.18. KBE von <i>S. aureus</i> (VA 31883) . . . . .	92
A.19. Wirkung von Tyrosol . . . . .	93
A.20. KBE von <i>S. aureus</i> (VA 19552) . . . . .	93
A.21. PGE <sub>2</sub> -Metabolite . . . . .	94
A.22. Wirkungen von Indometacin auf die PGE <sub>2</sub> - Metabolite im dualen Biofilm . .	94
A.23. PGE <sub>2</sub> -Produktion von <i>C. albicans</i> mit <i>S. aureus</i> . . . . .	95
A.24. Ausschluss substanzspezifischer Wirkungen auf <i>C. albicans</i> . . . . .	95
A.25. Ausschluss substanzspezifischer Wirkungen auf <i>S. aureus</i> . . . . .	95

# Tabellenverzeichnis

2.1. Mikroorganismen . . . . .	14
--------------------------------	----

# Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AChE	Acetylcholinesterase
aGM1	Asialogangliosid-1
Als3p	Agglutinin-ähnliches Protein 3
Aqua dest.	aqua destillata / destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Ca	Calcium
CF	Cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CIVS	cylindrical intravacuolar structures
CLSM	confocal laser scanning microscopy
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Fa.	Firma
FCS	fetal calf serum / fetales Kälberserum
FUN-1	2-Chloro-4-(2,3-Dihydro-3-Methyl-(Benzo-1,3-Thiazol-2-yl)-Methyliden)-1-Phenylquinolinium Iodid
KBE	koloniebildende Einheit/en
LB	Luria Broth Base - Nährmedium
McF	McFarland-Trübungsstandard
Mg	Magnesium
MRSA	methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
OD	optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP	Penicillin-bindendes Protein
PPAR $\gamma$	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter-Rezeptor- $\gamma$
PQS	Pseudomonas-Quinolon-Signal
QS	Quorum-sensing

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCV	small-colony-variants
TSB	Tryptone Soya Broth - Nährmedium
VAP	Ventilator-assoziierte Pneumonie
wt	Wild-Typ
XTT	2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carbox-Anilide
YPD	Yeast Peptone Dextrose - Nährmedium

# 1. Einleitung

Überall in der Natur kommen polymikrobielle Lebensformen vor. Im menschlichen Körper finden sich vor allem auf den Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes Mikroorganismen in hoher Dichte und Variabilität [159]. Zur Verbesserung der Überlebenschancen in diesen polymikrobiellen Gemeinschaften haben die Mikroorganismen besondere Organisationsstrukturen entwickelt, die als Biofilme bezeichnet werden.

## 1.1. Biofilme

Die Fähigkeit von Mikroorganismen, sich in Biofilmen zu organisieren, ist von immenser medizinischer Bedeutung. Man geht heute davon aus, dass schätzungsweise 65 % der bakteriellen Infektionen Biofilm-assoziiert sind [192]. Sowohl Bakterien als auch Pilze sind in der Lage Biofilme zu bilden. In der Natur stellen polymikrobielle Biofilme die vorherrschende Organisationsform dar [24, 79]. Biofilme sind gekennzeichnet durch eine strukturierte Gemeinschaft von Bakterienzellen, die an biotischen oder abiotischen Oberflächen adhäreren und von einer selbstproduzierten polymerischen Matrix umhüllt sind [42]. Die Biofilmbildung ist durch einen phasenhaften Verlauf gekennzeichnet (Abb. 1.1). Entscheidend für die Biofilmbildung ist die Phase der initialen Adhäsion. Dieser Schritt wird an abiotischen Oberflächen durch unspezifische Interaktionen vermittelt und vom Grad der Hydrophobizität sowie von der Zusammensetzung eines konditionierenden Films aus organischem Material beeinflusst. An biotischen Oberflächen, wie Gewebe oder Mukosa, wird dieser Prozess in der Regel durch spezifische Moleküle, wie Lektine, Liganden oder Adhäsine, vermittelt. Nach initialer Adhäsion gehen die Mikroorganismen feste und irreversible Bindungen mit ihren Oberflächen und untereinander ein, was zur Bildung von Mikrokolonien und zur Entstehung eines reifen dreidimensionalen Biofilms führt. Wenn Biofilme eine bestimmte Größe erreicht haben, können Teile von ihnen durch Scherkräfte abgelöst werden. Dieser Prozess ist von besonderer medizinischer Bedeutung, da abgelöste Teile von Biofilmen als Emboli zu Verschlüssen des peripheren Kapillarbetts führen können [42, 47, 142, 173].

Im Gegensatz zu bakteriellen Biofilmen bilden *Candida* - Biofilme komplexe Organisationsstrukturen aus Hefe- und filamentösen Zellen, die ebenfalls in eine selbstproduzierte Matrix eingebettet sind [150]. Reife Biofilme von *Candida (C.) albicans* zeigen einen typischen zweischichtigen Aufbau mit einer basalen Schicht, die vornehmlich aus Blastosporen besteht, und einem darüber liegendem Netzwerk aus Hyphen und extrazellulärem Material [3, 135]. Die

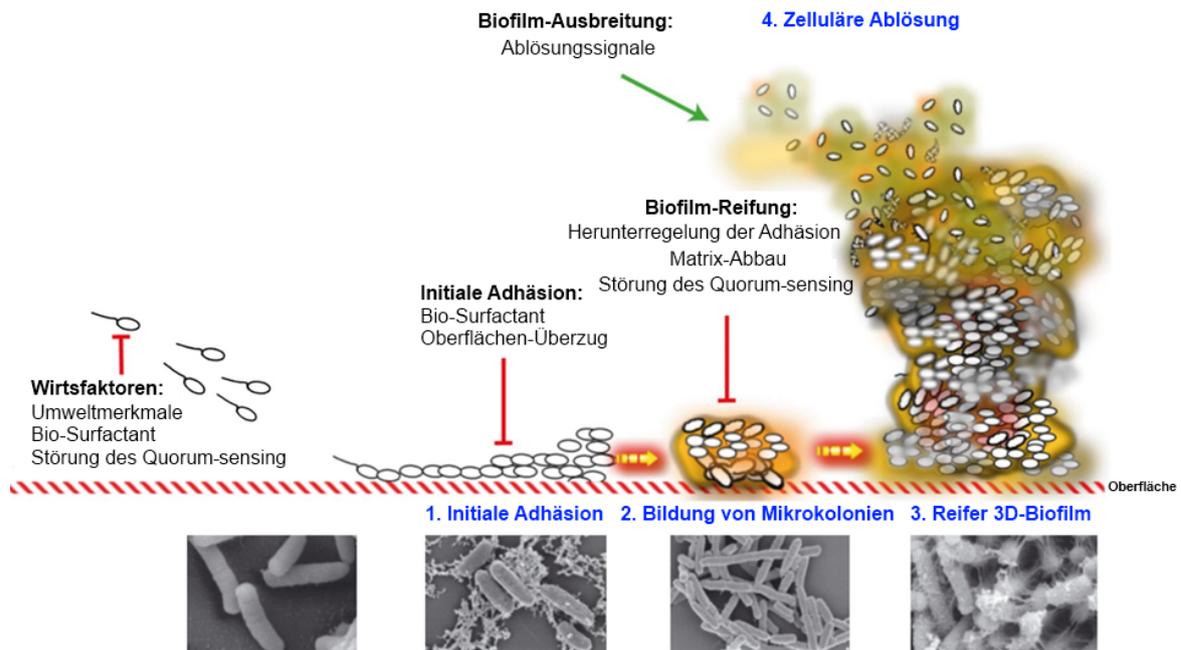


Abbildung 1.1.: Phasen der Biofilmbildung (modifiziert nach Rendueles et. al. [203])

Ausbildung dieser Struktur verläuft in drei Phasen: Frühphase (0 - 11 h), Intermediärphase (12 - 30 h) und Reifephase (38 - 72 h) [40]. Die Bildung des Biofilms beginnt mit dem Kontakt der Zellen zu einer polymerischen Oberfläche oder unter morphogeneseinduzierenden Wachstumsbedingungen. Die Adhärenzzeit des Pilzes liegt je nach verwendetem Material zwischen einer und drei Stunden, gefolgt von Knospung und Keimschlauchbildung [14, 92]. Die intermediäre Phase ist gekennzeichnet durch kontinuierliches Hyphenwachstum sowie Matrixproduktion. Anschließend werden Tochterzellen gebildet und aus dem Netzwerk freigesetzt [83]. In der Intermediärphase ist die Freisetzungsrates von Tochterzellen (Dispersion) aus dem Biofilm am höchsten. Diese Tochterzellen sind unabhängig vom benutzten Medium vorwiegend in der Hefenform [232]. In fließenden Systemen wird deutlich mehr extrazelluläre Matrix als unter statischen Inkubationsbedingungen gebildet [13, 89, 90, 128].

Die Reifung des Biofilms ist mit einer Zunahme der Toleranz gegenüber antimikrobiellen Substanzen, physikalischen Einflüssen und den Zellen des Immunsystems vergesellschaftet [40, 84, 185]. Ursächlich hierfür könnte unter anderem die Interaktion der verschiedenen Matrixproteine von unterschiedlichen Mikroorganismen sein, die eine hochviskose Matrix erzeugen und damit Zellen binden und Substanzen sequestrieren können [187]. So entsteht z. B. durch *C. albicans* synthetisiertes und in der Matrix deponiertes  $\beta$ -1,3-Glucan eine schwammartige Matrix, die Fluconazol-Moleküle daran hindert, ihre Zielstrukturen zu erreichen [7, 15, 40]. Das Antimykotikum wird dadurch wirkungslos [171].

Mikroorganismen können nicht nur an Oberflächen, sondern auch aneinander adhären. So binden z. B. Bakterien an die Zellwände von *C. albicans* [54]. Dabei sind Staphylokokken in

der Lage an beiden morphologischen Formen (Blastosporen und Hyphen) von *C. albicans* zu adhären, wohingegen sich *Pseudomonas (P.) aeruginosa* ausschließlich an die filamentöse Form von *C. albicans* anheftet [3, 182]. Darüber hinaus zeigt *Staphylococcus (S.) aureus* insgesamt eine höhere Assoziation zu den Hyphen von *C. albicans* als *P. aeruginosa* (56 % versus 17 %) [188]. Die Adhäsion von Staphylokokken bedeutet für *Candida* eine massive Stressreaktion mit nachfolgend veränderter Genexpression. Die Virulenz von *S. aureus* nimmt in Koexistenz mit *C. albicans* als Hefenform ab, mit der Hyphenform nimmt die Virulenz jedoch zu [188]. Nach der Biofilmbildung von *P. aeruginosa* auf den Hyphen ist ein Absterben der *Candida* - Zellen zu beobachten [96].

## 1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* ist in der Lage, schwere Infektionen der tiefen Atemwege vor allem bei vorgeschädigter Lunge, Wundinfektionen und Sepsis hervorzurufen [177]. In einer multizentrischen Punktprävalenzstudie zu Infektionen auf Intensivstationen wurden in 20 % der kulturell positiven Infektionen *Pseudomonas spp.* nachgewiesen [234]. In einer Sepsisstudie an älteren Patienten war *P. aeruginosa* mit einer Positivrate von 8,3 % der zweithäufigste Erreger in Blutkulturen, 7,1 % waren positiv für *S. aureus* und 2,6 % für *C. albicans* [205]. Bei Wundinfektionen stellt *P. aeruginosa* einen der am häufigsten nachgewiesenen Keime dar, wobei chronische Wunden, wie z. B. diabetische Ulzera oder Verbrennungswunden, besonders betroffen sind [69, 74, 78, 165, 238]. Nosokomiale Infektionen, wie z. B. Ventilator-assoziierte Pneumonien, aber auch Entzündungen des Hörapparates, ulzerative Keratitiden bei Kontaktlinsenträgern oder chronische Atemwegsinfektionen bei Patienten mit Cystische Fibrose stellen weitere Beispiele von Krankheitsbildern dar, die durch diesen Feuchtkeim hervorgerufen werden können [101, 154, 223, S. 266–267]. Zu den Besonderheiten dieses stäbchenförmigen, gramnegativen, fakultativ anaeroben Bakteriums zählen eine Vielzahl von Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren sowie die Fähigkeit, Biofilme zu bilden [156, 223, S. 525, S. 266].

Pili bzw. Flagellen spielen eine Rolle während des initialen Anhaftungsprozesses bzw. während der Dispersion, sind aber für die eigentliche Biofilmproduktion von untergeordneter Bedeutung [96]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass *P. aeruginosa* in Abwesenheit von *C. albicans* langsamer wächst [30]. Innerhalb der Biofilme liegen anaerobe Bedingungen vor, was bei *P. aeruginosa* eine veränderte Produktion von Enzymen zur Nitratnutzung nach sich zieht. Nicht nur das Erreichen des Reifestadiums, sondern auch verschiedene Kohlenhydratsubstrate wie z. B. Succinat, Citrat, Glutamat und Glukose sorgen für die Dispersion von *Pseudomonas* - Zellen aus dem Biofilm [213].

*P. aeruginosa* ist intrinsisch unempfindlich gegen eine Vielzahl von Antibiotika. Eine verstärkte Antibiotikaunempfindlichkeit, auch gegen Kombinationstherapien, konnte für *Pseudomonas* - Biofilme im Vergleich zu planktonisch oder als Monolayer wachsenden *Pseudomonas*-den nachgewiesen werden [1].

Weitere Faktoren wie Quorum-sensing-Moleküle (z. B. N-Acyl-Homoserinlacton), das Vorhandensein eines Typ-III-Sekretionssystems oder des Lipopolysaccharid-O-Antigens zählen ebenso zu den Virulenzdeterminanten von *P. aeruginosa* wie verschiedene sezernierte zum Teil antibiotisch wirkende Substanzen [88, 182]. Beispielhaft genannt seien das Exotoxin A, welches sowohl in Säugerzellen oder Nematoden, als auch in Pflanzen die Inhibition der Proteinsynthese bewirkt, Pyrrolnitrin, welches Enzyme der mitochondrialen Atmungskette hemmt oder verschiedene Phenazine [226, 230]. Hierzu zählt das wasserlösliche, redoxaktive, blau-grüne Phenazin-Pigment Pyocyanin sowie sein Abbauprodukt 1-Hydroxyphenazin. Beide wirken antibakteriell und antifungal, senken die mukoziliäre Clearance durch Desorganisation der Zilien, bewirken eine Zerstörung des respiratorischen Epithels und beeinträchtigen die Funktionen von Neutrophilen und Lymphozyten, wodurch die Entstehung respiratorischer Infektionen begünstigt wird [18, 70, 125, 221, 239]. Das Exopolysaccharid Alginat schützt *P. aeruginosa* vor Phagozytose durch Abwehrzellen durch Bildung einer mukösen Schleimkapsel und ist Hauptbestandteil der exopolymeren Matrix von Biofilmen [223, S. 266]. Alle genannten Faktoren tragen zur großen klinischen Bedeutung von *P. aeruginosa* als Hospitalkeim und Erreger vieler lebensgefährlicher Krankheiten bei [22, 55, 166].

### 1.3. *Staphylococcus aureus*

Aufgrund des hohen pathogenen Potenzials spielt *S. aureus* eine bedeutende Rolle in der ambulanten und stationären Patientenbehandlung. Zudem ist die fortwährende Ausbreitung hochresistenter Stämme, wie MRSA (Methicillin-resistenter *S. aureus*), ein vielschichtiges Problem im Gesundheitswesen [113].

Seine hohe Tenazität sowie die Bildung einer Vielzahl von Virulenzfaktoren werden für die weite Verbreitung dieser grampositiven, fakultativ anaeroben, koagulasepositiven Kokken als Krankheitserreger verantwortlich gemacht [156, S. 558]. Die Zellwand besteht aus einer dicken Peptidoglykanschicht, an der sich der sogenannte „clumping factor“ befindet. Dieser dient als Rezeptor für Fibrinogen. Protein A, das ebenfalls mit der Peptidoglykanschicht verbunden ist, verhindert durch die Bindung an das  $F_c$ -Stück von Immunglobulinen die Opsonierung und damit die Phagozytose durch Zellen des angeborenen Immunsystems. Vor allem unter dem Selektionsdruck der Phagozytose lässt sich *in-vivo* oft eine Kapsel aus Aminosackpolymeren nachweisen. Zu den extrazellulären Produkten zählen u. a. die freie Koagulase, die nicht nur Speziesmerkmal von *S. aureus* ist, sondern in Kombination mit dem o. g. Fibrinogenrezeptor für die Ausbildung eines Fibrinwalls sorgt, der die Erreger umscheidet [219]. Insbesondere die Staphylokinase, aber auch Lipasen, Hyaluronidasen und DNAsen sorgen dann für eine fortschreitende Ausbreitung im Gewebe. Darüber hinaus produziert *S. aureus* verschiedene Toxine, wie z. B. Hämolysine ( $\alpha$  -  $\epsilon$ ), das Panton-Valentine-Leukozidin, Enterotoxine, die für Nahrungsmittelvergiftungen verantwortlich sind, sowie die Exfoliatine A - C und das Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1), die akute lebensbedrohliche Erkrankungen

beim Menschen hervorrufen können [201, 223, S. 187–188]. *S. aureus* kolonisiert bei 20 - 50 % der Normalbevölkerung die Haut, insbesondere des Nasenvorhofs und des Perineums, seltener Kolon, Rektum und Vagina. Ausgehend von diesen Lokalisationen ist er in der Lage, sowohl oberflächliche als auch tiefe invasive Infektionen hervorzurufen. *S. aureus* verursacht 50 - 60 % aller Osteomyelitiden, 15 - 40 % der Gefäßprotheseninfektionen und bis zu 30 % aller Fälle von Sepsis und Endokarditis [223, S. 189–190]. 70 - 80 % aller Wundinfektionen werden durch *S. aureus* hervorgerufen [69, 74, 78, 238]. Typische Krankheitsbilder sind Pyodermien, Impetigo contagiosa, Pneumonien, Mastitis puerperalis, Parotitiden, aber auch Hirnabzesse und Meningitiden sowie der Pemphigus neonatorum oder das Staphylococcal-Scalded-Skin-Syndrom [223, S. 189-190]. Besondere Bedeutung kommt dem Erreger dadurch zu, dass etwa 90 % der Stämme Penicillinasen bilden und daher gegen „ungeschützte“ Penicilline resistent sind. Kommen zusätzlich noch modifizierte Penicillin-bindende Proteine (PBP2a) hinzu, werden alle Betalaktam-Antibiotika wirkungslos, da sie nicht mehr an die veränderten PBP binden können [129]. Aufgrund der Referenzsubstanz in der Resistenztestung werden diese Stämme als Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) bezeichnet. Die Bildung modifizierter PBP beruht auf der Aufnahme des *mecA*- oder des *mecC*-Gens [108, 109]. Gegen MRSA sind nur noch wenige Antibiotika-Gruppen wirksam [161]. *S. aureus* ist selbst in Gegenwart von Serum kaum in der Lage auf abiotischen Oberflächen einen Biofilm zu bilden [37]. Er kann aber Biofilm-assoziierte Infektionen ohne Fremdkörperbeteiligung, wie z. B. die Nativklappen-Endokarditis, chronische Verlaufsformen der Osteomyelitis, persistierende Wundinfektionen oder chronisch persistierende Infektionen der Atemwege bei Patienten mit Cystischer Fibrose verursachen [6, 47, 241]. Darüber hinaus ist er häufig in polymikrobiellen Biofilmen nachweisbar. Im polymikrobiellen Biofilm mit *C. albicans* bindet er an dessen Hyphen und bildet dort oberflächliche Mikrokolonien aus [83, 188]. In Biofilmen nimmt der Sauerstoffgradient von der Oberfläche zur Basis ab. Dadurch sind Wachstum, Proteinsynthese und metabolische Aktivität an der Oberfläche des Biofilms am stärksten und im Zentrum des Biofilms am geringsten ausgeprägt [19]. Die am langsamsten wachsenden Zellen im Zentrum sind am tolerantesten gegenüber sekundär bakteriziden Antibiotika, wie Betalaktamen, die nur auf proliferierende Bakterien wirken und können dadurch im Biofilm persistieren [59]. Persistenzellen, auch „small colony variants“ (SCV) genannt, zeigen sich in der Kultur auf Columbia-Agar als sehr kleine, nicht hämolysierende, unpigmentierte Kolonien [52]. Sie wurden vor allem bei Antibiotika-refraktären, rekurrenden und persistierenden Infektionen, wie der chronischen Osteomyelitis und chronischen Haut- und Weichteilinfektionen beschrieben [2, 21, 52, 95, 117]. Bei 6,6 % der an Cystischer Fibrose erkrankten Patienten konnte der SCV-Phänotyp nachgewiesen werden [233]. SCVs verschaffen sich außerdem einen Überlebensvorteil dadurch, dass sie Wirtszellen besser invadieren können als *S. aureus* - Zellen ohne SCV-Phänotyp. Die Wirtszellen werden nicht lysiert, möglicherweise weil der SVC-Phänotyp nur wenig oder gar kein Alpha-Toxin bildet [52]. Die intrazelluläre Lage schützt vor dem Angriff des Immunsystems und vor Antibiotika.

### 1.4. *Candida albicans*

*C. albicans* ist nur eine von circa 200 Spezies der Gattung *Candida*. Sie hat sich jedoch evolutionär am besten an Warmblüter angepasst. *C. albicans* ist Bestandteil der physiologischen Flora des Menschen und besiedelt vor allem die Mundhöhle (bis zu 40 % positive Sputumproben bei gesunden Menschen), die Kolon-Rektum-Region und die Vagina. Eine Infektion mit dieser einzelligen, kugelförmigen Hefe zählt zu den häufigsten Ursachen pilzbedingter Mortalität beim Menschen [76, 156, S. 815–816]. *C. albicans* verursacht bis zu 75 % aller Candida - Infektionen und über 60 % der invasiven Candidosen, welche v. a. bei immunsupprimierten Patienten mit einer hohen Mortalität vergesellschaftet sind [31, 200]. So konnte in einer Punktprävalenzstudie zu Infektionen auf Intensivstationen bei 17 % aller Patienten eine Infektion mit *C. albicans* nachgewiesen werden [234]. Der Nachweis im Respirationstrakt war assoziiert mit einer verlängerten Beatmungsdauer bzw. Liegezeit auf Intensivstationen sowie mit einer längeren Aufenthaltsdauer im Krankenhaus im Vergleich zu Patienten, die keine Besiedlung mit *C. albicans* vorwiesen [177]. Darüber hinaus stellt eine Besiedlung des Respirationstraktes mit *C. albicans* einen unabhängigen Risikofaktor für eine *P. aeruginosa* - Pneumonie dar [12].

Zu den bezeichnenden Eigenschaften gehören die veränderlichen Zellmorphologien, die Fähigkeit den Koloniephänotyp mit hoher Frequenz zu ändern und die genomische Diversität durch Chromosomenshuffling [33, 134]. *C. albicans* ist ebenfalls in der Lage, eine Kapsel zum Schutz vor Phagozytose und schädlichen Umwelteinflüssen zu bilden. Der wichtigste Pathogenitätsfaktor ist die Fähigkeit, in Abhängigkeit von äußeren Umwelteinflüssen binnen kurzer Zeit die Morphe von einer unizellulären Hefeform (Blastospore) in eine filamentöse Form (Hyphne und Pseudohyphne) zu verändern (= Dimorphismus). Bei einer Temperatur unter 37 °C, einem pH-Wert unter 4 oder einer Zelldichte über  $10^7$  Zellen/ml existiert *C. albicans* in der Hefenform. Pseudohyphen (unparallel und dicker als 2  $\mu\text{m}$ ) entsprechen elongierten, aneinander liegenden Hefezellen, die den Anschein von Verzweigungen erwecken. Echte Hyphen (parallele Wände, 2  $\mu\text{m}$  Zellbreite und Septen zur Trennung der Zellkerne) bilden sich z. B. in Gegenwart von Serum bei 37 °C und einem pH von 7 aus [29, 76, 150, 151]. Viele weitere Faktoren wie Nährstoffangebot und chemische Signalstoffe (Quorum-sensing-Moleküle) sind an der morphologischen Transition beteiligt [97]. Eine besondere Bedeutung kommt der Hefenform in der Phase der Dissemination zu, während die Transformation in die Hyphenform für die Adhärenz und Penetration von Epithelschichten und damit für die Gewebeinvasion essentiell ist [76, 188, 214]. An der Gewebeinvasion sind außerdem sezernierte Degradationsenzyme beteiligt, zu denen saure Aspartylproteinasen und Phospholipasen zählen [105, 134, 223, S. 604 – 605].

Im Biofilm finden sich alle drei Morphotypen, wobei die basale Schicht aus dicht gepackten, den Biofilm an der Oberfläche verankernden Hefenformen besteht. Darüber findet sich eine Schicht mit senkrecht orientierten Hyphen gefolgt von einer zunehmend lockeren Hyphen-

schicht, die vor allem unter Sauerstoffmangel vermehrt gebildet wird [14, 40]. *C. albicans* zeigt im Vergleich zu anderen *Candida spp.* ein signifikant stärkeres Biofilm-Wachstum [87, 92]. Hervorzuheben ist die hohe Antimykotikaunempfindlichkeit von Candida - Biofilmen. Intakte Biofilme sind unempfindlich gegenüber einer Vielzahl antifungal wirkender Substanzen, z. B. Amphotericin B oder Azolen wie Voriconazol [14, 90, 136]. Eine Antibiotikabehandlung mit Clindamycin, Penicillin G oder Vancomycin kann durch Zerstörung der obligat anaeroben bakteriellen Mikroflora ein überproportionales Wachstum von *C. albicans* im Gastrointestinaltrakt oder in der Vagina begünstigen, da diese als Platzkonkurrenten eine zu starke Candida - Proliferation unter Normalbedingungen verhindern [123, 134]. Durch die genannten Virulenzfaktoren sowie die große Anpassungsfähigkeit kann *C. albicans* ein breites Spektrum von Krankheiten beim Menschen auslösen. Hierzu zählen die symptomatische Besiedelung der Schleimhäute (z. B. Vaginalmykose, Mundsoor), verschiedene Hautmykosen (z. B. intertriginöse Candidiasis, Onychomykose) sowie die Candidämie mit disseminierten Organmykosen, die mit einer Letalität von bis zu 40 % vergesellschaftet sind [223, S. 605 – 606].

## 1.5. Zell-Zell-Kommunikation in Biofilmen

*In-vitro*-Studien komplexer mikrobieller Gemeinschaften zeigten, dass die Interaktionen innerhalb einer oder zwischen verschiedenen Spezies durch kleine, in das extrazelluläre Milieu sezernierte, Signalmoleküle vermittelt werden. Hierzu gehören neben extrazellulären Virulenzfaktoren oder sekundären Metaboliten auch Quorum-sensing (QS)-Moleküle [79, 97, 124]. Das QS-System ist ein Dichte- und Dosis-abhängiges interzelluläres Kommunikationssystem, das die Genexpression innerhalb einer Spezies oder zwischen verschiedenen Spezies koordiniert [242]. Es basiert auf der Bildung und Erkennung (sensing) selbstgenerierter Signalmoleküle, deren Expression oder Repression von der Populationsdichte (quorum) und der Beschaffenheit der Umgebung abhängen. QS-Systeme steuern die Expression einer Vielzahl exogener Virulenzfaktoren und sekundärer Metabolite, kontrollieren die Biofilmbildung und sind wesentlich an der Entwicklung von polymikrobiellen Gemeinschaften beteiligt, die sowohl aus Prokaryonten als auch aus Eukaryonten bestehen können [45]. Die QS-Systeme von *P. aeruginosa* und *C. albicans* sind inzwischen sehr gut untersucht. *P. aeruginosa* produziert drei Signalmoleküle, das 3-Oxo-C12-Homoserinlaktone (HSL), das C4-HSL und das *P. aeruginosa*-Quinolone-Signal (PQS) 2-Heptyl-3-Hydroxy-4-Quinolone und reguliert damit z. B. die Bildung von Elastasen, Exotoxin A, alkalischer Protease, Chitinase, Lektin, Rhamnolipid, Pyocyanin, Phenazin, Superoxid-Dismutase und Katalase [115]. *C. albicans* bildet mindestens zwei QS-Signalmoleküle - E,E-Farnesol und Tyrosol - die beide den Dimorphismus und die Biofilmbildung von *C. albicans* beeinflussen [8, 103, 194]. Farnesol inhibiert bei *P. aeruginosa* die Bildung des PQS durch die Hemmung der Transkription des *pqsA*-Operons und reduziert damit die Bildung von Pyocyanin [43]. Bei *S. aureus* bewirkt Farnesol eine Hemmung der

Biofilmbildung, eine Reduktion der Lipaseaktivität durch kompetitive Hemmung des katalytischen Zentrums sowie eine verminderte Bildung von Plasma-Koagulase. Die Hemmung der Bildung von  $\beta$ -Laktamasen führt zu einer zunehmenden Wirksamkeit von Betalaktam-Antibiotika [111, 137, 138].

Darüber hinaus produziert *C. albicans* Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ).  $PGE_2$  gehört zu den Eicosanoiden, einer Familie von 20-Karbonfettsäure-Metaboliten. Ausgehend von der Arachidonsäure (AA), die Bestandteil humaner Zellmembranen ist, wird durch die Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1 und -2) zunächst  $PGH_2$  gebildet, aus dem durch die PGE-Synthase  $PGE_2$  entsteht. Es sind 4 Prostaglandin  $E_2$ -Rezeptoren bekannt (EP1-4), die alle an sensorischen Neuronen zu finden sind.  $PGE_2$  kommt daher eine wesentliche Bedeutung bei der Wahrnehmung und Verarbeitung von Schmerz zu [122, 217].  $PGE_2$  reguliert außerdem den Tonus der glatten Muskulatur, was insbesondere am Uterus von klinischer Relevanz ist. Eine allgemeine Vasodilatation, die Erweiterung des Bronchialsystems sowie die Erhöhung der Mucinproduktion im Magen sind weitere Effekte [152, S. 421–422]. Des Weiteren löst  $PGE_2$  Fieber aus und beeinflusst das Immunsystem, indem es die Aktivierung, die Reifung und die Freisetzung von Zytokinen sowie die Migration von Säugerzellen, insbesondere die der angeborenen Immunabwehr, reguliert [5, 17, 75, 118, 179].

*C. albicans* ist bekannt als kommensaler Mikroorganismus gesunder Menschen, aber dennoch in der Lage, disseminierte oder chronische Infektionen auszulösen, wenn die Schleimhautbarriere verletzt oder die Immunantwort des Wirtes inadäquat ist. Im Rahmen der Entzündungsreaktion kommt es zu Zelluntergängen, wodurch AA freigesetzt wird. *C. albicans* besitzt keine AA, ist aber in der Lage, aus externen Arachidonsäure-Quellen authentisches Prostaglandin  $E_2$  zu synthetisieren [57, 176, 175]. Die Bildung von  $PGE_2$  bei *C. albicans* erfolgt über andere Wege als bei menschlichen und tierischen Zellen, da das Genom von *C. albicans* kein Cyclooxygenase-Homolog aufweist. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Fettsäure-Homolog *ole2* und das Kupfer-Oxidase-Homolog *fet3* in die  $PGE_2$ -Synthese von *C. albicans* involviert sind [57].

$PGE_2$  kann die Th1-Immunantwort, die Phagozytose und die Lymphozyten-Proliferation hemmen und eine Th2-Antwort auslösen, was zur Entwicklung chronischer *C. albicans* - Infektionen führen kann [57]. In *C. albicans* - Biofilmen wird verstärkt  $PGE_2$  gebildet. Es kumuliert im Biofilm und begünstigt den Übergang von der Hefen- zur Hyphenform.  $PGE_2$  reguliert damit den wichtigsten Virulenzmechanismus von *C. albicans*, den Dimorphismus, und begünstigt die Kolonisation von Geweben und Fremdkörpern [9, 57, 119, 176]. Bei Patienten mit Cystischer Fibrose war die chronische Kolonisation bzw. Infektion der Atemwege durch *C. albicans* mit einer Verschlechterung der Atemfunktion vergesellschaftet [71].

Somit könnte  $PGE_2$  einen signifikanten Einflussfaktor in Biofilm-assoziierten Infektionen darstellen. Zudem werden weitere physiologische Mechanismen durch Prostaglandin  $E_2$  mitreguliert.

## 1.6. Cystische Fibrose

Ein klassisches klinisches Beispiel für ein gemeinsames Vorkommen von *C. albicans*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* stellt die Cystische Fibrose dar. Die auch als Mukoviszidose bekannte autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung wird durch Mutationen im "cystic fibrosis"(CF)-Gen verursacht, was eine Funktionsveränderung des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)-Proteins mit sich bringt. Dieser Defekt führt zur Bildung zähflüssiger Sekrete durch exokrine Drüsen und damit zu Problemen im Digestiv- und Atemtrakt [25]. Die gehäuft auftretenden Infektionen und die daraus folgenden chronischen Entzündungen zerstören über längere Zeit die Lungenstruktur. Des Weiteren ist die Nährstoffaufnahme aus dem Gastrointestinaltrakt erschwert, sodass viele CF-Patienten nur schwer ein gesundes Körpergewicht erreichen. In Deutschland beträgt die Inzidenz bei Geburt 1:3300 bei einer Prävalenz von 0,829 auf 10000 Menschen. Mehr als 39 % haben eine F508-Deletion, bei knapp 47 % dieser Fälle sind beide Allele von der Mutation betroffen [44, 60].

Auf biochemischer Ebene betrachtet handelt es sich bei dem CFTR-Protein um einen cAMP-abhängigen Chlorid- und ATP-Kanal [202]. Je nach der Art der Störung bei der Bildung des CFTR-Proteins werden fünf Klassen unterschieden: I - keine Synthese, II - Prozessierungsblock, III - Regulierungsblock, IV - veränderte Leitfähigkeit, V - reduzierte Synthese. Folglich führen diese Veränderungen zu einer defizienten mukoziliären Clearance, zu einer bronchialen Obstruktion und zu einem gehäuften Auftreten von Infektionen [4, 95, 208].

Die chronische Infektion mit *P. aeruginosa* ist die Hauptursache für die Mortalität [102]. Im ersten Lebensjahrzehnt stellen *S. aureus* und *Haemophilus influenzae* die häufigsten Erreger dar. Bei über 60 % der Patienten konnte mindestens einmal der Nachweis einer positiven Kultur von *S. aureus* erbracht werden [233]. *C. albicans* ist in der Altersgruppe von 11 - 15 Jahren am häufigsten vertreten, insgesamt konnte er bei ca. 75 % aller Patienten beobachtet werden [16, 157, 233].

In der zweiten und dritten Lebensdekade steigt der Anteil von Patienten, die mit *P. aeruginosa* kolonisiert sind, deutlich [229, 233]. Die Besiedlungsraten liegen in dieser Altersgruppe bei ca. 70 % [16, 21]. Bei Mukoviszidose stehen supportive atemwegsreinigende Therapieoptionen neben der Antibiotika-Therapie zur Verfügung. Beispiele für supportive Therapien sind Perkussion und posturale Drainage, Expiration gegen positiven Druck, hochfrequente Thoraxkompressionen oder sportliche Betätigung [64]. Intravenöse Antibiotikatherapien sollten nur im stationären Setting durchgeführt werden [63]. Hierbei sollte gerade in milden Erkrankungsphasen die Monotherapie der Kombinationstherapie vorgezogen werden. In den letzten Jahren hat die Inhalationstherapie mit Antibiotika zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die Antibiotika können dadurch in hohen Konzentrationen direkt an den Wirkort transportiert werden. Bei persistierender Pseudomonas-Infektion kann laut der amerikanischen Leitlinie neuerdings mit Aztreonam inhaliert werden [167, 198]. Die in Deutschland geltende AWMF-Leitlinie empfiehlt zur Eradikation von *P. aeruginosa* in den tiefen Atemwegen zur inhalativen

Therapie Colistin (in Kombination mit oraler Gabe von Ciprofloxacin) oder Tobramycin [170]. Die US-amerikanische Cystic Fibrosis Foundation offeriert einen neuen Therapieansatz mit Ivacaftor, einem CFTR-Potentiator, sofern eine G551D-CFTR-Mutation vorliegt (4,3 % aller CF-Patienten) [44, 167, 244]. Des Weiteren sollte mit Dornase alfa und hypertoner Kochsalzlösung inhaliert werden. Die Benutzung von Kortikosteroiden bei einer akuten Exazerbation oder kontinuierliche  $\beta$ -Laktam-Antibiotika-Infusionen werden nicht empfohlen [63, 167].

### 1.6.1. Biofilm bei Cystischer Fibrose

Gerade in der Pathogenese der CF spielen Biofilme eine wichtige Rolle [98]. Für *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass sich mit der Krankheitsdauer auch die Virulenz der Erreger durch Adaptation verändert. In frühen Krankheitsstadien erfolgt die Infektion mit nicht-mukoiden *P. aeruginosa* [146, 233]. Die in einem späterem Krankheitsstadium gewonnenen *Pseudomonas spp.* waren weniger virulent. Sie zeigten keine Pilus-Beweglichkeit oder Pyocyanin-Produktion sowie eine reduzierte Sekretion von Proteasen, waren aber weiterhin zur Invasion fähig und produzieren im Gegenzug mehr Faktoren, die für eine persistierende Infektion sorgen [28, 160, 216]. Hierzu zählt die Überproduktion von Alginat (Exopolysaccharid) durch den mukösen Morphotypen, der für eine Persistenz in der Lunge sorgt und somit die frustrane Immunantwort des Körpers unterhält [112, 149, 233]. Hierdurch kommt es zu einer chronischen Gewebedestruktion mit folgender respiratorischer Insuffizienz [223, S. 267]. Bis zu 80 % aller erwachsenen Mukoviszidose-Patienten haben eine chronische *P. aeruginosa* - Infektion [99]. Über die letzten 20 Jahre konnte eine deutliche Zunahme der Infektionsraten mit *S. aureus* beobachtet werden. In einer Studie aus dem Jahr 2012 wurde bei 69 % der CF-Patienten in den USA eine *S. aureus* - Infektion nachgewiesen, 26,5 % davon waren Methicillin-resistent (MRSA). Durch die aggressiven Therapieregime sanken indessen die Infektionsraten durch *P. aeruginosa* auf unter 50 %. *S. aureus* ist somit der am häufigsten nachgewiesene Erreger in den Atemwegen bei Patienten mit Cystischer Fibrose [44, 215]. Bei etwa 2 % der Patienten mit persistierender *S. aureus* - Infektion konnten mukoide *S. aureus* - Isolate nachgewiesen werden. Diese besitzen einen Überlebensvorteil durch besseren Schutz gegen Neutrophile und können somit länger in der CF-Lunge persistieren [215]. Zudem konnte festgestellt werden, dass unter anaeroben Bedingungen, wie sie in den Mukus-Plaques der CF-Lunge vorliegen, die Produktion interzellulärer Adhäsionspolysaccharide bei *S. aureus* stark anstieg [231, 240].

## 1.7. Fragestellung

Ziel der Arbeit ist es, modellhaft das komplexe Zusammenwirken von Prokaryonten (*S. aureus* und *P. aeruginosa*) und Eukaryonten (*C. albicans*) im polymikrobiellen Biofilm zu untersuchen. Ein Krankheitsbild, bei dem es regelhaft zum Auftreten von Biofilmen von aller drei Mikroorganismen kommt ist die Cystische Fibrose. Bei Kindern mit Cystischer Fibrose haben Beobachtungen gezeigt, dass eine Eradikation von *S. aureus* zu einer früheren Besiedlung mit

*P. aeruginosa* führt [199]. *Candida spp.* und Schimmelpilze werden als reine Kolonisationskeime angesehen und in der Regel nicht behandelt. Die Therapie zielt in erster Linie auf die antibiotische Behandlung von *P. aeruginosa* im Falle einer Exazerbation, wohl wissend, dass die Antibiotika-Testung *in-vitro* nicht die besonderen Verhältnisse der CF-Lunge widerspiegelt [63]. Vor allem supportive Maßnahmen haben bei diesen Patienten zu einer Lebensverlängerung in mittlere Lebensalter geführt [64]. Rekurrende Infektionen schädigen jedoch die Lunge zusätzlich, sodass im finalen Stadium die Lungentransplantation unumgänglich ist [223]. Diese ist jedoch zur Zeit noch mit einer hohen Mortalität behaftet (5-Jahres-Überleben 59,6 %) [86]. Durch die morphologische und quantitative Untersuchung der Biofilme sowie der Effekte von Quorum-sensing-Molekülen sollen tiefere Einblicke in die Regulation von polymikrobiellen Gemeinschaften gewonnen werden, um daraus gegebenenfalls neue alternative Therapieansätze ableiten zu können.

## 2. Material und Methoden

Die Auflistung der verwendeten Materialien erfolgt in tabellarischer Form unter Angabe des Herstellers.

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Autoklavensautomat	Heraeus Instruments
Brutschrank - Bakterien (GFL 3032)	GFL
Dampfsterilisator (Varioklav)	H+P
Dichtemessgerät (Vitek DensiCheck)	BioMérieux
Digitalwaage (MXX-412)	Denver Instruments
Fluoreszenzmikroskop (BX 51)	Olympus
Gefrierschrank (-80 °C)	Heraeus Instruments
Inkubator (Cytoperm 2)	Heraeus Instruments
Kühlschrank (Liebherr Comfort) (8 °C und -18 °C)	Liebherr
Mikroplatten-Reader (Dynatech MR 5000)	Milenia Biotec
Multidetektion-Mikroplatten-Reader (Synergy HT)	BioTek
Phasenkontrastmikroskop (IMT-2)	Olympus
Pipetten (verschiedene Zugvolumina)	Eppendorf
Schwenkinkubator - Pilze (Inkubator 1000 und Unimax 1010)	Heidolph
Spektrophotometer	Eppendorf
Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 C)	Eppendorf
Ultraschallgerät (Ultrasonic Cleaner 200 T)	VWR
Ultrazentrifuge (Omnifuge 2.0 RS)	Heraeus Sepatech
Vortexer (Reax 1)	Heidolph
Zellzähler (Cell-Dyn 1800)	Abbott

**2.1.2. Verbrauchsmaterialien**

Aluminiumfolie	Laborbedarf
Entsorgungsbeutel	Carl Roth
Gewebekulturplatten (6 Vertiefungen)	Greiner Bio-One
Gewebekulturplatten (12 Vertiefungen)	Greiner Bio-One
Gewebekulturplatten (96 Vertiefungen)	VWR
Gewebekulturplatte mit Anti-Kaninchen-IgG-Beschichtung und Deckel	Cayman
Gewebekulturplatte mit Anti-Maus-IgG-Beschichtung und Deckel	Cayman
Glaswaren (Spatel, Zentrifugenröhrchen)	Laborbedarf
Latexhandschuhe (Peha-soft®)	Paul Hartmann
Mullkompressen	Fuhrmann
Nagellack	Drogeriehandel
Nitrilhandschuhe (Nobaglove®)	Noba Verbandmittel Danz
Objektträger und Deckgläser	Thermo Scientific
Pinzetten	Laborbedarf
Pipettenspitzen 100 µl (Ultratip)	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen 1000 µl	Sarstedt
Plastikdeckgläschen, steril (CellCulture Coverslips - Thermanox Plastic 13 mm)	Thermo Fisher Scientific
Plastikösen (1 µl / 10 µl)	Greiner Bio-One
Sicherheitsröhrchen (Safe-lock tubes) (1,5 ml / 2 ml)	Eppendorf
Spritzenfilter	Carl Roth
Stieltupfer (Raucotupf)	Lohmann-Rauscher
Zellschaber	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15 ml / 50 ml)	Greiner Bio-One

**2.1.3. Mikroorganismen**

Für die Untersuchungen der polymikrobiellen Biofilme von Hefepilzen und Bakterien wurden die in Tabelle 2.1 aufgezeigten Mikroorganismen verwendet. Bei den Patientenstämmen handelt es sich um klinische Isolate aus diagnostischen Proben, die an das Institut für Medizinische Mikrobiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg gesendet wurden.

Die beiden hier verwendeten Mutanten M134 und M1096 entstanden durch schrittweise Mutagenese von *C. albicans* SC 5314. Bei dem Stamm M134 sind im Vergleich zum Elternstamm SC 5314 beide URA3-Gene (Orotodin-5'-Monophosphat-Dekarboxylase) deletiert worden (= Ura3-Null-Mutante; siehe Tabelle 2.1). Der Stamm wird in der Literatur als CAI-4 bezeichnet [65, 68]. *C. albicans* M134 wurde als Ausgangsstamm für die Disruption der Multicopper-Oxidase-Gene *fet31* (früher als *fet3* bezeichnet) verwendet. *Fet31*-defiziente

Stämme produzieren geringere Mengen an PGE<sub>2</sub>, da das Multicopper-Oxidase-Homolog fet31 in die Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthese von *C. albicans* involviert ist [57].

Die Mutanten wurden uns vom Hans-Knoell-Institut Jena zur Verfügung gestellt.

Gattung	Stamm	Referenz/Quelle
<i>Candida albicans</i>	SC 5314	wt-Laborstamm, URA3/URA3, Farnesol-produzierend [72]
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	wt-Laborstamm, Farnesol-negativ [104]
<i>Candida albicans</i>	M134	prototroph, URA3-Null-Mutante von SC 5314, ( <i>ura3</i> <sup>-/-</sup> <i>rps1::URA3/RPS</i> ); identisch mit CAI-4 [68]; kurz als <i>ura3</i> <sup>-/-</sup> bezeichnet
<i>Candida albicans</i>	M1096	prototroph, identisch mit FET31-Nullmutante von CAI4, ( <i>ura3</i> <sup>-/-</sup> <i>fet31</i> <sup>-/-</sup> <i>::URA3</i> <sup>-/-</sup> ); [49]; kurz als <i>ura3</i> <sup>-/-</sup> <i>fet31</i> <sup>-/-</sup> bezeichnet
<i>Candida albicans</i>	VA 31883	Patientenisolat, Sputum von einem Patienten mit CF
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Laborstamm, motil, nicht mukoid [148]
<i>Staphylococcus aureus</i>	VA 19552	Patientenisolat, aus Rachenabstrich von einem Patienten mit CF
<i>Staphylococcus aureus</i>	VA 31883	Patientenisolat, Sputum von einem Patienten mit CF

Tabelle 2.1.: Mikroorganismen

#### 2.1.4. Kulturmedien und -platten

Chromagar Candida	BD
Columbia 5 % Schafblut - Agar	BD
LB-Nährmedium (Luria Broth Base - Miller's LB Broth Base)	Invitrogen
MacConkey-Agar No. 3	Oxoid
Mannitol-Kochsalz-Agar (Chapman)	BioMérieux
TSB-Nährmedium (Tryptone Soya Broth)	Oxoid
YPD-Nährmedium (Yeast Peptone Dextrose)	Sigma

**2.1.5. Chemikalien**

Calcofluor-white (lyophilisiertes Pulver)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) ohne Ca und Mg	Lonza
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) mit Ca und Mg	Lonza
Essigsäure 99 %-ig	Sigma
EIA Carbonatpuffer	Cayman
EIA Phosphatpuffer	Cayman
EIA Pufferkonzentrat	Cayman
EIA Waschpufferkonzentrat	Cayman
Ellman's Reagenz	Cayman
Ethanol (99,9 % und 70 %)	Zentralapotheke
Farnesol	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (fetal bovine serum)	Gibco
FUN-1 Zellfärbung (10 mM Lösung in DMSO)	Invitrogen
Glycerol gepuffert mit PBS (pH 8,4)	Euroimmun
Kristallviolett	Sigma
Methanol	J.T.Baker
Natriumchlorid (NaCl)	Zentralapotheke
Polysorbat 20	Cayman
Prostaglandin E <sub>2</sub>	Sigma
Prostaglandin E <sub>2</sub> Antikörper (monoklonal)	Cayman
Prostaglandin E <sub>2</sub> AChE-Tracer	Cayman
Prostaglandin E <sub>2</sub> EIA Standard	Cayman
Prostaglandin E Metabolite EIA Antiserum	Cayman
Prostaglandin E Metabolite EIA AChE-Tracer	Cayman
Prostaglandin E Metabolite EIA Standard	Cayman
RPMI-1640 mit L-Glutamin (Zellkulturmedium)	Gibco
Sputasol <sup>®</sup> (Liquid)	Oxoid
Tyrosol	Sigma-Aldrich
XTT	Trevigen

## 2.2. Methoden

Die kulturelle Anzucht des Biofilms, die Phasenkontrastmikroskopie sowie die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie orientierten sich an den von Chandra et al. publizierten Methoden [40]. Die Modifikationen sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

Die verwendeten Patientenisolate wurden im Diagnostiklabor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene aus klinischen Proben von Patienten mit Cystischer Fibrose angezüchtet. Dazu wurden Sputumproben mit steriler Kochsalzlösung im Verhältnis 1:1 homogenisiert und anschließend auf verschiedenen Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden 2 Tage bei 37 °C, zwei Tage bei 30 °C und 3 Tage bei Raumtemperatur bebrütet. Die Rachenabstriche wurden in gleicher Weise verarbeitet, allerdings ohne Homogenisierung. Die Isolate wurden mit Hilfe des Massenspektrometers Vitek MS (Firma BioMérieux) identifiziert und unter Verwendung des Microbank<sup>TM</sup>-Systems (Firma Bestbion) nach Herstellerangaben bei -80 °C asserviert.

### 2.2.1. Anlegen von Stockkulturen

Für die Nutzung in den Experimenten wurden von allen verwendeten Mikroorganismen Stockkulturen angelegt. Dazu wurden die Stämme aus dem Microbank<sup>TM</sup>-System auf Columbia-Agar mit 5 % Schafblut (Schafblut-Agar) ausgeimpft und über Nacht bei 37 °C und Raumluft inkubiert. Am Folgetag wurden Subkulturen auf Schafblut-Agar angelegt, die für weitere 24 h bei gleichen Bedingungen inkubiert wurden. Von den Subkulturen wurden 2 - 3 Kolonien in das entsprechende Flüssigmedium (YPD für *C. albicans*, LB für *P. aeruginosa*, TSB für *S. aureus*) eingebracht und über Nacht (16 - 20 h) bebrütet. 1,6 ml der jeweiligen Flüssigkultur wurden in 2 ml-Eppendorf-Röhrchen mit 0,4 ml Glycerol versetzt, so dass eine 20 %-ige Stocklösung entstand. Die Eppendorf-Röhrchen wurden bei -80 °C tiefgefroren. Am Folgetag wurde von jeder der angefertigten Stockkulturen mit einer 10 µl-Öse Material entnommen, auf Schafblut-Agar ausgeimpft und nach 24 h und 48 h visuell auf Reinheit überprüft. Die Stockkulturen wurden alle 4 Wochen bzw. nach 3-maliger Verwendung verworfen.

### 2.2.2. Anzucht der Stämme aus Stockkulturen

Die Bakterien wurden zunächst aus den Glycerolstocks auf Schafblut-Agar ausgeimpft und für 24 h bei 37 °C bebrütet. Danach wurden von der ersten Subkultur je 3 - 5 Kolonien in 5 ml TSB-Bouillon (*S. aureus*) bzw. LB-Flüssigmedium (*P. aeruginosa*) gegeben und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter Agitation (180 rpm) inkubiert. Ein Milliliter der Flüssigkultur wurde in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen bei 8000 U/min 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit je 1 ml DPBS gewaschen und anschließend in dem für das entsprechende Experiment erforderlichen Kulturmedium resuspendiert. Die *C. albicans* - Stämme wurden in 100 ml YPD-Medium bei 30 °C unter Agitation mit 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden 8 ml Flüssigkultur bei 1500 U/min

zentrifugiert. Das Pellett wurde zweimal mit je 8 ml DBPS gewaschen und hiernach ebenfalls in dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert.

### 2.2.3. Kultivierung von Biofilmen

In dieser Arbeit wurden sowohl duale als auch polymikrobielle Biofilme untersucht und mit monomikrobiellen Biofilmen von *C. albicans*, *S. aureus* und *P. aeruginosa* verglichen. Primär lag der Focus auf der Untersuchung der Bedeutung von *C. albicans* für die Ausbildung gemischter Biofilme, wie sie z. B. in der Lunge von CF-Patienten vorkommen (Teil 1 der Arbeit). Aus diesem Grund wurden folgende Kombinationen gewählt:

1. *C. albicans* mit *P. aeruginosa*
2. *C. albicans* mit *S. aureus*
3. *C. albicans* mit *P. aeruginosa* und *S. aureus*

Im Folgenden wird bei Kombination von *C. albicans* mit einem Bakterium von „dualen Biofilmen“ und bei Verwendung von allen drei Mikroorganismen von „polymikrobiellen Biofilmen“ gesprochen. Zur Anzucht der Biofilme wurden Flachboden-Gewebekulturplatten aus Polystyren verwendet. Zur Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) wurden Gewebekulturplatten mit 12 Vertiefungen gewählt. Für die Fluoreszenzfärbungen wurden die Biofilme auf Polystyren-Scheiben (slides) mit einem Durchmesser von 13 mm angezüchtet, die in Gewebekulturplatten mit 6 Vertiefungen eingelegt wurden. Die 6- bzw. 12-Lochplatten wurden mit jeweils 1 ml Pilz- oder Bakteriensuspension beimpft. Die Vertiefungen wurden anschließend mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 3 ml aufgefüllt.

Zur Bestimmung der Biofilm-Dicke mit dem Kristallviolett- bzw. mit dem XTT-Assay wurden die Biofilme in Platten mit 96 Vertiefungen kultiviert. Dazu wurden die Vertiefungen mit je 50 µl der Pilz- oder Bakteriensuspension beimpft. Die Vertiefungen wurden anschließend mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 150 µl aufgefüllt.

*C. albicans* wurde am Hämozytometer auf eine Konzentration von  $3 \times 10^6$  Zellen/ml, die Bakterien auf einen McF = 0,5 (ca.  $1 \times 10^8$  Zellen/ml) eingestellt. Als Medium wurde RPMI mit 10 % FCS verwendet. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in feuchter Atmosphäre zunächst ohne Agitation.

Für Untersuchungen zur Adhäsion der Mikroorganismen wurden die Platten für die Dauer von 1 h, 2 h und 3 h inkubiert. Zur Untersuchung der Biofilmbildung wurden Inkubationszeiten von 12 h, 24 h und 96 h gewählt, wobei nach 3 h Adhäsion ein Mediumwechsel durchgeführt wurde, um nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Von jeder Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Um die Effekte des Mediumwechsels auf die Biofilmbildung nach 96 h zu überprüfen, wurde in einem weiteren Ansatz zusätzlich zum ersten Mediumwechsel nach drei Stunden nach jeweils 24 h ein weiterer Mediumwechsel durchgeführt, also nach 24 h, 48 h und 72 h.

Zur weiteren Untersuchung dualer *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilme (Teil 2 der Arbeit) wurden die Anzuchtbedingungen adaptiert. Dazu wurden Gewebekulturplatten mit 12 Vertiefungen genutzt, die mit jeweils 1 ml der entsprechenden Keimsuspension oder mit Medium als Leerkontrolle beimpft wurden. Die Einstellung der *S. aureus* - Zellzahl erfolgte am Spektrometer auf eine OD<sub>600</sub> von 0,02 in RPMI + 10 % FCS, was einer Keimzahl von 1,5-3x10<sup>6</sup> KBE/ml entspricht.

Für den Kristallviolettversuch wurden 96-Loch-Platten verwendet, die mit jeweils 100 µl Keimsuspension oder Medium beimpft wurden. Die Platten wurden für 90 min, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h unter Agitation mit 75 rpm in einer feuchten Kammer auf dem Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Nach jedem Zeitpunkt wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnten reproduzierbar stabile Biofilme angezüchtet werden. Zur Überprüfung wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt (siehe Seite 26)[41, 85]. Zur Untersuchung des Einflusses von *C. albicans* - Überständen auf das Wachstum von *S. aureus* wurde wie folgt vorgegangen: Nach 90 min sowie 24 h, 48 h, 72 h und 96 h Inkubation wurden die Überstände abgenommen und durch einen Filter mit der Porengröße 0,22 µm steril filtriert. Jeweils 500 µl Überstand wurde 1:1 mit RPMI + 10 % FCS verdünnt und auf 24 h gewachsene *S. aureus* - Kulturen gegeben und anschließend weiter für 24 h bei 37 °C in feuchter Kammer unter Agitation bei 75 rpm inkubiert.

## 2.2.4. Methoden zur Quantifizierung von Biofilmen

### 2.2.4.1. Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Zur Erfassung von Veränderungen in der Zusammensetzung dualer und polymikrobieller Biofilme im Vergleich zu monomikrobiellen Biofilmen wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Milliliter bestimmt. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Überstände entfernt. Jeder Biofilm wurde, sofern möglich, vorsichtig mit 2 ml DPBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber abgelöst. Das abgelöste Material wurde in ein Eppendorf-Gefäß aufgenommen und entweder mechanisch oder chemisch in Anlehnung an die Methode von Efthimiadis et al. homogenisiert [50]. Für die mechanische Homogenisierung wurde der Biofilm in 1 ml DPBS aufgenommen, für 3 Minuten Ultraschall ausgesetzt und anschließend mit der Pipette homogenisiert. Für die chemische Lyse wurde der Biofilm mit 1 ml Sputasol liquid<sup>®</sup> (Konzentration 50 µg/ml) überschichtet, mit einem Zellschaber abgelöst und im Schüttelinkubator unter Agitation von 350 rpm bei 22 °C für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Homogenisate seriell 1:10 bis auf 10<sup>-7</sup> verdünnt und je 100 µl von jeder Verdünnung auf den entsprechenden Selektivmedien ausgespatelt. Folgende Selektivmedien wurden verwendet:

1. Chromagar Candida zur Anzucht von *C. albicans*
2. MacConkey-Agar zur Anzucht von *P. aeruginosa*

### 3. Mannitol-Salz (Chapman)-Agar zur Anzucht von *S. aureus*

Zur Kontrolle des Wachstums und der Reinheit der Probe wurde Columbia-Agar mit 5 % Schafblut verwendet. In Vorversuchen wurde die Selektivität aller 3 ausgewählten Platten überprüft. Die Bestimmung der Keimzahlen von *C. albicans* - Kolonien erfolgte nach 48 h Bebrütung bei 30 °C, die der Bakterienkolonien nach 24 h Bebrütung bei 37 °C. Zur Berechnung der KBE/ml wurden die Platten der Verdünnungsstufe verwendet, die mit 10-300 Kolonien bewachsen waren. Von den Triplikaten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

#### 2.2.4.2. Kristallviolett-Färbung

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um eine Quantifizierung der Biofilmdicke zu verschiedenen Messzeitpunkten zu ermöglichen. Sie wurde in Anlehnung an die Methode von Peeters et al. durchgeführt [186]. Um möglichst genaue Werte zu erhalten, wurde die optimale Kristallviolettkonzentration in Vorexperimenten ermittelt. Nach Inkubationszeiten von 3 h, 12 h, 24 h und 96 h wurde der Überstand entfernt und jede Vertiefung mit 200 µl DPBS vorsichtig gewaschen. Die Intaktheit des Biofilms wurde visuell am Phasenkontrastmikroskop überprüft. Im nächsten Schritt wurde der Überstand durch Ausklopfen der Platte vollständig dekantiert und der Biofilm mit 150 µl Methanol je Vertiefung für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Der so fixierte Biofilm wurde anschließend erneut am Phasenkontrastmikroskop auf Intaktheit überprüft. Nach Entfernung des Methanols wurde die Platte für 5 min luftgetrocknet. Alle Biofilme wurden nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit mit Kristallviolettkonzentrationen im Bereich von 0,01 % bis 1,5 % gefärbt und anhand der graphisch aufgetragenen Absorption die optimale Färbekonzentration ermittelt (Abb. A.1, S. 84). Hierzu wurde die ermittelte optische Dichte zu den jeweilig verwendeten Kristallviolettkonzentrationen aufgetragen. Die optimale Konzentration ist die Konzentration am Umschlagpunkt der Kurve vom dynamischen zum stationären Bereich der Kurve. Somit wurde eine Kristallviolettkonzentration von 0,2 % für alle weiteren Messungen und Experimente gewählt.

**2.2.4.2.1. Färbung** Die 4 %-ige Kristallviolett-Stammlösung wurde mit sterilem Aqua dest. auf 0,2 % verdünnt. 100 µl dieser Lösung wurden für 20 min bei Raumtemperatur in jede Vertiefung gegeben. Anschließend wurde mit Leitungswasser die überständige Farbe abgewaschen und die Platte erneut ausgeklopft. Mit 150 µl 33 %-iger Essigsäure je Vertiefung wurde das gebundene Kristallviolett unter fünfminütigem leichten Schaukeln herausgelöst. Der Inhalt jeder Vertiefung wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gefüllt und bei 14.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Jeweils 100 µl des zellfreien Überstandes wurden in eine neue 96-Loch-Platte pipettiert. Die optische Dichte wurde bei 570 nm am Mikroplattenreader (Dynatech MR 500) dreimal Leerwert-korrigiert gemessen.

**2.2.4.2.2. Quantifizierung der Biofilmdicke** Die Bestimmung der Biofilmdicke erfolgte entsprechend der Klassifikation von Stepanovic et al. [219]. Hierbei wurde ein Cut-Off-Wert bestimmt, der die Grundlage für die Klassifikation bildet. Der Cut-Off-Wert ( $OD_c$ ) ist der um drei Standardabweichungen vergrößerte Leerwert der Negativkontrollen. Die gemessenen OD-Werte wurden nun mit dem zuvor bestimmten  $OD_c$  verglichen und in folgende vier Gruppen eingeteilt:

$OD \leq OD_c$	keine Biofilmbildung
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	schwache Biofilmbildung
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	moderate Biofilmbildung
$4 \times OD_c < OD$	starke Biofilmbildung

Um eine graphische Darstellung zu ermöglichen, wurde ein  $OD/OD_c$ -Verhältnis berechnet.

### 2.2.4.3. XTT-Reduktionstest

Der XTT-Reduktionstest beruht auf der metabolischen Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes 2,3-Bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carbox-Anilide (XTT) in ein dunkelblaues XTT-Formazan-Produkt durch mitochondriale Dehydrogenasen [91, 220]. Dieser Farbumschlag kann kolorimetrisch gemessen werden. Dabei ist die Farbintensität proportional zur Biofilmdicke. Die Versuchsdurchführung orientierte sich an Ramage et al. [195] (adaptiert nach Hawser et al. [91]). Zur Anzucht wurde eine 96-Loch-Zellkulturplatte mit Flachboden verwendet, sodass sich in jeder Vertiefung abschließend insgesamt 150  $\mu$ l Volumen befanden, bestehend aus verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der Mikroorganismen zu je 50  $\mu$ l. Fehlendes Volumen wurde mit RPMI + 10 % FCS aufgefüllt. Anschließend wurde die Platte für 1 h bei 37 °C und 5 %  $CO_2$  inkubiert.

Die XTT-Lösung wurde unmittelbar vor dem Gebrauch entsprechend der Herstellerangaben frisch vorbereitet. Hierfür wurden 5 ml DPBS in das Fläschchen hinzugegeben, vorsichtig geschwenkt und 5 min bei 56 °C im Wasserbad erwärmt, sodass eine klare Flüssigkeit entstand. Anschließend wurde diese Flüssigkeit mit Hilfe eines 0,22  $\mu$ m-Bakterienfilters steril filtriert. Das leere XTT-Fläschchen wurde erneut mit 5 ml DPBS gefüllt und nochmals steril filtriert, sodass ein Gesamtvolumen von 10 ml XTT-Gebrauchslösung entstand. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes wurde das Röhrchen mit handelsüblicher Aluminiumfolie umwickelt.

Nach der Bebrütungszeit wurden die Überstände entfernt, die Biofilme vorsichtig gewaschen und anschließend mit 200  $\mu$ l XTT-Lösung überschichtet. Die Zellkulturplatten wurden anschließend für 60 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die XTT-Lösung aus jeder Vertiefung in ein 1,5 ml-Eppendorf- Gefäß mit Spitzboden überführt und bei 8000 rpm zentrifugiert, um zelluläre Bestandteile zu entfernen. 150  $\mu$ l von jedem Überstand wurden in eine 96-Loch-Zellkulturplatte mit Flachboden pipettiert. Die Messung erfolgte am Mikroplattenreader (Dynatech MR 5000) bei 490 nm in dreifacher Ausführung jeweils als Original-

werte und Leerwert-korrigierte Werte. Für die Auswertung wurden die Leerwert-korrigierten Daten verwendet.

### 2.2.5. Methoden zur Untersuchung der Biofilmstruktur

Um tiefere Einblicke in die Architektur gemischter Biofilme zu erlangen und ggf. eine Quantifizierung zu ermöglichen, wurden die Biofilme mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Dazu wurden die Biofilme auf sterilen Polystyren-Scheiben (slides; Durchmesser 13 mm) angezüchtet, die in die Vertiefungen der Zellkulturplatten eingelegt wurden. Nach der Inkubation wurde der Überstand entfernt und jeder Biofilm mit 1 ml DPBS vorsichtig gewaschen, um nicht adhärente Mikroorganismen zu entfernen. Jeder Biofilm wurde doppelt angelegt (2-fach-Bestimmung). Jeweils eine Biofilm-Kontrolle wurde nicht gefärbt, um Veränderungen durch den Färbeprozess erkennen zu können.

#### 2.2.5.1. Calcofluor-white-Färbung

Calcofluor-white ist ein optischer Aufheller, der vor allem an Zellulose und Chitin bindet [56, 81, 94]. Chitin, ein stickstoffhaltiges lineares Homopolysaccharid mit  $\beta$ -1,4-glykosidisch verknüpftem N-Acetylglucosamin, ist ein essentieller Bestandteil der Zellwände und Septen von pathogenen Pilzen. Intakte Zellwände stellen sich blau dar.

Die Färbelösung wurde entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. Calcofluor-white lag als lyophilisiertes Pulver vor. Es wurde mit 10 ml DMSO versetzt, so dass eine 100 mM Stocklösung entstand. Anschließend wurde die Stocklösung mit DPBS (1  $\mu$ l Calcofluor-white auf 4 ml DPBS) so verdünnt, dass eine Gebrauchslösung mit einer Endkonzentration von 25  $\mu$ M Calcofluor-white entstand. Diese Färbelösung wurde bis zur Verwendung mit Aluminiumfolie vor Licht geschützt. Jeder Biofilm wurde mit 3 ml Calcofluor-white-Gebrauchslösung überschichtet und anschließend unter Lichtabschluß bei 30 °C für 45 min inkubiert. Nach Entfernen der Farblösung wurde jeder Plastikträger mit einer sterilen Pinzette vorsichtig entnommen. Die überschüssige Färbelösung wurde durch seitliches Anstellen auf Krepppapier entfernt. Die Plastikträger wurden auf Objektträger übertragen, die durch eine kurze Vorbehandlung mit 70 %-igem Ethanol entfettet worden waren. Ein neues halbiertes slide wurde direkt neben dem bewachsenen slide platziert, um ein späteres akzidentielles Abkippen des Deckgläschens zu vermeiden. Abbildung 2.1 veranschaulicht die Anordnung. Als Einbettmedium diente ein Tropfen Glycerol, anschließend wurde der Biofilm mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach 24 h Trocknung wurde der Plastikträger mit handelsüblichem Nagellack abgedichtet und fixiert. Die visuelle Begutachtung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus IMT2-SFR) unter Verwendung eines UV-Fluoreszenzfilters.

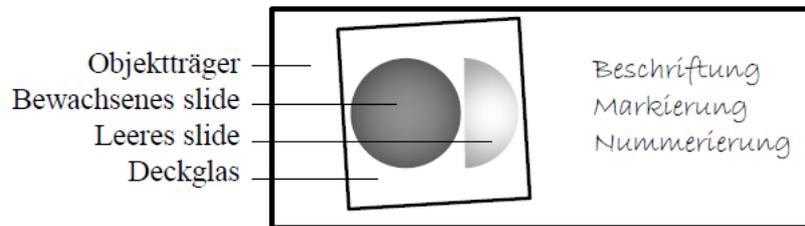


Abbildung 2.1.: Eindeckelung: Gezeigt ist die Anordnung des mit dem Biofilm bewachsenen Plastikträgers nach dem Eindeckelungsvorgang.

### 2.2.5.2. FUN-1-Färbung

FUN-1 [2-Chloro-4-(2,3-Dihydro-3-Methyl-(Benzo-1,3-Thiazol-2-yl)-Methyliden)-1-Phenylquinolinium Iodid] ist ein Fluoreszenzmolekül, das zur Färbung von Hefepilzen verwendet wird. Sofern die Plasmamembran intakt ist, wird der Farbstoff von lebenden als auch toten Zellen aufgenommen. Unter Fluoreszenzlicht (Anregung bei 470-590 nm Wellenlänge, Emission bei  $\geq 530$  nm) kann dann eine diffuse hellgelb-grünliche Färbung des Zytoplasmas beobachtet werden. Lebende Zellen transportieren den Farbstoff weiter in Vakuolen, wo es kompakte zylindrische, rot gefärbte Strukturen (cylindrical intravacuolar structures = CIVS) bildet. Diese sind 0,5-0,7  $\mu\text{m}$  breit und mindestens 1 bis mehrere  $\mu\text{m}$  lang. Eine Differenzierung zwischen lebenden, metabolisch aktiven und toten Zellen ist somit möglich (Abb. A.2, S. 85). Menschliche Zellen nehmen FUN-1 nicht auf [40, 58, 168]. Die Färbelösung wurde entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet. FUN-1 lag als 10 mM Lösung in 300  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst tiefgefroren vor. Das Auftauen der Färbelösung erfolgte erst kurz vor der Verarbeitung.

### 2.2.5.3. Fluoreszenz-Doppel-Färbung

Durch Kombination der beiden Farbstoffe Calcofluor-white und FUN-1 sollte eine zweifelsfreie Identifizierung lebender *C. albicans* - Zellen im polymikrobiellen Biofilm ermöglicht werden. Durch die drei verschiedenen anregenden Wellenlängen am CLSM stellten sich nach digitaler Einfärbung metabolisch aktive *C. albicans* - Zellen als blau begrenzte Zellen mit typischen roten Strukturen im Zytoplasma dar (siehe Abb. A.2, S. 85). Vorexperimente zeigten, dass Bakterien ebenfalls durch FUN-1 gefärbt werden, sodass eine Unterscheidung zwischen *P. aeruginosa* (grüne Stäbchen) und *S. aureus* (gelbe Kokken) in den folgenden Aufnahmen möglich ist. Deshalb konnte auf eine weitere Spezialfärbung der Bakterien verzichtet werden. Alle von dieser Festsetzung abweichende digitale Einfärbungen werden gesondert erwähnt. Zur Herstellung der Färbelösung wurde jeweils 1 ml DBPS (mit Ca und Mg) mit 0,31  $\mu\text{l}$  Calcofluor-white-Lösung (Endkonzentration 31  $\mu\text{M}$ ) und 1  $\mu\text{l}$  FUN-1-Lösung (Endkonzentration 10  $\mu\text{M}$ ) versetzt und in ein mit Aluminiumpapier ummanteltes 50 ml-Zentrifugenröhrchen

gefüllt. Die Biofilme wurden in Zellkulturplatten mit eingelegten Plastikträgern angezüchtet wie oben beschrieben. Jeder Biofilm wurde mit 1 ml Färbelösung überschichtet und die Gewebekulturplatte 45 min bei 30 °C unter Lichtabschluss inkubiert. Leerkontrollen wurden ebenfalls angelegt. Die Einbettung erfolgte analog dem beschriebenen Prozedere der Calcofluor-white-Färbung im Kapitel 2.2.5.1 ab Seite 21.

## **2.2.6. Mikroskopie**

### **2.2.6.1. Phasenkontrastmikroskopie**

Mit dieser Methode wurde die Qualität der Biofilme nach der entsprechenden Inkubationszeit beurteilt. Die Entwicklung der Biofilme wurde visuell mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops IMT-2 der Firma Olympus beobachtet. Bei dem verwendeten Stativ handelt es sich um ein IMT2-SFR. Es wurde ein Turret-Typ-Kondensator (ULWCD) verwendet mit einer numerischen Apertur von 0,4. Ein CDPL20XPL-Objektiv wurde dabei genutzt. Als Aufnahme-Software diente Image-Pro Plus (Version 5.0.1.11) der Firma Media Cybernetics.

### **2.2.6.2. Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie**

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (confocal laser scanning microscopy = CLSM) wurde am Laser-Raster-Mikroskop SP2 der Firma Leica im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchgeführt. Bei dem verwendeten Stativ handelt es sich um ein DM-IRE2 der Firma Leica. Es wurde ein 63er Objektiv verwendet mit einer numerischen Apertur von 1,4. Die Wellenlänge des anregenden Lasers war 488 nm für FUN-1, die Emission wurde in den Bereichen von 500 - 530 nm und 570 - 670 nm gemessen. Für Calcofluor-white wurde mit einer Wellenlänge von 364 nm angeregt. Die emittierte Strahlung wurde zwischen 409 - 468 nm aufgenommen. Die Aufnahmesoftware war die Originalsoftware der Fa. Leica. Für die Herstellung der Bildstapel, Einzelaufnahmen und Rekonstruktionen wurde ImageJ verwendet. Hiermit wurden die in Graustufen aufgenommenen Bildstapel verarbeitet und anschließend eingefärbt, wobei Calcofluor-white als Blauton, FUN-1 in Grün-, Gelb- und Orangetönen erscheint (Abweichungen werden an den entsprechenden Stellen gesondert erwähnt). Die weitere Bearbeitung der Bilder erfolgte mit Microsoft Paint und Paint.NET.

## **2.2.7. Quorum-sensing-Moleküle**

### **2.2.7.1. Bestimmung der Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)-Konzentration**

Zur Bestimmung der PGE<sub>2</sub>-Konzentration aus Überständen monomikrobieller und dualer Biofilme wurde ein kommerzieller monoklonaler enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) verwendet. Damit wurden sowohl die Wildtyp-Stämme von *C. albicans* als auch die

Mutanten (M134, M1096) untersucht. Zum entsprechenden Zeitpunkt wurden die Überstände der Biofilme abgenommen, bei 8000 x g zentrifugiert, zweimal mit Hilfe eines Bakterienfilters mit 0,22 µm Porengröße steril filtriert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Um eine Kontamination der Überstände mit vitalen Zellen von *S. aureus* bzw. *C. albicans* sicher auszuschließen, wurden 100 µl jedes zu untersuchenden Überstandes auf Columbia-Agar ausgespatelt und für 48 h bei 37 °C bzw. 30 °C bebrütet. Alle nach dieser Methode verarbeiteten Überstände waren zellfrei.

**2.2.7.1.1. PGE<sub>2</sub>-ELISA** Der Prostaglandin E<sub>2</sub> enzymgekoppelte Immunadsorbentstest basiert auf der gegenseitigen Verdrängung von einer variabel zu messenden Konzentration PGE<sub>2</sub> und einem in konstanter Konzentration vorliegendem PGE<sub>2</sub>-Acetylcholinesterase-Konjugat (Tracer = enzymmarkiertes Hapten) aus Bindungsplätzen einer limitierten Menge von murinen monoklonalen PGE<sub>2</sub>-Antikörpern [39]. Somit ist die Menge an Tracer, die an die Antikörper binden kann, umgekehrt proportional zur PGE<sub>2</sub>-Konzentration der Probe. Diese PGE<sub>2</sub>-Antikörper-Komplexe binden an die Mikrotiterplatten-gebundenen polyklonalen Anti-Maus-IgG (aus Ziegenserum). Ungebundene Reagenzien werden abgewaschen und nach Zugabe von Ellman's-Reagenz (enthält 5,5'-Dithio-Bis-(2-Nitrobenzoesäure) und Acetylthiocholin) entsteht durch die ablaufende enzymatische Reaktion Thiocholin, welches 5,5'-Dithio-Bis-(2-Nitrobenzoesäure) zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure umsetzt. Dieses gelb gefärbte Produkt absorbiert bei 405 nm spektrophotometrisch stark. Gemessen wurde mit einem Multidetektion-Mikroplatten-Reader (Synergy HT).

**2.2.7.1.2. PGE<sub>2</sub>-Metabolite-ELISA** PGE<sub>2</sub> wird in Serum schnell zu instabilen Zwischenprodukten (13,14-Dihydro-15-Keto-PGE<sub>2</sub> und 13,14-Dihydro-15-Keto-PGA<sub>2</sub>) abgebaut, die mit einem PGE<sub>2</sub>-Metabolite-Kit bestimmt wurden [57]. Dieses Kit überführt die instabilen Zwischenprodukte in ein messbares stabiles Derivat (Bicyclo-Prostaglandin E<sub>2</sub>), was als Marker für die PGE<sub>2</sub>-Produktion dient [38]. Kaninchen-Antiserum bindet das stabile Derivat ebenso wie den AChE-Tracer-Komplex. Beide Antikörper-Komplexe binden an die Mikrotiterplatten-gebundenen polyklonalen Anti-Kaninchen-IgG (aus Mausserum). Die nachfolgende Reaktion entspricht dem o. g. Vorgang. Die Test-Durchführung erfolgte streng nach den Vorgaben des Herstellers und wurde nicht modifiziert [38, 39].

**2.2.7.1.3. Zugabe von PGE<sub>2</sub>-Reinsubstanz zu monomikrobiellen *S. aureus* - Biofilmen** Monomikrobielle *S. aureus* - Biofilme (VA 19552) wurden in RPMI 1640 + 10 % FCS angezüchtet und nach 24 h mit verschiedenen Konzentrationen PGE<sub>2</sub>-Reinsubstanz (Stocklösung 1mg/ml in 99,9 % Ethanol) inkubiert. Der duale Standardbiofilm von *C. albicans* (SC 5314) mit *S. aureus* diente als Kontrolle. Folgende Konzentrationen wurden gewählt: 5 pg/ml, 12,5 pg/ml, 25 pg/ml, 50 pg/ml, 125 pg/ml, 250pg/ml und 500 pg/ml. Die Kontrollen enthielten RMPI + 10 % FCS ohne PGE<sub>2</sub>. Unter Agitation von 75 rpm bei 37 °C erfolgte eine Bebrü-

tung für weitere 24 h. Die dann anschließende Ausspätelung und Auszählung erfolgte nach dem Standardprotokoll (siehe Kap. 2.2.4.1 ab S. 18).

**2.2.7.1.4. Hitzebehandlung von Überständen** Um zu differenzieren, ob der waschstumss-timmulierende Effekt auf *S. aureus* im dualen Biofilm durch hitzelabile oder hitzestabile Substanzen hervorgerufen wird, wurden die Überstände von 72 - 96 h alten *C. albicans* - Biofilmen 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Anschließend wurden die hitzeinaktivierten Überstände im Verhältnis 1:1 mit frischem Medium versetzt, zu 24 h alten *S. aureus* - Biofilmen gegeben und für weitere 24 h inkubiert. Danach wurde die Anzahl der KBE im *S. aureus* - Biofilm bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Überstände.

Um die Auswirkungen einer Wärmebehandlung auf die PGE<sub>2</sub>-Reinsubstanz zu testen, wurden *S. aureus* - Biofilme mit zuvor für 30 min bei 56 °C erwärmtem PGE<sub>2</sub> inkubiert.

#### 2.2.7.2. Farnesol und Tyrosol

Die von *C. albicans* sezernierten QS-Moleküle Farnesol und Tyrosol wurden ebenfalls hinsichtlich ihres wachstumsstimulierenden Effektes auf *S. aureus* - Biofilme untersucht. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von Farnesol bzw. Tyrosol zu 24 h alten *S. aureus* - Biofilmen gegeben. Aus der Farnesol-Reinsubstanz wurde zunächst eine Stocklösung von 4,5 mmol/ml in DMSO hergestellt. Aus der Stocklösung wurden drei Gebrauchslösungen mit Konzentrationen von 500 µmol/ml, 50 µmol/ml und 25 µmol/ml hergestellt. Die Gebrauchslösungen mit einer Konzentration von 50 µmol/ml bzw. 25 µmol/ml wurden schrittweise 1:10 verdünnt bis auf Konzentrationen von 0,005 µmol/ml und 0,0025 nmol/ml. Da Farnesol in DMSO gelöst werden musste, wurde zum Ausschluß eines toxischen Effektes die gleiche Konzentration DMSO ohne Farnesol als Kontrolle mitgeführt.

Die Tyrosol-Reinsubstanz wurde ebenfalls in DMSO gelöst und auf eine Stockkonzentration von 7,2 mmol/ml eingestellt. Ausgehend von der Stocklösung wurden durch Verdünnung in RPMI + 10 % FCS Endkonzentrationen von 2,5 mmol, 1,0 mmol, 500 µmol und dann 1:10 seriell bis 0,005 pmol pro Vertiefung eingestellt. Die Biofilme wurden nach Zugabe der Substanzen für weitere 24 h bebrütet. Anschließend wurde die Anzahl der KBE bestimmt.

#### 2.2.7.3. Indometacin

Zur Blockade der PGE<sub>2</sub>-Synthese von *C. albicans* wurde Indometacin, ein nicht-selektiver COX-Inhibitor, verwendet. Indometacin gehört zu den nicht-steroidalen antiinflammatorischen Substanzen und wird medizinisch u. a. zur Behandlung von Schmerzen, Entzündungen und rheumatischen Erkrankungen eingesetzt [127]. Die Hemmung der ubiquitär im Gewebe vorkommenden Cyclooxygenase-1 (COX-1) sowie der induzierbaren COX-2 bewirkt eine Blockade der Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin H<sub>2</sub>, der Vorstufe von PGE<sub>2</sub> [5, 122, 180, 189].

Zur Vorbereitung der Experimente wurde eine Stocklösung von 1 M in DMSO hergestellt. Anschließend wurde die Stocklösung so verdünnt, dass sich in den Vertiefungen der Zellkulturplatte folgende Konzentrationen befanden: 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ . Die Indometacin-Konzentrationen wurden jeweils zu 24 h, 48 h, 72 h oder 96 h alten dualen Biofilmen gegeben, die anschließend für weitere 24 h inkubiert wurden. Die KBE aus den Biofilmen und die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen aus den Überständen wurden wie zuvor beschrieben bestimmt. Leerkontrollen wurden von *S. aureus* (VA 19552) und *C. albicans* (SC 5314) mit 1000  $\mu\text{M}$  Indometacin, 100 mM DMSO sowie mit RPMI-1640 + 10 % FCS angelegt.

### 2.2.8. Statistische Auswertung

Jedes Experiment wurde in dreifacher Bestimmung sowie an drei verschiedenen Tagen zur Überprüfung der Intra- und Interassay-Variabilität durchgeführt. Die statistische Aufarbeitung zur Ermittlung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen erfolgte mittels SigmaStat (Version 2.03) der Firma SPSS sowie mit Excel 2007 (Version 12.0.6683.5002) der Firma Microsoft.

Für die Berechnung der Signifikanz wurden t-Tests für jeweils zwei unabhängige Stichproben durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,05$  angenommen. Konnte für die berechnete Überschreitungswahrscheinlichkeit  $p$  festgestellt werden, dass  $p \leq \alpha$ , dann wurden die Unterschiede als signifikant ausgewiesen. Lag das Signifikanzniveau bei  $\alpha = 0,01$  wurden die Unterschiede als sehr signifikant, für  $\alpha = 0,001$  als hoch signifikant anerkannt, sofern hier auch  $p \leq \alpha$  galt.

Die Durchführung der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) erfolgte ebenfalls mit Excel. Hiermit war es möglich, mehr als zwei Stichproben bezüglich ihrer Mittelwerte zu vergleichen. Der hier berechnete F-Wert wird mit dem berechneten kritischen Wert  $F_{krit}$  verglichen. Ist  $F > F_{krit}$ , kann die Nullhypothese abgelehnt werden. Hierzu wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  angenommen. Gilt für die berechnete Überschreitungswahrscheinlichkeit  $P \leq \alpha$ , dann wurde der Unterschied als signifikant bezeichnet.

Allen in dieser Arbeit gezeigten Diagrammen liegen die Mittelwerte sowie die einfache Standardabweichung als Fehlerindikator der jeweiligen Experimente zugrunde. Sternchen in den Darstellungen kennzeichnen die als signifikant ausgegebenen Unterschiede. Höhere Signifikanzniveaus werden im Text gesondert erwähnt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Teil 1 - polymikrobielle Biofilme

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob in polymikrobiellen Biofilmen die Adhäsion und die Biofilmbildung eines Mikroorganismus von den Konkurrenzmikroorganismen beeinflusst wird. Dazu wurden sowohl duale als auch polymikrobielle Biofilme bestehend aus allen 3 Mikroorganismen (*C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) untersucht und mit den jeweiligen monomikrobiellen Biofilmen verglichen.

#### 3.1.1. Bestimmung der Adhäsionszeit

Die Adhäsionszeit polymikrobieller Biofilme wurde mithilfe der Phasenkontrastmikroskopie bestimmt. Innerhalb der ersten Stunde nach der Einsaat waren die Mikroorganismen noch nicht adhärent, viel mehr sorgte die Sedimentation für eine Anreicherung der Organismen am Boden der Kulturplatte. Schon kleinste Bewegungen führten zu einem Adhärenzverlust und zur Loslösung vom Untergrund. Nach 2 h (in Abb. 3.1 linkes Bild) begannen die Hefen kurze Keimschläuche zu bilden, aber ein fest haftender Mikroorganismenrasen existierte noch nicht. Im Medium fand sich ein hoher Anteil frei schwimmender Zellen. Nach 4 h (in Abb. 3.1 rechtes Bild) waren kaum noch Freiräume an der Plattenoberfläche vorhanden, die *C. albicans*-Hyphen verzweigten sich zunehmend und die Räume zwischen den Hefen wurden durch fest haftende Bakterienformationen ausgefüllt. Nach 3 h (in Abb. 3.1 mittleres Bild) fanden sich nur noch sehr wenige frei schwimmende Mikroorganismen im Medium (< 20 %). Etwa 80 % des Bodens der Vertiefungen der Gewebekulturplatte waren zu diesem Zeitpunkt mit fest

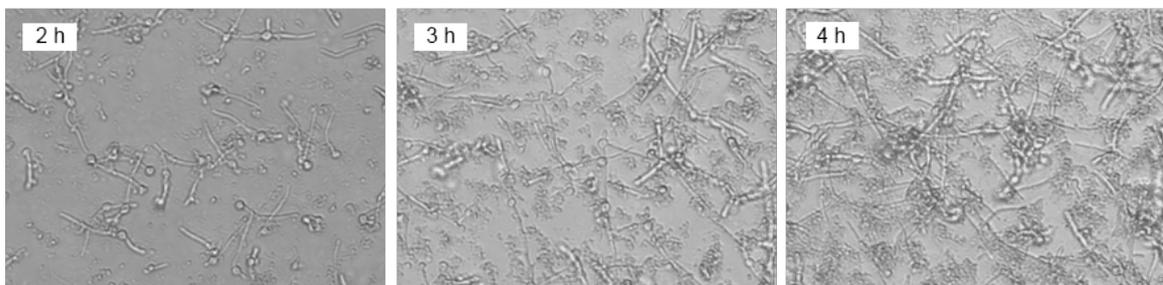


Abbildung 3.1.: Phasenkontrastmikroskopie: Aufnahmen vom polymikrobiellen Biofilm nach 2 h, 3 h und 4 h Inkubationszeit.

adhärierenden Bakterien- und Pilzzellen bedeckt. Die Hyphen waren deutlich kürzer als nach 4 h und es lagen weniger kugelige Hefen vor als nach 2 h. Diese Beobachtungen wurden in Wiederholungsexperimenten bestätigt. Nach viermaliger Durchführung des Ansatzes wurde eine Adhärenzzeit von drei Stunden als Grundlage für die Untersuchungen zur Biofilmbildung festgelegt, d. h. nach 3 h erfolgte ein Mediumwechsel, um lose, nicht adhärente Mikroorganismen zu entfernen. Die Biofilmbildung wurde in den folgenden Experimenten ausgehend von den adhärenenten Mikroorganismen betrachtet.

### 3.1.2. Einfluss verschiedener Mikroorganismen auf die Adhäsion

Um die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Mikroorganismen auf die Adhäsion zu untersuchen, wurden die einzelnen Spezies durch Bestimmung der koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml) am Ende der Adhäsionszeit, also nach 3 h, quantifiziert.

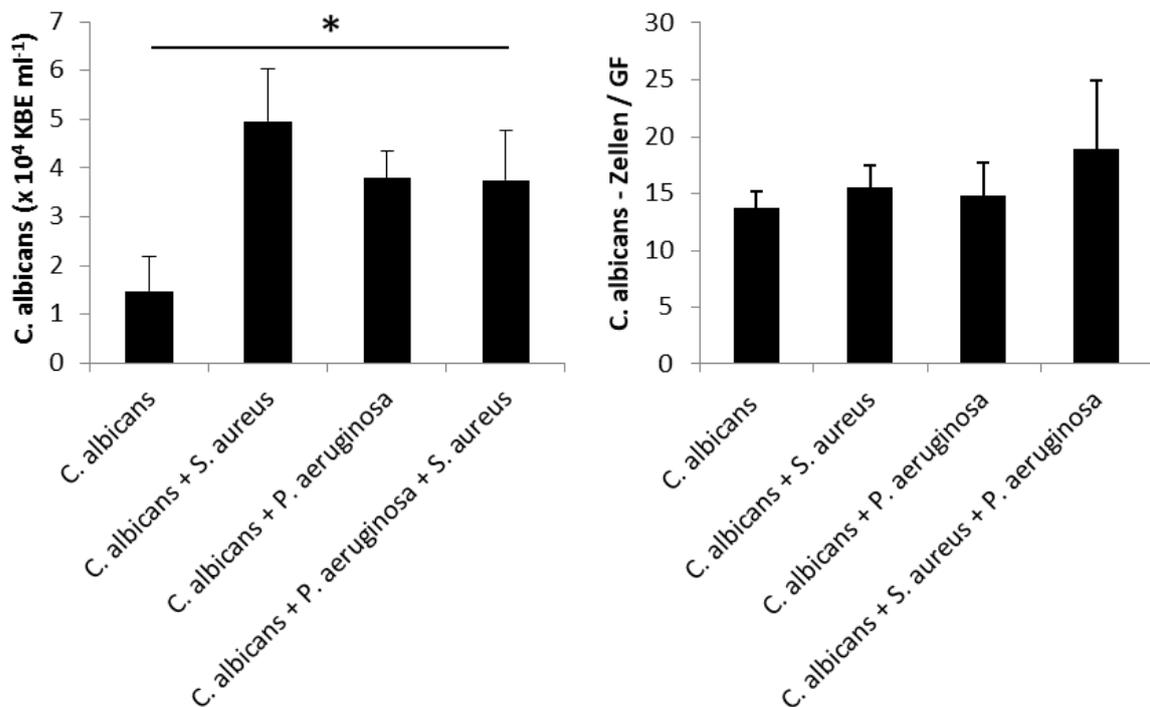


Abbildung 3.2.: Adhäsion: Abgebildet sind links die KBE/ml von *C. albicans* nach 3 h Adhäsion und rechts die Anzahl adhärenenter *C. albicans*-Zellen je Gesichtsfeld nach 3 h Inkubation mit und ohne Bakterien.

**C. albicans** Die Anzahl adhärenenter *C. albicans*-Zellen war zusammen mit Bakterien (entweder mit *S. aureus* oder mit *P. aeruginosa* oder mit beiden) deutlich höher als im monomikrobiellen *C. albicans*-Biofilm, sodass die Adhäsion von *C. albicans* durch Bakterien offensichtlich begünstigt wird (Abb. 3.2 links). Dabei waren die Unterschiede zwischen dem monomikrobiellen und den dualen bzw. dem polymikrobiellen Biofilm statistisch signi-

fikant ( $p < 0,05$ ). Zur Verifizierung des Ergebnisses wurde eine Calcofluor-white-Färbung durchgeführt und anschließend die adhärenenten *C. albicans* unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt (Abb. 3.3).

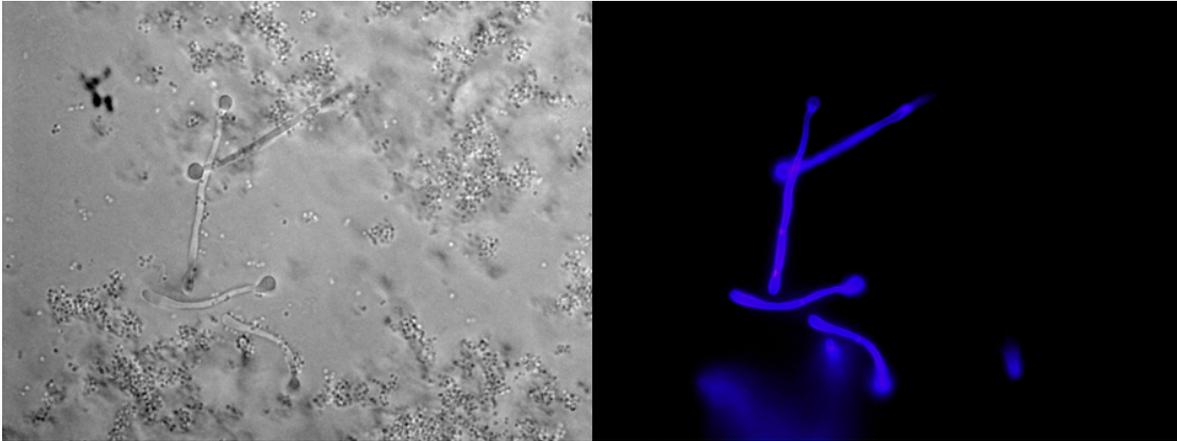


Abbildung 3.3.: Phasenkontrastmikroskopie (Bild links): Aufnahme am Phasenkontrastmikroskop vom polymikrobiellen Biofilm nach 3 h Inkubationszeit (Ursprungskonzentration 1:10 verdünnt).  
Fluoreszenzmikroskopie (Bild rechts): dazugehörige Fluoreszenzaufnahme (Vergrößerung 400x)

Die *Candida* - Zellen verteilten sich nicht gleichmäßig über die ausgezählten Gesichtsfelder. Es gab Bereiche auf dem Untergrund, in denen wenig bis gar keine Hefen adhärenent waren und andere Bezirke, in denen es nicht möglich war, die Anzahl der *C. albicans* aufgrund der Vielzahl an Zellen zweifelsfrei zu bestimmen. Um die Auszählbarkeit zu verbessern, wurden die Mikroorganismenkonzentrationen 1:10 verdünnt, so dass *C. albicans* in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  und die Bakterien in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  vorlagen. Es wurden jeweils 10 Gesichtsfelder ausgezählt und der Mittelwert gebildet (Abb. 3.2 rechts). Auch hier zeigte sich eine Zunahme adhärenenten *C. albicans* - Zellen in Anwesenheit der Bakterien. Der Effekt war im polymikrobiellen Ansatz am stärksten ausgeprägt, was im Widerspruch zu den Ergebnissen der Zellzahl-Bestimmung steht. Die Unterschiede zwischen den monomikrobiellen und den dualen bzw. polymikrobiellen Biofilmen waren statistisch nicht signifikant. Schwierigkeiten verursachten hier vor allem Übereinanderschichtungen sowie Verwachsungen und Verzweigungen der Hyphen, was die unterschiedlichen Testergebnisse erklärt.

***S. aureus*** Im Vergleich zu *S. aureus* alleine adhärenierten zusammen mit *C. albicans* deutlich mehr Zellen von *S. aureus* auf dem Boden der Petrischalen. In Anwesenheit von *C. albicans* und von *P. aeruginosa* hingegen war die Anzahl adhärenenten *S. aureus* - Zellen geringer (Abb. A.3, S. 85 links).

***P. aeruginosa*** Die Adhäsion von *P. aeruginosa* nahm sowohl in Anwesenheit von *C. albicans* als auch in Anwesenheit von *C. albicans* und *S. aureus* signifikant ab (Abb. A.3, S. 85 rechts).

### 3.1.2.1. Ergebnisse des XTT-Tests

Da sowohl Hefen als auch Bakterien XTT verstoffwechseln können, lässt der XTT-Test Rückschlüsse auf die Gesamtzahl stoffwechselaktiver Mikroorganismen im Biofilm und damit indirekt auf die Biofilmdicke zu. Hier sollten die Vorgänge in der frühen Adhäsionsphase genauer untersucht werden. Die am Spektrometer gemessenen Absorptionswerte zeigten auch nach mehrmaliger Wiederholung des Experimentes keine stabilen Messwerte. Eine konkrete Bestimmung der gesamten Biofilmmenge gelang in der Adhäsionsphase der Biofilmbildung nicht.

### 3.1.3. Einfluss verschiedener Mikroorganismen auf die Biofilmbildung

#### 3.1.3.1. Zeitliche Entwicklung der Biofilm-Dicke

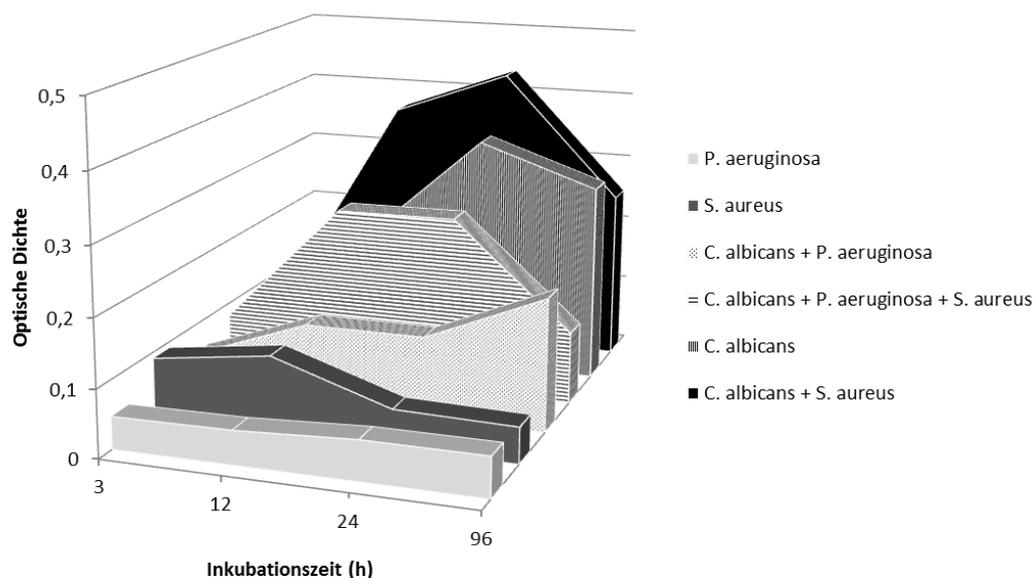


Abbildung 3.4.: Kristallviolett-Assay. Dargestellt sind die Leerwert-korrigierten Extinktionen der verschiedenen Biofilme nach 3 h, 12 h, 24 h und 96 h gemessen bei 570 nm.

Kristallviolett ist ein basischer Farbstoff, der an negativ geladene Oberflächenmoleküle und Polysaccharide in der extrazellulären Matrix lebender und toter Zellen bindet. Somit spiegelt die gemessene Extinktion die Gesamtmasse des Biofilms wieder. Insgesamt zeigte jeder Biofilm einen für ihn charakteristischen zeitlichen Verlauf (Abb. 3.4 und Abb. A.4, S. 86).

Auffallend war, dass die monomikrobiellen Biofilme von *P. aeruginosa* und *S. aureus* deutlich

dünnere blieben, als der *C. albicans* - Biofilm. Die Biofilmkombinationen der Bakterien mit *C. albicans* waren wesentlich dicker als die monomikrobiellen Bakterienbiofilme. Eine Kombination mit *C. albicans* führte demnach zur Ausbildung dickerer Biofilme. Der *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilm war dicker als der *C. albicans* - *P. aeruginosa* - Biofilm. Letzterer war sogar geringer als der monomikrobielle *C. albicans* - Biofilm. Der polymikrobielle Biofilm hatte im Verlauf mehr Masse als die monomikrobiellen Bakterienbiofilme und der duale *C. albicans* - *P. aeruginosa* - Biofilm. Allerdings war er dünner als der *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilm. *P. aeruginosa* wirkte sich somit negativ auf die Biofilmbildung von *C. albicans* aus. Alle Biofilme, an denen *S. aureus* beteiligt war, zeigten nach 96 h einen Abfall der Extinktion. Ursächlich könnten Vitalitätsveränderungen von *S. aureus* sein. Auch der Übergang in einen metabolisch ruhigeren Zustand (SCV-Bildung) könnte die Biomasseproduktion durch *S. aureus* erheblich reduzieren.

### 3.1.3.2. Quantitative Beurteilung der Biofilmproduktion anhand der OD/OD<sub>c</sub>-Ratio

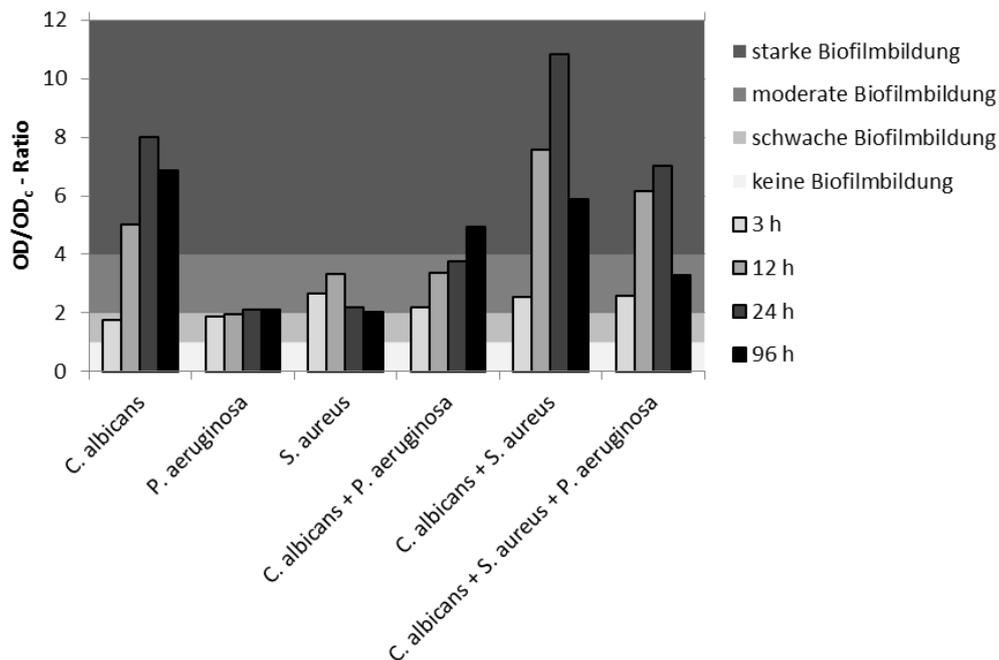


Abbildung 3.5.: Biofilmmassenproduktion: Gezeigt ist die OD/OD<sub>c</sub>-Ratio verschiedener Biofilme nach 3 h, 12 h, 24 h und 96 h zur Darstellung der Biofilmproduktion.

Mittels der OD/OD<sub>c</sub>-Ratio ist es möglich, die Biofilmproduktion in ein Klassifikationssystem einzuteilen. Somit sind nicht nur relative Vergleiche zwischen den einzelnen Kombinationen möglich, sondern auch absolute Aussagen bezüglich der Produktion von Biofilmmasse (Abb. 3.5). *P. aeruginosa* allein stellte sich zu allen Zeitpunkten als schwacher Biofilmproduzent heraus. *S. aureus* zeigte zunächst eine moderate, nach 24 h jedoch nur eine schwache Biofilmbildung. Bei *C. albicans* setzte nach 12 h bereits eine starke Biofilmbildung ein. Im

dualen *C. albicans* - *P. aeruginosa* - Biofilm nahm die Biofilm-Bildung kontinuierlich im Vergleich zum monomikrobiellen *P. aeruginosa* - Biofilm deutlich zu. In Zusammenschau mit dem monomikrobiellen *C. albicans* - Biofilm hingegen war die Biofilm-Masse deutlich geringer. Der duale *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilm war bereits nach 12 h wesentlich dicker als der monomikrobielle *S. aureus* - oder der monomikrobielle *C. albicans* - Biofilm. Den Höchstwert (größte gemessene OD/ODc-Ratio im gesamten Experiment) erreichte der *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilm nach 24 h. Alle drei Mikroorganismen zusammen bildeten einen Biofilm, der deutlich dicker war als die monomikrobiellen Biofilme von *S. aureus* und *P. aeruginosa*. Die Biofilmdicke war in etwa vergleichbar mit der des monomikrobiellen *C. albicans* - Biofilms. Insgesamt nahm die Masse dualer und polymikrobieller Biofilme im Vergleich mit rein bakteriellen Biofilmen deutlich zu. Dem monomikrobiellen *C. albicans* - Biofilm gegenüberstellend stieg die Biomasse nur in Kombination mit *S. aureus*. In Kombination mit *P. aeruginosa* hingegen nahm sie ab.

### 3.1.3.3. Veränderungen der quantitativen Zusammensetzungen in Biofilmen

Um Veränderungen der Zusammensetzung während der verschiedenen Phasen der Biofilmbildung zu verfolgen, wurden die einzelnen Spezies zunächst durch Bestimmung der koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml) in einer Zeitkinetik quantifiziert. Dabei wurden die Zellzahlen je Spezies im polymikrobiellen Biofilm mit denen im jeweiligen monomikrobiellen bzw. dualen Biofilm verglichen. Ein Mediumwechsel erfolgte zunächst einmalig nach 3 h Inkubationszeit.

#### 3.1.3.3.1. *C. albicans* in mono- und polymikrobiellen Biofilmen

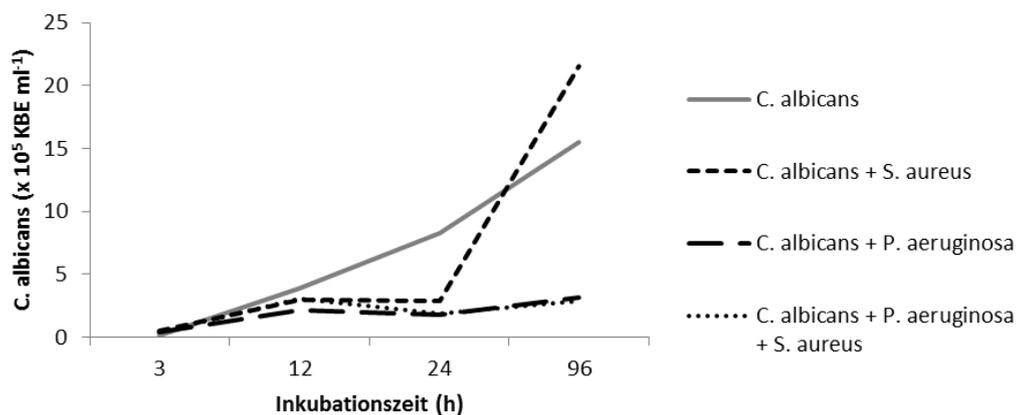


Abbildung 3.6.: KBE-Kinetik: Gezeigt ist die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) von *C. albicans* pro Milliliter in verschiedenen Biofilmen nach verschiedenen Inkubationszeiten.

Die Anzahl der KBE von *C. albicans* nahm im monomikrobiellen Biofilm nach der Adhäsion

sionsphase kontinuierlich zu und erreichte nach 96 h das Maximum (Abb. 3.6). Im dualen *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilm waren innerhalb der ersten 24 h signifikant ( $p \ll 0,001$ ) weniger *C. albicans* - Zellen enthalten als im monomikrobiellen *C. albicans* - Biofilm (Abb. A.5, S. 86). Nach 24 h war die Zunahme der KBE deutlich stärker als im monomikrobiellen *C. albicans* - Biofilm, so dass die Anwesenheit von *S. aureus* nach 24 h offensichtlich einen die Proliferation von *C. albicans* verstärkenden Effekt hatte. Demgegenüber war der Anteil der KBE von *C. albicans* in Anwesenheit von *P. aeruginosa* zu allen untersuchten Zeitpunkten deutlich geringer als in monomikrobiellen *C. albicans* - Biofilm und ebenfalls geringer als in dualen Biofilmen mit *S. aureus*. Zum maximalen Untersuchungszeitpunkt (96 h) waren die KBE vom monomikrobiellen *C. albicans* - Biofilms 5,4-fach und die im dualen *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilm 7,6-fach so groß wie die KBE im polymikrobiellen Biofilm. Diese Unterschiede waren hoch signifikant ( $p \ll 0,001$ ). Insgesamt scheint die Anwesenheit von *S. aureus* die Proliferation von *C. albicans* zu begünstigen, während *P. aeruginosa* die Proliferation von *C. albicans* zu hemmen scheint.

### 3.1.3.3.2. *S. aureus* und *P. aeruginosa* in mono- und polymikrobiellen Biofilmen

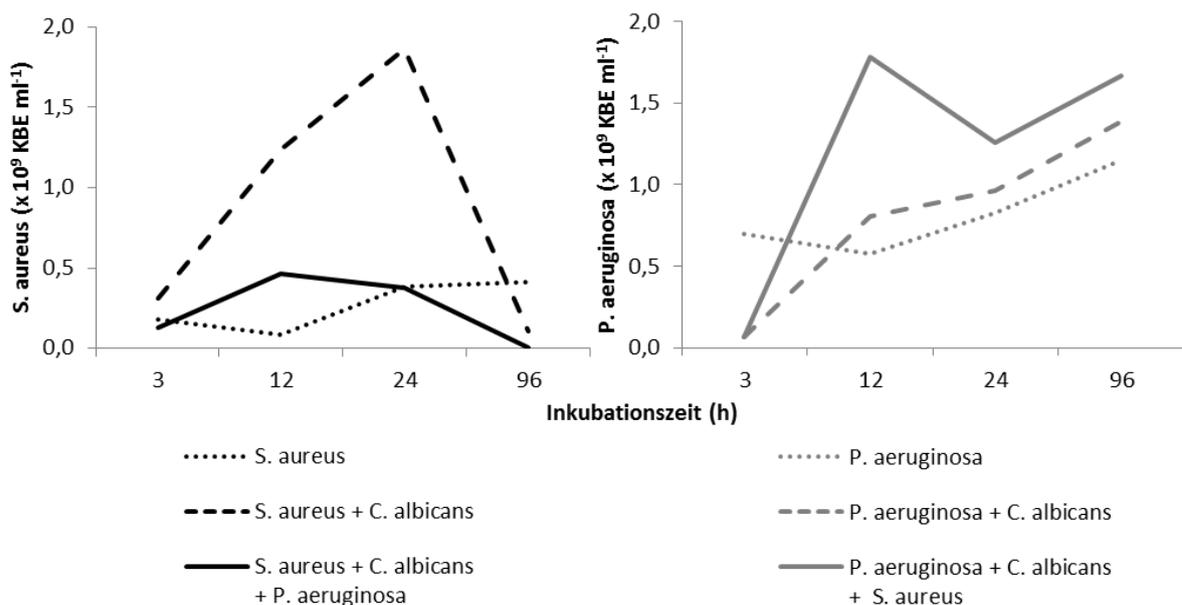


Abbildung 3.7.: KBE-Kinetik: Zu sehen sind die KBE/ml von *S. aureus* und *P. aeruginosa* in verschiedenen Biofilmen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

*S. aureus* zeigte im dualen Biofilm zusammen mit *C. albicans* bis 24 h ein deutlich stärkeres Wachstum als im mono- oder polymikrobiellen Biofilm. Zu diesem Zeitpunkt wurde die höchste KBE aller Zeitpunkte und Biofilmkombinationen gemessen (Abb. 3.7 links und A.6, S. 87). Die Zellzahlen von *S. aureus* im monomikrobiellen Biofilm stiegen vergleichsweise nur gering an (auf 227 % im Vergleich zum Ausgangswert). Nach 96 h kam es im dualen und

im polymikrobiellen Biofilm zu einem starken Abfall der KBE von *S. aureus* bis unter die Zellzahl des monomikrobiellen Biofilms. Über alle Zeitpunkte gemessen wurden im polymikrobiellen Biofilm weniger *S. aureus* - Zellen gezählt als im *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilm. Dieser Unterschied war nur bei 3 h nicht signifikant. Die Zellzahlen im dualen *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilm stiegen bis 24 h rasant an (auf 600 % im Vergleich zum Ausgangswert). Interessanterweise konnten SCV nicht nur im polymikrobiellen Biofilm mit *P. aeruginosa*, sondern auch im dualen Biofilm mit *C. albicans* nach 96 h nachgewiesen werden (Abb. A.7, S. 87). Insgesamt scheint *C. albicans* die Proliferation von *S. aureus* zu begünstigen. *P. aeruginosa* scheint sich hemmend auf die Vermehrung von *S. aureus* auszuwirken.

*P. aeruginosa* vermehrte sich sowohl im dualen Biofilm mit *C. albicans* als auch im polymikrobiellen *C. albicans* - *P. aeruginosa* - *S. aureus* - Biofilm deutlich stärker als im monomikrobiellen Biofilm (Abb. 3.7 rechts und A.8, S. 88). Dabei war die Anzahl der KBE zusammen mit *C. albicans* und *S. aureus* deutlich höher als im dualen Biofilm nur mit *C. albicans* allein. Außerdem waren im polymikrobiellen Biofilm deutlich mehr KBE von *P. aeruginosa* als von *S. aureus* nachweisbar, dieses Verhältnis änderte sich auch zu späteren Messzeitpunkten nicht. Die Relationen der einzelnen KBE von *P. aeruginosa* - Biofilmen zueinander änderten sich nach 24 h und 96 h nicht mehr. Insgesamt scheinen sowohl *C. albicans* als auch *S. aureus* die Vermehrung von *P. aeruginosa* im Biofilm zu begünstigen.

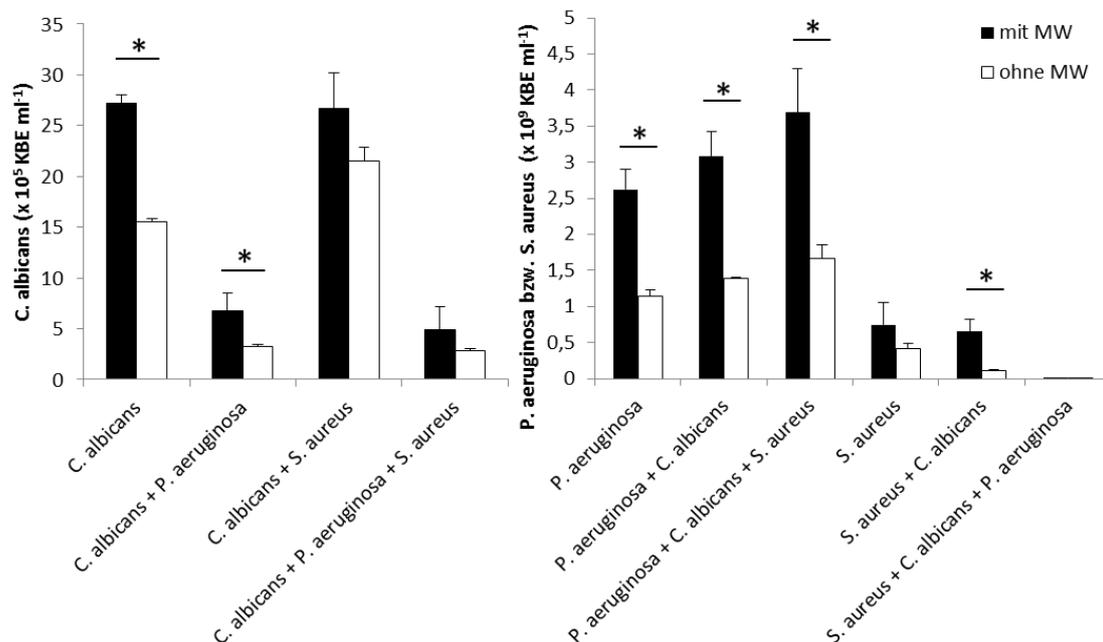


Abbildung 3.8.: Biofilm-KBE: Gezeigt sind die koloniebildenden Einheiten von *C. albicans* sowie *S. aureus* und *P. aeruginosa* in den verschiedenen Biofilmkombinationen nach 96 h Inkubationszeit mit und ohne Mediumwechsel nach jeweils 24 h. Signifikante Unterschiede in den KBE wurden mit Sternchen markiert.

**3.1.3.3.3. Einfluss des Mediumwechsels auf die Biofilmbildung** Die Auswirkungen eines zusätzlichen Mediumwechsels nach jeweils 24 h auf die quantitative Zusammensetzung der Biofilme ist in Abbildung 3.8 (sowie in Abb. A.9, S. 88 und A.10, S. 89) dargestellt. Der regelmäßige Mediumwechsel führte grundsätzlich zu einer Zunahme der KBE aller Mikroorganismen in allen Biofilmen. Bei *C. albicans* zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den KBE für den monomikrobiellen *C. albicans* - und den dualen *C. albicans* - *P.aeruginosa* - Biofilm. Betrachtet man die KBE von *S. aureus*, so wurden im monomikrobiellen und polymikrobiellen Biofilm keine statistisch signifikanten Unterschiede erreicht, aber auch hier ergab sich eine deutliche Tendenz zur Zunahme der Anzahl koloniebildender Einheiten durch einen regelmäßigen Mediumwechsel. Vor allem *P. aeruginosa* scheint von einem regelmäßigen Mediumwechsel zu profitieren. Hier waren die Unterschiede stets signifikant, für den monomikrobiellen Biofilm sogar hoch signifikant. Die Zunahme der KBE schwankte generell zwischen 73,6 % und 129,3 %.

#### 3.1.3.4. Veränderungen in der Biofilm-Architektur

In diesem Abschnitt wurde der Frage nachgegangen, wie Biofilme aufgebaut sind und ob sich durch Konkurrenzmikroorganismen Veränderungen im Aufbau von Biofilmen ergeben. Die Architektur der Biofilme wurde mit Hilfe der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) untersucht. Dazu wurden die Biofilme auf Polystyren-Scheiben (slides) angezüchtet und nach einer Inkubationszeit von 3 h, 12 h, 24 h und 96 h mit Calcofluor-white und FUN-1 angefärbt. Folgende Biofilm-Kombinationen wurden untersucht:

- *C.albicans* (Kontrolle)
- *C. albicans* + *P. aeruginosa*
- *C. albicans* + *S. aureus*
- *C. albicans* + *P. aeruginosa* + *S. aureus* („polymikrobieller Biofilm“)

**3.1.3.4.1. Adhäsionsphase** Der monomikrobielle *C. albicans* - Biofilm war nach 3 h durch lang aussprossende Keimschläuche gekennzeichnet (Abb. 3.9 A). Im Vergleich zum monomikrobiellen *C. albicans* - Biofilm waren in Kombination mit *P. aeruginosa* die Keimschläuche von *C. albicans* nach einer Adhäsionszeit von 3 h verkürzt (Vergl. Abb. 3.9 A und B). Kräftige metabolische Aktivität war jedoch in den Keimschläuchen nachweisbar. Die *P. aeruginosa* - Zellen adhärten an den Keimschläuchen oder lagerten oftmals paarig in unmittelbarer Umgebung (Abb. 3.9 B). Im Biofilm mit *S. aureus* waren die Keimschläuche geringfügig kürzer als im monomikrobiellen Biofilm. Die *S. aureus* - Zellen lagerten sich gattungstypisch in Haufen an die Keimschläuche an (Abb. 3.9 C). In der sagittalen Rekonstruktion war die Nutzung der Keimschläuche als Grundgerüst für die Verankerung der *S. aureus* - Zellen und das weitere Wachstum in höhere Schichten gut erkennbar (Abb. 3.9 D und A.11, S. 89).

Im polymikrobiellen Biofilm waren die Keimschläuche von *C. albicans* am kürzesten (Abb. 3.9 D). Trotzdem lag auch hier eine rege metabolische Aktivität vor. Insgesamt adhärten die Bakterien nach 3 h nicht nur am Boden der Polystyren-Scheiben, sondern v. a. an den Keimschläuchen von *C. albicans*, was offensichtlich zu einem verzögerten Längenwachstum der Keimschläuche führte.

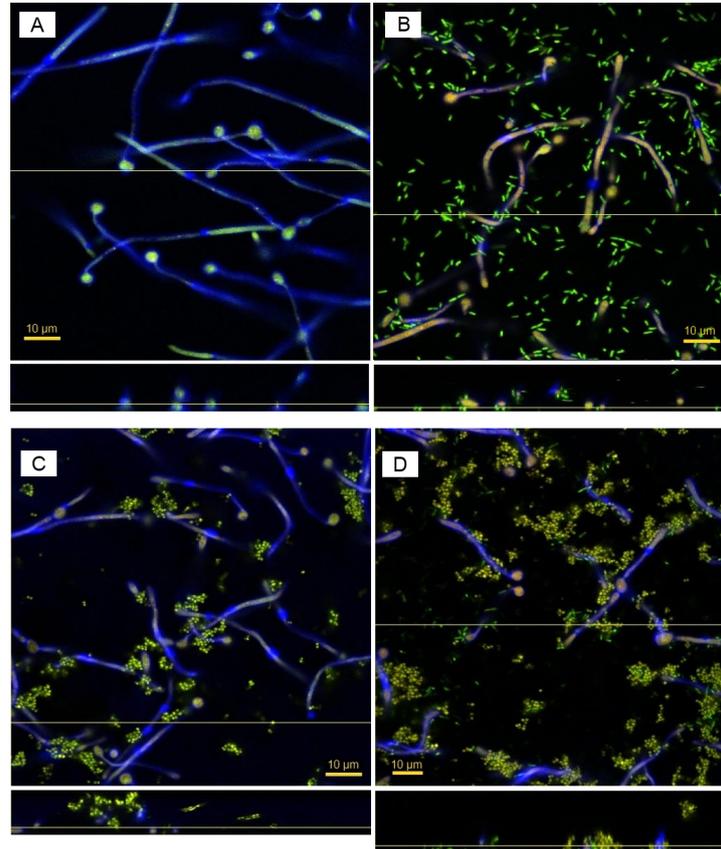


Abbildung 3.9.: Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (CLSM) mono- und polymikrobieller Biofilme nach 3 h Inkubationszeit: (A) *C. albicans*, (B) *C. albicans* + *P. aeruginosa* (C) *C. albicans* + *S. aureus* und (D) *C. albicans* + *S. aureus* + *P. aeruginosa*.

Beschriftete Bilder: Horizontalschnitte; jeweils darunter der im Bild markierte Sagittalschnitt mit Markierung der Höhe des Horizontalschnittes.

**3.1.3.4.2. Frühphase der Biofilmbildung** Nach 12 h hatte *C. albicans* bereits einen ca. 20 µm 2-schichtigen Biofilm bestehend aus adhären Hefezellen am Boden und einem darüber liegenden Hyphen-Geflecht gebildet. Erwartungsgemäß wiesen die am weitesten oben liegenden Hyphen die größte metabolische Aktivität auf (Abb. 3.10 A unten). Im dualen Biofilm mit *P. aeruginosa* zeigten die Stäbchen nach 12 h eine sehr starke Adhäsion an die *C. albicans* - Hyphen, vor allem in den unteren Schichten des Biofilms. Somit wirkte dieser Biofilm recht aufgelockert (Abb. 3.10 B unten). Im Bereich dichter *P. aeruginosa* - Aggregate wur-

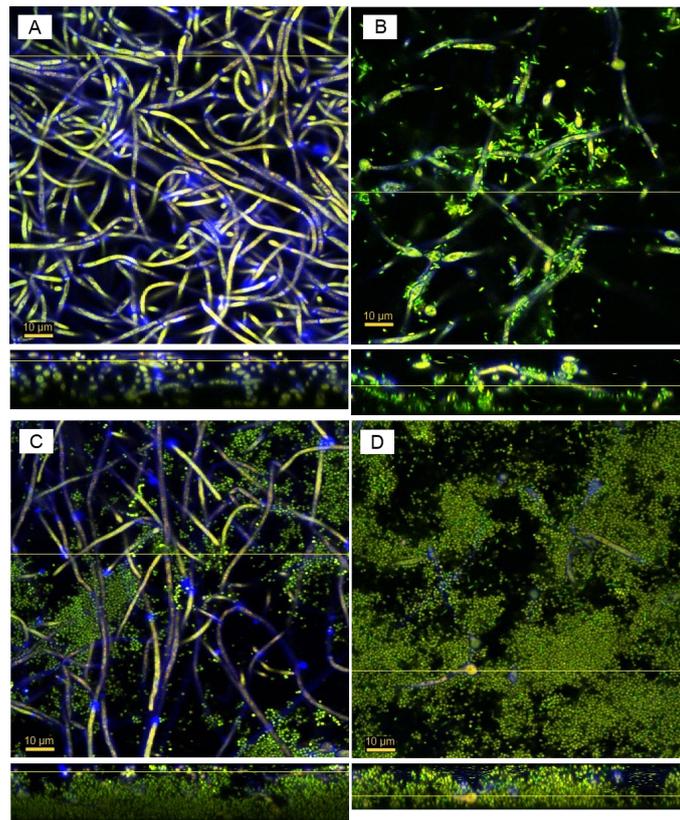


Abbildung 3.10.: Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie mono- und polymikrobieller Biofilme in der Frühphase der Biofilmbildung (nach 12 h Inkubationszeit): (A) *C. albicans*, (B) *C. albicans* + *P. aeruginosa* (C) *C. albicans* + *S. aureus* und (D) *C. albicans* + *S. aureus* + *P. aeruginosa*. Die gelben Linien markieren die Schnittebenen.

Beschriftete Bilder: Horizontalschnitte; jeweils darunter der im Bild markierte Sagittalschnitt mit Markierung der Höhe des Horizontalschnittes.

de eine durch FUN-1 grünlich angefärbte und die Bakterien umgebende Matrix sichtbar. Im Gegensatz dazu bildete sich im dualen Biofilm mit *S. aureus* eine dreischichtige Struktur, bestehend aus einer basalen sehr dichten Zone mit den verankerten Hefen und nahezu lückenlos angeordneten *S. aureus* - Zellen, eine mittlere kompakte Schicht mit aufstrebenden Hyphen und dazwischen gelagerten Kokken und eine durch langstreckig verlaufende Hyphen dominierte obere Schicht, in der *S. aureus* nur locker verteilt war. Zusätzlich fielen kanalartige Freiräume bis in tiefere Schichten in diesem sehr kompakten Biofilm auf (Abb. 3.10 C und Abb. A.12, S. 89). Im polymikrobiellen Biofilm waren vergleichsweise wenige und deutlich kürzere Hyphen von *C. albicans* sichtbar, sodass kein dichtes Hyphennetz entstand und der gesamte Biofilm weniger durchflochten erscheint (Abb. 3.10 D und Abb. A.13 links auf S. 90). Der *S. aureus* war hier die strukturgebende Spezies. Die *P. aeruginosa* - Stäbchen waren in die dichten Kokkenaggregate eingelagert oder seltener direkt an den Hyphen zu finden (Abb. A.13 rechts, S. 90).

**3.1.3.4.3. Intermediärphase** Nach 24 h zeigte der monomikrobielle *C. albicans* - Biofilm einen charakteristischen dreischichtigen Aufbau (Abb. 3.11). Dabei befanden sich die Hefezellen am Boden des Objektträgers, aus denen sämtliche Hyphen hervorgingen (untere Schicht). Darüber lag eine lockerere mittlere Schicht, die von einer dichteren oberen Schicht aus horizontal verlaufenden, metabolisch hoch aktiven Hyphen abgeschlossen wurde. Die auffällige Kompaktheit in der obersten Schicht könnte möglicherweise auch dem Eigengewicht des Deckgläschens geschuldet sein, wobei ein besseres Sauerstoff- und Nährstoffangebot ebenso ein dichtes Wachstum fördern könnte. Die Hyphen im dualen Biofilm mit *P. aeruginosa* waren deutlich kürzer als im monomikrobiellen Biofilm. In den Hyphen konnten nun deutlich Bereiche abgegrenzt werden, die nicht durch FUN-1 angefärbt wurden und damit metabolisch inaktiv waren (Abb. A.14 A, S. 90). Die *P. aeruginosa* - Zellen waren nur selten in Bereichen außerhalb des Gerüsts aus *C. albicans* - Hyphen zu finden, wodurch dieser Biofilm durch relativ große Zwischenräume gekennzeichnet war. Der duale Biofilm mit *S. aureus* war weiterhin sehr kompakt. Alle Bereiche wurden von *S. aureus* belegt mit Ausnahme der kanalartigen Strukturen, die den Biofilm durchzogen (Abb. A.14 B). Der polymikrobielle Biofilm konnte vergleichsweise nur kurze Hyphen von *C. albicans* vorweisen, ein dreischichtiger Aufbau bildete sich nicht heraus (Abb. A.14 C). *S. aureus* stellt hier die strukturgebende Bakterienpopulation dar, allerdings nahm die Anzahl von *P. aeruginosa* erheblich zu. An den Adhäsionspunkten mit den *C. albicans* - Hyphen traten Aussparungen der FUN-1-Färbung auf. Canyon-artige Strukturen bildeten sich nun auch im polymikrobiellen Biofilm heraus (Abb. A.15, S. 91).

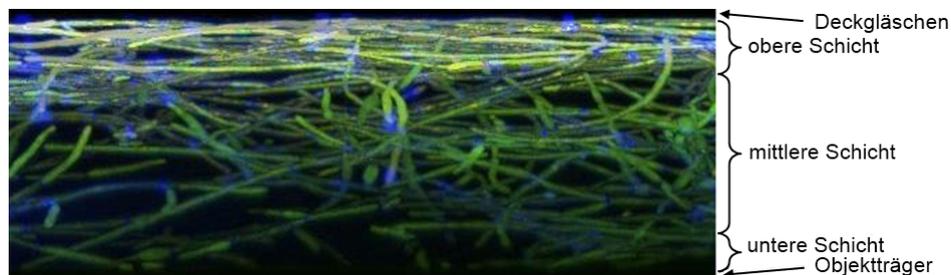


Abbildung 3.11.: Rekonstruktion der Biofilmstruktur: Gezeigt ist eine sagittale Ansicht einer dreidimensionalen Rekonstruktion des *C. albicans* - Biofilms nach 24 h Inkubationszeit.

**3.1.3.4.4. Reifephase** Der monomikrobielle *C. albicans* - Biofilm war nach 96 h vor allem durch sehr lange Hyphen gekennzeichnet, mit einem hohen Metabolismus vor allem in den oberen Schichten. Neu hinzu kamen unangefärbte Zellkompartimente, wie sie bisher nur in Biofilmen mit *P. aeruginosa* beobachtet wurden (Abb. A.16 A, S. 91). Die zuvor beschriebene Dreischichtung bestand fort. Im Gegensatz dazu waren die Hyphen im dualen Biofilm mit *P. aeruginosa* deutlich kürzer und teilweise abgeknickt. Zudem war eine starke Vermehrung von *P. aeruginosa* festzustellen (Abb. A.16 B). Die *P. aeruginosa* - Konglomerate waren zunehmend von einer anfärbbaren Matrix umgeben. Im dualen *C. albicans* - *S. aureus* -

Biofilm war das dreischichtige Grundgerüst der Hyphen weiterhin vorhanden, allerdings waren die Zellen von *S. aureus* nicht mehr so kompakt gelagert und ungleichmäßig angefärbt, was auf eine zunehmende Inaktivität hinweist (Abb. A.16 C). Insgesamt scheint dieser Biofilm nach 96 h an Integrität zu verlieren. Im polymikrobiellen Biofilm haben sich nach 96 h die Zellzahlen qualitativ zugunsten von *P. aeruginosa* verschoben. Diese dominierten vor allem in den oberen Biofilmbereichen (grün gefärbt), während *S. aureus* vorwiegend im unteren Bereich (orange gefärbt) zu finden war, sodass dieser Biofilm durch einen zweischichtigen Aufbau gekennzeichnet war (Abb. 3.12). Die nun auftretenden kleineren Kokken wirkten wie im dualen Biofilm ebenfalls teilweise inaktiv.

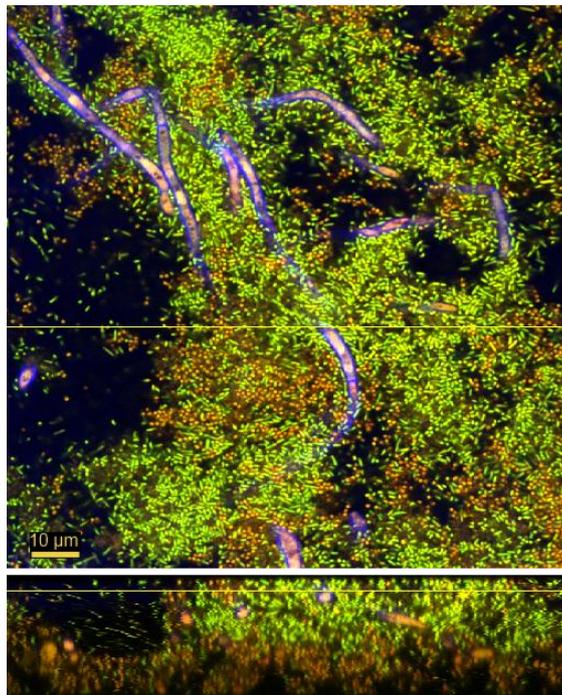


Abbildung 3.12.: Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie des reifen polymikrobiellen Biofilms nach 96 h Inkubationszeit: Die gelben Linien markieren die Schnittebenen. Bild oben: Horizontalschnitt; darunter der im oberen Bild markierte Sagittalschnitt mit Markierung der Höhe des Horizontalschnittes. (*S. aureus* gelb-orange; *P. aeruginosa* gelb-grün)

Insgesamt zeigen die Untersuchungen der Biofilm-Architektur, dass *S. aureus* und *P. aeruginosa* das Hyphenwachstum von *C. albicans* hemmen. Das Vorhandensein von *C. albicans* führt zur Zunahme der Bakterienzellzahlen von *S. aureus* und *P. aeruginosa*. *S. aureus* vermehrt sich im dualen Biofilm gegenüber *P. aeruginosa* vergleichsweise massenhaft. Die Architektur des polymikrobiellen Biofilms verändert sich mit zunehmender Reife. Hierbei bildet sich zwischen den Hyphen von *C. albicans* eine Zweischichtung aus, wobei *P. aeruginosa* die obere Schicht und die nun in unterschiedlicher Größe auftretenden *S. aureus* - Kokken die untere Schicht bilden.

### 3.2. Teil 2: Dualer *S. aureus* - *C. albicans* - Biofilm

Ein wesentliches Resultat aus den in Teil 1 dargestellten Experimenten war die Veränderung der kinetischen Entwicklung, der quantitativen Zusammensetzung und des strukturellen Aufbaus des dualen *S. aureus* - *C. albicans* - Biofilms. Wie in Abb. 3.4, S. 30 gezeigt, konnte für den dualen Biofilm, bestehend aus einem *S. aureus* - Patientenisolat (VA 19552) und dem *C. albicans* - Laborstamm SC 5314, eine deutliche Zunahme der Gesamt-Biofilmmasse im Vergleich zum monomikrobiellen *S. aureus* - Biofilm verzeichnet werden. Darüber hinaus kam es zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl koloniebildender Einheiten von *S. aureus* (VA 19552) in Anwesenheit von *C. albicans* (SC 5314). Ziel der weiteren Untersuchungen war es, zu analysieren, wodurch die hier beobachtete Wachstumsstimulation von *S. aureus* hervorgerufen wird.

#### 3.2.1. Biofilm

##### 3.2.1.1. Wachstumskinetik

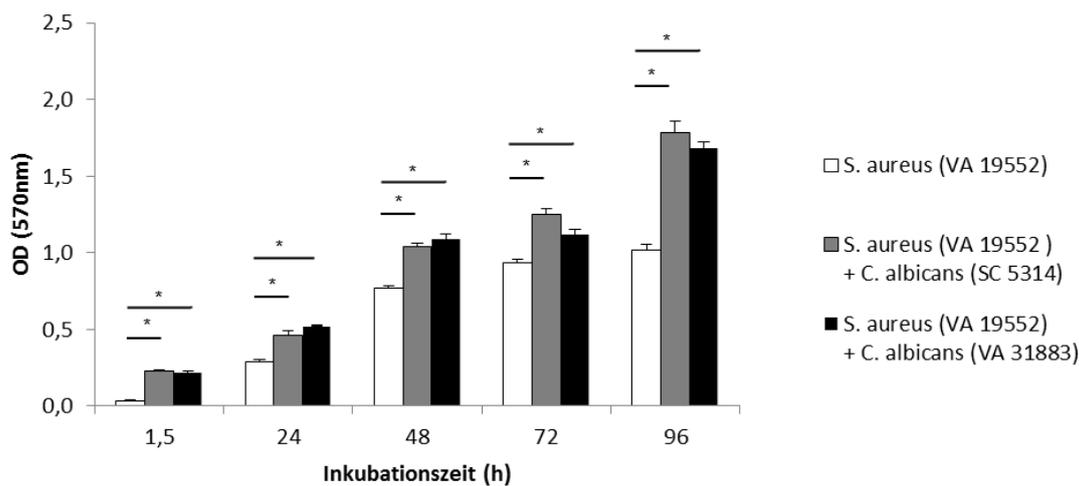


Abbildung 3.13.: Kristallviolett-Assay: Biofilmdicke der jeweiligen Biofilmkombinationen nach 1,5 h sowie nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h anhand der mittleren optischen Dichte gemessen bei 570 nm.

Zunächst sollte überprüft werden, ob die oben beschriebenen Beobachtungen stammsspezifisch sind oder ob derselbe Effekt auch mit anderen Stämmen von *S. aureus* (VA 31883) und *C. albicans* (VA 31883) auftritt. Zur Bestimmung der Biofilmmasse wurde die Kristallviolett-Färbung verwendet. Die Biomasse des dualen *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilms war zu allen Zeitpunkten signifikant höher als die des monomikrobiellen *S. aureus* - Biofilms unabhängig vom verwendeten Isolat (Abb. 3.13 und A.17, S. 92). Gezeigt sind die gemittelten Messwerte und die einfache Standardabweichung der optischen Dichte (OD) von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

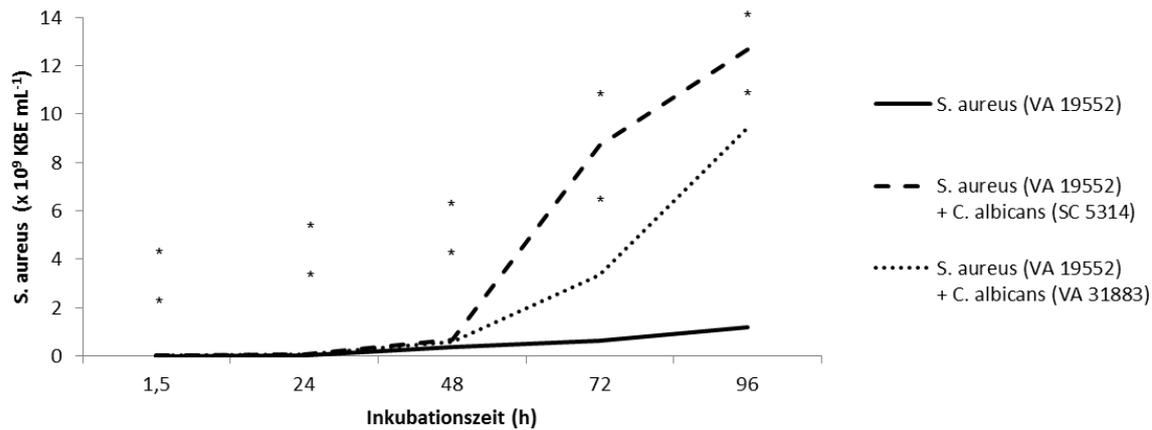


Abbildung 3.14.: Zeitkinetik der koloniebildenden Einheiten (KBE/ml) von *S. aureus* (VA 19552 und VA 31883) in Kombination mit *C. albicans* (SC 5314 oder VA 31883): Gezeigt sind die gemittelten KBE-Zahlen von *S. aureus* aus zwei unabhängigen Experimenten mit Dreifachbestimmung. Die Sterne indizieren einen hoch signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen den monomikrobiellen und den dualen Biofilmen.

Nach Quantifizierung der gleichen Stämme (Abb. 3.14 und A.18, S. 92) zeigte sich eine signifikante Zunahme der KBE von *S. aureus* (VA 19552), wenn dieser mit *C. albicans* (SC 5314) oder mit dem Patientenisolat (VA 31883) inkubiert wurde. Ein besonders starker Anstieg war nach 72 h festzustellen. Im dualen Biofilm mit *C. albicans* zeigte sich somit ein wachstumsstimulierender Effekt auf *S. aureus*. Dieser Effekt ist dabei weder für *S. aureus* noch für *C. albicans* stammspezifisch.

### 3.2.1.2. Beeinflussung des Wachstums

Um zu differenzieren, ob die beobachtete Wachstumsstimulation von *S. aureus* ausschließlich durch direkten Kontakt an das Hyphennetzwerk von *C. albicans* verursacht wird, wurden 24 h alte *S. aureus* - Biofilme (VA 19552) mit zellfreien Überständen von *C. albicans* (SC 5314 bzw. VA 31883) für weitere 24 h inkubiert. Die Überstände wurden zuvor 1:1 mit frischem Medium verdünnt und steril filtriert. Bemerkenswerterweise stiegen die KBE von *S. aureus* um mehr als das zehnfache an, wenn Überstände von 72 h oder 96 h alten *C. albicans* - Biofilmen verwendet wurden (Abb. 3.15). Der größte Zuwachs (28-fach) wurde unter Verwendung von Überständen eines 96 h alten *C. albicans* - Biofilms (SC 5314) beobachtet. Die Sterne indizieren einen hoch signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen der Kontrolle und den mit Überstand inkubierten Biofilmen. Um zu eruieren, ob der Effekt durch hitzelabile Bestandteile des Überstandes hervorgerufen wird, wurden die Überstände von *C. albicans* (SC 5314) in einem weiteren Versuch vor der Zugabe hitzeinaktiviert. Wie in Abbildung 3.16 gezeigt, konnten hitzebehandelte Überstände im Gegensatz zu unbehandelten Überständen zu keinem Zeitpunkt das Wachstum von *S. aureus* fördern. In den Abb. 3.15 und 3.16 sind

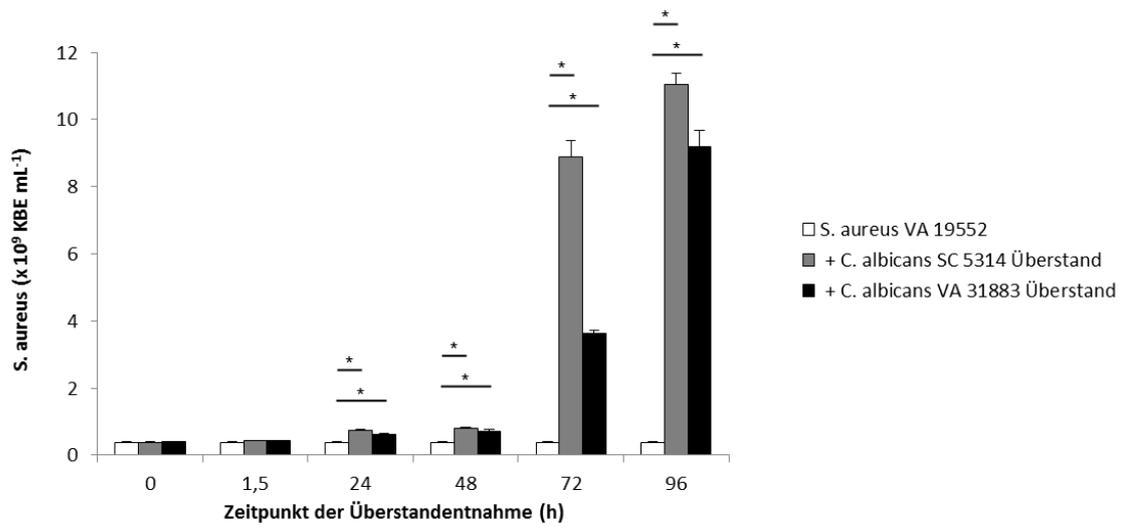


Abbildung 3.15.: Auswirkungen von zellfreien *C. albicans* - Überständen (SC 5314 und VA 31883) nach 0 h - 96 h Inkubationszeit auf 24 h alte *S. aureus* - Kulturen mittels KBE-Bestimmung.

die gemittelten KBE sowie die einfache Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten mit je dreifacher Wiederholung gezeigt. Hoch signifikante Unterschiede zwischen hitzebehandelten und unbehandelten Überständen sind mit Sternen gekennzeichnet. Diese Experimente demonstrieren, dass der wachstumsfördernde Effekt auf *S. aureus* durch hitzelabile Faktoren, die sich im Überstand von *C. albicans* - Kulturen befinden, hervorgerufen sein muss.

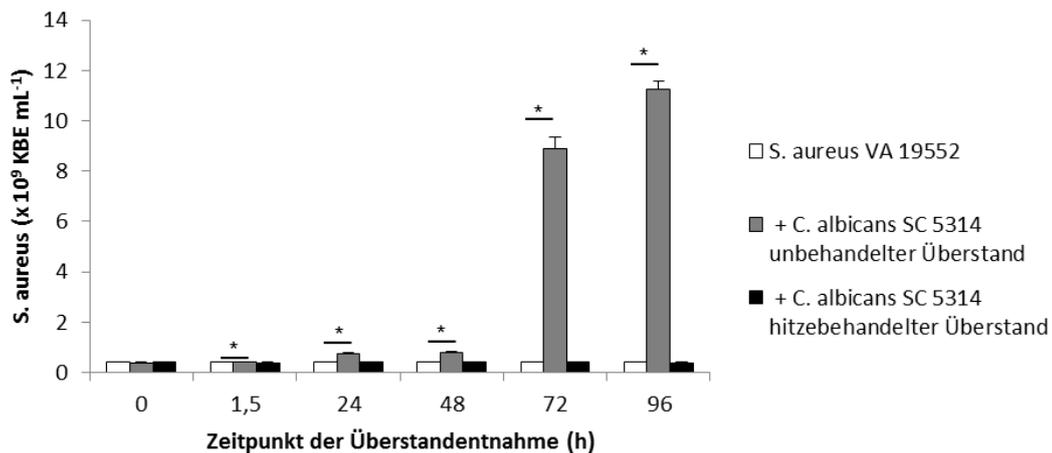


Abbildung 3.16.: Auswirkungen von zellfreien (hitzebehandelten und unbehandelten) *C. albicans* - Überständen (SC 5314) nach 0 h - 96 h Inkubationszeit auf 24 h alte *S. aureus* - Kulturen mittels KBE-Bestimmung.

### 3.2.2. Quorum-sensing-Moleküle von *C. albicans*

#### 3.2.2.1. Wirkung von Farnesol und Tyrosol auf die Biofilm-Bildung von *S. aureus*

Um den wachstumsfördernden Einfluss der Überstände aus *C. albicans* - Kulturen auf *S. aureus* zu präzisieren wurden die Auswirkungen einer Reihe von Molekülen, die von *C. albicans* sezerniert werden, genauer untersucht. Dazu zählen Farnesol, Tyrosol und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Zunächst wurde der Effekt von synthetischem Farnesol auf 24 h alte *S. aureus* - Biofilme nach Zugabe von verschiedenen Konzentrationen der Reinsubstanz untersucht.

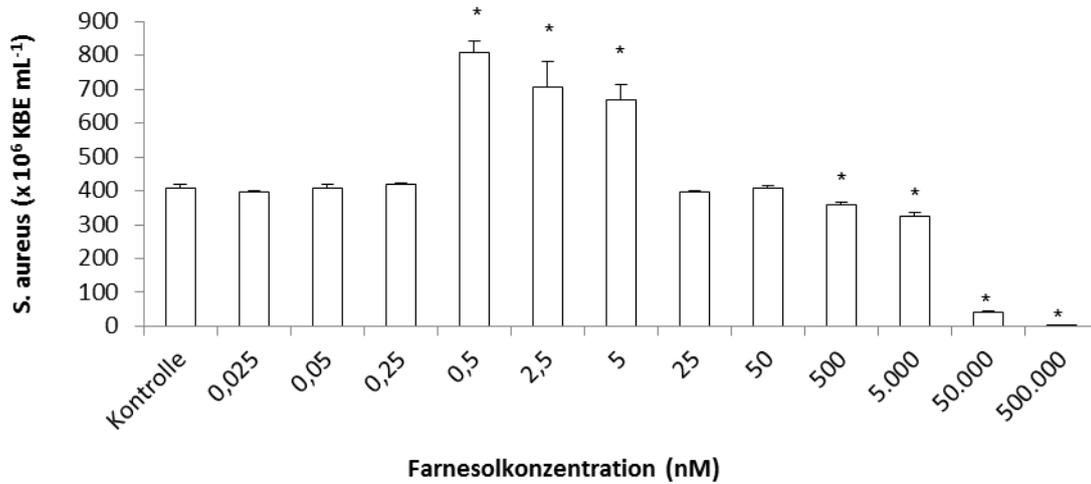


Abbildung 3.17.: Auswirkungen von Farnesol in verschiedenen Konzentrationen auf 24 h gewachsene *S. aureus* - Kulturen mittels KBE-Bestimmung. Die Sterne indizieren einen hoch signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) der gezeigten gemittelten KBE mit einfacher Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung im Vergleich zur Kontrolle.

Nach weiteren 24 h Inkubation wurde die Anzahl der KBE bestimmt. Als Kontrolle dienten *S. aureus* - Biofilme, die ohne Farnesol inkubiert wurden. Abb. 3.17 zeigt, dass synthetisches Farnesol in Konzentrationen zwischen 0,5 und 5 nM eine Zunahme der KBE bewirkt. Konzentrationen über 50 nM hingegen bewirkten eine Reduktion der Anzahl von *S. aureus* - Kolonien. Diese Unterschiede waren signifikant im Vergleich zum Kontrollbiofilm ohne Farnesol. In gleicher Verfahrensweise wurde der Einfluss von Tyrosol untersucht. Konzentrationen im Bereich von 2,5 mM bis 0,005 pM konnten keine Wachstumsstimulation von *S. aureus* hervorrufen (Abb. A.19, S. 93).

Um den Zusammenhang zwischen der Farnesolproduktion von *C. albicans* und dem Wachstum von *S. aureus* zu bestätigen, wurden Überstände des Farnesol-produzierenden *C. albicans* - Stamm SC 5314 und des Farnesol-negativen *C. albicans* - Stamm ATCC 10231 zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen und zu 24 h alten *S. aureus* - Biofilmen gegeben (Abb. 3.18). Der Überstand beider *C. albicans* - Stämme induzierte eine Zunahme der Anzahl koloniebildender Einheiten von *S. aureus* im Vergleich zur Kontrolle (*S. aureus* - Biofilm ohne

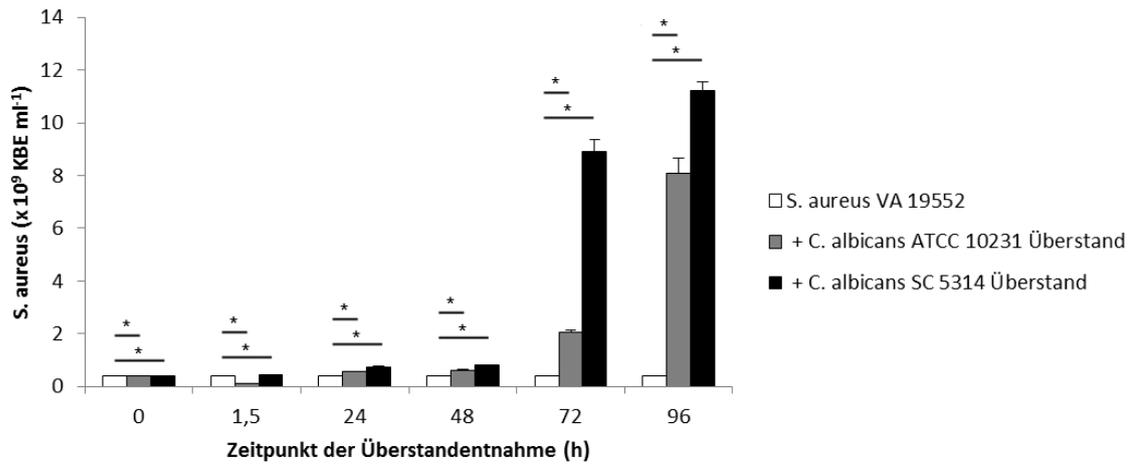


Abbildung 3.18.: Wachstumskinetik von *S. aureus* (VA 19552) im monomikrobiellen Biofilm nach Inkubation mit Überständen des Farnesol-produzierenden *C. albicans* - Stamm SC 5314 und des Farnesol-defizienten Stammes *C. albicans* ATCC 10231 anhand der KBE. Die Sterne indizieren einen hoch signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) der gezeigten gemittelten KBE mit einfacher Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung im Vergleich zur Kontrolle.

*C. albicans* - Überstand). Der Überstand des Farnesolproduzenten *C. albicans* (SC 5314) bewirkte eine signifikant stärkere Zunahme der Zellzahlen von *S. aureus* im Vergleich zum Farnesol-defizienten *C. albicans* - Stamm ATCC 10231. Da der Farnesol-negative *C. albicans* - Stamm ebenfalls das Wachstum von *S. aureus* protegierte (Abb. A.20, S. 93), lag die Vermutung nahe, dass eine weitere Substanz an der Ausbildung des Effektes beteiligt sein muss.

### 3.2.2.2. Einfluss von Prostaglandin E<sub>2</sub> auf die Biofilmbildung von *S. aureus*

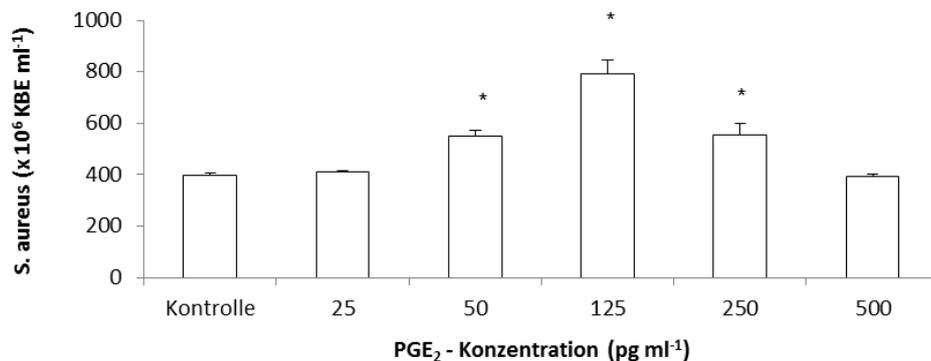


Abbildung 3.19.: Wirkung von PGE<sub>2</sub>-Reinsubstanz verschiedener Konzentrationen auf *S. aureus* VA 19552 mittels KBE-Bestimmung.

Neben Farnesol und Tyrosol sezerniert *C. albicans* Prostaglandin E<sub>2</sub>. Um zu überprüfen, ob PGE<sub>2</sub> einen Effekt auf die Biofilmbildung von *S. aureus* hat, wurden 24 h alte *S. aureus* - Biofilme zunächst mit verschiedenen Konzentrationen von synthetischem PGE<sub>2</sub> inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.19 dargestellt. Die Mittelwerte der KBE unbehandelter *S. aureus* - Biofilme dienten als Kontrolle. PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 50 pg/ml - 250 pg/ml bewirkten eine starke Zunahme der KBE im *S. aureus* - Biofilm. Der Unterschied zwischen mit PGE<sub>2</sub> behandelten und unbehandelten *S. aureus* - Biofilmen war statistisch signifikant.

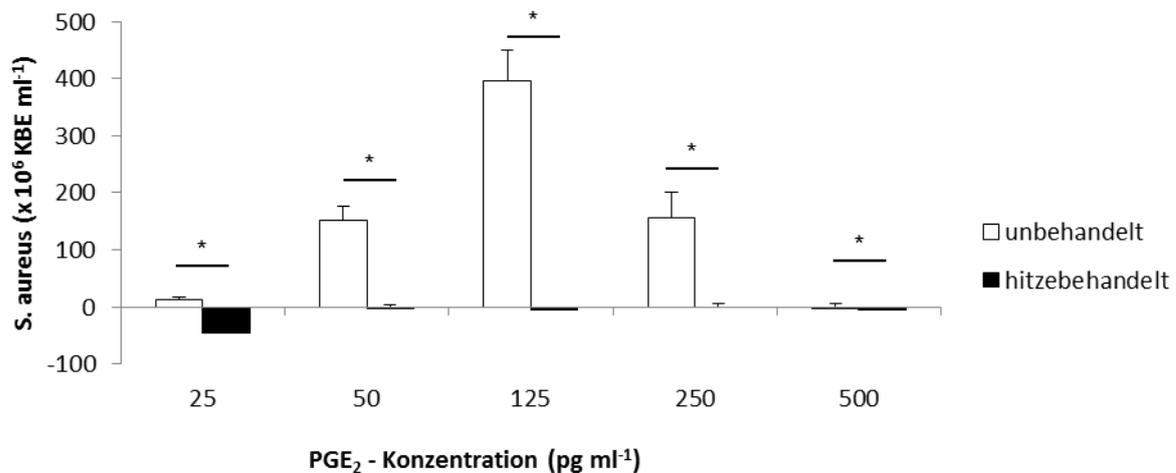


Abbildung 3.20.: Hitzebehandlung verschiedener Konzentrationen der PGE<sub>2</sub>-Reinsubstanz und Auswirkung auf das Wachstum von *S. aureus* VA 19552 mittels KBE-Bestimmung.

Um zu untersuchen, ob PGE<sub>2</sub> hitzelabil ist, wurden unter gleichen Bedingungen *S. aureus* - Kulturen mit unbehandeltem oder hitzebehandeltem PGE<sub>2</sub>-haltigem Medium verschiedener Konzentrationen inkubiert. Abb. 3.20 zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen der KBE von *S. aureus* normalisiert auf die Mittelwerte der unbehandelten Kontrollen. Hitzebehandeltes PGE<sub>2</sub>-haltiges Medium führte zu keinem Anstieg der KBE von *S. aureus* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, was die Hitzelabilität von PGE<sub>2</sub> bestätigt. Insgesamt zeigen unsere bisherigen Experimente, dass sowohl subinhibitorische Konzentrationen von Farnesol als auch reines PGE<sub>2</sub> die Biofilmbildung von *S. aureus* förderten.

Im nächsten Schritt wurden die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen (Abb. 3.21) und die Konzentrationen der PGE<sub>2</sub>-Metabolite (Abb. A.21, S. 94) in den Überständen von Biofilmen des Farnesolproduzierenden *C. albicans* SC 5314 und des Farnesol-negativen ATCC 10231 bestimmt. In Überständen von SC 5314 fanden sich signifikant höhere Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> (13 pg/ml - 240 pg/ml) und seiner Metabolite (17 pg/ml - 543 pg/ml) als in Überständen des Stammes ATCC 10231 (8 pg/ml - 176 pg/ml bzw. 12 pg/ml - 369 pg/ml) in 24 h bis 96 h gewachsenen Biofilmen.

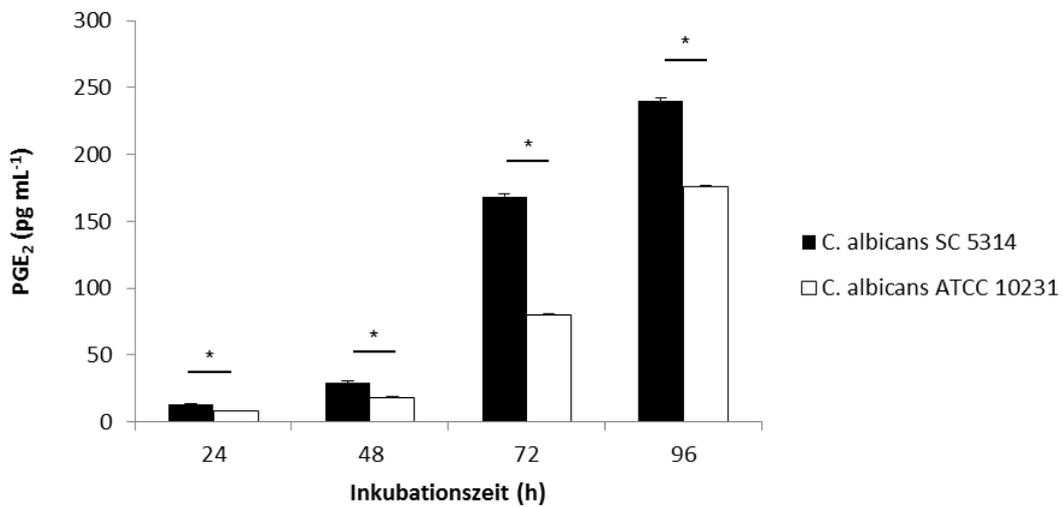


Abbildung 3.21.: PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen in Überständen von *C. albicans* SC 5314 (Farnesolproduzent) und ATCC 10231 (produziert kein Farnesol) nach verschiedenen Inkubationszeiten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p < 0,05$ ) sind durch Sterne gekennzeichnet. Beide Experimente wurden doppelt durchgeführt mit jeweils drei Wiederholungen.

### 3.2.2.3. *C. albicans* - Mutator-Stämme

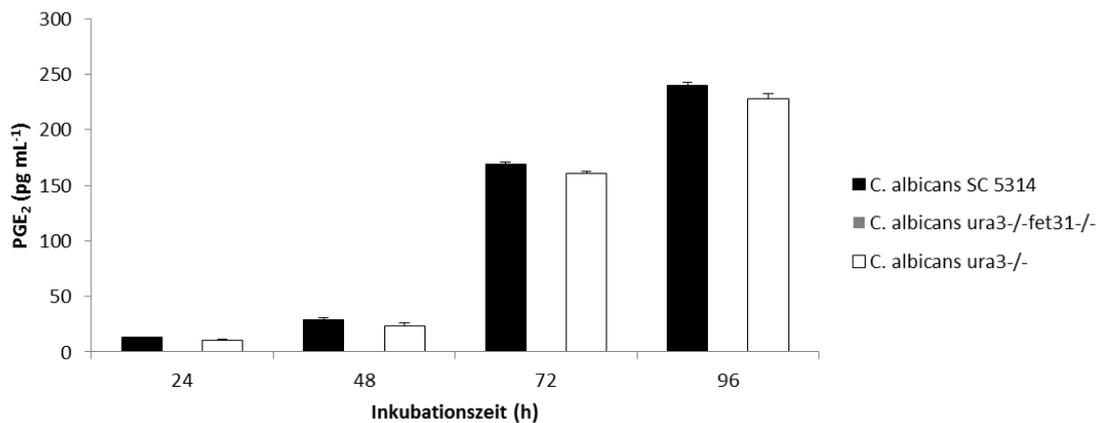


Abbildung 3.22.: PGE<sub>2</sub>-Level in Kulturüberständen von *C. albicans* SC 5314, M134 (ura3<sup>-/-</sup>) und M1096 (ura3<sup>-/-</sup>fet31<sup>-/-</sup>) nach verschiedenen Inkubationszeiten.

Um die bisherigen Ergebnisse weiter zu untermauern, wurden Experimente mit genetisch veränderten *C. albicans*-Stämmen durchgeführt. Zunächst wurden die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Kulturüberständen vom *C. albicans*-Wildtyp SC 5314, vom Referenzstamm M134 (ura3<sup>-/-</sup>) und der PGE<sub>2</sub>-Nullmutante M1096 nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h Inkubationszeit bestimmt (Abb. 3.22). Für die PGE<sub>2</sub>-Nullmutante M1096 (ura3<sup>-/-</sup>fet31<sup>-/-</sup>), bei der beide Allele des Kupferoxidase-Gens fet31 ausgeschaltet wurden, konnten mit dem hier verwen-

deten ELISA keine messbaren  $\text{PGE}_2$ -Konzentrationen ermittelt werden. Im Gegensatz dazu bildeten der Wildtyp-Stamm SC 5314 und der M1096-Mutterstamm M134 (*ura3*<sup>-/-</sup>) zu allen Zeitpunkten ähnlich viel  $\text{PGE}_2$ .

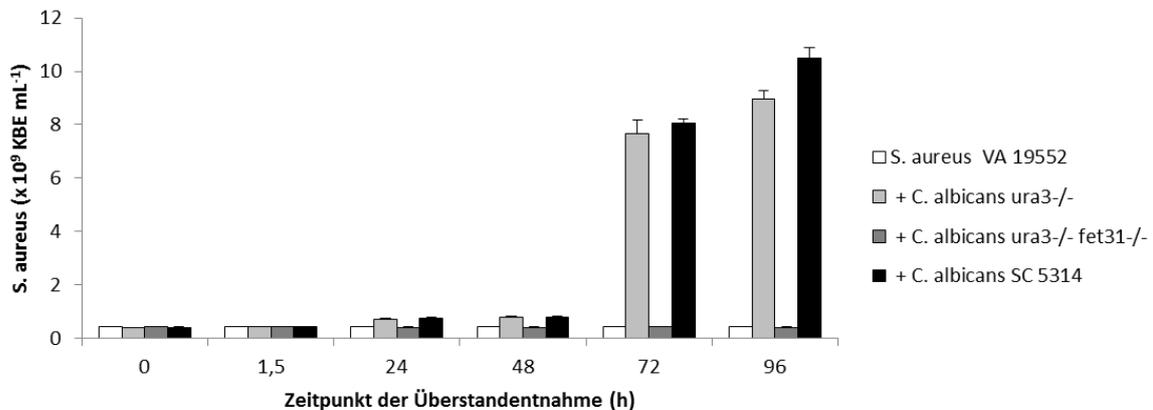


Abbildung 3.23.: Auswirkungen von zellfreien Kulturüberständen der *C. albicans* - Stämme SC 5314, M134 (*ura3*<sup>-/-</sup>) und M1096 (*ura3*<sup>-/-</sup>*-fet31*<sup>-/-</sup>), die nach unterschiedlichen Inkubationszeiten entnommen wurden, auf den *S. aureus* - Biofilm nach weiteren 24 h Bebrütung mittels KBE-Bestimmung.

Die Inkubation 24 h alter *S. aureus* - Biofilme mit zellfreien Überständen von *C. albicans* SC 5314 (Wildtyp, Kontrolle) und M134 (Mutterstamm von M1096,  $\text{PGE}_2$ -Bildner) führte nach weiteren 24 h zu einer Zunahme der KBE im *S. aureus* - Biofilm (Abb. 3.23). Die Überstände der *C. albicans* - Mutante M1096 (*ura3*<sup>-/-</sup>*-fet31*<sup>-/-</sup>) hingegen waren zu keiner Zeit in der Lage, einen wachstumsfördernden Effekt auf den *S. aureus* - Biofilm auszuüben.

#### 3.2.2.4. Einfluss von Indometacin

Da ein konzentrationsabhängiger wachstumsfördernder Effekt von  $\text{PGE}_2$  durch die o. g. Experimente beschrieben werden konnte, wurden in weiteren Versuchen die Auswirkungen des nichtspezifischen Cyclooxygenasehemmers Indometacin auf die stimulatorische Aktivität von *C. albicans* auf *S. aureus* getestet. Hierfür wurde Indometacin in verschiedenen Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$  - 1000  $\mu\text{M}$ ) zu dualen Biofilmen von *C. albicans* SC 5314 und *S. aureus* VA 19552 nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0 h - 96 h) hinzugefügt und nach erneuter Inkubation für 24 h die  $\text{PGE}_2$ -Konzentrationen im ELISA gemessen. Unbehandelte Kulturen des dualen Biofilms dienten als Kontrolle. Unsere Messungen zeigten, dass Indometacin die Biosynthese von  $\text{PGE}_2$  (Abb. 3.24) und dessen Metaboliten (Abb. A.22, S. 94) in Konzentrationen zwischen 10  $\mu\text{M}$  - 1000  $\mu\text{M}$  effektiv hemmt. Die Unterschiede zwischen den mit Indometacin behandelten und nicht mit Indometacin behandelten Biofilmen waren hoch signifikant ( $p < 0,001$ ). Dieser Einfluss von Indometacin auf die  $\text{PGE}_2$ -Produktion wirkte sich auch auf das Wachstum von *S. aureus* in dualen Biofilmen aus (Abb. 3.25). Indometacin war in der Lage, das Wachstum von *S. aureus* in dualen Biofilmen mit *C. albicans* dosisabhängig zu hemmen.

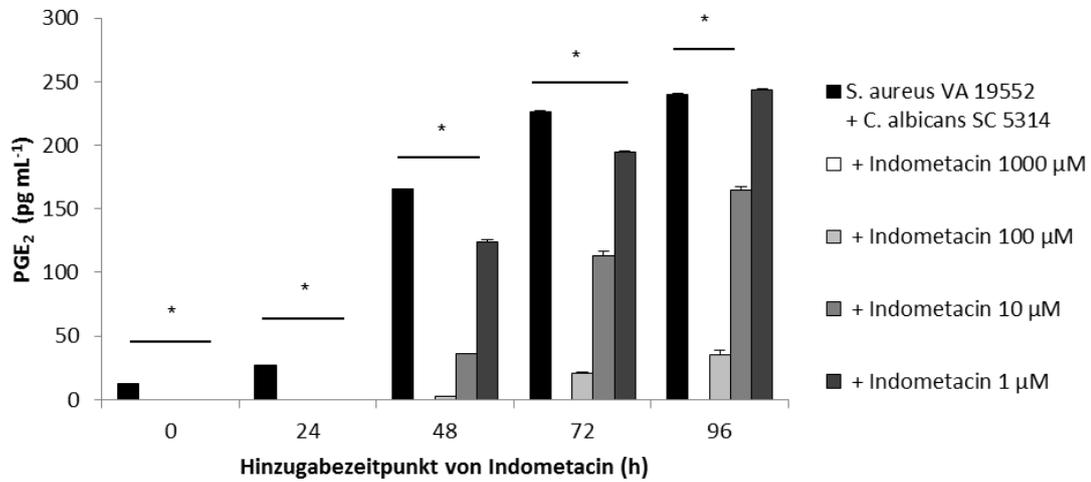


Abbildung 3.24.: Indometacin in verschiedenen Konzentrationen wurde zum dualen Biofilm bestehend aus *S. aureus* VA 19552 und *C. albicans* SC 5314 zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h - 96 h) hinzugegeben und anschließend die  $\text{PGE}_2$ -Konzentrationen im Überstand mittels ELISA gemessen.

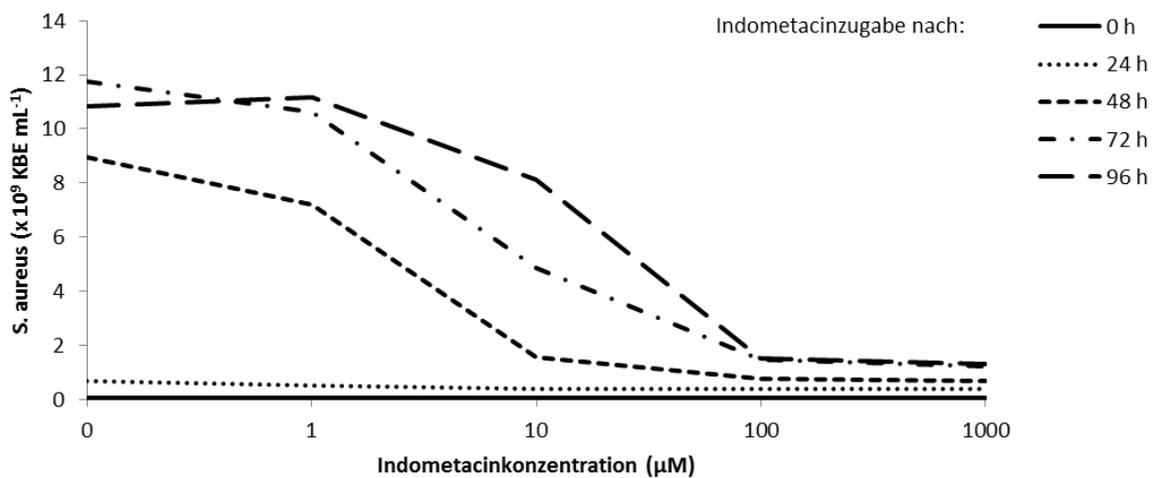


Abbildung 3.25.: Verschiedene Konzentrationen von Indometacin wurden zum dualen *S. aureus* VA 19552 - *C. albicans* SC 5314 - Biofilm zu verschiedenen Zeitpunkten appliziert. Gezeigt ist die Auswirkung auf die KBE von *S. aureus*.

**3.2.2.5. Einfluss von *S. aureus* auf die PGE<sub>2</sub>-Produktion von *C. albicans***

Mit diesem Experiment sollte der Frage nachgegangen werden, ob *S. aureus* möglicherweise eine stimulierende Wirkung auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese von *C. albicans* haben könnte. Dazu wurden die PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen in monomikrobiellen *C. albicans* - Biofilmen (SC 5314) mit denen in dualen *S. aureus* - *C. albicans* - Biofilmen zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen. Ein signifikanter Unterschied konnte nur nach einer Inkubationszeit von 96 h beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt produzierte der monomikrobielle *C. albicans* - Biofilm sogar höhere PGE<sub>2</sub>-Mengen als der duale Biofilm (Abb. A.23, S. 95). Eine Stimulation der PGE<sub>2</sub>-Synthese von *C. albicans* durch *S. aureus* konnte nicht nachgewiesen werden.

**3.2.2.6. Ausschluss substanzspezifischer Wirkungen**

Um einen wachstumshemmenden Einfluss durch den Lösungsvermittler DMSO oder durch Indometacin selbst auf *C. albicans* oder *S. aureus* auszuschließen, wurden die KBE-Zahlen monomikrobieller Biofilme nach Hinzugabe der Substanzen nach bestimmten Inkubationszeiten (0 h - 96 h) untersucht. Die Abbildungen A.24 und A.25 (S. 95) zeigen exemplarisch für *S. aureus* VA 19552 und *C. albicans* SC 5314, dass sich keine signifikanten Unterschiede auf die KBE und somit das Wachstum durch diese Substanzen ergaben.

## 4. Diskussion

Die Koexistenz von Bakterien und Hefen wurde in verschiedenen Studien beschrieben. So zeigte bereits die Untersuchung von Hermann et al. eine deutliche Assoziation von *P. aeruginosa* und *S. aureus* in Probenkulturen mit positivem *C. albicans* - Nachweis im Vergleich zu *C. albicans* - negativen Kulturen [93]. Auch neuere Studien belegen die klinische Relevanz der hier untersuchten Organismenkombinationen. So sind Verbrennungswunden zunächst meistens mit *S. aureus* infiziert, im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer Dominanz von *P. aeruginosa* in den Wunden [144]. Die einzigen in dieser Untersuchung nachgewiesenen Pilze waren *Candida spp.* In einer Studie zur Prävalenz von Infektionen auf Intensivstationen konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Dauer des Aufenthaltes auf der Intensivstation und dem Auftreten von Infektionen v. a. durch Methicillinresistente *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas species* und *Candida species* bestand [234]. Klotz und Mitarbeiter berichteten, dass 100 von 372 Patienten mit Candidämie (27 %) polymikrobielle Blutkulturen hatten. Bei 88 Patienten (24 %) konnten neben *Candida spp.* Bakterien in der Blutkultur nachgewiesen werden [130].

Bei polymikrobiellen Infektionen ist die Biofilmbildung die typische Organisationsform der Mikroorganismen [42, 48, 54]. Biofilme sind strukturierte mikrobielle Gemeinschaften, die an biotischen oder abiotischen Oberflächen haften und in einer aus Exopolymeren bestehenden Matrix eingebettet sind, um der Immunantwort des Wirts zu widerstehen. Biofilme weisen eine erhöhte Toleranz gegenüber antimikrobiell wirkenden Substanzen auf [147, 193, 196, 197]. Typische Biofilm-assoziierte Infektionen, bei denen die hier untersuchten Mikroorganismen häufig ko-isoliert werden, sind chronische Wundinfektionen, chronische Nasennebenhöhlen- und Lungeninfektionen bei Patienten mit Cystischer Fibrose oder das diabetische Ulcus cruris [100, 207].

### 4.1. Adhäsion

Vorraussetzung für die Biofilmbildung ist eine ausreichende Adhäsion von Mikroorganismen auf der Oberfläche. Zur Untersuchung der quantitativen Verhältnisse in den verschiedenen Biofilmen wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten bestimmt. Für monomikrobielle und duale Biofilme, die *C. albicans* enthalten, wurden Adhäsionszeiten zwischen ein und drei Stunden beschrieben [14, 40, 92, 102, 232]. Unsere Ergebnisse zeigten, dass nach zwei Stunden noch kein genügend fester Halt im polymikrobiellen Biofilm gegeben war. Die Mikro-

organismen verloren bereits bei kleinster Manipulation die Haftung. Im Medium waren noch viele frei flottierende Organismen nachweisbar. Die Adhäsion von Mikroorganismen verläuft in zwei Phasen. Mikroorganismen tasten mit Hilfe einer Reihe extrazellulärer Organellen und Proteine, wie Flagellen, Pili, Fimbrien und Oberflächenproteinen, die Oberflächen ab, bevor sie sich zunächst locker und damit reversibel an die Oberflächen anheften. Danach beginnen die Mikroorganismen extrazelluläre, polymere Substanzen aus Polysacchariden, Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden zu produzieren, über die nun eine irreversible Bindung zwischen Mikroorganismus und Oberfläche vermittelt wird [32, 110, 155, 204, 228]. Eine irreversible Bindung an die Oberfläche der Polystyrenplatten war in unseren Experimenten nach drei Stunden erreicht. Nach vier Stunden war die Adhärenz hervorragend, allerdings konnten wir zu diesem Zeitpunkt bereits eine zunehmende Ausbreitung und Vermehrung, beispielsweise durch Knospung der Hefezellen, die regelhaft zwischen drei und sechs Stunden stattfindet, beobachten [92].

Die Adhäsion an abiotischen Flächen hängt von der Oberflächenbeschaffenheit der Materialien ab. Mikroorganismen adhäreren vor allem an Oberflächen, die mit einem Film überzogen sind, der Komponenten wie Nukleinsäuren, Proteine, Aminosäuren, Zucker und Fettsäuren enthält [204]. Bei dem von uns verwendeten Material handelt es sich um Kulturplatten aus Polystyren, das sich in verschiedenen Publikationen als Material zur Kultivierung von Biofilmen sowohl für Bakterien als auch *C. albicans* als geeignet erwiesen hat [162, 163, 164, 172]. Polystyren hat eine glatte, hydrophobe Oberfläche [77, 116]. Fimbrien und Bestandteile grampositiver Bakterien (z. B. Mycolsäuren) begünstigen eine bessere Adhäsion an hydrophobe Oberflächen, wohingegen extrazelluläre polymerische Substanzen und Lipopolysaccharide durch Hydrophilie gekennzeichnet sind [47]. Lee und Mitarbeiter berichteten, dass die Biofilmbildung von *S. aureus* auf hydrophoben Oberflächen (Polypropylen und Polystyren) niedriger ist als auf hydrophilen Oberflächen (Glas und rostfreier Stahl) [143]. Wurde dem Medium Glukose beigefügt stieg die Biofilmbildung auf hydrophoben Oberflächen deutlich an. Um auf abiotischen Oberflächen Biofilme bilden zu können, wurde für *S. aureus in-vitro* gezeigt, dass Plasmaproteine auf den Mikrotiterplatten und die Ergänzung von Salz und Glukose zum Nährmedium notwendig sind [37].

Durch Quantifizierung der Mikroorganismen nach 3 h fiel auf, dass im monomikrobiellen Biofilm deutlich weniger Hefezellen adhärerten als im dualen oder polymikrobiellen Biofilm. Die meisten adhärenen *C. albicans* - Zellen wurden im dualen Biofilm mit *S. aureus* nachgewiesen, was zunächst die Vermutung nahe legt, dass vor allem *S. aureus* aber auch *P. aeruginosa* die Adhäsion von *C. albicans* begünstigen (Abb. A.5, S. 86). Durch CLSM konnten wir zeigen, dass die Keimschlauchbildung von *C. albicans* in Anwesenheit der Bakterien inhibiert war. Dieser Effekt wurde von anderen Autoren ebenfalls beschrieben [67]. Freie Oberflächen bilden die Voraussetzung für die Anheftung, sodass kürzere Hyphen Freiräume für die Adhäsion von mehr *C. albicans* - Zellen lassen.

*S. aureus* adhärerte in Anwesenheit von *C. albicans* schneller, sodass nach drei Stunden (so-

wie auch nach 12 h und 24 h) die KBE von *S. aureus* im dualen Biofilm stets deutlich höher waren als im mono- oder polymikrobiellen Biofilm (Abb. A.6, S. 87).

Im Gegensatz zu *S. aureus* zeigte *P. aeruginosa* im dualen und polymikrobiellen Biofilm nach 3 h signifikant geringere Zellzahlen als im monomikrobiellen Biofilm, was zumindest zu diesem Zeitpunkt einen antagonistischen Effekt vermuten lässt. Zu allen späteren Untersuchungszeitpunkten konnten in den dualen oder polymikrobiellen Biofilmen stets mehr *P. aeruginosa* - Zellen nachgewiesen werden als im monomikrobiellen Biofilm (Abb. A.8, S. 88). Eine Ursache liegt darin begründet, dass *S. aureus* auch an die Hefenform von *C. albicans* binden kann, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß. *P. aeruginosa* hingegen bindet ausschließlich an die Hyphenform. In der Phase der Adhäsion bilden sich zunächst nur Keimschläuche und kurze Hyphen, was die Unterschiede zwischen *S. aureus* und *P. aeruginosa* erklärt [96, 182].

Zur Aufklärung der Architektur der Biofilme wurde die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) verwendet. *C. albicans* bildet nach 3 h Inkubationszeit im dualen Biofilm mit *S. aureus* ein Grundgerüst, auf dem *S. aureus* - Kolonien entstehen (Abb. A.11, S. 89). Das Wachstum der *C. albicans* - Hyphen wurde durch die Anwesenheit von *S. aureus* nur geringfügig vermindert. Wir konnten frühere Berichte bestätigen, die ebenfalls zeigten, dass *S. aureus* Mikrokolonien an den Hyphen von *C. albicans* bildet und diese als Grundgerüst zur Bildung eines Biofilms nutzt [36, 83, 181]. Erst dadurch wird es *S. aureus* möglich, einen dicken, festen Biofilm zu bilden [83]. Das durch *C. albicans* produzierte Agglutinin-ähnliche Protein 3 (Als3p) vermittelt die Adhärenz von *S. aureus* auf den Hyphen. Peters et al. konnten zeigen, dass ohne Als3p signifikant weniger *S. aureus* - Zellen an *C. albicans* adhäreren [190].

Die Untersuchung mittels Kristallviolett konnte im Vergleich zeigen, dass der monomikrobielle *C. albicans* - sowie *P. aeruginosa* - Biofilm die geringste Ausgangsmasse aller Kombinationen aufwies. Hohe Ausgangsmassen wurden für alle Biofilme, an denen *C. albicans* beteiligt war, nachgewiesen (Abb. 3.5, S. 31).

## 4.2. Biofilmbildung

Während der weiteren Biofilmreifung konnte ein wachstumshemmender Effekt von *P. aeruginosa* auf *C. albicans* beobachtet werden, was bereits früher beschrieben wurde [96, 124, 227]. Die Gesamtmasse des dualen *C. albicans* - *P. aeruginosa* - Biofilms sowie die *C. albicans* - Zellzahlen waren zu jedem Zeitpunkt geringer als im monomikrobiellen *C. albicans* - Biofilm. Im polymikrobiellen Biofilm konnte der gleiche Effekt beobachtet werden, da die Biofilmmasse des dualen *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilms stets größer war. Möglicherweise hemmt *P. aeruginosa* auch das Wachstum von *S. aureus* im polymikrobiellen Biofilm, da die Zellzahlen von *S. aureus* nur geringfügig anwachsen und die Zellzahlen von *S. aureus* im reifen Biofilm nach 96 h unter den Ausgangswert abfielen. Zu diesem Zeitpunkt konnten erstmals auf den Agar-

platten SCVs nachgewiesen werden (Abb. A.7, S. 87). Die von *P. aeruginosa* sezernierten Exo-  
produkte Hydroxyquinolon-N-Oxid und Pyocyanin verursachen durch Hemmung des aeroben  
Elektronentransportes von *S. aureus* eine Selektion von SCVs [23, 70, 125, 174, 221, 230]. Die  
SCVs bilden fermentativ Laktat, das von *P. aeruginosa* konsumiert wird und den beobach-  
teten wachstumsfördernden Effekt auf *P. aeruginosa* im polymikrobiellen Biofilm erklären  
könnte [62]. Weiterhin auffallend waren vakuolenartige Kompartimente in den *C. albicans* -  
Hyphen im 24 h und 96 h gewachsenen dualen *C. albicans* - *P. aeruginosa* - Biofilm. Die-  
se Hyphen-Kompartimente fanden sich nur in Biofilmbinationen mit *P. aeruginosa* und  
als einzige Ausnahme auch nach 96 h im monomikrobiellen *C. albicans* - Biofilm. Die beob-  
achtete Vakuolisierung könnte durch aktive Sequestration von toxischen Substanzen aus dem  
Zytoplasma in die Vakuole eine Rolle in der Detoxifikation von Substanzen spielen und Kor-  
relat einer Stressreaktion sein [183]. Eine weitere Aufgabe wird für die Hyphendifferenzierung  
und folglich für die Gewebeinvasion diskutiert [114, 184].

Ein wachstumsstimulierender Effekt von *S. aureus* auf *C. albicans* war bei gleichzeitigem  
Vorhandensein von *P. aeruginosa* nicht nachweisbar. In der CLSM waren die Stäbchen nach  
96 h vor allem in den oberen Biofilmschichten zu finden, teilweise bildete sich eine Zweisei-  
tung aus, wobei die Staphylokokken die untere Schicht und teilweise kleinere Kokken bildeten  
(Abb. 3.12, S. 39). Pyocyanin und sein Stoffwechselprodukt 1-Hydroxyphenazin könnten für  
die beobachteten Veränderungen der Kokken verantwortlich sein [18, 125]. Die Bevorzugung  
aerober Umgebungsbedingungen sowie die Motilität von *P. aeruginosa* könnten die Ursache  
für die Ausbildung der Schichtung sein [101, 156, S. 525].

Die Biofilmmassen verhielten sich erwartungsgemäß konkordant zu den Beobachtungen der  
KBE-Messungen und konnten durch Bildung einer OD/OD<sub>c</sub>-Ratio nach der Klassifikation  
von Stepanovic et al. veranschaulicht werden (Abb. 3.5, S. 31) [219].

Eine Zunahme der Masse der monomikrobiellen Bakterienbiofilme wurde erst durch die Kom-  
bination mit *C. albicans* erreicht, was schon früher beschrieben wurde [83, 181, 188]. Nach  
Durchführung einer Reihe von Experimenten mit *C. albicans*, *P. aeruginosa* und *S. aureus*  
optimierten wir ein *in-vitro* - Biofilmmodell mit dem Ziel, die Interaktionen zwischen *C. al-  
bicans* und *S. aureus* genauer zu analysieren. Zur Biofilmanzucht wurde sowohl für *S. aureus*  
als auch für *C. albicans* eine Zellzahl von  $1,5 \cdot 10^6$  KBE/ml eingestellt, um die Interaktionen  
besser untersuchen zu können. Zudem wurde jeweils nach 24 h Inkubation ein Mediumwechsel  
durchgeführt, um eine stabile Nährstoffversorgung zu garantieren und toxische Substanzen  
zu reduzieren. Auf einen Waschvorgang der Biofilme vor der weiteren Verarbeitung wur-  
de verzichtet. Aufgrund des hohen Reifegrades gelang es mit mechanischen Methoden nicht  
den Biofilm in kleinste Anteile zu zerlegen, um eine gleichmäßige KBE-Bestimmung durch-  
zuführen. Daraufhin wurde eine chemische oder mechanische Homogenisierung durchgeführt  
(Kapitel 2.2.4.1, S. 18).

Im dualen *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilm wurde ein Wachstumsvorteil von *S. aureus* und *C. albicans*  
gegenüber den jeweiligen monomikrobiellen Biofilmen beobachtet, wobei *S. aureus*

stärker profitierte. Der fördernde Effekt von *C. albicans* auf *S. aureus* wurde bereits früher beschrieben und konnte in unseren Experimenten für die dualen Biofilme von *S. aureus* VA 19552 mit *C. albicans* SC 5314 und *C. albicans* VA 31883 bestätigt werden (Abb. 3.14, S. 41) [35, 83, 218]. Im 24 h gereiften Biofilm wurden kleine Canyon-artige Strukturen und Kanäle in der kompakten Biofilmstruktur gefunden, die von der Oberfläche in tiefere Biofilmschichten verlaufen und sich dann aufzweigen (Abb. A.12, S. 89). Bei diesen Strukturen könnte es sich um Versorgungskanäle handeln, die einen Austausch von Nährstoffen ermöglichen [3, 222, 142]. Diese komplexe Architektur war im 96 h alten dualen *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilm nicht mehr zu sehen. Zudem konnte in anderen Studien Sauerstoff als limitierender Wachstumsfaktor in tieferen Schichten des Biofilms detektiert werden und könnte somit auch hier im gereiften Biofilm zur Abnahme der KBE von *S. aureus* im dualen bzw. polymikrobiellen Biofilm geführt haben [133]. Die inhomogene Färbung von *S. aureus* sowie das Auftreten von sehr kleinen Kokken legt die Vermutung der Bildung von SCVs nahe, die auf den Agarplatten nur zu diesem Zeitpunkt im dualen *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilm nachgewiesen werden konnte (Abb. A.7, S. 87).

Proteinexpressionsstudien bei 24 h gewachsenen dualen *S. aureus* - *C. albicans* - Biofilmen identifizierten 27 verschiedene regulierte Proteine, die zumeist mit Wachstum, Metabolismus oder Stressreaktion assoziiert sind [188]. Zu den herunterregulierten Staphylokokkenproteinen gehörte CodY, ein globaler Transkriptionsrepressor von Virulenzfaktoren [145]. Möglicherweise lässt sich hiermit die schon früher beobachtete Mortalitätszunahme von Mäusen im Infektionsmodell mit *S. aureus* und *C. albicans* erklären [34]. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass CodY die Biofilmbildung in einem statischen Biofilmmodell hemmt, sodass die verminderte Expression von CodY die Biofilmbildung und damit die Adhäsion an *C. albicans* begünstigt [158]. Die Ursache für den wachstumsstimulierenden Effekt auf *S. aureus* in dualen Biofilmen mit *C. albicans* blieb lange Zeit ungeklärt [84, 181]. Der erhöhte Glukosegehalt in der Matrix von *C. albicans* - Biofilmen wurde als mögliche Ressourcenquelle für das verstärkte Wachstum von *S. aureus* vermutet [83]. In unserer Arbeit konnten wir das von *C. albicans* sezernierte PGE<sub>2</sub> als Stimulus identifizieren (Kapitel 3.2.2.2, S. 44).

In Biofilmen sind mikrobielle Interaktionen oftmals polydirektional, was beispielsweise dazu führt, dass *C. albicans* einen negativen Effekt auf die Motilität von *P. aeruginosa* ausübt [177]. Die vorbestehenden Eigenschaften der Mikroorganismen werden durch das Zusammenreffen der drei untersuchten Organismen im polymikrobiellen Biofilm durch polydirektionale Signale moduliert. So wurden einerseits Veränderungen bei der Adhäsion, Biofilmreifung und Biofilmdispersion, andererseits aber auch Modulationen zellulärer Antworten beobachtet [10, 34, 45, 46, 188]. Die Grundlage hierfür bildet Quorum-sensing.

### 4.3. Quorum-sensing

Quorum-sensing beschreibt die Kommunikation zwischen Mikroorganismen und spielt eine immense Rolle in polymikrobiellen Biofilmen [150]. Staib et al. stellten bereits 1976 die Hypothese auf, dass Endprodukte von *C. albicans* als Substrat für ein verstärktes Wachstum von *S. aureus* dienen könnten [218]. Auch wir konnten zeigen, dass zellfreie Überstände von *C. albicans* – Biofilmen Wachstum, Proliferation und Biofilmbildung von *S. aureus* fördern. Eines der kontinuierlich von *C. albicans* in die Umgebung abgegebenen Produkte ist Farnesol, welches als Quorum-sensing Molekül in die Regulation des Hefen-Myzel-Dimorphismus des Pilzes involviert ist [103, 141]. Die Kumulation von Farnesol verhindert durch Hemmung des Präinitiationskomplexes der Translation der Proteinbiosynthese die Keimschlauchbildung von *C. albicans*, weshalb die *C. albicans* - Morphologie als knospende Hefe bestehen bleibt [51, 103]. Durch diese Suppression der Hyphenbildung wird die Biofilmbildung stark reduziert [8, 194]. Hohe Farnesolkonzentrationen zeigen außerdem eine antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene Pathogene [111]. Hada et al. berichteten über eine Inhibition des Wachstums von *S. aureus* ab einer Konzentration von  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$  (entspricht  $90 \mu\text{M}$ ) [80]. Eine Hemmung des Wachstums in diesen Konzentrationsbereichen konnten wir ebenfalls beobachten (Abb. 3.17, S. 43). Darüber hinaus konnten wir in unseren Experimenten zeigen, dass subinhibitorische Konzentrationen zwischen  $0,5 \text{ nM}$  -  $5 \text{ nM}$  die Biofilmbildung von *S. aureus* nicht mehr hemmen, sondern deutlich verstärken. Der wachstumsstimulierende Effekt subinhibitorischer Konzentrationen ist für eine Vielzahl von Substanzen, u. a. für einige Antibiotika und Antimykotika beschrieben worden [120, 121, 136, 225]. Allerdings wurde auch beschrieben, dass in Überständen von *C. albicans* - Kulturen, die sich in der stationären Phase befinden, Farnesol in Konzentrationen zwischen  $2 \mu\text{M}$  -  $4 \mu\text{M}$  akkumuliert, d. h. in 1000- bis 10000-fach höheren Konzentrationen als die, die in unserem Modell eine Wachstumsförderung von *S. aureus* hervorriefen [169]. In Konzentrationen zwischen  $2 \mu\text{M}$  -  $4 \mu\text{M}$  hingegen war in unserem Modell kein wachstumsstimulierender sondern eher ein wachstumshemmender Effekt auf *S. aureus* nachweisbar. Unsere Daten zeigen außerdem, dass die Biofilmbildung von *S. aureus* nicht nur durch den Farnesol-produzierenden Stamm SC 5314, sondern ebenfalls durch den Farnesol-defizienten *C. albicans* - Stamm ATCC 10231 verstärkt wird, wenngleich auf einem niedrigeren Niveau als zusammen mit *C. albicans* SC 5314 (Abb. 3.18, S. 44). Diese Ergebnisse führten uns zu dem Schluss, dass eine andere Substanz für die gesteigerte Biofilmbildung von *S. aureus* verantwortlich sein muss. Neben Farnesol bildet *C. albicans*  $\text{PGE}_2$ , welches ebenfalls sezerniert wird. Der Effekt auf das Wachstum von *S. aureus* konnte ebenfalls nicht beobachtet werden, wenn Überstände von *C. albicans* oder Medien, die mit gereinigtem  $\text{PGE}_2$  angereichert waren, hitzebehandelt wurden. Diese Beobachtung unterstützt die Resultate von Carlson, der eine erhöhte Mortalitätsrate von Mäusen beobachtete, wenn diese simultan mit subletalen Dosen von *S. aureus* und *C. albicans* infiziert wurden. Dieser Effekt konnte nicht beobachtet werden, wenn eines der Agentien hitzeinaktiviert wurde [34]. Auch Harriott und

Noverr vermuteten ein hyphennahes, hitzelabiles Produkt, dass die Biofilmbildung von *S. aureus* forciert [84].

Es konnte in anderen Studien demonstriert werden, dass PGE<sub>2</sub> die Keimschlauchbildung induziert und in die Biofilmbildung von *C. albicans* involviert ist, sodass von *C. albicans* produziertes PGE<sub>2</sub> möglicherweise als ein potentieller Virulenzfaktor diskutiert werden muss [9, 119, 175]. Die Fähigkeit von *C. albicans* Hyphen auszubilden kennzeichnet den entscheidenden Virulenzfaktor. Hyphen-vermittelte aktive Penetration des Wirtsgewebes ist die Hauptinvasionsroute von *C. albicans* [235, 236]. Die Gewebeinvasion durch *C. albicans* ist mit der Sekretion von Zytokinen assoziiert, die die Immunabwehrmechanismen des Wirts induzieren. Auch bei Candida - Infektionen stellt die Phagozytose durch Makrophagen und Neutrophile die erste Verteidigungslinie des Immunsystems dar, allerdings ist die intrazelluläre Abtötung der Candida - Zellen nicht immer effektiv. Als zugrunde liegende Mechanismen werden die Hemmung der Phagosomenreifung und der Stickoxid (NO)-Produktion diskutiert [61]. Möglicherweise könnten diese Effekte aus der PGE<sub>2</sub>-Sekretion von *C. albicans* resultieren. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von PGE<sub>2</sub> an den EP2-Rezeptor der Makrophagen zu einer Suppression der Makrophagenreifung führt [245].

PGE<sub>2</sub> reguliert die Aktivierung, Reifung, Migration und Zytokinsekretion vieler Immunzellen, insbesondere der Zellen der angeborenen Immunabwehr. In Zusammenhang mit einer Infektion hemmt endogenes PGE<sub>2</sub> auch die zytolytische Effektorfunktion von Natürlichen Killerzellen (NK), sowie die Aktivierung, Migration und Produktion von proteolytischen Enzymen in Granulozyten und limitiert die Phagozytose und Zerstörung von Pathogenen durch Alveolarmakrophagen (Zusammenfassungen [5, 118]). Aronoff et al. berichteten über die negative regulatorische Rolle von endogen produziertem und exogen hinzugefügtem PGE<sub>2</sub> auf die FcR $\gamma$ -vermittelte Phagozytose von bakteriellen Pathogenen durch Alveolarmakrophagen [11]. Somit könnte das von *C. albicans* produzierte PGE<sub>2</sub> die lokale Immunabwehr des Wirtes beeinträchtigen. Diese Annahme wird durch Untersuchungen von Roux et al. unterstrichen. Sie zeigten, dass eine Besiedlung der Atemwege durch *C. albicans* die Phagozytose von *S. aureus* und *P. aeruginosa* hemmt und die Prävalenz von bakteriellen Pneumonien erhöht. Diese konnten durch eine Behandlung mit Antimykotika reduziert werden [209, 210].

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die entweder mit *S. aureus* oder *C. albicans* inokuliert wurden, die dann folgende Infektion überlebten, wohingegen eine kombinierte Infektion mit beiden Pathogenen zu einer Zunahme der Mortalitätsrate auf 40 - 100 % führte [34, 189]. Im Gegensatz dazu zeigten Studien mit COX-2-defizienten Mäusen eine verbesserte mikrobielle Clearance und erhöhte Überlebensraten [26, 53, 211]. Diese Beobachtung deckt sich mit unseren Untersuchungen, bei denen ein mutierter *C. albicans* - Stamm, der keine PGE<sub>2</sub>-Synthese aufweist, keine Wachstumsförderung von *S. aureus* bewirkt (Abb. 3.23, S. 47). Des Weiteren reduziert der nicht-selektive COX-Inhibitor Indometacin, der die Biosynthese von PGE<sub>2</sub> durch *C. albicans* blockt, in unseren Experimenten das Wachstum von *S. aureus* in dualen Biofilmen auf ein Niveau, wie es in monomikrobiellen *S. aureus* - Biofilmen

vorherrscht (Abb. 3.25, S. 48). Demnach könnte eine zusätzliche Behandlung mit Indometacin oder Antimykotika positive Effekte bei simultanen *S. aureus* - *C. albicans* - Infektionen aufweisen [11, 82, 209, 210].

Wir untersuchten außerdem den Einfluss von *S. aureus* auf die PGE<sub>2</sub>-Synthese von *C. albicans* in dualen Biofilmen im Vergleich zu monomikrobiellen *C. albicans* - Biofilmen, da wir im reifen dualen Biofilm eine Zunahme der Biofilmdicke und der KBE von *C. albicans* beobachtet hatten (Abb. A.23, S. 95). Allerdings konnten wir keine Stimulation der PGE<sub>2</sub>-Synthese von *C. albicans* in Anwesenheit von *S. aureus* feststellen. Möglicherweise spielen bakterielle Peptidoglykan-ähnliche Moleküle von *S. aureus* eine Rolle, für die ein positiver Effekt auf das Hyphenwachstum von *C. albicans* beschrieben wurde [237, 243].

Im Vergleich zum Farnesol-produzierenden Stamm SC 5314 sezernierte der Farnesol-defiziente Stamm ATCC 10231 signifikant niedrigere Mengen von PGE<sub>2</sub>, was den Schluss nahe legt, dass die Unterschiede in der Wachstumsstimulation von *S. aureus* eher auf Unterschiede in der PGE<sub>2</sub>- als in der Farnesol-Synthese zurückzuführen sind. Darüber hinaus waren die gemessenen Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> in Überständen von *C. albicans* - Biofilmen etwa genauso hoch, wie die Konzentrationen von reinem synthetischen PGE<sub>2</sub>, für die eine wachstumsstimulierende Wirkung auf *S. aureus* nachgewiesen wurde (Abb. 3.19, S. 44 und Abb. 3.22, S. 46). Wenngleich es uns aus technischen Gründen nicht möglich war, die Farnesol-Konzentration in den Überständen zu bestimmen, so scheint PGE<sub>2</sub> die führende Rolle in der Induktion der Biofilmbildung von *S. aureus* zuzukommen.

#### 4.4. Klinischer Kontext

Interaktionen zwischen Organismen, die sich in Biofilmen organisieren, verändern sich während des Krankheitsprozesses und haben somit eine enorme Bedeutung für den klinischen Alltag. Ein Beispiel hierfür ist die sich verändernde Antibiotikaresistenz. So konnte gezeigt werden, dass für Azole, die die Matrix von *C. albicans* - Biofilmen durchdringen können, die Penetration im polymikrobiellen Biofilm aufgrund der Schleimproduktion von *S. epidermidis* reduziert ist [3]. Ein anderes Beispiel ist die erhöhte Toleranz von *Staphylococcus spp.* gegenüber Vancomycin, wenn im Biofilm *Candida spp.* anwesend sind [31]. In einem Experiment an Ratten wurden Inokulationsdosen von *P. aeruginosa* bestimmt, die noch nicht zu einer bakteriellen Pneumonie führten. Die Instillation dieser Dosen kombiniert mit *C. albicans* führte bei 34 % der Tiere zu einer *P. aeruginosa* - Pneumonie, da auch die Funktion von Makrophagen durch *C. albicans* gehemmt wurde [209]. Nseir und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine antimykotische Behandlung zu einem reduzierten Risiko einer VAP oder tracheobronchialen Kolonisation mit *P. aeruginosa* führt [178]. In einer Untersuchung zu Nagelinfektionen konnte festgestellt werden, dass eine Infektion mit Pilzen die Kolonisation und das Wachstum von *P. aeruginosa* potenziert [66]. Eine aktuelle Studie an Zebrafischen konnte eine Zunahme der epithelialen Invasion von *C. albicans* bei Koinfektion mit *P. aeruginosa* zeigen, was zu einer

deutlichen Erhöhung der Mortalität führte [20]. Eine Erkrankung, bei der es regelmäßig zum Auftreten aller 3 untersuchten Mikroorganismen kommt, ist die Cystische Fibrose.

#### 4.4.1. Cystische Fibrose

Chronische Entzündungsreaktionen sowie Retention von zähem Schleim in der Lunge sind typisch für das Krankheitsbild der Cystischen Fibrose (CF), einer genetischen Erkrankung, die durch Mutationen im CFTR-Gen (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) hervorgerufen wird [25, 44]. In einer von Harmon et al. publizierten Studie wurde gezeigt, dass eine fehlerhafte Funktion des Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptors (PPAR $\gamma$ ) in Epithelzellen zu einer Akkumulation von PGE<sub>2</sub> führt [82]. Ursache hierfür ist die erniedrigte Konversion von PGE<sub>2</sub> zum PPAR $\gamma$ -Liganden 15-Keto-PGE<sub>2</sub>. Endogenes PGE<sub>2</sub> erhält die Integrität der Schleimhautbarriere in der Lunge und im Gastrointestinaltrakt [27, 82, 224]. Im Rahmen von Entzündungen kommt es zur Zerstörung von Zellen auf den Schleimhäuten und damit zur Freisetzung von PGE<sub>2</sub>. Normalerweise wird PGE<sub>2</sub> schnell zu Metaboliten abgebaut. Dieser Abbau scheint bei der CF gestört, so dass möglicherweise PGE<sub>2</sub> in der CF-Lunge kumuliert. Erhöhte PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen im Respirationstrakt von an CF leidenden Patienten wurden in verschiedenen Studien nachgewiesen [153, 206]. Wenn PGE<sub>2</sub> das Wachstum von *S. aureus* begünstigt, wie in dieser Arbeit gezeigt, dann könnte dies eine mögliche Ursache für die frühe Kolonisation und Persistenz von *S. aureus* in der Lunge von Patienten mit Cystischer Fibrose sein. In den USA waren 2012 69 % aller CF-Patienten mit *S. aureus* und 49,6 % mit *P. aeruginosa* kolonisiert [44]. Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine deutsche Studie von 2008, die eine Prävalenz von 63,3 % für *S. aureus*, 50 % für *P. aeruginosa* und 78,3 % für *C. albicans* bei CF-Patienten zeigen konnte [233]. Dabei konnte bei 12 % der CF-Patienten im Alter von 11-15 Jahren eine Kolonisation mit mucoiden *P. aeruginosa* nachgewiesen werden, wohingegen 70 % der Patienten der gleichen Altersgruppe mit *S. aureus* kolonisiert waren. In der Altersgruppe zwischen 20 und 41 Jahren waren 38 % der Patienten mit mucoiden *P. aeruginosa* und 57 % mit *S. aureus* besiedelt. Offensichtlich liegt es in der Pathogenese der Mukoviszidose begründet, dass es zu einer chronischen Pseudomonaden - Besiedlung im Laufe der Krankheitsprogredienz kommt. Der CFTR bindet im Normalzustand das Lipopolysaccharid von Pseudomonaden und löst die angeborene Immunabwehr aus, womit die Neigung von CF-Patienten zu dauerhaften Pseudomonaden - Infektionen erklärt wird [191]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die vom menschlichen Immunsystem produzierten Defensine durch hohe Salzkonzentrationen, wie sie in der CF-Lunge nachgewiesen wurden, deaktiviert werden und damit eine lokale Immundefizienz entsteht [73, 208]. Im Verlaufe der Erkrankung nehmen die Virulenz und die Zytotoxizität von *P. aeruginosa* zu [229]. Die auch von uns *in-vitro* gemachte Beobachtung, dass sich die Anwesenheit von *P. aeruginosa* negativ auf das Wachstum anderer Bakterien und Pilze auswirkt, konnte auch bei Patienten bestätigt werden. So wurde aus Atemwegsmaterialien von *P. aeruginosa* - besiedelten CF-Patienten seltener *C. albicans* und *S. aureus* angezüchtet [126, 157]. Eine aktuelle Untersuchung zu

dualen *S. aureus* - *P. aeruginosa* - Biofilmen konnte einen Aggregations- und Kolonisationsvorteil an Keratinozyten für *P. aeruginosa* in Anwesenheit von *S. aureus* im Vergleich zu monomikrobiellen Infektionen zeigen [10]. Interessanterweise binden sowohl *P. aeruginosa* als auch *S. aureus* kompetitiv an den gleichen Rezeptor auf CF-Epithelzellen. Hierbei handelt es sich um einen Zuckeranteil des Asialogangliosid-1 (aGM1) [107]. Dieses Glycolipid kommt in der Plasmamembran respiratorischer Epithelzellen bei CF deutlich häufiger vor (12 % vs. 2,9 %) als bei gesunden Probanden [212]. Durch die feste Bindung von *P. aeruginosa* und *S. aureus* an die Epithelzellen entgehen sie der mukociliären Clearance. Die intermikrobielle Konkurrenz um diese Bindungsplätze scheint offensichtlich eine Rolle in der Pathogenese zu spielen [146]. Diese These wird von Studien gestützt, die gezeigt haben, dass eine kontinuierliche Staphylokokken - Prophylaxe zu einer geringeren Besiedelungsrate mit Staphylokokken führt, aber auch zu einer früheren Zunahme der *P. aeruginosa* - Nachweise [21, 199].

#### 4.4.2. Ausblick

Die chronische Kolonisation der Lunge bei Patienten mit CF und die durch sie unterhaltene chronische Entzündungsreaktion führen zu einer progredienten Verschlechterung der Lungenfunktion, so dass früher oder später eine Lungentransplantation unvermeidbar wird. Die Organisation der Mikroorganismen in Biofilmen erschwert die antimikrobielle Therapie, so dass es wünschenswert wäre, die dauerhafte Kolonisation von Mikroorganismen zu verhindern. Eine Möglichkeit könnte die Blockade des aGM1 durch Liganden oder Antikörper darstellen und einen präventiven Effekt ausüben, um die initiale Kolonisation zu verhindern und in späteren Krankheitsstadien die mukociliäre Clearance zu unterstützen [107]. Nach erfolgreicher Etablierung von *P. aeruginosa* in der CF-Lunge ist eine dauerhafte Eradikation nicht mehr möglich. Neben der antibiotischen Therapie könnten beispielsweise PQS-Inhibitoren entwickelt werden, um die Infektiosität, Toxizität und Virulenz von *P. aeruginosa* zu reduzieren [43]. Wir haben in unseren Experimenten gezeigt, dass der Cyclooxygenasehemmer Indometacin einen hemmenden Effekt auf die Biofilmbildung von *S. aureus* hat. Ein antiinflammatorischer Effekt des unspezifischen Cyclooxygenasehemmers Ibuprofen wirkte sich in mehreren klinischen Studien hemmend auf die Progression der CF aus [131, 132, 139, 140, 167]. In einer aktuellen Studie konnte eine geringere Letalität bei dualen *C. albicans* - *S. aureus* - Infektionen bei Mäusen durch die Behandlung mit einem Prostaglandin E<sub>2</sub>-Antagonisten nachgewiesen werden [106]. Die Wirkung gegenüber dem getesteten MRSA-Stamm wurde allerdings nicht über den PGE<sub>2</sub>-Rezeptor EP<sub>4</sub> vermittelt, sondern zeigte eine direkte antimikrobielle Aktivität. Möglicherweise könnte eine additive Behandlung einer simultanen *C. albicans* - *S. aureus* - Infektion mit einem Cyclooxygenasehemmer neben dem antiinflammatorischen Effekt durch Hemmung von PGE<sub>2</sub> auch *in-vivo* einen positiven Effekt auf den Krankheitsprozess ausüben und sollte Gegenstand weiterer Studien sein.

## 5. Zusammenfassung

Die Biofilmproduktion steigt durch die Kombination von *S. aureus* und *P. aeruginosa* mit *C. albicans* stark an, da die Bakterien die Hyphen als zusätzliche Adhäsionsfläche nutzen. Daraus folgende Phänomene sind als Aggregatbildung an den Hyphen sowie durch Veränderungen in der dreidimensionalen Grundstruktur im polymikrobiellen Biofilm auch morphologisch sichtbar. In gemeinsamer Koexistenz mit *C. albicans* nimmt auch die Zellzahl von *S. aureus* und *P. aeruginosa* im Biofilm stark zu. Im reifen polymikrobiellen Biofilms dominiert *P. aeruginosa*. Es finden sich hier auffallende phänotypische Adaptationen von *C. albicans* sowie stark regressive Veränderungen von *S. aureus*. Demgegenüber konnten die größten Zellzahlen und die höchste Kompaktheit im dualen *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilm nachgewiesen werden. In diesem Biofilm führt die Interaktion mit *C. albicans* zu einer Wachstumsstimulation v. a. von *S. aureus*. Wir konnten zeigen, dass PGE<sub>2</sub> ein Schlüsselmolekül für das Wachstum und die Biofilmbildung von *S. aureus* im dualen Biofilm ist. Möglicherweise könnten subinhibitorische Konzentrationen von Farnesol diesen Effekt verstärken, während Tyrosol keinen stimulierenden Effekt aufwies. In der Pathogenese Biofilm-assoziiierter Infektionen kommen dem von *C. albicans* sezernierten PGE<sub>2</sub> daher zwei wichtige Funktionen zu: (I) es regt die Hyphenbildung des Pilzes an und (II) es begünstigt die Proliferation von *S. aureus*. Somit sollte bei zukünftigen Studien die Organisation der hier untersuchten Organismen in Biofilmen berücksichtigt werden, da sich durch intermikrobielle Kommunikation (Quorum-sensing) auch pathogenene Eigenschaften verändern. Adaptationen der Invasionsfähigkeit, Toxizität und Antibiotikotoleranz sind die Folge. Klinische Relevanz für diese Organisation im polymikrobiellen Biofilm ergibt sich für das Krankheitsbild der Cystischen Fibrose, bei der regelhaft alle drei untersuchten Organismen nachgewiesen werden können [28, 44, 126, 157, 167, 223]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Indometacin, ein nicht-selektiver Cyclooxygenasehemmer, die Bildung von PGE<sub>2</sub> in dualen Biofilmen wirkungsvoll hemmt und somit das Wachstum von *S. aureus* inhibiert. Möglicherweise steht hiermit eine neue Therapieergänzung bei kombinierten *C. albicans* - *S. aureus* - Infektionen zur Verfügung und sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

## Literaturverzeichnis

- [1] Aaron, S. D., Ferris, W., Ramotar, K., Vandemheen, K., Chan, F., und Saginur, R. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology*, 40(11):4172–4179, 2002.
- [2] Acar, J. F., Goldstein, F. W., und Lagrange, P. Human infections caused by thiamine- or menadione-requiring staphylococcus aureus. *Journal of clinical microbiology*, 8(2):142–147, 1978.
- [3] Adam, B., Baillie, G. S., und Douglas, L. J. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of medical microbiology*, 51(4):344–349, 2002.
- [4] Afzelius, B. A. und Mossberg, B. Immotile cilia. *Thorax*, 35:401–404, 1980.
- [5] Agard, M., Asakrah, S., und Morici, L. A. Pge(2) suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3(Article 45):1–11, 2013.
- [6] Akers, K. S., Cardile, A. P., Wenke, J. C., und Murray, C. K. Biofilm formation by clinical isolates and its relevance to clinical infections. *Advances in experimental medicine and biology*, 830:1–28, 2015.
- [7] Al-Fattani, M. A. und Douglas, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of medical microbiology*, 55(8):999–1008, 2006.
- [8] Alem, M. A. S., Oteef, M. D. Y., Flowers, T. H., und Douglas, L. J. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic cell*, 5(10):1770–1779, 2006.
- [9] Alem, Mohammed A. S. und Douglas, L. J. Prostaglandin production during growth of *Candida albicans* biofilms. *Journal of medical microbiology*, 54(Pt 11):1001–1005, 2005.
- [10] Alves, P. M., Al-Badi, E., Withycombe, C., Jones, P. M., Purdy, K. J., und Maddocks, S. E. Interaction between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is beneficial for colonisation and pathogenicity in a mixed biofilm. *Pathogens and Disease*, 76(1):1–10, 2018.
- [11] Aronoff, D. M., Canetti, C., und Peters-Golden, M. Prostaglandin e2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an e-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic amp. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(1):559–565, 2004.
- [12] Azoulay, E. *Candida* colonization of the respiratory tract and subsequent *Pseudomonas* ventilator-associated pneumonia. *Chest*, 129(1):110–117, 2006.

- [13] Baillie, G. S. und Douglas, L. J. Candida biofilms and their susceptibility to antifungal agents. *Methods in enzymology*, 310:644–656, 1999.
- [14] Baillie, G. S. und Douglas, L. J. Role of dimorphism in the development of candida albicans biofilms. *Journal of medical microbiology*, 48(7):671–679, 1999.
- [15] Baillie, G. S. und Douglas, L. J. Matrix polymers of candida biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 46(3):397–403, 2000.
- [16] Bakare, N., Rickerts, V., Bargon, J., und Just-Nübling, G. Prevalence of aspergillus fumigatus and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses*, 46(1-2):19–23, 2003.
- [17] Bankhurst, A. D. The modulation of human natural killer cell activity by prostaglandins. *Journal of clinical & laboratory immunology*, 7(2):85–91, 1982.
- [18] Baron, S. S. und Rowe, J. J. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 20(6):814–820, 1981.
- [19] Beer, D. d., Stoodley, P., Roe, F., und Lewandowski, Z. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnology and Bioengineering*, 43(11):1131–1138, 1994.
- [20] Bergeron, A. C., Seman, B. G., Hammond, J. H., Archambault, L. S., Hogan, D. A., und Wheeler, R. T. Candida and pseudomonas interact to enhance virulence of mucosal infection in transparent zebrafish. *Infection and immunity*, 2017.
- [21] Besier, S., Smaczny, C., Mallinckrodt, C. v., Krahl, A., Ackermann, H., Brade, V., und Wichelhaus, T. A. Prevalence and clinical significance of staphylococcus aureus small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. *Journal of clinical microbiology*, 45(1):168–172, 2006.
- [22] Bessa, L. J., Fazii, P., Di Giulio, M., und Cellini, L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *International wound journal*, 12(1):47–52, 2015.
- [23] Biswas, L., Biswas, R., Schlag, M., Bertram, R., und Götz, F. Small-colony variant selection as a survival strategy for staphylococcus aureus in the presence of pseudomonas aeruginosa. *Applied and environmental microbiology*, 75(21):6910–6912, 2009.
- [24] Bittar, F., Richet, H., Dubus, J.-C., Reynaud-Gaubert, M., Stremmler, N., Sarles, J., Raoult, D., und Rolain, J.-M. Molecular detection of multiple emerging pathogens in sputa from cystic fibrosis patients. *PloS one*, 3(8):e2908, 2008.
- [25] Boucher, R. C. Airway surface dehydration in cystic fibrosis: pathogenesis and therapy. *Annual review of medicine*, 58:157–170, 2007.
- [26] Bowman, C. C. und Bost, K. L. Cyclooxygenase-2-mediated prostaglandin e2 production in mesenteric lymph nodes and in cultured macrophages and dendritic cells after infection with salmonella. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(4):2469–2475, 2004.

- [27] Bozyk, P. D. und Moore, B. B. Prostaglandin e2 and the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 45(3):445–452, 2011.
- [28] Bragonzi, A., Paroni, M., Nonis, A., Cramer, N., Montanari, S., Rejman, J., Di Serio, C., Döring, G., und Tümmler, B. Pseudomonas aeruginosa microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 180(2):138–145, 2009.
- [29] Brand, A. Hyphal growth in human fungal pathogens and its role in virulence. *International journal of microbiology*, 2012:1–11, 2012.
- [30] Brand, A., Barnes, J. D., Mackenzie, K. S., Odds, F. C., und Gow, N. A. Cell wall glycans and soluble factors determine the interactions between the hyphae of candida albicans and pseudomonas aeruginosa. *FEMS microbiology letters*, 287(1):48–55, 2008.
- [31] Brogden, K. A. und Guthmiller, J. M., editors. *Polymicrobial Diseases: Chapter 18 Interactions between Candida Species and Bacteria in Mixed Infections*. ASM Press, Washington (DC), 2002.
- [32] Bullitt, E. und Makowski, L. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. *Nature*, 373(6510):164–167, 1995.
- [33] Calderone, R., Odds, F. C., und Boekhout, T. Candida albicans: fundamental research on an opportunistic human pathogen. *FEMS yeast research*, 9(7):971–972, 2009.
- [34] Carlson, E. Synergistic effect of candida albicans and staphylococcus aureus on mouse mortality. *Infection and immunity*, 38(3):921–924, 1982.
- [35] Carlson, E. Enhancement by candida albicans of staphylococcus aureus, serratia marcescens, and streptococcus faecalis in the establishment of infection in mice. *Infection and immunity*, 39(1):193–197, 1983.
- [36] Carlson, E. und Johnson, G. Protection by candida albicans of staphylococcus aureus in the establishment of dual infection in mice. *Infection and immunity*, 50(3):655–659, 1985.
- [37] Cassat, J. E., Lee, C. Y., und Smeltzer, M. S. Investigation of biofilm formation in clinical isolates of staphylococcus aureus. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 391:127–144, 2007.
- [38] Cayman Chemical. Prostaglandin e metabolite elisa kit: Item no 514531, online verfügbar unter <https://www.caymanchem.com/pdfs/514531.pdf>, zuletzt geprüft am 15.01.2016.
- [39] Cayman Chemical. Prostaglandin e2 elisa kit - monoclonal: Item no 514010, online verfügbar unter <https://www.caymanchem.com/pdfs/514010.pdf>, zuletzt geprüft am 15.01.2016.
- [40] Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., und Ghanoun, M. A. Biofilm formation by the fungal pathogen candida albicans: Development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*, 183(18):5385–5394, 2001.

- [41] Chen, P., Abercrombie, J. J., Jeffrey, N. R., und Leung, K. P. An improved medium for growing staphylococcus aureus biofilm. *Journal of microbiological methods*, 90(2):115–118, 2012.
- [42] Costerton, J. W., Stewart, P. S., und Greenberg, E. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418):1318–1322, 1999.
- [43] Cugini, C., Calfee, M. W., Farrow, J. M., Morales, D. K., Pesci, E. C., und Hogan, D. A. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits pqs production in pseudomonas aeruginosa. *Molecular microbiology*, 65(4):896–906, 2007.
- [44] Cystic Fibrosis Foundation. Cystic fibrosis foundation - patient registry 2012 annual data report. *Cystic fibrosis patient registry, report of 2012 data*, 2012:1–28, 2013.
- [45] Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., und Greenberg, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science (New York, N.Y.)*, 280:295–298, 1998.
- [46] deRepentigny, J., Levesque, R., und Mathieu, L. G. Increase in the in vitro susceptibility of staphylococcus aureus to antimicrobial agents in the presence of candida albicans. *Canadian journal of microbiology*, 25(4):429–435, 1979.
- [47] Donlan, R. M. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9):881–890, 2002.
- [48] Douglas, L. J. Candida biofilms and their role in infection. *Trends in microbiology*, 11(1):30–36, 2003.
- [49] Eck, R., Hundt, S., Hartl, A., Roemer, E., und Künkel, W. A multicopper oxidase gene from candida albicans: cloning, characterization and disruption. *Microbiology (Reading, England)*, 145:2415–2422, 1999.
- [50] Efthimiadis, A. und Spanevello, A. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridisation. *The European respiratory journal*, 20(Supplement 37):19–23, 2002.
- [51] Egbe, N. E., Dornelles, T. O., Paget, C. M., Castelli, L. M., und Ashe, M. P. Farnesol inhibits translation to limit growth and filamentation in c. albicans and s. cerevisiae. *Microbial cell (Graz, Austria)*, 4(9):294–304, 2017.
- [52] Eiff, C. v., Peters, G., und Becker, K. The small colony variant (scv) concept—the role of staphylococcal scvs in persistent infections. *Injury*, 37(2):S26–S33, 2006.
- [53] Ejima, K., Layne, M. D., Carvajal, I. M., Kritek, P. A., Baron, R. M., Chen, Y.-H., Vom Saal, J., Levy, B. D., Yet, S.-F., und Perrella, M. A. Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to endotoxin-induced inflammation and death. *Federation of American Societies for Experimental Biology journal*, 17(10):1325–1327, 2003.
- [54] El-Azizi, M., Starks, S., und Khardori, N. Interactions of candida albicans with other candida spp. and bacteria in the biofilms. *Journal of applied microbiology*, 96(5):1067–1073, 2004.

- [55] El-Naggar, M. Y., Gohar, Y. M., Sorour, M. A., und Waheeb, M. G. Hydrogel dressing with a nano-formula against methicillin-resistant staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa diabetic foot bacteria. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26(2):408–420, 2016.
- [56] Elorza, M. V., Rico, H., und Sentandreu, R. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in saccharomyces cerevisiae and candida albicans cells. *Journal of general microbiology*, 129:1577–1582, 1983.
- [57] Erb-Downward, J. R. und Noverr, M. C. Characterization of prostaglandin e2 production by candida albicans. *Infection and immunity*, 75(7):3498–3505, 2007.
- [58] Essary, B. D. und Marshall, P. A. Assessment of fun-1 vital dye staining: Yeast with a block in the vacuolar sorting pathway have impaired ability to form civs when stained with fun-1 fluorescent dye. *Journal of microbiological methods*, 78(2):208–212, 2009.
- [59] Evans, D. J., Allison, D. G., Brown, M. R., und Gilbert, P. Effect of growth-rate on resistance of gram-negative biofilms to cetrимide. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 26(4):473–478, 1990.
- [60] Farrell, P. M. The prevalence of cystic fibrosis in the european union. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 7(5):450–453, 2008.
- [61] Fernández-Arenas, E., Bleck, Christopher K E, Nombela, C., Gil, C., Griffiths, G., und Diez-Orejas, R. Candida albicans actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes. *Cellular microbiology*, 11(4):560–589, 2009.
- [62] Filkins, L. M., Graber, J. A., Olson, D. G., Dolben, E. L., Lynd, L. R., Bhujju, S., und O’Toole, G. A. Coculture of staphylococcus aureus with pseudomonas aeruginosa drives s. aureus towards fermentative metabolism and reduced viability in a cystic fibrosis model. *Journal of bacteriology*, 197(14):2252–2264, 2015.
- [63] Flume, P. A., Mogayzel, P. J., Robinson, K. A., Goss, C. H., Rosenblatt, R. L., Kuhn, R. J., und Marshall, B. C. Cystic fibrosis pulmonary guidelines. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 180(9):802–808, 2009.
- [64] Flume, P. A., Robinson, K. A., O’Sullivan, B. P., Finder, J. D., Vender, R. L., Willey-Courand, D.-B., White, T. B., und Marshall, B. C. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: Airway clearance therapies. *Respiratory care*, 54(4):522–537, 2009.
- [65] Fonzi, W. A. und Irwin, M. Y. Isogenic strain construction and gene mapping in candida albicans. *Genetics*, 134:717–728, 1993.
- [66] Foster K, Thomas L, Warner J, Desmond R, und Elewski BE. A bipartite interaction between pseudomonas aeruginosa and fungi in onychomycosis. *Archives of dermatology*, 141(11):1467–1468, 2005.
- [67] Fox, S. J., Shelton, B. T., und Kruppa, M. D. Characterization of genetic determinants that modulate candida albicans filamentation in the presence of bacteria. *PloS one*, 8(8):e71939, 2013.

- [68] Fradin, C., Groot, P. d., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F. C., und Hube, B. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of candida albicans in human blood. *Molecular microbiology*, 56(2):397–415, 2005.
- [69] Frank, D. N., Wysocki, A., Specht-Glick, D. D., Rooney, A., Feldman, R. A., St Amand, Allison L, Pace, N. R., und Trent, J. D. Microbial diversity in chronic open wounds. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 17(2):163–172, 2009.
- [70] Gibson, J., Sood, A., und Hogan, D. A. Pseudomonas aeruginosa-candida albicans interactions: Localization and fungal toxicity of a phenazine derivative. *Applied and environmental microbiology*, 75(2):504–513, 2009.
- [71] Gileles-Hillel, A., Shoseyov, D., Polachek, I., Korem, M., Kerem, E., und Cohen-Cymberknoh, M. Association of chronic candida albicans respiratory infection with a more severe lung disease in patients with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*, 50:1082–1089, 2015.
- [72] Gillum, A. M., Tsay, E. Y., und Kirsch, D. R. Isolation of the candida albicans gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of s. cerevisiae ura3 and e. coli pyrF mutations. *Molecular & general genetics : MGG*, 198(2):179–182, 1984.
- [73] Goldman, M. J., Anderson, G. M., Stolzenberg, E. D., Kari, U. P., Zasloff, M., und Wilson, J. M. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 88(4):553–560, 1997.
- [74] Gontcharova, V., Youn, E., Sun, Y., Wolcott, R. D., und Dowd, S. E. A comparison of bacterial composition in diabetic ulcers and contralateral intact skin. *The open microbiology journal*, 4:8–19, 2010.
- [75] Goto, T., Herberman, R. B., Maluish, A., und Strong, D. M. Cyclic amp as a mediator of prostaglandin e-induced suppression of human natural killer cell activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 130(3):1350–1355, 1983.
- [76] Gow, N. A. R., Brown, A. J. P., und Odds, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. *Current opinion in microbiology*, 5(4):366–371, 2002.
- [77] Guilbaud, M., Bruzaud, J., Bouffartigues, E., Orange, N., Guillot, A., Aubert-Frambourg, A., Monnet, V., Herry, J.-M., Chevalier, S., und Bellon-Fontaine, M.-N. Proteomic response of pseudomonas aeruginosa pa01 adhering to solid surfaces. *Frontiers in microbiology*, 8:1465, 2017.
- [78] Gupta, A. K., Batra, P., Mathur, P., Karoung, A., Thanbuana, B. T., Thomas, S., Balamurugan, M., Gunjyal, J., und Misra, M. C. Microbial epidemiology and antimicrobial susceptibility profile of wound infections in out-patients at a level 1 trauma centre. *Journal of Patient Safety & Infection Control*, 3(3):126–129, 2015.
- [79] Gupta, N., Haque, A., Mukhopadhyay, G., Narayan, R. P., und Prasad, R. Interactions between bacteria and candida in the burn wound. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, 31(3):375–378, 2005.

- [80] Hada, T., Shiraishi, A., Furuse, S., Inoue, Y., Hamashima, H., Matsumoto, Y., Masuda, K., und Shiojima, K. Inhibitory effects of terpenes on the growth of staphylococcus aureus. *Natural medicines = Shōyākugaku zasshi / The Japanese Society of Pharmacognosy*, 57(2):64–67, 2003.
- [81] Hageage, G. J. und Harrington, B. J. Use of calcofluor white in clinical mycology. *Laboratory Medicine*, 15(2):109–112, 1984.
- [82] Harmon, G. S., Dumlao, D. S., Ng, D. T., Barrett, K. E., Dennis, E. A., Dong, H., und Glass, C. K. Pharmacological correction of a defect in ppar-gamma signaling ameliorates disease severity in cftr-deficient mice. *Nature medicine*, 16(3):313–318, 2010.
- [83] Harriott, M. M. und Noverr, M. C. Candida albicans and staphylococcus aureus form polymicrobial biofilms: Effects on antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(9):3914–3922, 2009.
- [84] Harriott, M. M. und Noverr, M. C. Ability of candida albicans mutants to induce staphylococcus aureus vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(9):3746–3755, 2010.
- [85] Harrison, J. J., Stremick, C. A., Turner, R. J., Allan, N. D., Olson, M. E., und Ceri, H. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nature protocols*, 5(7):1236–1254, 2010.
- [86] Hartert, M., Senbaklavacin, O., Gohrbandt, B., Fischer, B. M., Buhl, R., und Vahld, C.-F. Lung transplantation: a treatment option in end-stage lung disease. *Deutsches Ärzteblatt international*, 111(7):107–116, 2014.
- [87] Hasan, F., Xess, I., Wang, X., Jain, N., und Fries, B. C. Biofilm formation in clinical candida isolates and its association with virulence. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 11(8-9):753–761, 2009.
- [88] Hauser, A. R. Pseudomonas aeruginosa: So many virulence factors, so little time. *Critical care medicine*, 39(9):2193–2194, 2011.
- [89] Hawser, S. P., Baillie, G. S., und Douglas, L. J. Production of extracellular matrix by candida albicans biofilms. *Journal of medical microbiology*, 47(3):253–256, 1998.
- [90] Hawser, S. P. und Douglas, L. J. Resistance of candida albicans biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(9):2128–2131, 1995.
- [91] Hawser, S. P., Norris, H., Jessup, C. J., und Ghannoum, M. A. Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino) carbonyl]-2h-tetrazolium hydroxide (xtt) colorimetric method with the standardized national committee for clinical laboratory standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. *Journal of clinical microbiology*, 36(5):1450–1452, 1998.
- [92] Hawser, S. P. und Douglas, L. J. Biofilm formation by candida species on the surface of catheter materials in vitro. *Infection and immunity*, 62(3):915–921, 1994.
- [93] Hermann, C., Hermann, J., Munzel, U., und Rüchel, R. Bacterial flora accompanying candida yeasts in clinical specimens. *Mycoses*, 42(11-12):619–627, 1999.

- [94] Herth, W. Calcofluor white and congo red inhibit chitin microfibril assembly of *Pectinomyces*: Evidence for a gap between polymerization and microfibril formation. *The Journal Of Cell Biology*, 87:442–450, 1980.
- [95] Hirschhausen, N., Block, D., Bianconi, I., Bragonzi, A., Birtel, J., Lee, J. C., Dübbers, A., Küster, P., Kahl, J., Peters, G., und Kahl, B. C. Extended staphylococcus aureus persistence in cystic fibrosis is associated with bacterial adaptation. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 303(8):685–692, 2013.
- [96] Hogan, D. A. und Kolter, R. Pseudomonas-candida interactions: An ecological role for virulence factors. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5576):2229–2232, 2002.
- [97] Hogan, D. A., Vik, Å., und Kolter, R. A pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule influences candida albicans morphology. *Molecular microbiology*, 54(5):1212–1223, 2004.
- [98] Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G. L., Coenye, T., Donelli, G., Hall-Stoodley, L., Holá, V., Imbert, C., Kirketerp-Møller, K., Lebeaux, D., Oliver, A., Ullmann, A. J., und Williams, C. Escmid guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(Suppl 1):S1–25, 2015.
- [99] Høiby, N. Recent advances in the treatment of pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis. *BMC medicine*, 9(1):1–7, 2011.
- [100] Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Jensen, P. Ø., Kolpen, M., Qvist, T., Aanaes, K., Pressler, T., Skov, M., und Ciofu, O. Diagnosis of biofilm infections in cystic fibrosis patients. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 125(4):339–343, 2017.
- [101] Høiby, N., Ciofu, O., und Bjarnsholt, T. Pseudomonas aeruginosa biofilms in cystic fibrosis. *Future microbiology*, 5(11):1663–1674, 2010.
- [102] Holcombe, L. J., McAlester, G., Munro, C. A., Enjalbert, B., Brown, A. J. P., Gow, N. A. R., Ding, C., Butler, G., O’Gara, F., und Morrissey, J. P. Pseudomonas aeruginosa secreted factors impair biofilm development in candida albicans. *Microbiology*, 156(5):1476–1486, 2010.
- [103] Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P., und Nickerson, K. W. Quorum sensing in the dimorphic fungus candida albicans is mediated by farnesol. *Applied and environmental microbiology*, 67(7):2982–2992, 2001.
- [104] Hornby, J. M. und Nickerson, K. W. Enhanced production of farnesol by candida albicans treated with four azoles. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(6):2305–2307, 2004.
- [105] Ibrahim, A. S., Mirbod, F., Filler, S. G., Banno, Y., Cole, G. T., Kitajima, Y., Edwards, J. E. Jr, Nozawa, Y., und Ghannoum, M. A. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of candida albicans. *Infection and immunity*, 63(5):1993–1998, 1995.

- [106] Ikeh, Mélanie A C, Fidel, P. L., und Noverr, M. C. Prostaglandin e2 receptor antagonist with antimicrobial activity against methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(3), 2018.
- [107] Imundo, L., Barasch, J., Prince, A., und Al-Awqati, Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92:3019–3023, 1995.
- [108] Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., und Hiramatsu, K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(5):1323–1336, 2001.
- [109] Ito, T., Hiramatsu, K., Tomasz, A., Lencastre, H. d., Perreten, V., Holden, Matthew T G, Coleman, D. C., Goering, R., Giffard, P. M., Skov, R. L., Zhang, K., Westh, H., O’Brien, F., Tenover, F. C., Oliveira, D. C., Boyle-Vavra, S., Laurent, F., Kearns, A. M., Kreiswirth, B., Ko, K. S., Grundmann, H., Sollid, J. E., John, Joseph F Jr, Daum, R., Soderquist, B., und Buist, G. Guidelines for reporting novel meca gene homologues. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(10):4997–4999, 2012.
- [110] Izano, E. A., Amarante, M. A., Kher, W. B., und Kaplan, J. B. Differential roles of poly-n-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular dna in staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 74(2):470–476, 2008.
- [111] Jabra-Rizk, M. A., Meiller, T. F., James, C. E., und Shirliff, M. E. Effect of farnesol on staphylococcus aureus biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(4):1463–1469, 2006.
- [112] Jelsbak, L., Johansen, H. K., Frost, A.-L., Thøgersen, R., Thomsen, L. E., Ciofu, O., Yang, L., Haagenen, Janus A J, Høiby, N., und Molin, S. Molecular epidemiology and dynamics of pseudomonas aeruginosa populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infection and immunity*, 75(5):2214–2224, 2007.
- [113] Jiménez, J. N., Ocampo, A. M., Vanegas, J. M., Rodríguez, E. A., Garcés, C. G., Patiño, L. A., Ospina, S., und Correa, M. M. Characterisation of virulence genes in methicillin susceptible and resistant staphylococcus aureus isolates from a paediatric population in a university hospital of medellín, colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(8):980–985, 2011.
- [114] Johnston, D. A., Eberle, K. E., Sturtevant, J. E., und Palmer, G. E. Role for endosomal and vacuolar gtpases in candida albicans pathogenesis. *Infection and immunity*, 77(6):2343–2355, 2009.
- [115] Juhas, M., Eberl, L., und Tummler, B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of pseudomonas. *Environmental microbiology*, 7(4):459–471, 2005.
- [116] Juvonen, H., Oja, T., Määttänen, A., Sarfraz, J., Rosqvist, E., Riihimäki, T. A., Toivakka, M., Kulomaa, M., Vuorela, P., Fallarero, A., Peltonen, J., und Ihalainen, P. Protein and bacterial interactions with nanostructured polymer coatings. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 136:527–535, 2015.

- [117] Kahl, B., Herrmann, M., Everding, A. S., Koch, H. G., Becker, K., Harms, E., Proctor, R. A., und Peters, G. Persistent infection with small colony variant strains of staphylococcus aureus in patients with cystic fibrosis. *The Journal of infectious diseases*, 177(4):1023–1029, 1998.
- [118] Kalinski, P. Regulation of immune responses by prostaglandin e2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(1):21–28, 2012.
- [119] Kalo-Klein, A. und Witkin, S. S. Prostaglandin e2 enhances and gamma interferon inhibits germ tube formation in candida albicans. *Infection and immunity*, 58(1):260–262, 1989.
- [120] Kaplan, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. *The International journal of artificial organs*, 34(9):737–751, 2011.
- [121] Kaplan, J. B., Jabbouri, S., und Sadvovskaya, I. Extracellular dna-dependent biofilm formation by staphylococcus epidermidis rp62a in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics. *Research in microbiology*, 162(5):535–541, 2011.
- [122] Kawabata, A. Prostaglandin e2 and pain—an update. *Biol Pharm Bull*, 34(8):1170–1173, 2011.
- [123] Kennedy, M. J. und Volz, P. A. Ecology of candida albicans gut colonization: Inhibition of candida adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infection and immunity*, 49(3):654–663, 1985.
- [124] Kerr, J. R. Suppression of fungal growth exhibited by pseudomonas aeruginosa. *Journal of clinical microbiology*, 32(2):525–527, 1994.
- [125] Kerr, J. R., Taylor, G. W., Rutman, A., Høiby, N., Cole, P. J., und Wilson, R. Pseudomonas aeruginosa pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *Journal of clinical pathology*, 52(5):385–387, 1999.
- [126] Kerr, J. Inhibition of fungal growth by pseudomonas aeruginosa and pseudomonas cepacia isolated from patients with cystic fibrosis. *The Journal of infection*, 28:305–310, 1994.
- [127] Khanna, S., Madan, M., Vangoori, A., Banerjee, R., Thaimattam, R., Jafar Sadik Basaha, S K, Ramesh, M., Casturi, S. R., und Pal, M. Evaluation of glycolamide esters of indomethacin as potential cyclooxygenase-2 (cox-2) inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 14(14):4820–4833, 2006.
- [128] Kharazmi, A., Giwerzman, B., und Hoiby, N. Robbins device in biofilm research. *Methods in enzymology*, 310:207–215, 1999.
- [129] Kim, C., Milheirigo, C., Gardete, S., Holmes, M. A., Holden, Matt T. G., Lencastre, H. d., und Tomasz, A. Properties of a novel pbp2a protein homolog from staphylococcus aureus strain lga251 and its contribution to the beta-lactam-resistant phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 287(44):36854–36863, 2012.
- [130] Klotz, S. A., Chasin, B. S., Powell, B., Gaur, N. K., und Lipke, P. N. Polymicrobial bloodstream infections involving candida species: analysis of patients and review of the literature. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 59(4):401–406, 2007.

- [131] Konstan, M. W., Hoppel, C. L., Chai, B. L., und Davis, P. B. Ibuprofen in children with cystic fibrosis: pharmacokinetics and adverse effects. *The Journal of pediatrics*, 118(6):956–964, 1991.
- [132] Konstan, M. W., Byard, P. J., Hoppel, C. L., und Davis, P. B. Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis. *The New England journal of medicine*, 332(13), 1995.
- [133] Kragh, K. N., Hutchison, J. B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, Aled E L, Irie, Y., Jensen, P. Ø., Diggle, S. P., Allen, R. J., Gordon, V., und Bjarnsholt, T. Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *mBio*, 7(2):e00237–16, 2016.
- [134] Krause, R., Schwab, E., Bachhiesl, D., Daxböck, F., Wenisch, C., Krejs, G. J., und Reisinger, E. C. Role of candida in antibiotic-associated diarrhea. *The Journal of infectious diseases*, 184(8):1065–1069, 2001.
- [135] Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., und Ghannoum M. A. Comparison of biofilms formed by candida albicans and candida parapsilosis on bioprosthetic surfaces. *Infection and immunity*, 70(2):878–888, 2002.
- [136] Kuhn, D. M., George, T., Chandra, J., Mukherjee, P. K., und Ghannoum M. A. Anti-fungal susceptibility of candida biofilms: Unique efficacy of amphotericin b lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6):1773–1780, 2002.
- [137] Kuroda, M., Nagasaki, S., Ito, R., und Ohta, T. Sesquiterpene farnesol as a competitive inhibitor of lipase activity of staphylococcus aureus. *FEMS microbiology letters*, 273(1):28–34, 2007.
- [138] Kuroda, M., Nagasaki, S., und Ohta, T. Sesquiterpene farnesol inhibits recycling of the c55 lipid carrier of the murein monomer precursor contributing to increased susceptibility to beta-lactams in methicillin-resistant staphylococcus aureus. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 59(3):425–432, 2007.
- [139] Lands, L. C., Milner, R., Cantin, A. M., Manson, D., und Corey, M. High-dose ibuprofen in cystic fibrosis: Canadian safety and effectiveness trial. *The Journal of pediatrics*, 151(3):249–254, 2007.
- [140] Lands, L. C. und Stanojevic, S. Oral non-steroidal anti-inflammatory drug therapy for lung disease in cystic fibrosis. *The Cochrane database of systematic reviews*, 4:CD001505, 2016.
- [141] Langford, M. L., Hargarten, J. C., Patefield, K. D., Marta, E., Blankenship, J. R., Fanning, S., Nickerson, K. W., und Atkin, A. L. Candida albicans czf1 and efg1 coordinate the response to farnesol during quorum sensing, white-opaque thermal dimorphism, and cell death. *Eukaryotic cell*, 12(9):1281–1292, 2013.
- [142] Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., und Caldwell, D. E. Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of bacteriology*, 173(20):6558–6567, 1991.

- [143] Lee, J.-S., Bae, Y.-M., Lee, S.-Y., und Lee, S.-Y. Biofilm formation of staphylococcus aureus on various surfaces and their resistance to chlorine sanitizer. *Journal of food science*, 80(10):M2279–86, 2015.
- [144] Lessa Soares de Macedo, Jefferson und Santos, J. B. Bacterial and fungal colonization of burn wounds. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(5):535–539, 2005.
- [145] Levdikov, V. M., Blagova, E., Joseph, P., Sonenshein, A. L., und Wilkinson, A. J. The structure of cody, a gtp- and isoleucine-responsive regulator of stationary phase and virulence in gram-positive bacteria. *The Journal of biological chemistry*, 281(16):11366–11373, 2006.
- [146] Levy, H., Kalish, L. A., Cannon, C. L., García, K. C., Gerard, C., Goldmann, D., Pier, G. B., Weiss, S. T., und Colin, A. Predictors of mucoidpseudomonas colonization in cystic fibrosis patients. *Pediatric pulmonology*, 43(5):463–471, 2008.
- [147] Lewis, K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(4):999–1007, 2001.
- [148] Li, J., Turnidge, J., Milne, R., Nation, R. L., und Coulthard, K. In vitro pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(3):781–785, 2001.
- [149] Li, Z., Kosorok, M. R., Farrell, P. M., Laxova, A., West, S. E. H., Green, C. G., Collins, J., Rock, M. J., und Splaingard, M. L. Longitudinal development of mucoid pseudomonas aeruginosa infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *Journal of the American Medical Association*, 293(5):581–588, 2005.
- [150] Lim, C. S.-Y., Rosli, R., Seow, H. F., und Chong, P. P. Candida and invasive candidiasis: back to basics. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 31(1):21–31, 2012.
- [151] Lo, H.-J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., und Fink, G. R. Nonfilamentous c. albicans mutants are avirulent. *Cell*, 90(5):939–949, 1997.
- [152] Löffler, G., Petrides, P. E., und Heinrich, P. C. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 8 edition, 2007.
- [153] Lucidi, V., Ciabattoni, G., Bella, S., Barnes, P. J., und Montuschi, P. Exhaled 8-isoprostane and prostaglandin e(2) in patients with stable and unstable cystic fibrosis. *Free radical biology & medicine*, 45(6):913–919, 2008.
- [154] Lyczak, J. B., Cannon, C. L., und Pier, G. B. Establishment of pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, 2(9):1051–1060, 2000.
- [155] Ma, L., Jackson, K. D., Landry, R. M., Parsek, M. R., und Wozniak, D. J. Analysis of pseudomonas aeruginosa conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of bacteriology*, 188(23):8213–8221, 2006.

- [156] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., und Brock, T. D. *Mikrobiologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, 2001.
- [157] Mainz, J. G., Naehrlich, L., Schien, M., Kading, M., Schiller, I., Mayr, S., Schneider, G., Wiedemann, B., Wiehlmann, L., Cramer, N., Pfister, W., Kahl, B. C., Beck, J. F., und Tummler, B. Concordant genotype of upper and lower airways *p aeruginosa* and *s aureus* isolates in cystic fibrosis. *Thorax*, 64(6):535–540, 2009.
- [158] Majerczyk, C. D., Sadykov, M. R., Luong, T. T., Lee, C., Somerville, G. A., und Sonenshein, A. L. Staphylococcus aureus cody negatively regulates virulence gene expression. *Journal of bacteriology*, 190(7):2257–2265, 2008.
- [159] Manson, J. M., Rauch, M., und Gilmore, M. S. The commensal microbiology of the gastrointestinal tract. *Advances in experimental medicine and biology*, 635:15–28, 2008.
- [160] Mathee, K., Ciofu, O., Sternberg, C., Lindum, P. W., Campbell, J. I., Jensen, P., Johnsen, A. H., Givskov, M., Ohman, D. E., Molin, S., Høiby, N., und Kharazmi, A. Mucoïd conversion of pseudomonas aeruginosa by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology (Reading, England)*, 145(6):1349–1357, 1999.
- [161] McGuinness, W. A., Malachowa, N., und DeLeo, F. R. Vancomycin resistance in staphylococcus aureus. *The Yale journal of biology and medicine*, 90(2):269–281, 2017.
- [162] Merghni, A., Ben Nejma, M., Dallel, I., Tobji, S., Ben Amor, A., Janel, S., Lafont, F., Aouni, M., und Mastouri, M. High potential of adhesion to biotic and abiotic surfaces by opportunistic staphylococcus aureus strains isolated from orthodontic appliances. *Microbial pathogenesis*, 91:61–67, 2016.
- [163] Merritt, K. und Chang, C. C. Factors influencing bacterial adherence to biomaterials. *Journal of biomaterials applications*, 5(3):185–203, 1991.
- [164] Merritt, K., Gaiñd, A., und Anderson, J. M. Detection of bacterial adherence on biomedical polymers. *Journal of biomedical materials research*, 39(3):415–422, 1998.
- [165] Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., van Eldere, J., Glupczynski, Y., van Laethem, Y., Jacobs, F., Lebecque, P., Malfroot, A., Tulkens, P. M., und van Bambeke, F. Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13(6):560–578, 2007.
- [166] Mihai, M. M., Holban, A. M., Giurcaneanu, C., Popa, L. G., Buzea, M., Filipov, M., Lazar, V., Chifriuc, M. C., und Popa, M. I. Identification and phenotypic characterization of the most frequent bacterial etiologies in chronic skin ulcers. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 55(4):1401–1408, 2014.
- [167] Mogayzel, P. J., Naureckas, E. T., Robinson, K. A., Mueller, G., Hadjiliadis, D., Hoag, J. B., Lubsch, L., Hazle, L., Sadosa, K., und Marshall, B. Cystic fibrosis pulmonary guidelines. chronic medications for maintenance of lung health. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 187(7):680–689, 2013.

- [168] Molecular Probes Inc. Probes for yeast viability: Live/dead® yeast viability kit, online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/l7009>, zuletzt geprüft am 09.08.2017, 2001.
- [169] Mosel, D. D., Dumitru, R., Hornby, J. M., Atkin, A. L., und Nickerson, K. W. Farnesol concentrations required to block germ tube formation in candida albicans in the presence and absence of serum. *Applied and environmental microbiology*, 71(8):4938–4940, 2005.
- [170] Müller, F. M., Bend, J., und Rietschel, E. S3 - Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften: Lungenerkrankung bei Mukoviszidose, Online verfügbar unter <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/026-022.html>, zuletzt geprüft am 12.11.2017, 2013.
- [171] Nett, J. E., Sanchez, H., Cain, M. T., und Andes, D. R. Genetic basis of candida biofilm resistance due to drug-sequestering matrix glucan. *The Journal of infectious diseases*, 202(1):171–175, 2010.
- [172] Nobbs, A. H., Vickerman, M. M., und Jenkinson, H. F. Heterologous expression of candida albicans cell wall-associated adhesins in saccharomyces cerevisiae reveals differential specificities in adherence and biofilm formation and in binding oral streptococcus gordonii. *Eukaryotic cell*, 9(10):1622–1634, 2010.
- [173] Nobile, C. J., Schneider, H. A. N. J. E. S. D. C. F. S. G., Andes, D. R., und Mitchell, A. P. Complementary adhesin function in c. albicans biofilm formation. *Current biology : CB*, 18(14):1017–1024, 2008.
- [174] Noto, M. J., Burns, W. J., Beavers, W. N., und Skaar, E. P. Mechanisms of pyocyanin toxicity and genetic determinants of resistance instaphylococcus aureus. *Journal of bacteriology*, pages e00221–17, 2017.
- [175] Noverr, M. C. Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. *Infection and immunity*, 70(1):400–402, 2002.
- [176] Noverr, M. C., Phare, S. M., Toews, G. B., Coffey, M. J., und Huffnagle, G. B. Pathogenic yeasts cryptococcus neoformans and candida albicans produce immunomodulatory prostaglandins. *Infection and immunity*, 69(5):2957–2963, 2001.
- [177] Nseir, S. und Ader, F. Pseudomonas aeruginosa and candida albicans: Do they really need to stick together? *Critical care medicine*, 37(3):1164–1165, 2009.
- [178] Nseir, S., Jozefowicz, E., Cavestri, B., Sendid, B., Pompeo, C., Dewavrin, F., Favory, R., Roussel-Delvallez, M., und Durocher, A. Impact of antifungal treatment on candida–pseudomonas interaction: a preliminary retrospective case–control study. *Intensive care medicine*, 33(1):137–142, 2007.
- [179] Obermajer, N., Wong, J. L., Edwards, R. P., Odunsi, K., Moysich, K., und Kalinski, P. Pge(2)-driven induction and maintenance of cancer-associated myeloid-derived suppressor cells. *Immunological investigations*, 41(6-7):635–657, 2012.
- [180] Orido, T., Fujino, H., Hasegawa, Y., Toyomura, K., Kawashima, T., und Murayama, T. Indomethacin decreases arachidonic acid uptake in hca-7 human colon cancer cells. *Journal of pharmacological sciences*, 108(3):389–392, 2008.

- [181] Ovchinnikova, E. S., Krom, B. P., Busscher, H. J., und van der Mei, Henny C. Evaluation of adhesion forces of staphylococcus aureus along the length of candida albicans hyphae. *BMC microbiology*, 12:281–287, 2012.
- [182] Ovchinnikova, E. S., Krom, B. P., van der Mei, Henny C., und Busscher, H. J. Force microscopic and thermodynamic analysis of the adhesion between pseudomonas aeruginosa and candida albicans. *Soft Matter*, 8(24):2454–2461, 2012.
- [183] Palmer, G. E., Kelly, M. N., und Sturtevant, J. E. The candida albicans vacuole is required for differentiation and efficient macrophage killing. *Eukaryotic cell*, 4(10):1677–1686, 2005.
- [184] Palmer, G. E. Endosomal and ap-3-dependent vacuolar trafficking routes make additive contributions to candida albicans hyphal growth and pathogenesis. *Eukaryotic cell*, 9(11):1755–1765, 2010.
- [185] Paramonova, E., Krom, B. P., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., und Sharma, P. K. Hyphal content determines the compression strength of candida albicans biofilms. *Microbiology (Reading, England)*, 155(6):1997–2003, 2009.
- [186] Peeters, E., Nelis, H. J., und Coenye, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of microbiological methods*, 72:157–165, 2008.
- [187] Pereira, C. A., Romeiro, R. L., Costa, A. C. B. P., Machado, A. K. S., Junqueira, J. C., und Jorge, A. O. C. Susceptibility of candida albicans, staphylococcus aureus, and streptococcus mutans biofilms to photodynamic inactivation: an in vitro study. *Lasers in medical science*, 26(3):341–348, 2011.
- [188] Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., Scheper, M. A., Leid, J. G., Costerton, J. W., und Shirtliff, M. E. Microbial interactions and differential protein expression in staphylococcus aureus - candida albicans dual-species biofilms. *FEMS immunology and medical microbiology*, 59(3):493–503, 2010.
- [189] Peters, B. M. und Noverr, M. C. Candida albicans-staphylococcus aureus polymicrobial peritonitis modulates host innate immunity. *Infection and immunity*, 81(6):2178–2189, 2013.
- [190] Peters, B. M., Ovchinnikova, E. S., Krom, B. P., Schlecht, L. M., Zhou, H., Hoyer, L. L., Busscher, H. J., van der Mei, Henny C., Jabra-Rizk, M. A., und Shirtliff, M. E. Staphylococcus aureus adherence to candida albicans hyphae is mediated by the hyphal adhesin als3p. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 12):2975–2986, 2012.
- [191] Pier, G. B. Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide: A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 297(5):277–295, 2007.
- [192] Potera, C. Forging a link between biofilms and disease. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5409):1837–1839, 1999.
- [193] Ramage, G. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in candida albicans biofilms. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 49(6):973–980, 2002.

- [194] Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., und Lopez-Ribot, J. L. Inhibition of candida albicans biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and environmental microbiology*, 68(11):5459–5463, 2002.
- [195] Ramage, G., Vande Walle, K., Wickes, B. L., und Lopez-Ribot, J. L. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of candida albicans biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(9):2475–2479, 2001.
- [196] Ramage, G., VandeWalle, K., Bachmann, S. P., Wickes, B. L., und Lopez-Ribot, J. L. In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed candida albicans biofilms determined by time-kill studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(11):3634–3636, 2002.
- [197] Ramage, G., Wickes, B. L., und Lopez-Ribot, J. L. Biofilms of candida albicans and their associated resistance to antifungal agents. *American clinical laboratory*, 20(7):42–44, 2001.
- [198] Ratjen, F., Munck, A., Kho, P., und Angyalosi, G. Treatment of early pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis: the elite trial. *Thorax*, 65(4):286–291, 2010.
- [199] Ratjen, F., Comes, G., Paul, K., Posselt, H. G., Wagner, T. O. F., und Harms, K. Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of p. aeruginosa acquisition in patients with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*, 31:13–16, 2001.
- [200] Reboli, A. C., Rotstein, C., Pappas, P. G., Chapman, S. W., Kett, D. H., Kumar, D., Betts, R., Wible, M., Goldstein, B. P., Schranz, J., Krause, D. S., und Walsh, T. J. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *The New England journal of medicine*, 356:2472–2482, 2007.
- [201] Reeves, M. W., Pine, L., Feeley, J. C., und Wells, D. E. Presence of toxic shock toxin in toxic shock and other clinical strains of staphylococcus aureus. *Infection and immunity*, 46(2):590–597, 1984.
- [202] Reisin, I. L., Prat, A. G., Abraham, E. H., Amara, J. F., Gregory, R. J., Ausiello, D. A., und Cantiello, H. F. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual atp and chloride channel. *The Journal of biological chemistry*, 269(32):20584–20591, 1994.
- [203] Rendueles, O. und Ghigo, J.-M. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS microbiology reviews*, 36(5):972–989, 2012.
- [204] Renner, L. D. und Weibel, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS bulletin*, 36(5):347–355, 2011.
- [205] Reunes, S., Rombaut, V., Vogelaers, D., Brusselaers, N., Lizy, C., Cankurtaran, M., Labeau, S., Petrovic, M., und Blot, S. Risk factors and mortality for nosocomial bloodstream infections in elderly patients. *European journal of internal medicine*, 22(5):e39–e44, 2011.
- [206] Rigas, B., Korenberg, J. R., Merrill, W. W., und Levine, L. Prostaglandins e2 and e2 alpha are elevated in saliva of cystic fibrosis patients. *The American journal of gastroenterology*, 84(11):1408–1412, 1989.

- [207] Romero, D. und Kolter, R. Will biofilm disassembly agents make it to market? *Trends in microbiology*, 19(7):304–306, 2011.
- [208] Rosenstein, B. J. und Zeitlin, P. L. Cystic fibrosis. *Lancet*, 351(9098):277–282, 1998.
- [209] Roux, D., Gaudry, S., Dreyfuss, D., El-Benna, J., de Prost, N., Denamur, E., Saumon, G., und Ricard, J.-D. *Candida albicans* impairs macrophage function and facilitates *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in rat. *Critical care medicine*, 37(3):1062–1067, 2009.
- [210] Roux, D., Gaudry, S., Khoy-Ear, L., Aloulou, M., Phillips-Houlbracq, M., Bex, J., Skurnik, D., Denamur, E., Monteiro, R. C., Dreyfuss, D., und Ricard, J.-D. Airway fungal colonization compromises the immune system allowing bacterial pneumonia to prevail. *Critical care medicine*, 41(9):e191–9, 2013.
- [211] Sadikot, R. T., Zeng, H., Azim, A. C., Joo, M., Dey, S. K., Breyer, R. M., Peebles, R. S., Blackwell, T. S., und Christman, J. W. Bacterial clearance of *Pseudomonas aeruginosa* is enhanced by the inhibition of cox-2. *European journal of immunology*, 37:1001–1009, 2007.
- [212] Saiman, L. und Prince, A. *Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialogm1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 92(4):1875–1880, 1993.
- [213] Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A. H., Davies, D. G., und Gilbert, P. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of bacteriology*, 186(21):7312–7326, 2004.
- [214] Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C., und López-Ribot, J. L. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection. *Eukaryotic cell*, 2(5):1053–1060, 2003.
- [215] Schwartbeck, B., Birtel, J., Treffon, J., Langhanki, L., Mellmann, A., Kale, D., Kahl, J., Hirschhausen, N., Neumann, C., Lee, J. C., Götz, F., Rohde, H., Henke, H., Küster, P., Peters, G., und Kahl, B. C. Dynamic in vivo mutations within the *ica* operon during persistence of *Staphylococcus aureus* in the airways of cystic fibrosis patients. *PLoS pathogens*, 12(11):e1006024, 2016.
- [216] Smith, E. E., Buckley, D. G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L. R., D’Argenio, D. A., Miller, S. I., Ramsey, B. W., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Burns, J. L., Kaul, R., und Olson, M. V. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(22):8487–8492, 2006.
- [217] Southall, M. D. und Vasko, M. R. Prostaglandin receptor subtypes, ep3c and ep4, mediate the prostaglandin e2-induced camp production and sensitization of sensory neurons. *The Journal of biological chemistry*, 276(19):16083–16091, 2001.
- [218] Staib, F., Grosse, G., und Mishra, S. K. *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection (animal experiments). *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, 234(4):450–461, 1976.

- [219] Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B., und Svabic-Vlahovic, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40:175–179, 2000.
- [220] Stevens, M. G. und Olsen, S. C. Comparative analysis of using mtt and xtt in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Journal of immunological methods*, 157(1-2):225–231, 1993.
- [221] Stewart-Tull, D. E. S. und Armstrong, A. V. The effect of 1-hydroxphenazine and pyocyanin from *pseudomonas aeruginosa* on mammalian cell respiration. *Journal of medical microbiology*, 5:67–73, 1972.
- [222] Stoodley, P., Beer, D. d., und Lewandowski, Z. Liquid flow in biofilm systems. *Applied and environmental microbiology*, 60(8):2711–2716, 1994.
- [223] Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G.-D., Kaufmann, S. H. E., und Schulz, T. F. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Verlag Berlin-Heidelberg, Berlin, 7 edition, 2012.
- [224] Takeuchi, K., Kato, S., und Amagase, K. Prostaglandin ep receptors involved in modulating gastrointestinal mucosal integrity. *Journal of pharmacological sciences*, 114(3):248–261, 2010.
- [225] Tammer, I., Reuner, J., Hartig, R., und Geginat, G. Induction of candida albicans biofilm formation on silver-coated vascular grafts. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 69(5):1282–1285, 2014.
- [226] Tan, M.-W., Mahajan-Miklos, S., und Ausubel, F. M. Killing of caenorhabditis elegans by pseudomonas aeruginosa used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96:715–720, 1999.
- [227] Thein, Z. M., Samaranayake, Y. H., und Samaranayake, L. P. Effect of oral bacteria on growth and survival of candida albicans biofilms. *Archives of oral biology*, 51(8):672–680, 2006.
- [228] Thomas, W. E., Nilsson, L. M., Forero, M., Sokurenko, E. V., und Vogel, V. Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated escherichia coli. *Molecular microbiology*, 53(5):1545–1557, 2004.
- [229] Tramper-Stranders, G. A., van der Ent, C. K., Molin, S., Yang, L., Hansen, S. K., Rau, M. H., Ciofu, O., Johansen, H. K., und Wolfs, T. F. W. Initial pseudomonas aeruginosa infection in patients with cystic fibrosis: characteristics of eradicated and persistent isolates. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(6):567–574, 2012.
- [230] Tripathie, R. K. und Gottlieb, D. Mechanism of action of the antifungal antibiotic pyrrolnitrin. *Journal of bacteriology*, 100(1):310–318, 1969.
- [231] Ulrich, M., Bastian, M., Cramton, S. E., Ziegler, K., Pragman, A. A., Bragonzi, A., Memmi, G., Wolz, C., Schlievert, P. M., Cheung, A., und Döring, G. The staphylococcal respiratory response regulator srrab induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting staphylococcus aureus from neutrophil

- killing under anaerobic growth conditions. *Molecular microbiology*, 65(5):1276–1287, 2007.
- [232] Uppuluri, P., Chaturvedi, A. K., Srinivasan, A., Banerjee, M., Ramasubramaniam, A. K., Köhler, J. R., Kadosh, D., López-Ribot, J. L., und Doering, T. L. Dispersion as an important step in the candida albicans biofilm developmental cycle. *PLoS pathogens*, 6(3):1–13, 2010.
- [233] Valenza, G., Tappe, D., Turnwald, D., Frosch, M., König, C., Hebestreit, H., und Abele-Horn, M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 7(2):123–127, 2008.
- [234] Vincent, J.-L., Rello, J., und Marshall, J. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Journal of the American Medical Association*, 302(21):2323–2329, 2009.
- [235] Wächtler, B., Citiulo, F., Jablonowski, N., Förster, S., Dalle, F., Schaller, M., Wilson, D., und Hube, B. Candida albicans-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. *PLoS one*, 7(5):e36952, 2012.
- [236] Wächtler, B., Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F., und Hube, B. From attachment to damage: defined genes of candida albicans mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS one*, 6(2):e17046, 2011.
- [237] Wang, Y. und Xu, X.-L. Bacterial peptidoglycan-derived molecules activate candida albicans hyphal growth. *Communicative & integrative biology*, 1(2):137–139, 2008.
- [238] Weiss, C. A., Statz, C. L., Dahms, R. A., Remucal, M. J., Dunn, D. L., und Beilman, G. J. Six years of surgical wound infection surveillance at a tertiary care center: review of the microbiologic and epidemiological aspects of 20,007 wounds. *Archives of surgery (Chicago, Ill. : 1960)*, 134(10):1041–1048, 1999.
- [239] Wilson, R., Pitt, T., Taylor, G., Watson, D., MacDermot, J., Sykes, D., Roberts, D., und Cole, P. Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by pseudomonas aeruginosa inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro. *The Journal of clinical investigation*, 79:221–229, 1987.
- [240] Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K. C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., Botzenhart, K., Yankaskas, J. R., Randell, S., Boucher, R. C., und Döring, G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *The Journal of clinical investigation*, 109(3):317–325, 2002.
- [241] Wu, H., Moser, C., Wang, H.-Z., Høiby, N., und Song, Z.-J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International journal of oral science*, 7(1):1–7, 2015.
- [242] Xavier, K. B. und Bassler, B. L. Interference with ai-2-mediated bacterial cell-cell communication. *Nature*, 437(7059):750–753, 2005.

- [243] Xu, X.-L., Lee, R. T. H., Fang, H.-M., Wang, Y.-M., Li, R., Zou, H., Zhu, Y., und Wang, Y. Bacterial peptidoglycan triggers candida albicans hyphal growth by directly activating the adenylyl cyclase *cyr1p*. *Cell host & microbe*, 4(1):28–39, 2008.
- [244] Yu, H., Burton, B., Huang, C.-J., Worley, J., Cao, D., Johnson, J. P., Urrutia, A., Joubran, J., Seepersaud, S., Sussky, K., Hoffman, B. J., und van Goor, F. Ivacaftor potentiation of multiple *cftr* channels with gating mutations. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*, 11(3):237–245, 2012.
- [245] Zaslona, Z., Serezani, C. H., Okunishi, K., Aronoff, D. M., und Peters-Golden, M. Prostaglandin e2 restrains macrophage maturation via e prostanoid receptor. *Blood*, 119(10):2358–2366, 2012.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die durch Ihre Unterstützung zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt **Frau Oberärztin PD Dr. med. Ina Tammer** für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die wissenschaftliche Begleitung. Ihre konstruktiven und kompetenten Kommentare sowie Denkanstöße haben maßgeblich zum Entstehen der Arbeit beigetragen.

Weiterhin insbesondere danke ich **Frau Kristin Cebulski** für die zahlreichen praktischen Ratschläge bei der experimentellen Arbeit sowie die unkomplizierte Hilfestellung bei auftretenden Fragen und Problemen.

Auch möchte ich **Herrn Dr. rer. nat. Roland Hartig** für die ausdauernde Bereitschaft danken, mir seine technische Expertise für die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie sowie die vielen Tipps im Umgang mit Softwareproblemen bereit zu stellen.

Ganz besonders möchte ich meiner Verlobten **Alexandra Schreiber** für ihr liebevolles Verständnis und die viele Geduld danken. Sie hat mich zu jedem Zeitpunkt unterstützt, mir den Rücken gestärkt und mich auch in angespannter und gestresster Laune ertragen. Zusätzlich gilt mein Dank auch ihren Eltern, die mir stets den Ansporn gegeben haben, diese Arbeit fertig zu stellen.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meiner Familie, insbesondere **meinen Eltern**, die mir das Studium erst ermöglichten und mir immer zur Seite standen. Ihre steten Ermunterungen und ihre vorbehaltlose Unterstützung in jeder Situation haben wesentlich zum Zustandekommen der Arbeit beigetragen.

## **Ehrenerklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

WECHSELWIRKUNGEN VON PSEUDOMONAS AERUGINOSA, STAPHYLOCOCCUS AUREUS UND  
CANDIDA ALBICANS IM POLYMIKROBIELLEN BIOFILM

am **Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene**

mit Unterstützung durch **Oberärztin PD Dr. med. Ina Tammer**

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 28. Juni 2018

Jan Krause

## **Bildungsweg**

### **Schulbildung**

08/1994 - 07/1998	<b>Grundschule Amesdorf</b>
08/1998 - 07/2000	<b>Sekundarschule-Wippertal Giersleben</b>
08/2000 - 05/2007	<b>Dr.-Frank-Gymnasium Staffurt</b> Abschluss: Abitur

### **Hochschulbildung**

10/2007 - 11/2013	<b>Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg</b> Studium der Humanmedizin Abschluss: Staatsexamen
11/2013 - 03/2014	<b>Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg</b> Immatrikulation als Promotionsstudent

### **Berufliche Bildung**

seit 01/2014	<b>AMEOS Klinikum Aschersleben</b> <b>Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie</b> Weiterbildung zum Facharzt für Gefäßchirurgie
--------------	--

# A. Anhang

## A.1. Abbildungen

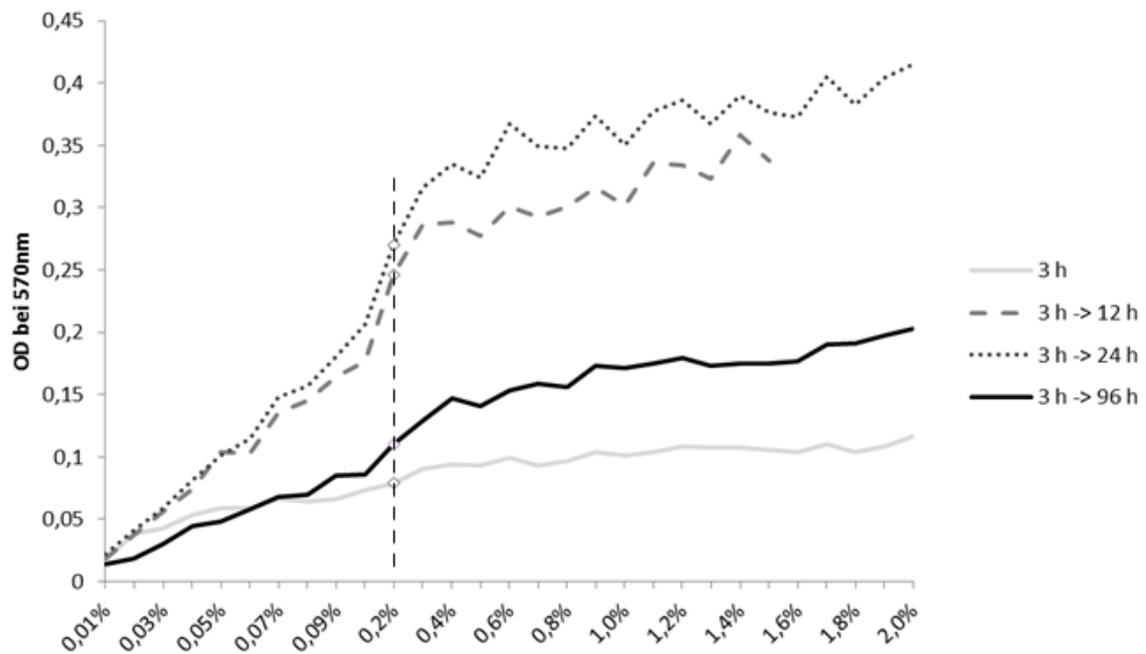


Abbildung A.1.: Kristallviolett-Konzentrationsermittlung: Dargestellt ist die optische Dichte bei unterschiedlichen Kristallviolettkonzentrationen am Beispiel eines polymikrobiellen Biofilms nach 3 h Adhäsion und nachfolgender 0-, 12-, 24- und 96-stündiger Biofilmbildung. Die gestrichelte Senkrechte markiert den Umschlagpunkt der Graphen.

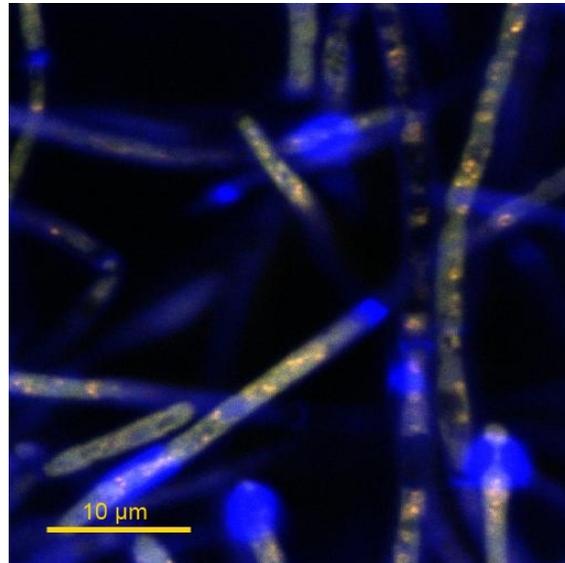


Abbildung A.2.: Calcofluor-white - FUN-1 - Doppelfärbung: Orange-rötliche Einschlusskörperchen sind beweisend für einen aktiven Zellmetabolismus der durch die blau eingefärbte Zellwand gekennzeichneten *C. albicans* - Zellen (monomikrobieller Biofilm nach 12 h).

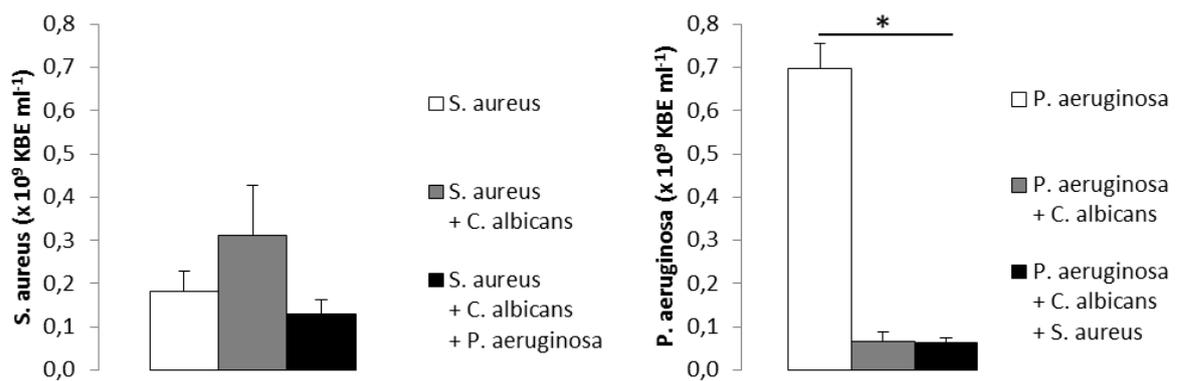


Abbildung A.3.: Adhäsion: Zu sehen sind die KBE/ml von *S. aureus* (links) und *P. aeruginosa* (rechts) nach 3 h Adhäsion in den verschiedenen Biofilmkombinationen.

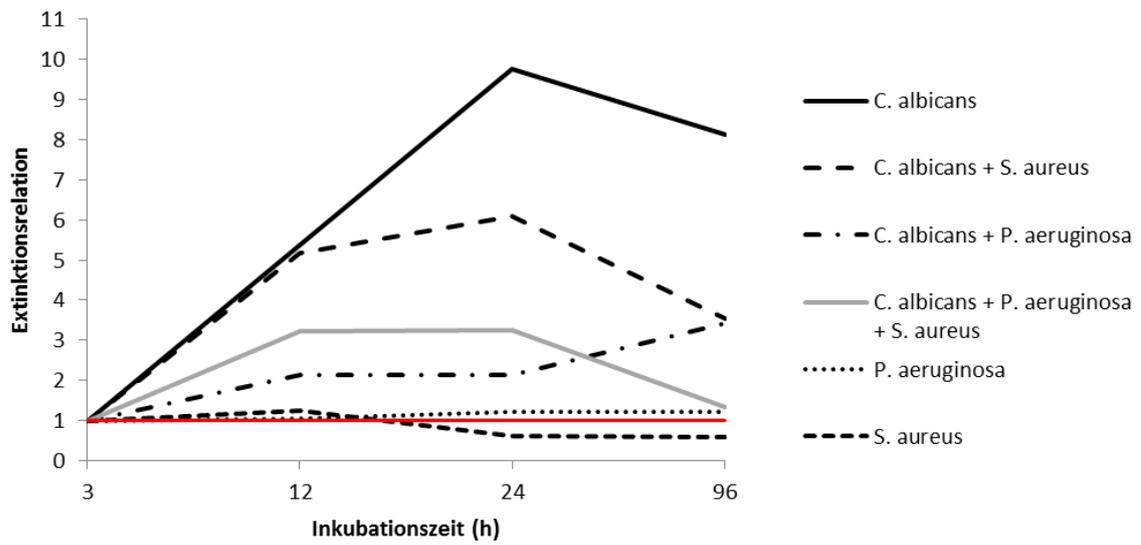


Abbildung A.4.: Kinetik der Extinktionsveränderung; relative Entwicklung der Messwerte zur Veranschaulichung der Biofilmentwicklung nach 12 h, 24 h und 96 h. Der normierte Ausgangswert nach 3 h wird durch die rote Linie markiert.

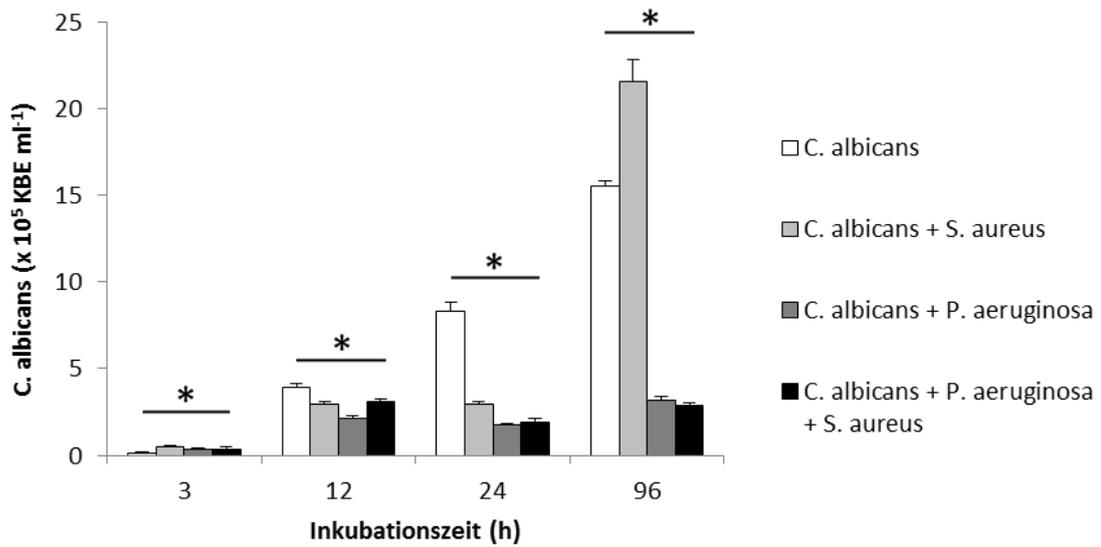


Abbildung A.5.: Biofilm-KBE: Zu sehen sind die KBE/ml von *C. albicans* nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

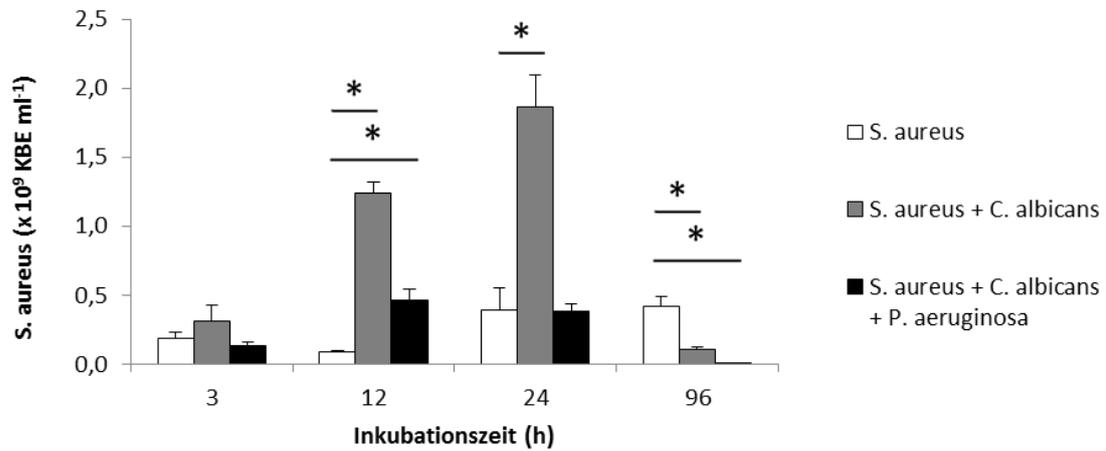


Abbildung A.6.: Biofilm-KBE: Zu sehen sind die KBE/ml von *S. aureus* nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

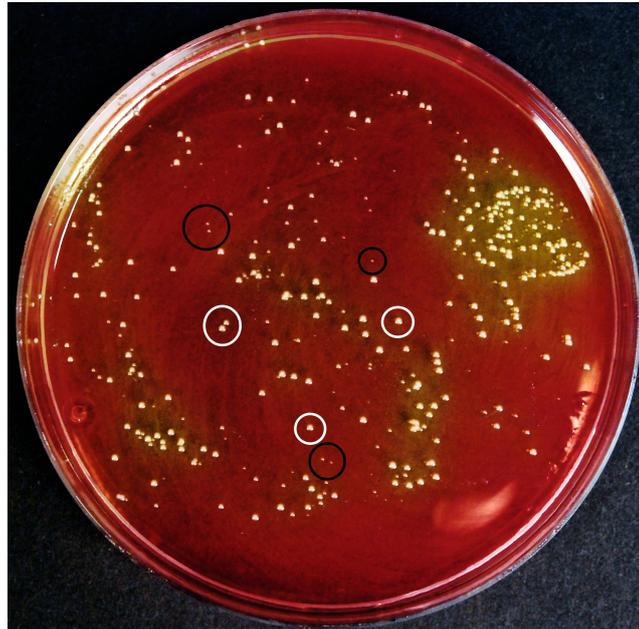


Abbildung A.7.: SCV auf Chapman-Agar: Bei den kleinen Kolonien (schwarze Markierungen) handelt es sich um small-colony-variants (SCV) von *S. aureus* nach 24 h Inkubation auf Chapman-Agar. Zum Vergleich sind normal große Kolonien weiß markiert. (Aufnahme eines 96 h gewachsenen *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilms ohne Mediumwechsel nach 1000-facher Verdünnung)

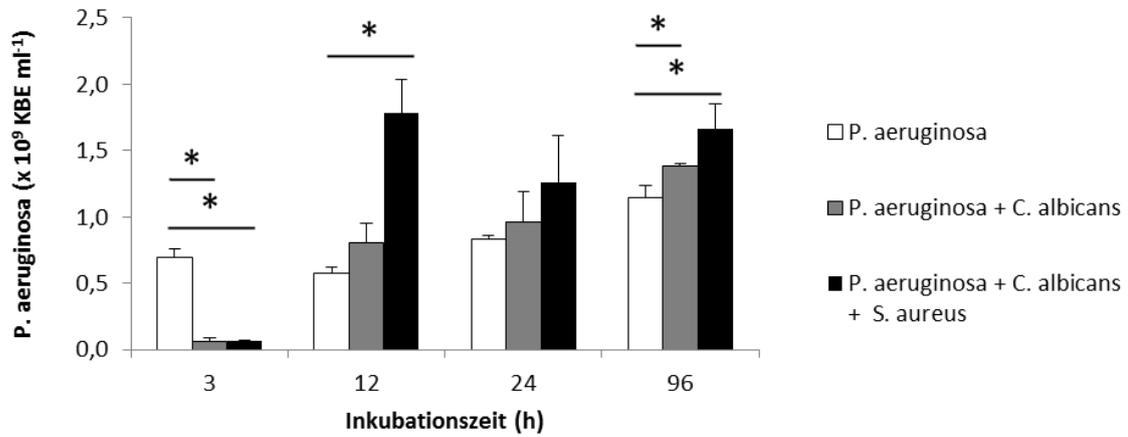


Abbildung A.8.: Biofilm-KBE: Zu sehen sind die KBE/ml von *P. aeruginosa* in verschiedenen Biofilmen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

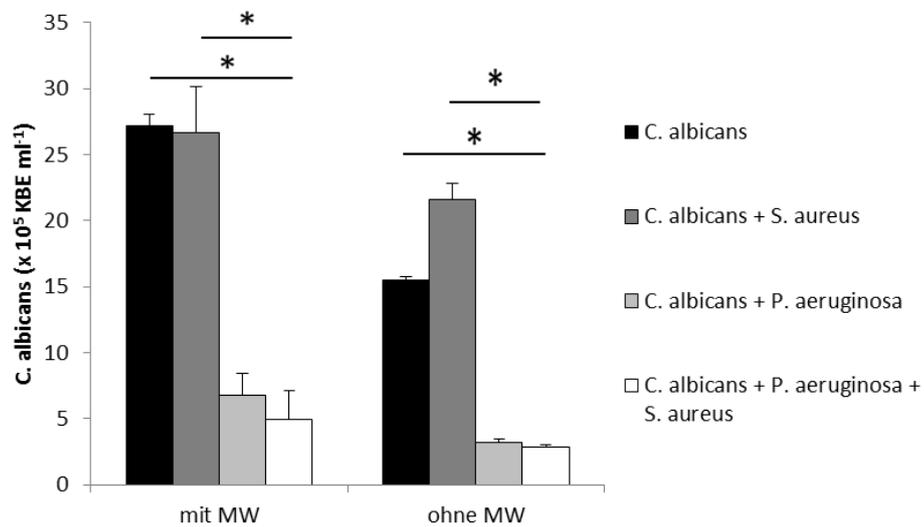


Abbildung A.9.: Biofilm-KBE mit Mediumwechsel: Dargestellt sind die KBE/ml von *C. albicans* in den verschiedenen Biofilmkombinationen nach 96 h Inkubationszeit mit und ohne Mediumwechsel nach jeweils 24 h.

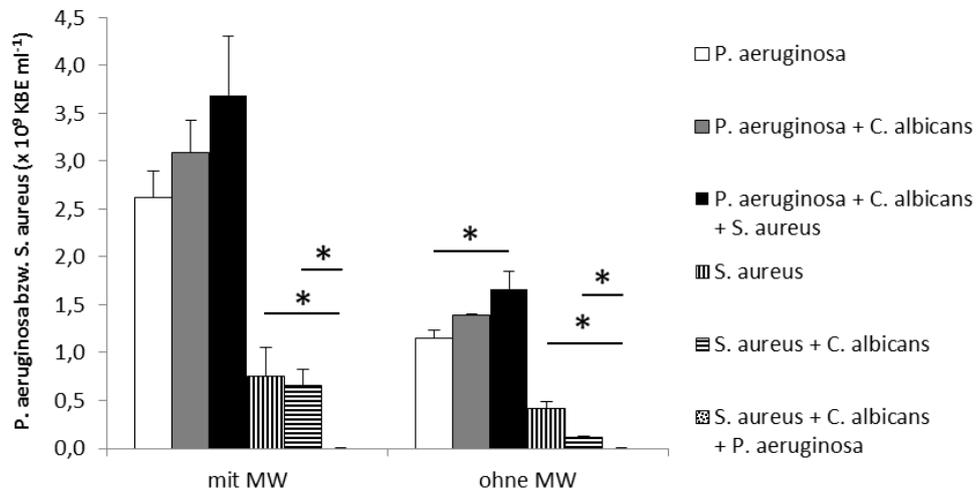


Abbildung A.10.: Biofilm-KBE mit Mediumwechsel: Dargestellt sind die KBE/ml von *S. aureus* und *P. aeruginosa* in verschiedenen Biofilmkombinationen nach 96 h Inkubationszeit mit Mediumwechsel nach jeweils 24 h.



Abbildung A.11.: Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie: Sagittale Rekonstruktion des *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilms nach 3 h Inkubationszeit.

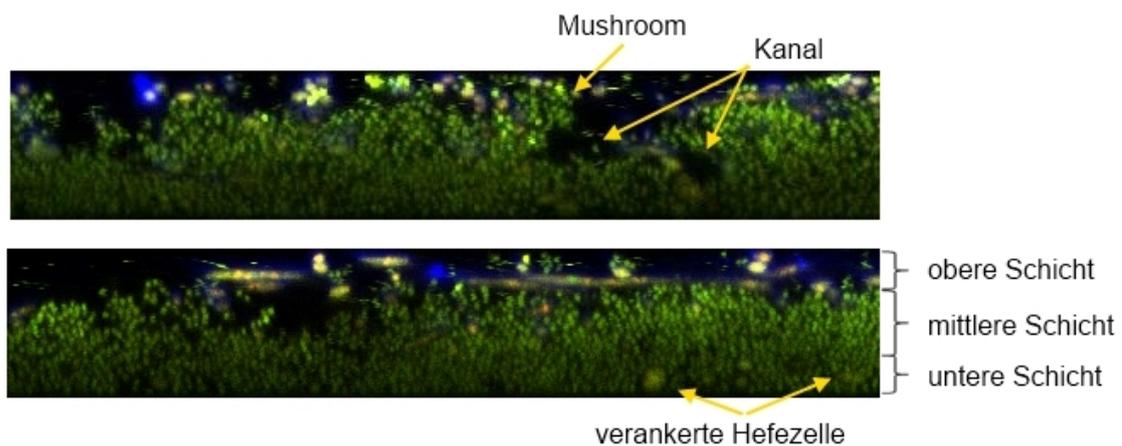


Abbildung A.12.: Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie: Gezeigt ist eine sagittale Rekonstruktion des *C. albicans* - *S. aureus* - Biofilms nach 12 h Inkubationszeit. Im Bild oben sind die Kanäle sowie eine pilzartige Formation des Biofilms zu erkennen. Im unteren Bild ist die typische Dreischichtung dargestellt.

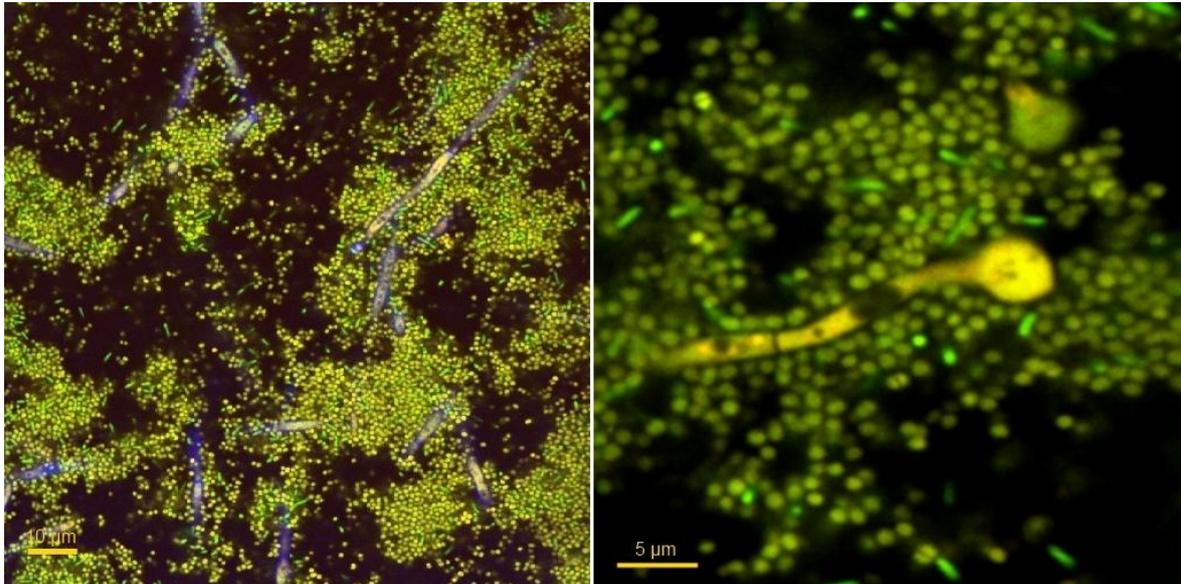


Abbildung A.13.: Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie: Dargestellt ist eine Aufnahme des polymikrobiellen Biofilms nach 12 h Inkubationszeit im mittleren Drittel des Biofilms (links). Exemplarisch vergrößerte Darstellung einer *C. albicans* - Hyphe in Bodennähe mit anhaftender massiver Präsenz der Staphylokokken und dazwischen wenigen Pseudomonaden (rechts).

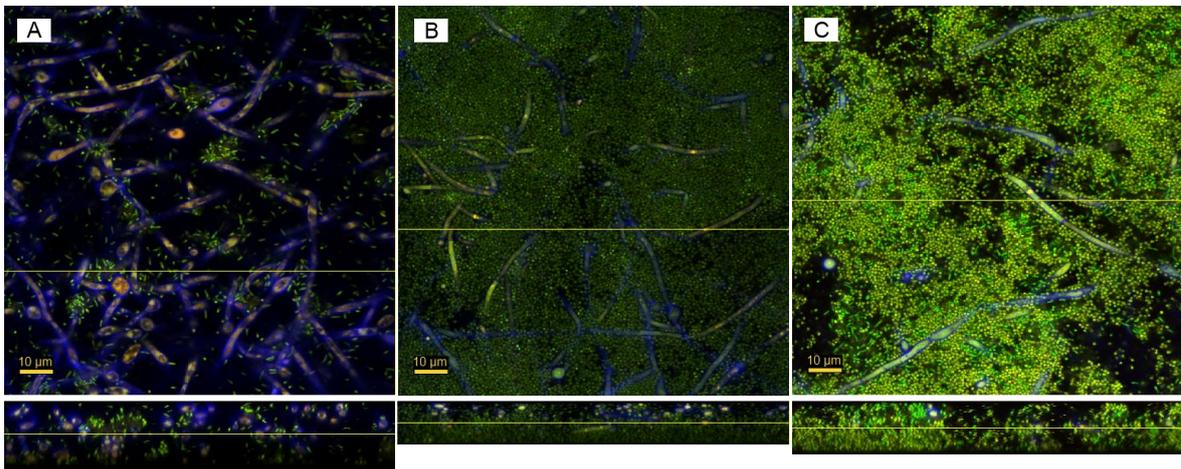


Abbildung A.14.: Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie: Dargestellt sind Aufnahmen der dualen Biofilme von *C. albicans* mit *P. aeruginosa* (A) bzw. mit *S. aureus* (B) sowie der polymikrobielle Biofilm (C) nach 24 h Inkubationszeit. Beschriftete Bilder: Horizontalschnitte; jeweils darunter der im Bild markierte Sagittalschnitt mit Markierung der Höhe des Horizontalschnittes.



Abbildung A.15.: Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie: Gezeigt ist ein sagittaler Schnitt des polymikrobiellen Biofilms nach 24 h Inkubationszeit. Zwischen den dominierenden Staphylokokken existieren Canyon-artige Strukturen bis in die untersten Schichten des Biofilms.

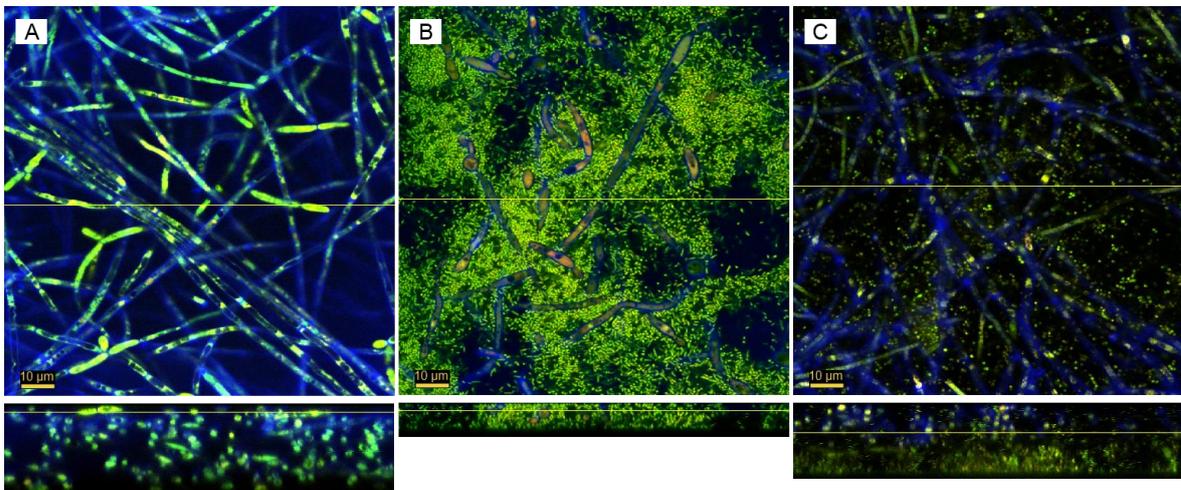


Abbildung A.16.: Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie: Dargestellt sind Aufnahmen des monomikrobiellen *C. albicans* - Biofilms (A) sowie der dualen Biofilme von *C. albicans* mit *P. aeruginosa* (B) bzw. *S. aureus* (C) nach 96 h Inkubationszeit. Beschriftete Bilder: Horizontalschnitt; jeweils darunter der im Bild markierte Sagittalschnitt mit Markierung der Höhe des Horizontalschnittes.

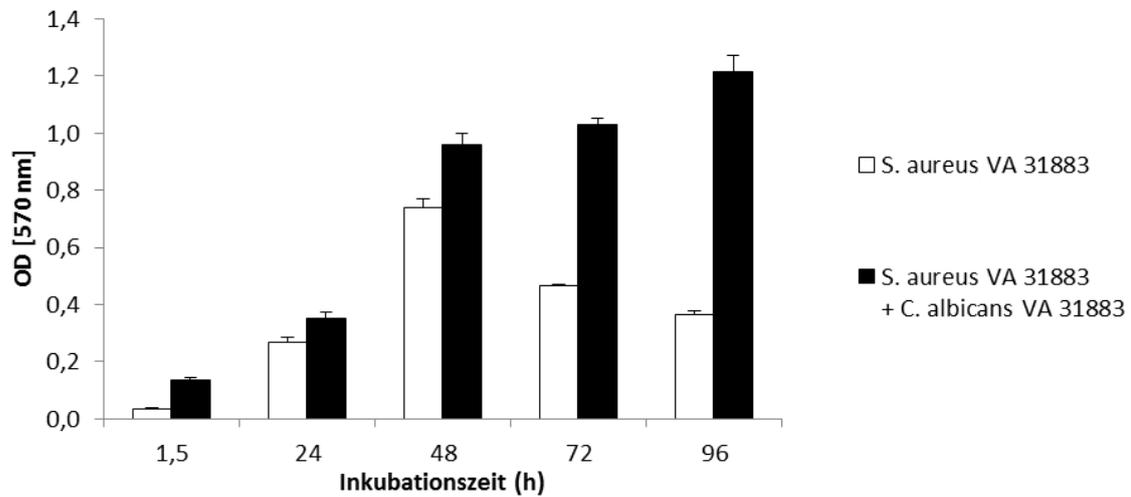


Abbildung A.17.: Kristallviolett-Assay: Biofilmdicke der jeweiligen Biofilmkombinationen nach 1,5 h sowie nach 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h anhand der mittleren optischen Dichte gemessen bei 570 nm.

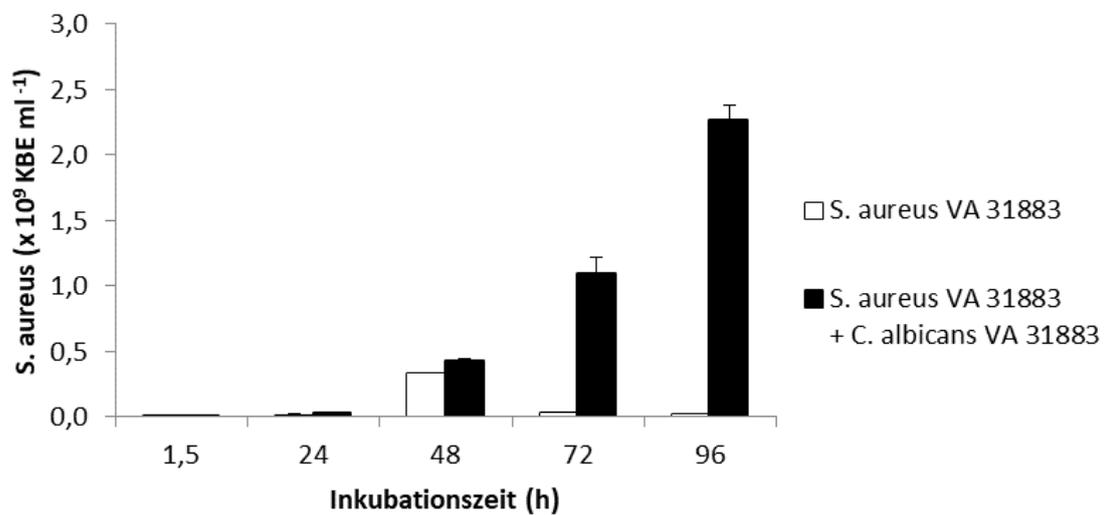


Abbildung A.18.: Biofilm-KBE von *S. aureus*: Zu sehen sind die KBE-Zahlen von *S. aureus* (VA 31883) im monomikrobiellen Biofilm im Vergleich zum dualen Biofilm mit *C. albicans* (VA 31883).

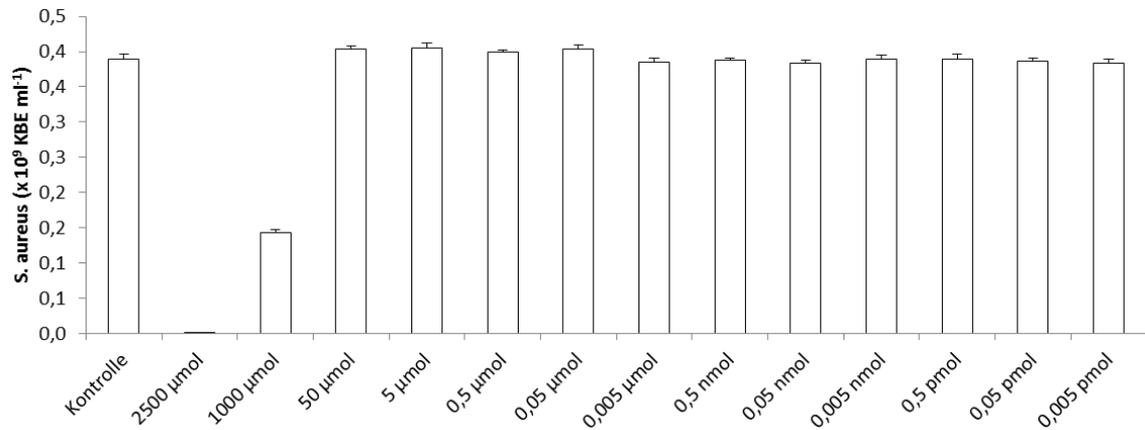


Abbildung A.19.: Wirkung von Tyrosol: Zu sehen sind die Auswirkungen von Tyrosol in verschiedenen Konzentrationen auf 24 h gewachsene *S. aureus* - Kulturen (VA 19552) anhand der KBE-Anzahl.

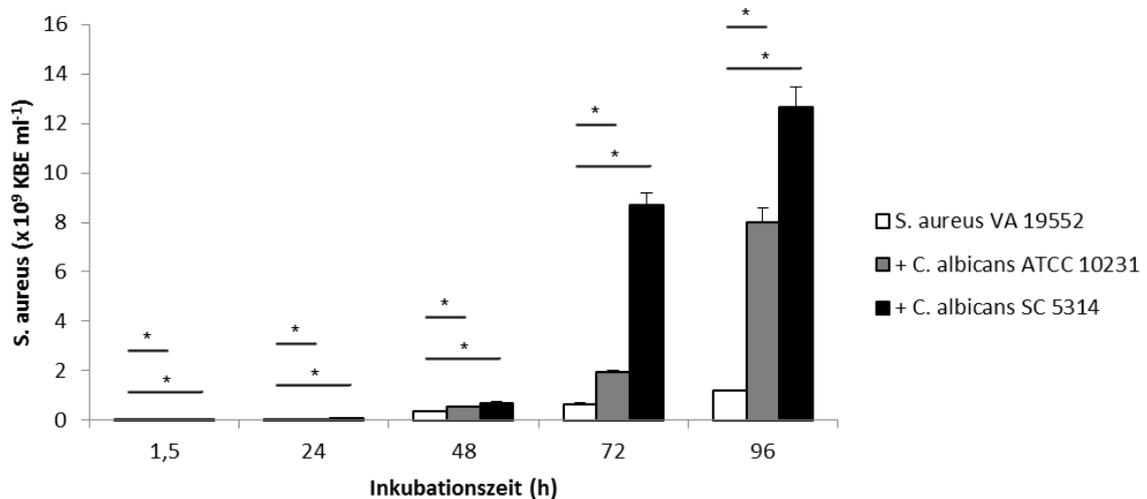


Abbildung A.20.: Biofilm-KBE von *S. aureus*: Zu sehen sind die KBE-Zahlen von *S. aureus* (VA 19552) im monomikrobiellen Biofilm im Vergleich zum dualen Biofilm mit *C. albicans* ATCC 10231 bzw. SC 5314. Die Sterne indizieren einen hoch signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) der gezeigten gemittelten KBE mit einfacher Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung im Vergleich zur Kontrolle.

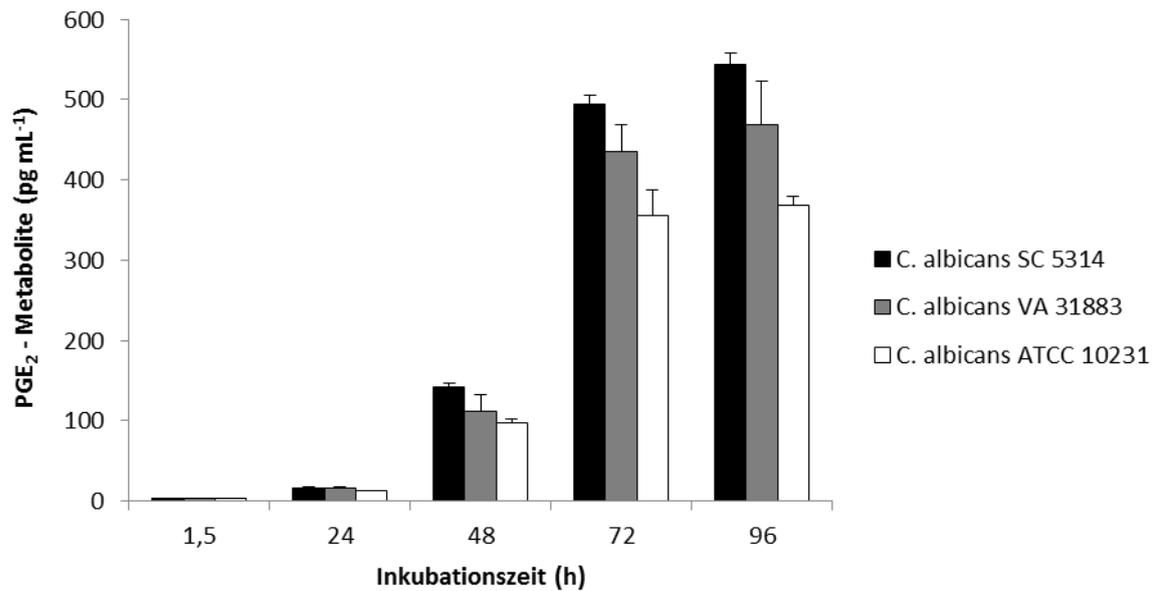


Abbildung A.21.: PGE<sub>2</sub>-Metabolite-Konzentration: Gezeigt sind die Konzentrationen der PGE<sub>2</sub>-Metabolite in Überständen von *C. albicans* SC 5314, VA 31883 und ATCC 10231 nach den angegebenen Inkubationszeiten. Die Experimente wurden doppelt durchgeführt mit jeweils drei Wiederholungen.

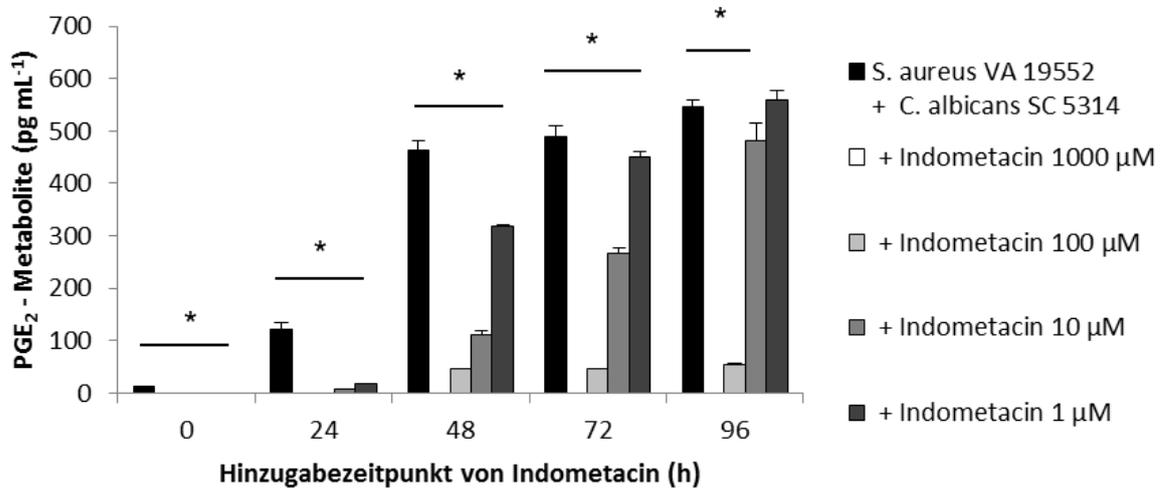


Abbildung A.22.: Indometacin in verschiedenen Konzentrationen wurde zum dualen Biofilm bestehend aus *S. aureus* VA 19552 und *C. albicans* SC 5314 zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h - 96 h) hinzugegeben und nach weiterer Inkubation für 24 h die PGE<sub>2</sub>-Metabolite-Konzentrationen im Überstand mittels ELISA gemessen. Die Sterne indizieren einen hoch signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) aus zwei unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung im Vergleich zur Kontrolle.

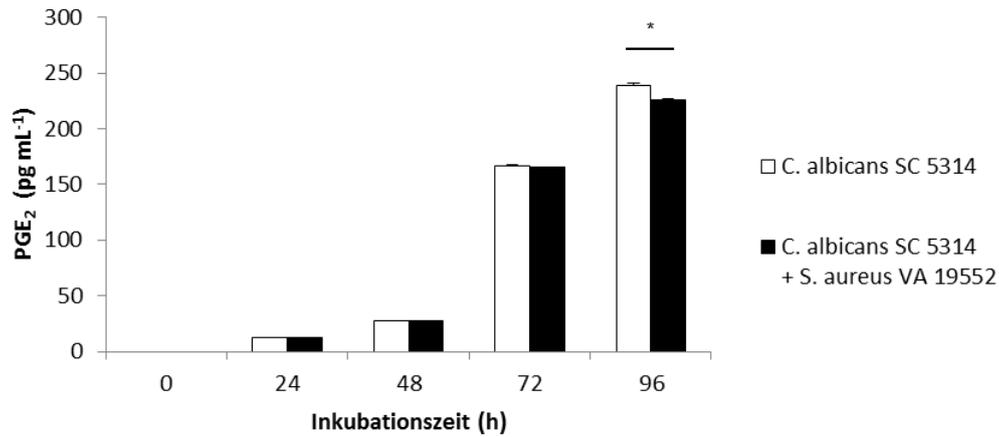


Abbildung A.23.: PGE<sub>2</sub>-Produktion: Gezeigt sind die Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> nach verschiedenen Inkubationszeiten im *C. albicans* - Biofilm SC 5314 im Vergleich zum dualen Biofilm mit *S. aureus* VA 19552. Der Stern indiziert einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den gemessenen PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen.

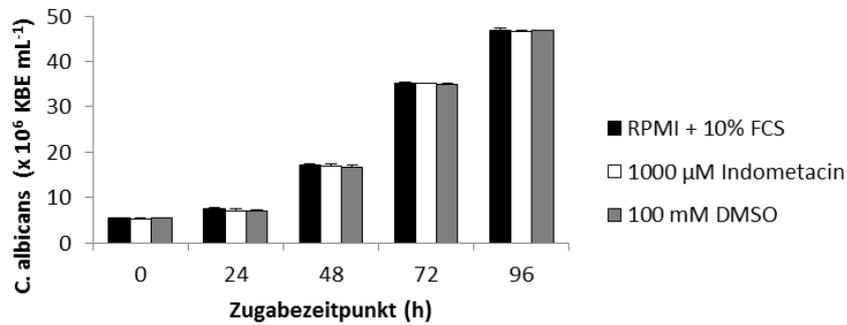


Abbildung A.24.: Indometacin und DMSO beeinflussen das Wachstum von *C. albicans* SC 5314 nicht.

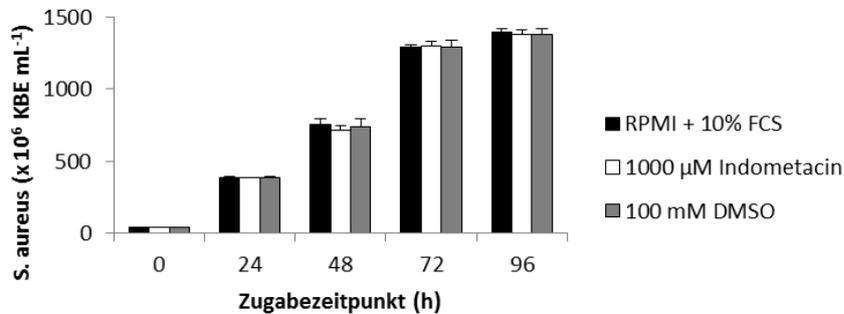


Abbildung A.25.: Indometacin und DMSO beeinflussen das Wachstum von *S. aureus* VA 19552 nicht.